

ABNORMAL STRUKTUR HISTOLOGIS KORTEKS CEREBELLAR TIKUS DENGAN NORMAL FOLIASI AKIBAT IRADIASI SINAR X MASA POSTNATAL

WIN DARMANTO

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

Our previous experiment showed that prenatal exposure of rats to X-irradiation on gestation day 21st as the late gestation period causes heterotopic Purkinje cells and abnormal foliation of the cerebellum. However the present study observed the heterotopik of Purkinje cell layer following exposure of the rats to X-irradiation on postnatal day (P) 4, without abnormal foliation of the cerebellum. It also demonstrated the process of re-derangement of Purkinje cells. Rat pups were exposed to 2.5 Gy X-irradiation and the cerebellum was examined histologically and by immunohistochemistry to identify Purkinje cells. At 6 h after exposure, extensive cell death was observed in the external granular layer (EGL) of the cerebellum. By P7 (3 days after exposure), while Purkinje cells with well developed dendrites aligned underneath the EGL in the control cerebellum, Purkinje cells with shorter and abnormally oriented dendrites failed to align and re-deranged in the heterotopic location. On adult, the cerebellum of rats irradiated was observed almost normal folial developed. It is strong support previous study that the critical stage for cerebellar abnormal foliation caused X-irradiation is in the early postnatal period.

Key words: cerebellum, foliation, postnatal day, Purkinje cell, X-irradiation

PENGANTAR

Penelitian kami sebelumnya menunjukkan bahwa radiasi sinar-X pada masa akhir kehamilan tikus menyebabkan gangguan migrasi sel Purkinje, sehingga menyebabkan *heterotopic Purkinje cell* (sel Purkinje salah letak) dan kelainan foliasi dari cerebellum (Darmanto *et al.*, 1998, Darmanto *et al.*, 2000, Inouye, 1979).

Selama masa akhir kehamilan, calon mikroneuron, yaitu sel granulosa, membentuk lapisan sel granulosa di bagian luar (*external granular layer*/EGL), seterusnya sel-sel tersebut aktif membelah dan meluas ke seluruh permukaan dari calon cerebellum (Darmanto *et al.*, 2000). Sel granulosa setelah membelah selanjutnya bermigrasi meninggalkan EGL menuju ke lapisan dalam sel granulosa (*internal granular layer*/IGL) melalui lapisan sel Purkinje (Inouye *et al.*, 1992; Darmanto *et al.*, 2000; Darmanto, 2000). Di sisi lain, sel saraf muda sebagai calon sel Purkinje bermigrasi dari daerah ventrikel menuju daerah permukaan luar dari cerebellum (korteks), dan setelah menempati posisi tertentu sel akan berdeferensiasi menjadi sel Purkinje (Yuasa *et al.*, 1993). Pada anak tikus umur 4 hari (postnatal 4/P4), sel Purkinje muda membentuk deretan satu lapis sel dengan posisi tepat di bawah EGL, dan selanjutnya dari dendrit sel Purkinje tumbuh dan berkembang membentuk percabangan (Darmanto *et al.*, 2000, Darmanto *et al.*, 1998, Wetts and Herrup, 1982). Pada saat cerebellum berkembang, pada tahap ini sangat sensitif terhadap radiasi sinar X.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa radiasi sinar-X pada anak tikus umur 4 hari (P4), yaitu saat setelah sel Purkinje menempati satu lapis sel menunjukkan kelainan foliasi yang sangat minim (Darmanto *et al.*, 2000), namun kami tidak mengamati bagaimana kondisi posisi dan perkembangan sel Purkinje akibat radiasi sinar-X.

Oleh karena itu penelitian dirancang untuk mendemonstrasikan perkembangan sel Purkinje setelah radiasi sinar-X pada saat anak tikus berumur 4 hari, yaitu setelah sel Purkinje terbentuk satu lapis.

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan Percobaan

Delapan induk tikus putih bunting strain Std:Wistar/ST ditempatkan dalam kandang terbuat dari *stainless steel* diletakkan dalam rumah hewan, temperatur ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), kelembapan relatif ($50 \pm 10\%$) dan jadwal perubahan gelap/terang selama 12 jam. Tikus diberi makanan standar (CE-2, CLEA, Japan) dan air minum *ad libitum*. Tikus bunting dibiarkan melahirkan dan menyusui anaknya.

Cara Kerja

Anak tikus umur empat hari (P4), diradiasi sinar-X seluruh tubuhnya dengan dosis 2,5 Gy pada pk 10.00 pagi. Faktor radiasi diatur dengan 140 kVp, 5 mA, dengan diberi filtrasi radiasi yaitu logam Al ketebalan 0,5 mm Cu + 0,5 mm 10 a.m. Untuk memperoleh distribusi dosis

yang merata, tikus ditempatkan pada kotak plastik di atas papan yang dapat berputar selama diradiasi (iradiasi) dengan kecepatan 4 rpm. Kontrol anak tikus diperlakukan dengan kondisi yang sama hanya tidak diradiasi dengan sinar-X.

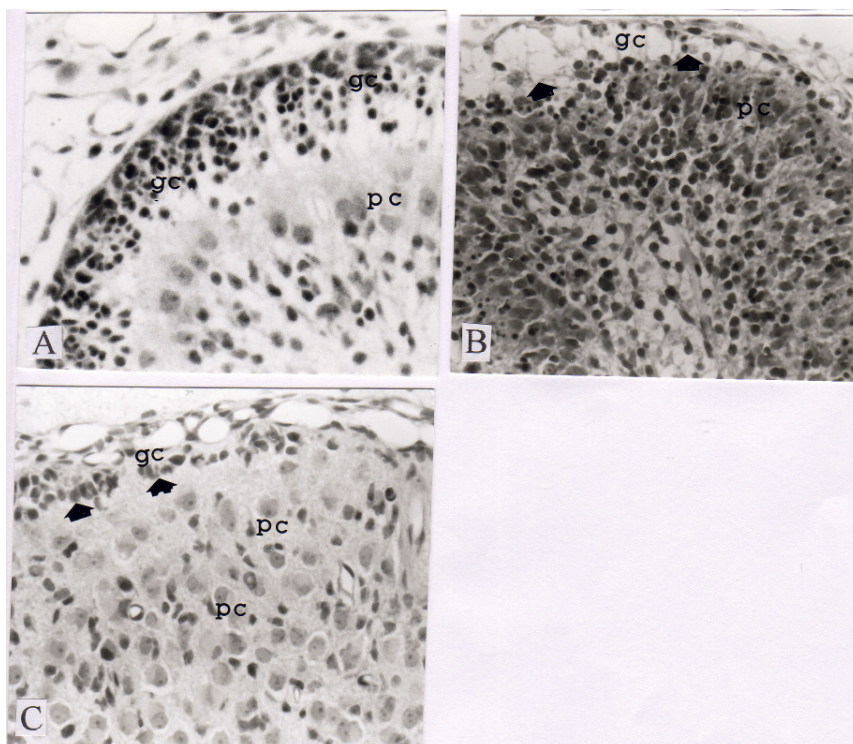
Penelitian ini menggunakan delapan induk mencit (delapan keturunan anak tikus) yang dibagi menjadi dua kelompok kontrol dan kelompok iradiasi. Anak tikus baik kontrol maupun iradiasi dibunuh dengan cara dianestesi dengan *diethyl ether*, diperfusi melalui jantung dengan larutan *formaldehyde* 4%, selanjutnya difiksasi dengan larutan yang sama selama semalam. Pengambilan cerebellum pada anak tikus, dilakukan setiap hari setelah iradiasi yaitu anak tikus umur lima hari (P5) sampai anak tikus umur 20 hari (P20) dan dewasa. Setelah difiksasi, cerebellum didehidrasi, embeding dengan parafin dan dibuat sayatan secara berseri pada posisi *mid-sagittal* dengan ketebalan 5 mm. Sayatan tersebut diwarnai dengan hematoxilin dan eosin (HE) dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

Pemeriksaan secara imunohistokimia digunakan anti inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor, untuk mendeteksi sel Purkinje. Pemeriksaan secara imunohistokimia diambil 2 sampai 3 sayatan untuk setiap cerebellum yang dipilih dari rangkaian pita sayatan. Sayatan dimasukkan larutan xylene untuk mengeluarkan parafin, rangkaian alkohol dengan

konsentrasi berseri dari tinggi ke rendah untuk tujuan hidrasi, dan diinkubasi ke dalam rangkaian larutan sebagai berikut: (1) methanol 80% yang mengandung 0,6% H_2O_2 ; (2) dalam 0,1 M *phosphate-buffered saline* (PBS), pH 7,0 mengandung 0,3% Triton X-100 selama 30 menit; (3) dalam 10% serum kambing normal pada temperatur kamar selama 10 menit; (4) dalam anti-IP3 *receptor antibody*, 4C11 (Maeda, *et al.*, 1988) diencerkan dalam PBS sebesar 1: 100, diletakkan pada temperatur 4° C selama semalam; (5) dalam *biotinylated universal secondary antibody* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pada temperatur kamar selama 30 menit; (6) dalam *peroxidase-conjugated streptavidin* (Vector Laboratories) pada temperatur kamar selama 50 menit; dan (7) direaksikan dengan 0,02% larutan *diaminobenzidine/DAB* (Vector Laboratories) dan 0,006% H_2O_2 pada temperatur kamar selama 5–10 menit. Sayatan selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan rangkaian alkohol berseri, dan *mounting* (penutupan dengan *cover glass*). Sayatan yang telah kering diamati dengan mikroskop cahaya.

HASIL

Kematian sel granulosa di bagian *External Granular Layer* (EGL) setelah iradiasi sinar-X. Akibat iradiasi sinar-



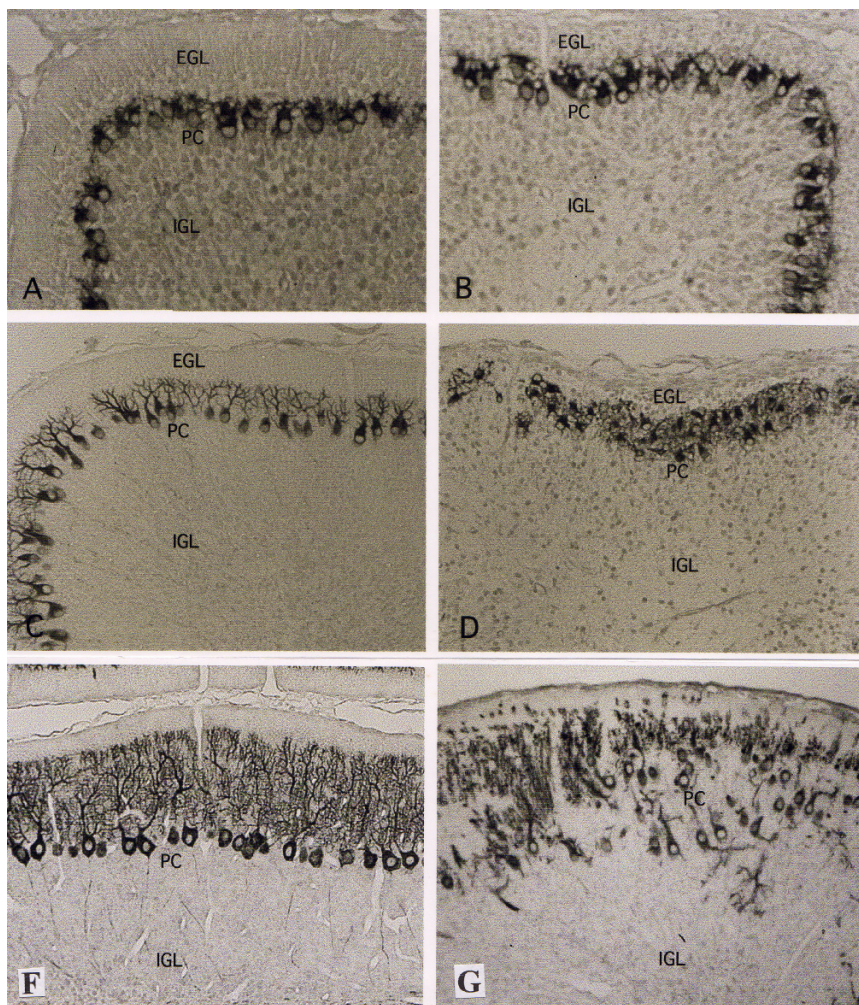
Gambar 1. Kerusakan cerebellum di daerah EGL berupa kematian sel granulosa akibat iradiasi sinar-X, diamati dengan pewarnaan hematoxilin eosin. A: Histologi cerebellum anak tikus kontrol, sel granulosa tersusun antara 5–9 sel. B: Histologi cerebellum anak tikus 24 jam setelah iradiasi, kematian sel granulosa di EGL ditandai dengan adanya kondensasi sel dan kerusakan jaringan korteks. gc: *granular cell*; pc: *Purkinje cell*. Perbesaran 100×

X pada cerebellum diamati pada potongan mid-sagital dari bagian vermis anterior dan dorsal dari fisura skunder dari cerebellum. Gambar 1 menunjukkan adanya kerusakan jaringan kortek cerebellum akibat efek akut dari radiasi sinar-X. Efek akut tersebut berupa kematian sel granulosa di bagian EGL, sehingga terlihat kerusakan jaringan di daerah EGL, teramati sangat jelas pada selang waktu 24 jam setelah iradiasi. (Gambar 1B). Pada cerebellum kontrol, daerah kortek cerebellum tersusun oleh sel granulosa dengan susunan ketebalan sel granulosa sekitar 8–10 sel (Gambar 1A). Tidak terlihat adanya kematian sel Purkinje akibat radiasi sinar-X ini, sehingga diduga sel Purkinje ini sangat resisten terhadap radiasi sinar-X. Tiga hari setelah iradiasi (P7), sisa

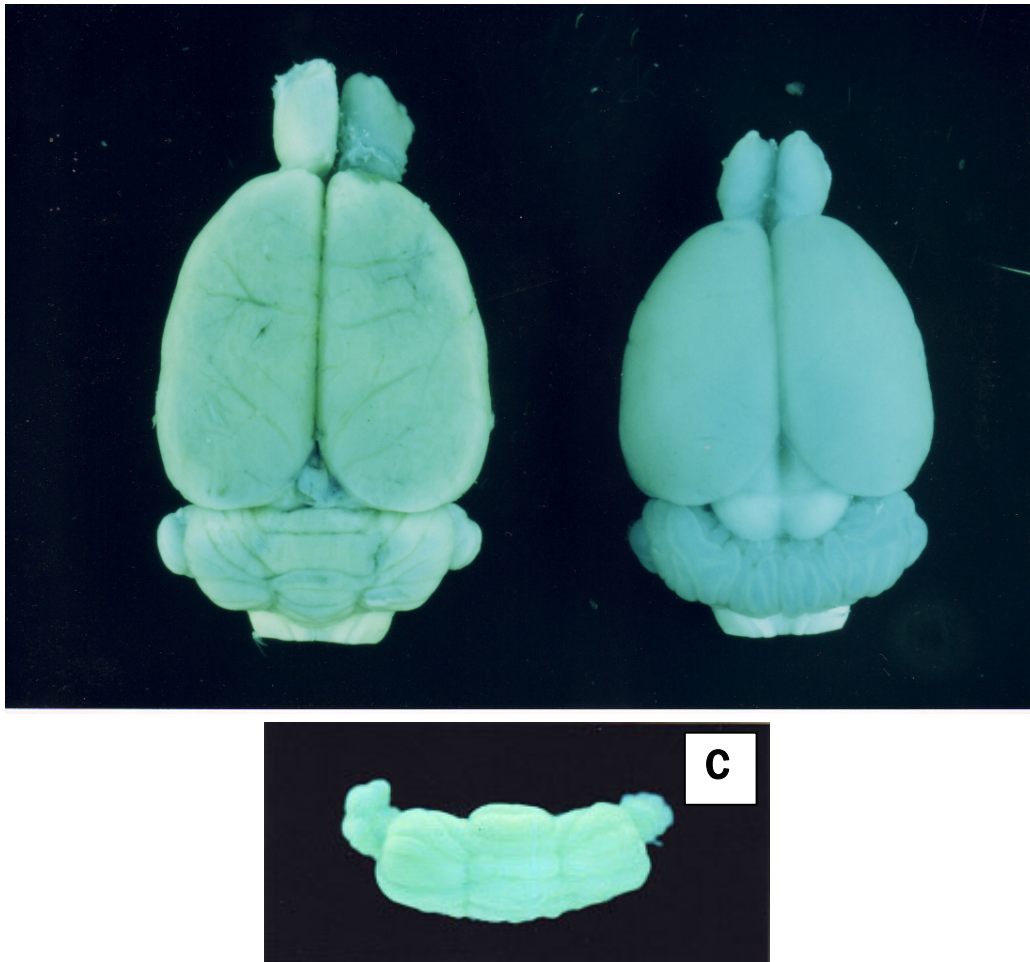
sel granulosa yang masih hidup menunjukkan variasi yang tinggi di antara beberapa bagian di dalam cerebellum, yaitu sekitar ketebalannya 1–3 sel granulosa menyusun bagian korteks cerebellum, beberapa bagian menunjukkan sel granulosa mati semua, sehingga tidak tampak adanya sel granulosa. (Gambar 1C).

Kondisi sel Purkinje heterotopik pada cerebellum tikus setelah iradiasi sinar-X masa postnatal

Gambar 2 menunjukkan perkembangan sel Purkinje setelah iradiasi sinar-X. 24 jam setelah iradiasi sinar X (anak tikus umur 5 hari/P5), susunan sel Purkinje tidak



Gambar 2. Immuhistokimia terhadap *IP3 receptor* pada anak mencit umur 5, 7, dan 12 hari. A: Cerebellum tikus kontrol umur 5 hari, susunan sel Purkinje membentuk satu deret sel dengan kuncup dendrit mulai tumbuh normal. B: Cerebellum tikus iradiasi, susunan sel Purkinje masih belum berubah, dengan susunan sama dengan kontrol. C: Cerebellum tikus kontrol umur 7 hari (P7) dendrit sel Purkinje tumbuh sempurna, sedangkan pada tikus iradiasi (D) dendrit tidak tumbuh dan susunan sel Purkinje kembali tidak teratur membentuk beberapa lapis sel, seperti pada masa akhir kehamilan (UK 21 hari). E: Cerebellum tikus kontrol umur 12 hari (P12) sel Purkinje tumbuh sempurna, sedangkan pertumbuhan sel Purkinje tikus iradiasi semakin tidak normal baik posisi (heterotopik) maupun dendritnya. Perbesaran 500X. EGL: *external granular layer*; PCL: *Purkinje cell layer*; IGL: *internal granular layer*.



Gambar 3. Perbandingan pola arah foliasi pada (anak panak); (A) cerebelum tikus dewasa kontrol dan (B) tikus iradiasi masa prenatal (pada umur kehamilan 21 hari/UK 21 hari (C) tikus yang iradiasi sinar X pada postnatal (saat anak mencit umur 4 hari/P4). Scale bars = 225 mm

menunjukkan perbedaan jelas antara kontrol dengan kelompok iradiasi sinar-X (Gambar 2B). Sel Purkinje baik pada kontrol maupun perlakuan menunjukkan susunan yang normal yaitu satu lapis sel dengan kuncup dendrit mengarah ke permukaan cerebellum (Gambar 2A, B). Namun tiga hari setelah iradiasi (P7) susunan sel Purkinje mulai terganggu (tidak teratur) dan beberapa arah dendrit sel Purkinje terbalik dan sebagian mengalami retardasi (kelambatan perkembangan). Sedangkan pada kontrol, anak mencit mulai umur 5 hari, sel Purkinje sudah membentuk satu lapis. Pada umur 7 hari (P7) dendrit sel Purkinje berkembang sempurna (Gambar 2C). Pada P12 sel Purkinje hampir berkembang lengkap (Gambar 2E), sedangkan pada cerebellum iradiasi, dendrit sel Purkinje tetap tidak berkembang, ditandai dengan beberapa dendrit mengalami retardasi dengan cabang dendrit yang sangat sedikit dan pendek (Gambar 2F).

Pengamatan terhadap patogenesis terjadinya foliasi abnormal pada cerebellum, dilakukan dengan cara; anak tikus iradiasi dipelihara sampai dewasa dan selanjutnya pola foliasi dimati pada saat dewasa. Hasil pengamatan pola foliasi pada anak tikus iradiasi setelah dewasa menunjukkan adanya arah foliasi yang normal (Gambar 3B). Tidak nampak adanya gangguan yang jelas pada pola arah foliasi tikus iradiasi tersebut, meskipun ukuran cerebellum terlihat lebih kecil bila dibandingkan dengan cerebellum kontrol. Hal ini sangat berbeda bila pada pola arah foliasi cerebellum tikus yang diradiasi sinar X pada UK 21 hari (Gambar 3C) (Darmanto *et al.*, 2000).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sel Purkinje membentuk susunan satu lapis setelah anak tikus umur 4 hari, dan pada tahap ini pola foliasi normal telah dibentuk, walaupun kondisi sel Purkinje telah berubah lagi menjadi tidak teratur.

PEMBAHASAN

Pengamatan dengan menggunakan imunohistokimia, penelitian ini mendemonstrasikan serangkaian perubahan seluler pada cerebellum tikus akibat radiasi sinar-X masa postnatal, yaitu anak tikus umur 4 hari, tahap dimana sel Purkinje mulai membentuk satu lapis sel.

Iradiasi sinar-X menyebabkan efek akut berupa kematian sel granulosa di daerah EGL dan adanya proses pemulihan juga telah diperelajari sebelumnya (Darmanto *et al.*, 2000; Darmanto, 2003). Pada penelitian ini iradiasi dilakukan pada anak tikus umur 4 hari (P4) yaitu pada saat tahap sel Purkinje telah membentuk susunan satu lapis sel dengan kuncup dendrit menghadap permukaan cerebellum. Sel Purkinje terlihat resisten terhadap efek radiasi sinar-X menyebabkan kematian sel, namun akibat iradiasi perkembangan sel menjadi terganggu, yaitu kembali membentuk susunan yang tidak teratur, terlihat lebih dari satu lapis sel dan menunjukkan pertumbuhan dendrit tidak normal. Kondisi ini sebagian mengalami pemulihan pada saat dewasa, namun tidak lengkap sempurna, yaitu susunan lapisan sel Purkinje tidak teratur sebagian mengalami heterotopik pada daerah IGL dengan orientasi percabangan dendrit tidak normal.

Altman and Bayer 1985, menunjukkan bahwa pada mamalia yang baru lahir, dendrit lateral (*perisomatic processes*) dari sel Purkinje berkembang dalam tiga dimensi. Dari hasil pengamatan Altman and Bayer 1985, juga menunjukkan bahwa pada masa anak tikus baru lahir, kuncup apikal dendrit masih mengalami pertumbuhan tiga dimensi. Pada penelitian ini disorientasi sel Purkinje pada cerebellum tikus iradiasi mulai sekitar 3 hari setelah iradiasi (anak tikus umur 7 hari). Kami menduga bahwa saat terjadi kerusakan EGL atau sel granulosa banyak mengalami kematian, seperti pada anak tikus umur 7 hari, dapat menyebabkan perubahan orientasi arah perkembangan sel Purkinje.

Sebelumnya kami telah berhasil mendemonstrasikan bahwa iradiasi sinar X saat akhir kehamilan (umur kehamilan ke-21/UK 21 hari) pada mencit menyebabkan kematian sel granulosa pada EGL, dan menyebabkan penurunan protein Reelin pada tahap awal perkembangan anak tikus. Kekurangan protein Reelin pada tahap awal perkembangan cerebellum ini menyebabkan sel Purkinje salah orientasi dan salah letak (heterotopik) yang bersifat permanen (Darmanto *et al.*, 2000, Darmanto, 2003; Darmanto, 2004). Kami juga menduga bahwa abnormal foliasi pada cerebellum akibat iradiasi sinar-X pada UK 21 hari, nampak sebagai akibat dari posisi sel Purkinje yang tidak normal (Darmanto *et al.*, 2000). Pada UK 21 hari calon

sel Purkinje bermigrasi dari daerah ventrikuler menuju ke daerah korteks dari cerebellum hampir selesai, namun sel Purkinje masih membentuk multilayer (Altman and Bayer, 1978, Goffinet *et al.*, 1984) Iradiasi sinar-X pada tahap ini menginduksi foliasi abnormal. Namun, jika anak tikus diradiasi sinar-X pada umur 4 hari (P4) dengan dosis yang sama menunjukkan perkembangan foliasi yang menyerupai normal, walaupun sel granulosa di daerah EGL sebagian banyak mengalami kematian. Sehingga masa kritis untuk perkembangan foliasi cerebellum adalah masa akhir kebuntingan sampai masa awal kelahiran yaitu saat sel Purkinje tersusun satu lapis sel.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa iradiasi sinar-X pada P4 menyebabkan kematian sel granulosa di daerah EGL dan diikuti dengan susunan sel Purkinje abnormal, namun pola foliasi cerebellum terlihat mendekati normal. Penemuan ini merupakan fakta baru yang memperkuat hasil penelitian sebelumnya bahwa tahap akhir kehamilan adalah masa kritis dalam memunculkan pola abnormal foliasi dari cerebellum.

UACAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian dikerjakan di laboratorium Teratologi dan Genetik, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Japan, dengan biaya dari Monbukagakusho dan JSPS Japan. Oleh karena itu dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-sebesarnya kepada para pembimbing kami yaitu: Prof. Dr. Yoshiharu Murata dan Prof. Minoru Inouye, Ph.D. yang telah memberi kesempatan dan bimbingan dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Altman J and Bayer SA, 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat I. cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *Journal of Comparative and Neurology*. 179:23–48.
- Altman J and Bayer SA, 1985. Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *Journal of Comparative and Neurology*. 231:27–41.
- Darmanto W, 2004. Tingkat kelainan sel Purkinje heterotopik hubungannya dengan perbedaan sensitivitas antara lobus anterior dan posterior dari cerebellum tikus terhadap radiasi sinar-X. *Berkala Penelitian Hayati*. 9 (2):93–98.
- Darmanto W, 2003. Perbedaan ekspresi protein reelin antara lobus anterior dan posterior dari cerebellum tikus putih akibat radiasi sinar-X masa pralahir. *Journal of Mathematics and Science*. 8(2):105–110.

- Darmanto W, Inouye M, Hayasaka S, Takagishi Y, Aolad HM, Ogawa M, Mikoshiba K, and Murata Y, 1998. Abnormal foliation of the rat cerebellum following prenatal exposure to X-radiation. *Teratology*. 57:227.
- Darmanto W, Inouye M, Takagishi Y, Ogawa M, Mikoshiba K, Murata Y, 2000. Derangement of Purkinje Cells in the rat cerebellum Following Prenatal Exposure to X-Irradiation: Decreased Reelin Level is Possible Cause. *Journal Neuropathology and Experimental Neurology*. 59:245–256.
- Darmanto W, 2000. Kelainan migrasi sel granulosa dan kelainan foliasi pada cerebellum tikus putih akibat radiasi sinar-X. *Journal of Mathematics and Science*. 5(3):
- Goffinet AM, So KF, Yamamoto M, Edwards M, Caviness VS, 1984. Architectonic and hodological organization of the cerebellum in reeler mutant mice. *Development Brain Research*. 16:263–276.
- Inouye M, 1979. Cerebellar malformations in prenatally X-irradiated rats: quantitative analysis and detailed description. *Teratology*. 20:353–364.
- Inouye M, Hayasaka S, Funahashi A, and Yamamura H, 1992. Gamma-radiation produces abnormal Bergman fibers and ectopic granule cells in mouse cerebellar cortex. *Journal Radiation Research*. 33:275–281.
- Maeda N, Niinobe M, Nakahira K, and Mikoshiba K, 1988. Purification and characterization of P400 protein, a glycoprotein characteristic of Purkinje cell, from mouse cerebellum. *Journal Neurochemical*. 51:1724–30.
- Wetts R and Herrup K, 1982. Cerebellar Purkinje cells are descended from a small number of progenitors committed during early development: Quantitative analysis of Lurcher chimeric mice. *Journal Neuroscience*. 2:1494–1498.
- Yuasa S, Kitoh J, Oda SI, Kawamura K, 1993. Obstructed migration of Purkinje cells in the developing cerebellum of the reeler mutant mouse. *Anatomy and Embryology*. 188:317–329.