

ABSTRACT

Background: Atherosclerosis and its complication such as coronary artery disease (CAD) are the leading cause of morbidity and mortality of people in the world. Atherosclerosis is related with dyslipidemia and inflammatory response on the endothelial causes endothelial dysfunction is an early marker for atherosclerosis. Characteristics of endothelial dysfunction are decrease in expression and activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and further decrease in the production of nitric oxide (NO). The development of atherosclerosis can actually be prevented and modified, however the pathogenesis of atherosclerosis has not been revealed so that prevention effort as well as treatment of this disease is still controversial, and research associated with vitamin E decreased the incidence of atherosclerosis is not yet give satisfactory results.

Objectives: The present study aimed to explore the effect of atherogenic diet, lipopolysaccharide (LPS) endotoxin and vitamin E against the incidence of atherosclerosis by measuring the levels of blood lipids, histopathological coronary artery wall examination, analysis of the expression and activation of the intracellular eNOS, production of blood NO.

Methods: Experimental studies (Post-test control group design) on period of 12 weeks of treatment. Male adult assigned to four groups (n=44), 10 weeks old, body of weight 150-200 grams were randoms. After a one week on period of adaptation, group 1 (n=12) was fed with normal rat chow (standard diet), group 2 (n=12) was fed with atherogenic diet and injection LPS intra peritoneal with doses of 50 µg on the end of week 4 and 8. The treatment group 3 (n=12) like group 2 and this group were supplemented with vitamin E (α-Tocopherol) orally (5 IU daily). Group 4 (n=8) like group 2 and this group were supplemented with vitamin E (α-Tocopherol) orally (5 IU daily) on the end of week 6. Samples (blood and heart tissue) were taken on the end of week 4,8, and 12 for analysis of the levels of blood lipids with enzymatic test, histopathological coronary artery wall examination with hematoxylin and eosin, analysis of the expression and activation of the intracellular eNOS with immunohistochemical analysis, and the levels of blood NO with spectrophotometry. Data presented as means ± SD, one way Anova or Kruskal – Wallis test followed by Tukey HSD test were used to evaluate significant differences from the control and each group.

Results: Result showed that feeding of rats with atherogenic diet for 4 week significantly increased the levels of blood total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL), $P < 0.05$ (hypercholesterolemic rats), where relationship between TC and LDL of 92,1%,

TC and HDL of 56 %. Increased the levels of LDL further modification/oxidation of LDL as key event in initiation and development atherosclerosis seen from a decrease in the expression and activation of the intracellular eNOS, and more vacuolation formed on the walls of blood vessels. Feeding of rats with atherogenic diet and 4 weeks after injection of LPS increased the levels of blood TC, LDL, HDL and TG (hyperlipidemic-bacteremic rats), however 8 weeks after injection of LPS showed decreased the levels of blood TC, HDL, LDL compared with happened without vitamin E (α -Tocopherol) and TG levels showed a significant increased in blood (hyperlipidemic), $P < 0,05$. Effect of feeding rats with atherogenic diet for 4 week resulting vacuolation on tunica intima/subendothelial dan tunica media coronary artery wall more than happens in rats control, decreased expression and activation of the intracellular eNOS are meaningless, however levels of blood NO more or less the same level as that occur in rats control. The injection effect of LPS after more than 4 weeks in rats with atherogenic diet showed a decreased in vacuolation, levels of blood NO, however increased expression and activation of the intracellular eNOS are meaningless. Administration of vitamin E for rats with atherogenic diet, and injection of LPS after more than 4 weeks showed increased vacuolation, decreased expression or activation of eNOS, and increased levels of blood NO are meaningless.

Conclusions: Effect of atherogenic diet against the incidence of atherosclerosis associated with hypercholesterolemia and increased the levels of LDL as key event in initiation and development atherosclerosis seen from a decrease in the expression and activation of the intracellular eNOS, and more vacuolation formed on the walls of blood vessels. The injection effect of LPS after more than 4 weeks in rats with atherogenic diet not showed to initiation of the atherogenic process, however effect of vitamin E showed the anti-inflammatory action to minimize LPS effects (non-antioxidant mechanisms of vitamin E).

Key words: Atherosclerosis, Endothelial, Lipoprotein, Nitric oxide, Tocopherol, Sprague Dawley, Vitamin E.

ABSTRAK

Latar belakang: Aterosklerosis dan komplikasinya seperti *coronary artery disease* (CAD) adalah penyebab terbesar morbiditas dan mortalitas manusia di dunia. Kejadian aterosklerosis dihubungkan dengan dislipidemia dan respon peradangan pada endotel yang menyebabkan disfungsi endotel yang ditandai menurunnya ekspresi dan aktivasi *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) dan lebih lanjut berkurangnya produksi nitrik oksid (NO). Perkembangan aterosklerosis sebenarnya dapat dimodifikasi dan dicegah, tetapi patogenesis aterosklerosis yang jelas belum terungkap sehingga upaya pencegahan maupun pengobatan penyakit ini masih kontroversial, dan penelitian keterkaitan vitamin E dengan penurunan insidensi aterosklerosis belum memberi hasil yang memuaskan.

Tujuan: Penelitian ini mengkaji pengaruh diet aterogenik, endotoksin lipopolisakarida (LPS) dan vitamin E terhadap kejadian aterosklerosis dengan mengkaji kadar lipid darah, pemeriksaan histopatologis arteri koroner, analisis ekspresi dan aktivasi eNOS intraseluler serta produksi NO dalam darah.

Metode: Penelitian menggunakan rancangan eksperimental (*Post-test control group design*) dengan lama perlakuan 12 minggu. Sebanyak 44 ekor tikus *Sprague Dawley* (SD) jantan, berumur 10 minggu, berat badan 150-200 gram dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Setelah 1 minggu periode adaptasi, kelompok 1 diberi pakan standar, kelompok 2 diberi pakan aterogenik dan injeksi Lipopolisakarida (LPS) intra peritoneal dengan dosis 50 µg pada minggu keempat dan kedelapan. Perlakuan pada kelompok 3 sama halnya seperti kelompok 2, tetapi ditambah pemberian vitamin E (α -Tocopherol) per oral 5 IU/hari, dan pada kelompok 4 vitamin E diberikan pada minggu keenam. Pengambilan sampel dilakukan pada minggu keempat, kedelapan dan duabelas untuk analisis kadar lipid darah dengan uji enzimatik, gambaran histopatologis arteri koroner dengan pewarnaan hematosilin-eosin, ekspresi dan aktivasi eNOS dengan analisa imunohistokimia, serta kadar NO darah dengan spektrofotometri. Uji kemaknaan memakai Anova atau Kruskal – Wallis test diikuti Tukey HSD. Tingkat kepercayaan 95%, perbedaan bermakna bila $p < 0,05$.

Hasil: Hasil menunjukkan bahwa tikus dengan diet aterogenik selama 4 minggu secara signifikan meningkatkan kadar kolesterol darah (hiperkolesterolemik), $P < 0.05$, dan kadar kolesterol total memiliki hubungan yang signifikan dengan high-density lipoprotein (HDL) sebesar 56%, dengan low-density lipoprotein

(LDL) sebesar 92.1% dengan arah korelasi positif. Peningkatan kadar LDL lebih lanjut dapat terjadi modifikasi/oksidasi LDL yang merupakan kejadian menentukan dalam inisiasi dan berkembangnya aterosklerosis yang terlihat dari penurunan ekspresi dan aktivasi eNOS intraseluler, dan lebih banyak terbentuk vakuolasi pada dinding pembuluh darah. Tikus yang diberi diet aterogenik dan 4 minggu setelah injeksi LPS kadar TG juga meningkat (hiperlipidemik-bakteremik), tetapi 8 minggu setelah injeksi LPS menunjukkan penurunan kadar kolesterol total, LDL, dan HDL.

Pemberian vitamin E bersamaan diet aterogenik pada tikus SD tidak menunjukkan penurunan kadar kolesterol total, LDL, HDL dibanding dengan yang terjadi tanpa pemberian vitamin E, dan kadar TG menunjukkan peningkatan (hiperlipidemik), $P < 0.05$. Pemberian vitamin E diawal perlakuan pada tikus dengan diet aterogenik dan 4 minggu setelah injeksi LPS tampak penurunan kadar lipid darah, tetapi 8 minggu setelah injeksi LPS terlihat peningkatan kadar kolesterol total, LDL, HDL ($P < 0.05$). Diet aterogenik menunjukkan perubahan gambaran histopatologis arteri koroner berupa vakuolasi pada tunika intima/subendotelial dan tunika media yang lebih banyak dibanding dengan yang terjadi pada tikus kontrol, penurunan ekspresi dan aktivasi eNOS intraseluler secara tidak bermakna, tetapi kadar NO lebih kurang sama dengan yang terjadi pada tikus kontrol. Efek LPS setelah lebih dari 4 minggu injeksi pada tikus dengan diet aterogenik menunjukkan penurunan vakuolasi dan kadar NO darah, tetapi terlihat peningkatan ekspresi dan aktivasi eNOS intraseluler secara tidak bermakna. Pemberian vitamin E pada tikus dengan diet aterogenik dan lebih dari 4 minggu setelah injeksi LPS menunjukkan peningkatan vakuolasi, penurunan ekspresi maupun aktivasi eNOS intraseluler, dan peningkatan kadar NO darah secara tidak bermakna.

Kesimpulan: Pemberian diet aterogenik berpengaruh terhadap kejadian aterosklerosis sehubungan dengan hiperkolesterolemia dan peningkatan kadar LDL sebagai faktor kunci dalam inisiasi dan berkembangnya aterosklerosis yang terlihat dari lebih banyak terbentuk vakuolasi pada dinding pembuluh darah dan penurunan ekspresi maupun aktivasi eNOS intraseluler. Pengaruh LPS setelah lebih dari 4 minggu injeksi pada tikus dengan diet aterogenik tidak terlihat menambah efek dalam berkembangnya aterosklerosis, tetapi pengaruh vitamin E menunjukkan lebih berperan sebagai anti peradangan menekan efek LPS (peran non-antioksidan vitamin E).

Kata Kunci: Aterosklerosis, Endotel, Lipoprotein, Nitrik oksid, Tokoferol, *Sprague Dawley*, Vitamin E.