

## HUBUNGAN POSITIF ANTARA ULKUS KAKI DIABETIK DENGAN PERSENTASE SEL BERMARKAH CD4<sup>+</sup> PEMBAWA MALONDIALDEHID

I Wayan Putu SutirtaYasa<sup>1✉</sup>, Ketut Suastika<sup>2</sup>,  
Anak AgungGede Sudewa Djelantik<sup>2</sup>, I Nyoman Mantik Astawa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School for Graduate Study, Udayana University

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Udayana University

<sup>3</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University

Email: psutirtayasa@yahoo.com

### Abstrak

Tingginya angka kejadian ulkus kaki diabetik (UKD) dan luka di kaki yang sulit sembuh memberi petunjuk kemungkinan ada proses kematian sel imun yang sangat banyak dan belum jelas mekanismenya secara molekuler pada jaringan UKD. Telah diteliti hubungan antara derajat UKD dengan persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa malondialdehid (MDA). Penelitian ini adalah penelitian observasional dengan rancangan *cross sectional analytic study* yang dilakukan di Rumah Sakit pemerintah dan swasta di Denpasar, Badung, Tabanan, dan Gianyar. Parameter yang diukur dari bahan darah adalah kadar gula darah memakai metode enzimatik (heksokinase), dan dari bahan jaringan kaki, dihitung sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa MDA memakai metode imunohistokimia (reagen dari Bidesign dan Abcam). Dari 80 sampel UKD didapatkan 49 (61,2%) penderita laki-laki dan 31 (38,8%) penderita wanita, berdasarkan tingkat keparahan UKD, sampel dipilah lagi menjadi: 29 (31,9%) derajat 2; 20 (21,9%) derajat 3; 13 (14,3%) derajat 4; dan 18 (19,8%) derajat 5, rata-rata persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA adalah  $75,0 \pm 20,5$  %, Didapatkan korelasi positif kuat antara persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa malondialdehid dengan derajat UKD ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,01$ ). Pada penelitian ini membuktikan ada mekanisme kematian sel imun dan sekaligus menjawab permasalahan bahwa pada penderita UKD mudah terkena infeksi dan sulit untuk disembuhkan, dengan dibuktikan bahwa ada korelasi positif kuat antara derajat UKD dengan persentase pembentukan MDA dari sel bermarkah CD4<sup>+</sup>, ini menyatakan bahwa semakin berat derajat UKD semakin banyak mengalami kematian sel imun.

Kata kunci: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, malondialdehid, *caspase-3*, ulkus kaki diabetik.

### Pendahuluan

Penyakit diabetes melitus (DM) merupakan penyakit yang berkaitan dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Prevalensi penderita DM pada orang dewasa di dunia berkisar 8,7 % pada tahun 2002 sebagian besar

tergolong diabetes tipe 2 (ADA, 2004a). *World Health Organization* (WHO) memprediksi akan terjadi kenaikan jumlah pasien dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi 21,3 juta pada tahun 2030 (Perkeni, 2006). Diabetes Melitus di Indonesia diduga belum terdiagnosis sekitar 50 % (Perkeni, 2006). Prevalensi DM di Manado mencapai 6 % (Suyono, 2004), di Kotamadya Surabaya 4,16 % (Askandar, 1997). Di Desa Sangsit Buleleng Bali prevalensi DM 7,5 % (Suastika, *et al.*, 2004).

Penderita DM sering terjadi komplikasi pada pembuluh darah berupa makroangiopati, mikroangiopati, neuropati, penurunan daya tahan tubuh sehingga memudahkan terjadi infeksi, inflamasi, iskemia dan kematian sel (Masharani, *et al.*, 2004). Mekanisme terjadinya kematian sel pada penderita DM melalui penurunan glukosa intraseluler maupun peningkatan glukosa ekstraseluler. Peningkatan glukosa ekstraseluler mengakibatkan terjadi reaksi glikasi (reaksi non enzimatis antara glukosa dengan protein) dan membentuk basa *schiff*, kemudian menjadi produk amadori dan akhirnya membentuk protein yang sangat toksik, disebut *advanced glycation end product* (AGEs) (Andi, 2004; Kathryn, *et al.* 2005). Adanya proses autooksidasi pada hiperglikemi dan reaksi glikasi ini memicu pembentukan radikal bebas (RB) khususnya radikal superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), dan oksidan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) melalui reaksi *Haber-Weis* dan *Fenton* akan membentuk radikal hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ). Radikal bebas dapat merusak membran sel, menjadi lipid peroksida atau malondialdehid (MDA), bila berlanjut mengakibatkan kerusakan sistem membran sel dan kematian sel (Baynes, 1991; Gitawati, 1995; Sukmawati, 1999; Tjokroprawiro 1993;). Jaringan atau sel yang sangat rentan terhadap RB adalah eritrosit, leukosit/limfosit, fibroblas, sel tumor, endotel, liposome, dan mitokondria. Dengan demikian sel bermarkah *Cluster of Differentiation 4* ( $CD4^+$ ) (sel imun) sangat rentan mengalami kerusakan sekitar jaringan ulkus kaki diabetik (Waspadji, S. 2000),

Berdasarkan latar belakang di atas maka dalam penelitian ini diteliti apakah ada korelasi positif antara sel bermarkah  $CD4^+$  pembawa MDA dengan derajat UKD?

## Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional menggunakan rancangan *cross sectional analytical study* (Newman *et al*, 1988; Zainuddin, 1999). Sampel adalah penderita DM dengan ulkus kaki diabetik (UKD), umur di bawah 60 tahun, bersedia ikut dalam penelitian, dan menanda tangani surat persetujuan penelitian atas dasar kesadaran (*informed consent*), diambil saat operasi di RS (*Hospital Based*) Negeri dan swasta di Denpasar, Badung, Gianyar dan Tabanan. Sampel dipilih dengan teknik *consecutive sampling* dari populasi terjangkau

Besar sampel sesuai besar sampel perhitungan analitik korelatif menurut Dahlan (2006).

$$n = \left\{ \frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{0.05 \ln[(1+r)/(1-r)]} \right\}^2 + 3 =$$

Dalam hal ini:  $n$  = besar sampel untuk masing-masing kelompok;  $Z_{\alpha}$  = kesalahan tipe I = 5% (hipotesis satu arah);  $Z_{\alpha} = 1,64$ ;  $Z_{\beta}$  = kesalahan tipe II = 10%;  $Z_{\beta} = 1,28$ ;  $r = 0,87$  (Sutirta-Yasa *et al.*, 2007).

Jadi besar sampel minimal masing masing kelompok derajat UKD adalah 8 sampel.

Jaringan diambil dari hasil *debridement* dari UKD, kemudian difiksasi dengan formalin 10% pada *buffer phosphat*, disimpan pada suhu 4-8 °C. Pemerosean jaringan adalah: dehidrasi, *clearing*, impregnasi, dan *embedding*. Jaringan yang telah berada dalam blok paraffin, kemudian disayat dengan *rotary microtome*, dengan ketebalan 3  $\mu$ m. Untuk merekatkan jaringan ke gelas objek dipakai *poly L-lisine*. Prosedur pewarnaan IHK memakai indirek imunoasai berlabel ganda (*indirect immunoassay double labeling*), Sel bermarkah CD4<sup>+</sup> diidentifikasi memakai antibodi monoklonal dari *mouse* terhadap CD4-gp 55kD, klon dari BL4 berupa IgG2a $\square$ , katalog no. P42115M, no. lot 7E14306, Buatan Biodesign (pada IHK Ab monoklonal I, anti *mouse* IgG-biotin diencerkan 1:100 dalam 5% susu skim, memakai substrat DAB, sehingga pada sel terlihat warna coklat); malondialdehid adalah lipid peroksida

diidentifikasi memakai antibodi poliklonal dari rabbit, reagen kat. no. ab6463. plc 332 Buatan Abcam Cambridge CB4 OFW,UK, terregistrasi di England no.3509322 (pada IHK Ab II poliklonal MDA dari *rabbit* diencerkan 1: 200 dalam susu skim 5%) substrat NBT, pada sel terlihat warna biru); (Sudiana, 2004; 2005, yang dimodifikasi). Pembacaan preparat IHK memakai mikroskop binokuler yang disambungkan dengan layar monitor. Preparat yang akan dihitung hanya berisi nomor atau kode yang dibuat oleh petugas di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Identitas sampel seperti nama, umur, derajat UKD, tidak diketahui oleh peneliti pada saat membaca preparat. Menghitung persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup>pembawa MDA adalah jumlah sel bermarkah/petanda MDA (terlihat warna biru pada sel) dan bermarkah CD4<sup>+</sup> (terlihat warna coklat pada sel) dibagi seluruh jumlah sel bermarkah CD4<sup>+</sup> (terlihat warna coklat pada sel) kali 100%, pada sepuluh lapang pandang, pembesaran 400X, perpindahan 10X.

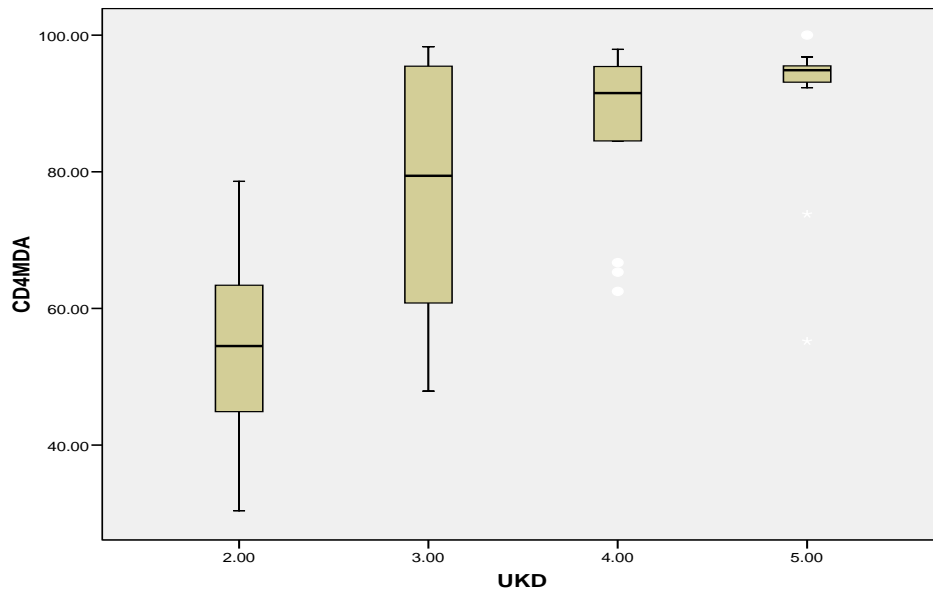
Analisis statistik data menggunakan program aplikasi SPSS 13.0 *for windows* (Triton, 2006). Untuk membuktikan bahwa ada hubungan antara derajat ulkus kaki diabetik dengan persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa malondialdehid data dimasukkan pada program SPSS 13.0 for windows, dengan analisis korelasi kuatnya hubungan dengan uji korelasi *Product Moment (Spearman)*.

## **Hasil dan Pembahasan**

Pada penelitian ini diteliti 80 orang UKD. Berdasarkan tingkat keparahan UKD, sampel dipilah lagi menjadi: 29 (31,9%) derajat 2; 20 (21,9%) derajat 3; 13 (14,3%) derajat 4; dan 18(19,8%) derajat 5. Berdasarkan jenis kelamin, didapatkan 49 (61,2%) penderita laki-laki dan 31 (38.8%) penderita wanita, pada hitung sel didapat rata-rata persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA adalah  $75,0 \pm 20,5 \%$

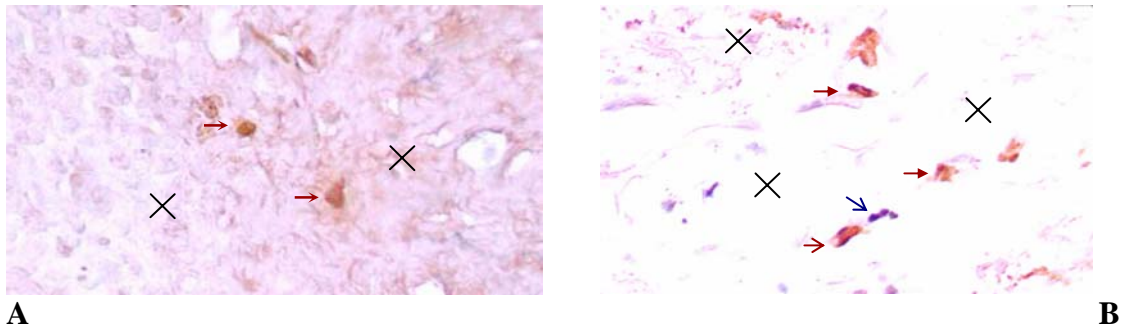
Dari uji analisis *Product Moment (Spearman)* didapat adanya korelasi positif kuat persentase sel yang bermarkah CD4<sup>+</sup> MDA dengan derajat UKD, dengan  $r = 0,71$  ( $p < 0,01$ ).

Sebaran sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa malondialdehid (CD4<sup>+</sup> MDA) dari Jaringan pada berbagai derajat UKD, dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Sebaran Sel Bermarkah CD4<sup>+</sup> Pembawa Malondialdehid (CD4<sup>+</sup> MDA) dari Jaringan berbagai Derajat UKD.

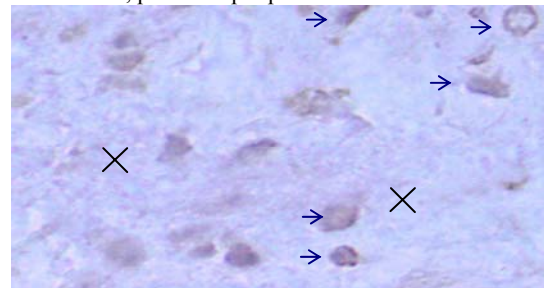
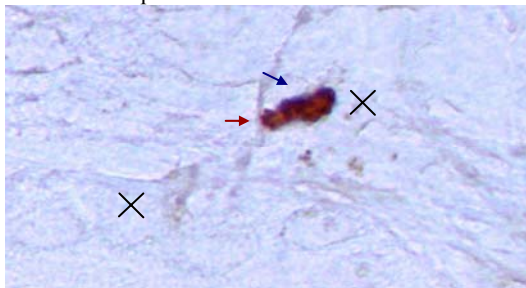
Persentase sel yang bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA dari jaringan kaki UKD derajat 2:  $54,05 \pm 13,42\%$ ; derajat 3:  $77,17 \pm 17,43\%$ ; derajat 4:  $88,52 \pm 12,41\%$ ; derajat 5:  $91,65 \pm 10,52\%$ . Rata-rata persentase sel yang bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA antara jaringan UKD derajat 2 dengan derajat 3 sangat lebar, ini menunjukkan bahwa pada penderita UKD didapatkan proses kematian sel yang lebih tinggi seiring dengan peningkatan derajat UKD. Sebaran persentase sel yang bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA pada UKD derajat 3 sangat lebar, karena perbedaan derajat 2 (infeksi selulitis, osteomielitis) sedangkan derajat 3 (derajat 2 ditambah abses), derajat 4 (gangren, tumit, jari kaki) derajat 5 (gangren seluruh kaki) berpengaruh terhadap nilai persentase tersebut. Reaksi peradangan dan jaringan mati sangat berpengaruh terhadap proses kematian sel imun CD4<sup>+</sup> melalui proses pembentukan MDA (Gambar 1). Pembentukan MDA pada membran sel imun (Gambar 2 dan 3).



**Gambar 2** Sel Bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA dari jaringan:

**A)** kaki non diabetik pembesaran 1000X, (tanda x) struktur jaringan; mulai rusak, Tanda → menunjukkan sel bermarkah CD4<sup>+</sup>, tidak ada petanda MDA

**B)** UKD derajat 2, pembesaran 1000X, struktur jaringan mulai rusak, Tanda → sel CD4<sup>+</sup> bermarkah MDA (tanda→) pembawa MDA, petanda lipid peroksida di membran sel



**Gambar 3** Sel Bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA dari jaringan UKD

**A)** derajat 3 pembesaran 1000X, (tanda x) menunjukkan struktur jaringan yang sudah rusak, (tanda →) menunjukkan sel bermarkah CD4<sup>+</sup> sangat jelas, (tanda→) menunjukkan pembawa MDA, terjadi lipid peroksidasi di membran sel

**B)** UKD derajat 5, pembesaran 1000X, tanda x) menunjukkan struktur jaringan sangat rusak sehingga tidak beraturan, (tanda→) menunjukkan sel bermarkah CD4<sup>+</sup> terlihat jelas, tetapi warna coklat tersebut buram, (tanda→) sel bermarkah MDA, petanda lipid peroksidasi di membran

Molekul CD4<sup>+</sup> berperan amat penting dalam sistem kekebalan tubuh, molekul ini paling banyak terdapat pada sel limfosit T helper, ditemukan juga di jaringan pada *subset* dari sel makrofag atau monosit, di timus pada sel timosit dan di otak pada sel mikroglia. Sel limfosit T *helper* merupakan *subset* sel limfosit T yang membantu sel lainnya dalam sistem pertahanan tubuh. Sel makrofag/monosit merupakan sel fagosit dan juga sebagai penyaji antigen (*antigen presenting cells/APC*). Pada proses pengenalan antigen eksogen (sebagai contoh mikroba, jamur, debu) yang masuk ke tubuh, antigen ini akan melalui endositosis oleh sel fagosit *Antigen presenting cell* seperti: makrofag, sel dendritik, dan sel B. Antigen eksogen dirombak/diproses di

dalam sel APC (antigen protein eksogen dalam endosome berpotongan dengan gelembung trans Golgi berisi MHC kelas II) menjadi fragmen peptida dengan berat molekul kecil (bentuk yang dapat dikenal) kemudian siap ditayangkan ke sel lain melalui *Major Hystocompatibility Complex* (MHC) kelas II keluar dari membran sel yang dapat dikenal oleh molekul  $CD4^+$  dari sel limfosit T (Abbas, 2005; Roit, *et al.* 2001.)

Pada penelitian ini sejumlah sel bermarkah  $CD4^+$  (warna coklat pada dinding sel), juga didapat markah MDA (warna biru pada sel), dari sel imun jaringan UKD derajat 2, 3, 4 dan 5. Ini menandakan sel imun tersebut sudah sebagai pembawa MDA di membran sel sebagai petanda kematian sel (Gambar 2 dan 3).

Molekul  $CD4^+$  melekat pada membran sel, bila membran ini rusak (ditemukan MDA hampir pada seluruh sel  $CD4^+$  pada UKD derajat 4 dan 5), secara tidak langsung fungsi molekul  $CD4^+$  akan terganggu, sinyal yang ditangkap dari luar tidak dapat diteruskan ke dalam sel melalui membran sel yang telah rusak.

Akibat dari zat kimia yang tinggi dari jaringan yang rusak diduga akan merusak molekul  $CD4^+$  (Gambar 3) semakin tinggi derajat UKD warna coklat di membran sel semakin memudar, diduga ikatan Ag-Ab melemah (AbMo dari *mouse* terhadap molekul  $CD4^+$ , Ab poliklonal dari *rabbit* terhadap MDA). Perubahan molekuler pada  $CD4^+$  ini akan mengganggu fungsi, gangguan interaksi sel APC dengan sel T  $CD4^+$ , maka dampak awal adalah terjadi gangguan fungsi proses pengenalan sistem imun. Proses pengenalan sangat penting untuk pertahanan tubuh dapatan. Tanpa proses pengenalan, imunitas dapatan, baik humoral maupun seluler tidak akan berjalan sesuai harapan. Bila membran sel bermarkah  $CD4^+$  (sel Th) mengalami perubahan yang semakin memburuk, sitokin yang dikeluarkan oleh sel T *helper* juga menurun, sehingga sitokin tersebut tidak cukup untuk mengaktivasi sel B sebagai pembentuk antibodi ataupun mengaktivasi sel T sitotoksik sebagai sel eksekutor, yang selanjutnya akan mengganggu sistem imunitas humoral maupun imunitas seluler. Sel fagosit monosit dalam perkembangannya juga memerlukan sitokin dari sel T *herper*, sehingga terjadi gangguan fungsi dari sel monosit

makrofag dalam fungsinya sebagai sel fagositosis. Sel fagosit monosit ini sangat penting untuk sistem kekebalan, di jaringan seperti di susunan saraf disebut sel mikrogial, di paru disebut makrofag alveolar, di ginjal disebut fagosit mesangial, di limfenod disebut *resident* dan *circulating macrophages*, di sendi disebut sel mesangial dan makrofag monosit yang ada di sirkulasi darah (Abbas and Lichtamn, 2005). Gangguan fungsi sel bermarkah CD4<sup>+</sup> seperti sel limfosit T (*helper*) telah terbukti menurunkan daya pertahanan tubuh pada penderita *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Pada penderita HIV yang sudah mengarah ke *Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome* (AIDS), ada penurunan jumlah sel CD4<sup>+</sup> sehingga fungsi sel imun berupa pertahanan tubuh menurun terhadap infeksi maupun sel kanker.

Radikal bebas bersifat toksik terhadap dinding sel merupakan molekul oksigen yang reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbita terluarnya. Radikal ini dapat mengambil elektron dari molekul lain dan akan memicu terjadinya reaksi oksidasi pada dinding sel yang tersusun atas asam lemak tidak jenuh (*unsaturated fatty acids*). Bagian dinding sel tersebut umumnya terdiri atas asam lemak dari fosfolipid dan glikolipid yang mengandung asam lemak tidak jenuh tersebut yang disebut *polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) dari dinding sel bermarkah CD4<sup>+</sup> sehingga terbentuk lipid peroksid (MDA) (Jong *et al*, 2004).

Pada penelitian ini didapat korelasi positif kuat antara persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup>MDA dengan derajat UKD ( $r = 0,71$   $p < 0,01$ ). Hasil penelitian ini didukung oleh Tjokroprawiro (1993), yang mendapatkan bahwa pada penderita diabetik terjadi berbagai bentukan radikal bebas seperti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radikal hidroksil yang mempermudah terbentuknya lipid peroksida (MDA) pada membran sel.

## **Simpulan**

Pada penelitian ini dapat dibuat kesimpulan sebagai berikut  
Korelasi positif kuat antara derajat ulkus kaki diabetik dengan persentase sel bermarkah CD4<sup>+</sup> pembawa malondialdehid..



## **Saran**

Hasil penelitian tidak dapat menyimpulkan hubungan sebab dan akibat, tentang banyaknya kematian sel yang bermarkah  $CD4^+$ , akan menyebabkan derajat UKD bertambah parah ataupun semakin parah derajat UKD maka akan menyebabkan kematian sel yang bermarkah  $CD4^+$ , akan bertambah banyak, karena metode yang dipakai adalah rancangan *cross sectional analytic study* sehingga masih bersifat hubungan atau korelasi. Perlu dibuktikan dengan metode penelitian yang lain sehingga dapat dibuktikan sebab dan akibat dengan memakai binatang coba.

## **Kebaharuan**

Temuan baru penelitian ini didapatkan bahwa derajat ulkus kaki diabetik mempunyai korelasi positif kuat dengan persentase sel bermarkah  $CD4^+MDA$ , yang berarti bahwa semakin tinggi derajat UKD semakin banyak didapat kematian sel imun yang ditandai dengan persentase sel bermarkah  $CD4^+$  pembawa malondialdehid.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas, A. K. 2005. Disease of Immunity. In: Robbins and Cotran editors. Pathologic Basis of Disease. 7<sup>th</sup> eds. Philadelphia:193-268
- Abbas, A. K. and Lichtamn, A. H. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth eds. Elsevier Saunders. Philadelphia: 16-40.
- ADA American Diabetes Assosiation. 2004a. Screening for Type2 Diabetes. Diabetes Care, 27. (Suppl 1): S91-S93..
- Andi, W. 2004. Mitochondrial Oxidation Damage in Type 2 Diabetes. In : Tjokroprawiro A dkk. Editors. Naskah Lengkap Surabaya Diabetes Ufdate-XIV. Surabaya. 21-22 Agustus p.1.
- Baynes, J.W. 1991. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. Diabetes. 40: 405-412.
- Gitawati, R. 1995. Radikal Bebas – Sifat dan Peran dalam Menimbulkan Kerusakan / Kematian Sel. Cermin Dunia Kedokteran. 102 : 33-36.
- Kathryn, E., Wellen, G.S., and Hotamisligil. 2005. Inflammation, Stress, and Diabetes. J. Clin. Invest 115: 1111-1119.
- Masharani, U, Karam, J.H., and German, M.S. 2004. Pancreatic Hormones &

- Diabetes Mellitus. In: Greenspan FS, Gardner DG. Editors. Basic & Clinical Endocrinology 7<sup>th</sup> Ed. New York: McGraw-Hill. P. 658-746.
- Newman T.B, Browner W.S, Cummings S.R., and Hulley SB. 1988. Designing a New Study: Cross-sectional and Case-control Studies In: Hulley SB, and Cummings SR. editors. Designing Clinical Research. Sydney. Williams & Wilkins. P.75-86
- Perkeni. 2006. Konsensus Pengelolaan Diabetes pada Diabetes Melitus tipe 2. PB Perkeni. Jakarta.
- Roit, I., Brostoff, J., and Male D. 2001. Immunology. Sixth eds. Philadelphia. :245-256.
- Suastika, K., Aryanna, I.G.P, dan Saraswati, I.M.R., Budhiarta, A.A.G, Sutanegara, I.N.D. 2004 Metabolic Syndrome in Rural Population of Bali. In. J Of Obesity. 28 (Suppl.1) : 26-29 May : 555.
- Sudiana, Ketut. 2004. Teknologi Laboratorium : Histological and Immunohistochemistry Techniques. Devisi Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Sudiana, Ketut. 2005. Teknologi Ilmu Jaringan Dan Imunohistokimia. Edisi ke 1. Sagung Seto. Jakarta. Hal. 1-47.
- Suryohudoyo, P. 1993. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas. Dalam : Simposium Oksidan dan Antioksidan Tjokroprawiro Edt. Persatuan Ahli Penyakit Dalam Cabang Surabaya. Hal.37-50.
- Sutirta-Yasa, IWP., Suastika K., Sudewa AAG.D., dan Mantik -Astawa N. 2007. Hubungan Derajat ulkus kaki diabetik dengan jumlah mononuklear CD4<sup>+</sup> dan T CD8<sup>+</sup>. DUE-Like Batch III UNUD, FK UNUD.
- Suyono, S. 2004. Kecendrungan Peningkatan Jumlah Penyandang Diabetes. In: Soegondo S., Soewondo P., Subekti I., editor. Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu. 4<sup>th</sup> Ed. Jakarta. Balai Penerbit FKUI. p.1-6.
- Tjokroprawiro, A. 1993. Radikal Bebas. Aspek Klinik dan Kemungkinan Aplikasi Terapi. Dalam : Simposium Oksidan dan Antioksidan Tjokroprawiro Edt. Persatuan Ahli Penyakit Dalam Cabang Surabaya. hal.11-36.
- Triton, P.B. 2006. SPSS 13.0 Terapan: Riset Statistik Parametrik. Yogyakarta: Andi. Hal 61-108.
- Waspadji, S. 2000. Telaah Mengenai Hubungan Faktor Metabolik dan Respon Imun pada Pasien Diabetes Melitus tipe1 : Kaitannya dengan Ulkus/gangren Diabetes. Program Pascasarjana Universitas Indonesia. JKPKBPPK/Badan Litbang Kesehatan.  
Available from: <http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbpppk-gdl-res-2000-sarwono-389-gangren>.
- WHO. 1999. Consultation Report Definition. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complication.
- Zainuddin, 1999. Metodologi Penelitian.Surabaya. Universitas Airlangga, hal. 102.

**POSITIVE CORRELATION BETWEEN SEVERITY FOOT ULCER AND  
PERCENTAGE OF CELL MARKED CD4<sup>+</sup> CARRYING  
MALONDIALDEHYDE**

**I Wayan Putu Sutirta Yasa, Ketut Suastika, A.A.G. Sudewa. D,**

**Nyoman Mantik Astawa**

**Doctorate Postgraduate Program Udayana University**

**Abstract**

The high incidence of diabetic foot ulcer (DFU) and hardly healed foot wound clearly indicates the possible process of so many immune cell lyses in the wound, of which the molecular mechanism is not well-understood. A research to determine the correlation between the CD4 cells carrying malondialdehyde (MDA) and the degree of diabetic foot ulcer was carried out in a cross-sectional analytical study. Blood and tissue samples were collected from the patients with diabetic foot ulcers admitted to both state and private hospitals in Denpasar, Badung, Tabanan and Gianyar. The parameters of this study were the concentration of blood glucose and the percentage of CD4<sup>+</sup> cells bearing MDA. The concentration of blood glucose was determined by enzymatic (heksokinase) and the number of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA was determined by double-labelling immunochemistry. 80 DFU samples consisting of 49 (61,2%) men and 31 (38,8%) women were used in this study. On the basis of their DFU degree, 29 (31,9%) samples were categorized as degree-2, 20 (21%) samples as degree-3, 13 (14,3%) samples as degree-4 and 18 (19,8%) samples as degree-5 of diabetic foot ulcers. The average percentage of CD4<sup>+</sup> bearing MDA was 75±20,5%. A strong positive correlation between the percentage of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA and the degree of diabetic foot ulcers was observed in this study ( $r=0,71;p<0.01$ ). It appears that the lysis of immune cells plays important role in worsening diabetic foot ulcers.

**Introduction**

Diabetes melitus (DM) is a disease closely related to the dysfunction of carbohydrate, lipid, and protein metabolism. The prevalence of diabetes suffered by adults in the world is about 8.7 % in 2002 and mostly categorized as type-2 diabetes (ADA, 2004a). World Health Organization (WHO) predicted that the diabetic patients will increase significantly in the near future, from 8.4 million in 2000 to 21.3

million in 2030 (Perkeni, 2006). Approximately 50 % of diabetes melitus cases in Indonesia is undiagnosed (Perkeni, 2006). In Menado, the prevalence of diabetes melitus is 6 % (Suyono, 2004), and in Surabaya city it is around 4.16 % (Askandar, 1997). In Sangsit village, Buleleng, Bali, the prevalence of diabetes is about 7.5 % (Suastika, *et al.*, 2004).

The complication of blood vein such as macroangiopathy, microangiopathy, neuropathy, and decrease of self defence were frequently observed in diabetic patients which led to infection, inflammation, ischemia, and cellular damage of the affected tissues (Masharani, *et al*, 2004). The lysis of cells in diabetic patients occurs through mechanism related to the decrease of intracellular glucose and the increase of extracellular glucose. The increase in extracellular glucose usually results in glycation reaction, a non-enzymatic reaction between glucose and protein to form schiff base and then amadori product, which finally produces a very toxic protein known as advanced glycation end product (AGEs) (Andi, 2004; Kathryn, *et al.* 2005). The presence of autooxidation process in hyperglychemic condition and glycation reaction can trigger the formation of free radicals, especially superoxide ( $O_2^{\bullet}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), through Haber-Weis and Fenton reaction to form hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ). Free radicals can damage cellular membrane to form lipid peroxide or generally known as malondialdehyde (MDA). If this process proceeds for a prolonged period of time, it will in turn damage cellular membrane which will finally lead to the lysis of cells (Baynes, 1991; Gitawati, 1995; Sukmawati, 1999; Tjokropawiro 1993). Tissues or cells which are susceptible to the attack of the free radicals are erythrocyte, leucocytet/lymphocyte, fibroblast, tumour cell, endotelial cells, liposome, and mitochondria. In diabetic patients, immune cells such as  $CD4^+$  are therefore likely to be susceptible to the effect of radicals, especially those found around diabetic foot ulcer (Waspadji, S. 2000). As the MDA is an important indicator of cellular damage caused by the attack of free radicals, its presence in the cellular membrane clearly indicates the process of cellular damage. A study was therefore

conducted to determine the correlation between the degree of diabetic foot ulcer and the percentage of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA molecule

### **Research Methodology**

This research was an observational cross sectional study (Newman *et al*, 1988; Zainuddin, 1999). Blood and tissue debridement samples were collected from the patients with diabetic foot ulcer. The criteria of patients included in this study were aged below 60 years, agreeing to joint the research project, admitted for operative treatment to state and private hospitals in Denpasar, Badung, Gianyar, and Tabanan). The samples were collected by methods of consecutive sampling technique in accessible population.

The sample size was estimated by the following analytical correlative calculation (Dahlan, 2006) according to the following equation.

$$n = \left\{ \frac{Z\alpha + Z\beta}{0.05 \ln \left[ \frac{(1+r)}{(1-r)} \right]} \right\}^2 + 3 =$$

Where  $n$  = sample size within each group;  $Z\alpha$  = type I failure = 5% (one directional hypothesis);  $Z\alpha = 1,64$ ;  $Z\beta$  = type II failure = 10%;  $Z\beta = 1,28$ ;  $r = 0.87$  (Sutirta-Yasa *et al.*, 2007). By adding all values to the equation, then the sample size was determined to be 8 samples per group.

Tissue samples were collected from DFU debridement and were fixed in 10% formaldehyde in phosphate buffer. Tissue samples were then processed for a routine histological preparation by the following steps i.e, dehydration, clearing, impregnation, and embedding. Thin sections of paraffin-embedded tissue were prepared using a 3 um thick rotary microtome and they were then put onto poly L-lisine coated microscope slides. They were then subjected for double immunostaining procedures using anti-CD4 and anti-MDA antibodies.

In the double immunostaining procedures, thin tissue sections on the microscope slides were firstly deffarafinized twice by xylene, and cleared twice by absolute ethanol. Tissue sections were then treated with 0.5% trypsin for 20 minutes to retrieve the hidden antigen, and then with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 minutes to block the endogenous peroxidase. Mouse anti-human CD4 antibody (Biodesign international, CD4-gp 55kD, BL4 clone using IgG2 $\alpha$ , catalouge no. P42115M, no. lot 7E14306) diluted 1:200 in 5% skim milk in Phosphate buffered saline was added to the tissue sections and incubated for 18 hours at room temperature in a humid atmosphere. Following three times washes with PBS, goat anti mouse IgG-biotin (Biodesign international) diluted 1:100 in 5% skim milk in PBS was added and incubated for 1 hour at room temperature. The washing procedure was carried out as above and avidin-horseradish peroxidase was then added to the tissue sections for 10 minutes in room temperature. The presence of cells bearing human CD4<sup>+</sup> molecule was the visualized by adding diazinobenzidine (DAB) substrate (Sigma Co, USA, 50 mg/50 ml PBS containing 0.07% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 5-10 minutes at room temperature. The tissue sections were the washed in running tap water for 5 minutes and were then subjected for immunostaining with anti-MDA antibody.

After washing 3 times with PBS, rabbit polyclonal anti-MDA antibody (AbCam, kat. no. ab6463. plc 332, Cambridge CB4 OFW,UK, registered in England no.3509322) diluted 1: 200 in 5% skim milk 5% were added to the tissue sections and incubated for 1 hour at room temperature. Anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Bio-Rad) diluted 1:80 in 5% skim milk in PBS was added and incubated for 1 hour at room temperature. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) substrate kit (Bio-Rad, USA) was then added to the tissue section to visualize the cells carrying MDA molecule and incubated for 20 minutes in room temperature. The tissue sections were washed in running tap water for 5 minutes, dehydrated twice in absolute ethanol, cleared twice in xylene, and mounted in ethelane (Sudiana, 2004; 2005). The tissue sections were examined under light

microscope. The presence of CD4<sup>+</sup> cells was characterized by brown ring around the cellular membrane, whereas cells bearing MDA was characterized by blue ring around the cellular membrane. The number of cells bearing both brown and blue rings in 10 microscopic fields was counted to determine the percentage of CD4<sup>+</sup> carrying MDA molecule.

The data obtained from this study were analyzed using SPSS 13.0 *for windows* (Triton, 2006) to determine the correlation between the percentage of CD4<sup>+</sup> cells bearing MDA and the degree of DFU.

### Results and Discussion

80 DFU patients consisting of 49 (61.2%) man and 31 (38.8%) women were included in this study. Based on their DFU degrees, 29 (31.9%) samples were categorized as degree-2 DFU, 20 (21.9%) samples as degree-3; 13 (14.3%) samples as degree-4; and 18 (19.8%) samples as degree-5. The average percentage CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA was  $75.0 \pm 20.5$  %. Spearman test revealed a strong positive correlation between the percentage CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA and the DFU degrees ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.01$ ). The distribution pattern of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA at various DFU degrees is presented in Figure 1.

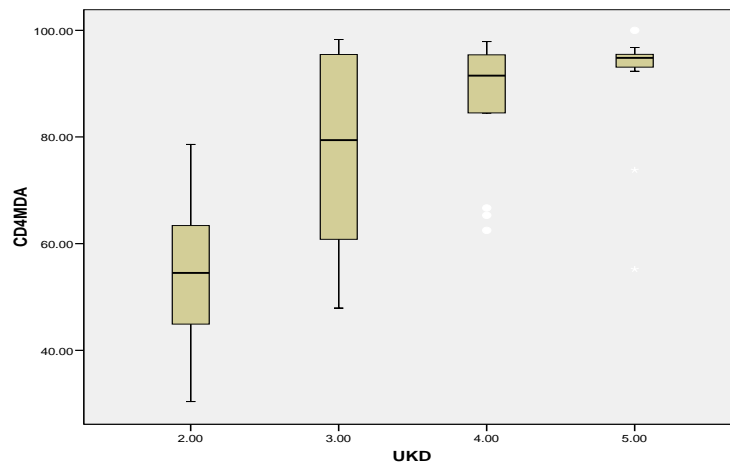


Figure 1. The distribution pattern of CD4<sup>+</sup> cells bearing MDA in various DFU degrees.

The percentages of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA at various DFU degrees were 54.05 ± 13.42% (degree-2); 77.17 ± 17.43% (degree-3), 88.52 ± 12.41% (degree-4), and 91.65 ± 10.52% (degree-5). The variation in the percentage of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA among DFU degree-2 and 3 was very wide indicating that the increase in lysed cells among DFU patients is closely related to the increase in the severity of DFU. The variation in the percentage CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA among degree-3 DFU patients was also wide which is likely caused by the different level of tissues damage within the degree-2 itself. DFU is categorized as degree-2 if there are cellulitic infection and osteomyelitis, while degree-3 (degree-2 plus absces), degree-4 (gangrene, heel, toe), degree-5 (gangrene on all foot) was found to affect the percentage. The lyses of CD4<sup>+</sup> cells through formation of MDA was likely to worsen the inflammation reaction and lysed tissue (Figure 1, 2 and 3).

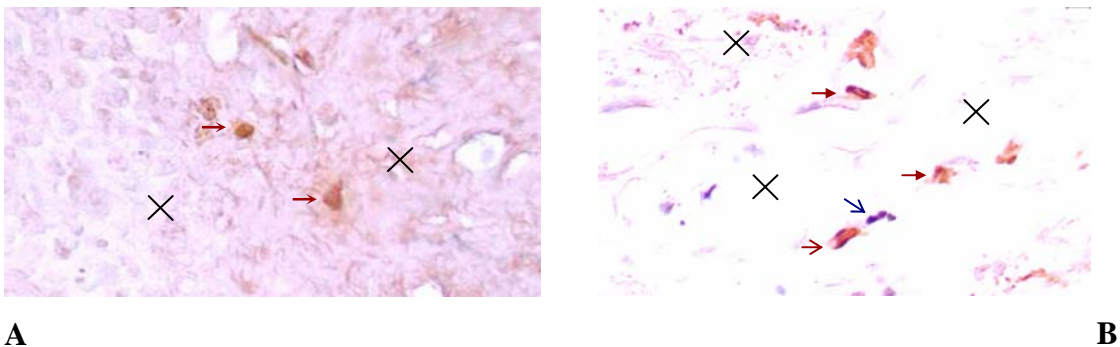
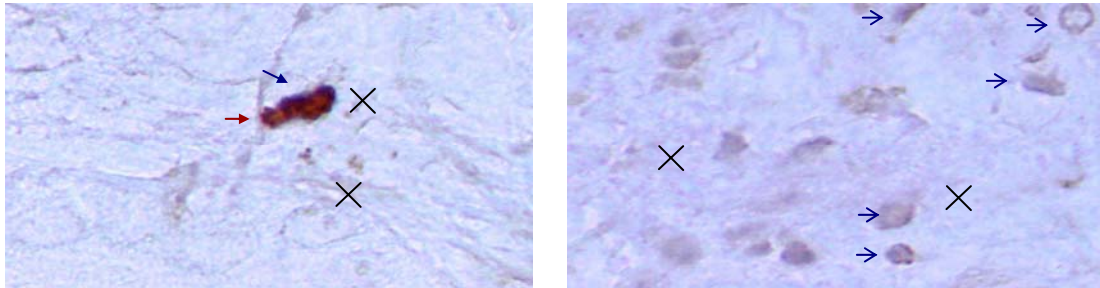


Figure 2 Cell marked CD4<sup>+</sup>MDA of tissue:

**A)** non diabetic foot (1000X zoom), x early damage of tissue structure, → indicates cell marked CD4<sup>+</sup>, no MDA sign

**B)** DFU degree-2 (1000X zoom), x early damage of tissue structure, → cell CD4<sup>+</sup> marked MDA, → MDA carrier, sign of lipid peroxidation on membrane cell





**A**

**B**

**Figure 3 Cell marked CD4<sup>+</sup>MDA of DFU tissue**

**A)** degree-3 (1000X zoom), x damaged tissue structure, → indicates cell marked CD4<sup>+</sup>, → indicates MDA carrier, present of lipid peroxidation on membrane cell

**B)** DFU degree-5 (1000X zoom), x very damaging tissue structure (disorder), → indicates clear cell marked CD4<sup>+</sup>, however, fades brown color, → indicates cell mark MDA, sign of lipid peroxidation on membrane cell

CD4<sup>+</sup> molecule plays an important role in our immune system. CD4 molecule is found mostly in T-helper lymphocytes, and it is also found in macrophage and monocytes, thymocytes, and in brain microglial cells. When exogenous antigens (microbes, fungi, dust etc.) are exposed to body specific immune system, they are firstly taken up by antigen presenting cells (APCs) such as macrophages, dendritic cells, and B-cells. In these APCs, such exogenous antigens are processed into peptide fragments with low molecular weights which are readily presented to MHC molecules on the surface of cellular membrane. T-helper cells which have CD4 molecules on the surface of their membrane recognize the antigen as foreign molecules and therefore help other immune cells to destroy the foreign antigens. Both specific humoral (antibody) and cellular (cytotoxic T lymphocytes) immunities play important role in the destruction of such foreign antigens (Abbas, 2005; Roit, *et al.* 2001). It is therefore clear that CD4<sup>+</sup> cells play a pivotal role in the body specific immune system. The increase in number of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA molecules clearly indicates a massive destruction of immune cells in the tissues of diabetic foot ulcer.

CD4<sup>+</sup> cells bearing MDA were observed in all DFU degrees (2, 3, 4, and 5), indicating a sign of lysed cells (Figure 2 and 3). Molecular changes in CD4<sup>+</sup> cells will affect the interaction between APCs and CD4<sup>+</sup> T cells which leads to dysfunctions of immune system in diabetic foot ulcers. Recognition process is very important in acquired immunity. Without recognition process, acquired immunity will not be processed as expected. The damage of CD4<sup>+</sup> cells will reduce cytokine production by T-lymphocytes which is required in the activation of both B cells and cytotoxic T cells. Reduction in cytokine production will lead to deficiency in antibody production and dysfunction of specific cellular immunities.

Phagocytic monocytes also need cytokine secreted by T-helper cells during their development. As phagocytic cells, monocytes also play important role in the immune system and they are found in many tissues such as nervous system (known as microglial cells), lung (known as alveolar macrophage), kidney (known as phagocytic mesangial cells), lymph node (known as resident and circulating macrophages) (Abbas and Lichtman, 2005). The decrease in CD4<sup>+</sup> cells has been observed in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients which often contributes to the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the affected patient (Abbas, 2005).

Free radical is a reactive oxygen which is highly toxic to cellular membrane as it has unpaired electron on its outer orbital. Such a free radical can take up an electron from other molecules, triggering an oxidation reaction on the membrane of cells composed of lipids of unsaturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid. The reaction of this free radical on membrane of CD4<sup>+</sup> cells results in the formation of lipid peroxidation or malondialdehyde (MDA) (Jong *et al*, 2004).

### **Novelty**

The strong positive correlation between DFU degrees and the percentage of CD4<sup>+</sup> carrying MDA is a new finding. It means that the higher DFU degree is the

more damaged immune cells are found indicated by the increase in CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA molecules

### **Conclusion**

A strong positive correlation between DFU degrees and the percentage of CD4<sup>+</sup> cells carrying MDA means that severity of DFU can be predicted from the number CD4 cells carrying MDA.

### **Future Direction**

In this study, the cause and effect correlation between the number of lysed CD4<sup>+</sup> cells and the increase in DFU degrees, or vice versa could not be determined as the the cross sectional analytical study adopted but could only be determined as normal correlation. Consequently, a further study, probably using animal model, is required to determine such cause and effect correlation..

### **References**

- Abbas, A. K. 2005. Disease of Immunity. In: Robbins and Cotran editors. Pathologic Basis of Disease. 7<sup>th</sup> eds. Philadelphia:193-268
- Abbas, A. K. and Lichtamn, A. H. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth eds. Elsevier Saunders. Philadelphia: 16-40.
- ADA American Diabetes Assosiation. 2004a. Screening for Type2 Diabetes. Diabetes Care, 27. (Suppl 1): S91-S93..
- Andi, W. 2004. Mitochondrial Oxidation Damage in Type 2 Diabetes. In : Tjokroprawiro A dkk. Editors. Naskah Lengkap Surabaya Diabetes Ufdate-XIV. Surabaya. 21-22 Agustus p.1.
- Baynes, J.W. 1991. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. Diabetes. 40: 405-412.

- Gitawati, R. 1995. Radikal Bebas – Sifat dan Peran dalam Menimbulkan Kerusakan / Kematian Sel. *Cermin Dunia Kedokteran*. 102 : 33-36.
- Kathryn, E., Wellen, G.S., and Hotamisligil. 2005. Inflammation, Stress, and Diabetes. *J. Clin. Invest* 115: 1111-1119.
- Masharani, U, Karam, J.H., and German, M.S. 2004. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: Greenspan FS, Gardner DG. Editors. *Basic & Clinical Endocrinology* 7<sup>th</sup> Ed. New York: McGraw-Hill. P. 658-746.
- Newman T.B, Browner W.S, Cummings S.R., and Hulley SB. 1988. Designing a New Study: Cross-sectional and Case-control Studies In: Hulley SB, and Cummings SR. editors. *Designing Clinical Research*. Sydney. Williams & Wilkins. P.75-86
- Perkeni. 2006. *Konsensus Pengelolaan Diabetes pada Diabetes Melitus tipe 2*. PB Perkeni. Jakarta.
- Roit, I., Brostoff, J., and Male D. 2001. *Immunology*. Sixth eds. Philadelphia. :245-256.
- Suastika, K., Aryanna, I.G.P, dan Saraswati, I.M.R., Budhiarta, A.A.G, Sutanegara, I.N.D. 2004 Metabolic Syndrome in Rural Population of Bali. In. *J Of Obesity*. 28 (Suppl.1) : 26-29 May : 555.
- Sudiana, Ketut. 2004. *Teknologi Laboratorium : Histological and Immunohistochemistry Techniques*. Devisi Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Sudiana, Ketut. 2005. *Teknologi Ilmu Jaringan Dan Imunohistokimia*. Edisi ke 1. Sagung Seto. Jakarta. Hal. 1-47.
- Suryohudoyo, P. 1993. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas. Dalam : *Simposium Oksidan dan Antioksidan* Tjokroprawiro Edt. Persatuan Ahli Penyakit Dalam Cabang Surabaya. Hal.37-50.
- Sutirta-Yasa, IWP., Suastika K., Sudewa AAG.D., dan Mantik -Astawa N. 2007. Hubungan Derajat ulkus kaki diabetik dengan jumlah mononuklear CD4<sup>+</sup> dan T CD8<sup>+</sup>. DUE-Like Batch III UNUD, FK UNUD.

- Suyono, S. 2004. Kecendrungan Peningkatan Jumlah Penyandang Diabetes. In:  
Soegondo S., Soewondo P., Subekti I., editor. Penatalaksanaan Diabetes  
Melitus Terpadu. 4<sup>th</sup> Ed. Jakarta. Balai Penerbit FKUI. p.1-6.
- Tjokroprawiro, A. 1993. Radikal Bebas. Aspek Klinik dan Kemungkinan Aplikasi  
Terapi. Dalam : Simposium Oksidan dan Antioksidan Tjokroprawiro Edt.  
Persatuan Ahli Penyakit Dalam Cabang Surabaya. hal.11-36.
- Triton, P.B. 2006. SPSS 13.0 Terapan: Riset Statistik Parametrik. Yogyakarta: Andi.  
Hal 61-108.
- Waspadji, S. 2000. Telaah Mengenai Hubungan Faktor Metabolik dan Respon Imun  
pada Pasien Diabetes Melitus tipe1 : Kaitannya dengan Ulkus/gangren  
Diabetes. Program Pascasarjana Universitas Indonesia. JKPKBPPK/Badan  
Litbang Kesehatan.  
Available from: <http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbpppk-gdl-res-2000-sarwono-389-gangren>.
- WHO. 1999. Consultation Report Definition. Definition, Diagnosis and Classification  
of Diabetes Mellitus and Its Complication.
- Zainuddin, 1999. Metodologi Penelitian. Surabaya. Universitas Airlangga, hal. 102.