

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### **2.1 *Lupus Eritematosus Sistemik (LES)***

##### **2.1.1 Definisi LES**

Penyakit autoimun adalah penyakit akibat kelompok kondisi peradangan kronis yang mempengaruhi jutaan orang di seluruh dunia dan disebabkan oleh respon imun yang tidak toleran terhadap jaringan tubuh sendiri. Salah satu penyakit autoimun adalah LES, yang merupakan penyakit peradangan jaringan ikat multisistem dengan angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi (Miranda, 2010). LES merupakan penyakit autoimun kronis dan kompleks (Zhu *et al.*, 2007). Menurut Perhimpunan Reumatologi Indonesia (2011), LES adalah penyakit inflamasi autoimun kronis yang belum jelas penyebabnya dengan gambaran klinis luas dan perjalanan penyakit yang beragam. Terdapat banyak bukti bahwa patogenesis LES bersifat multifaktor yang melibatkan faktor lingkungan, genetik, dan hormonal (Mok and Lau, 2003). Penyakit ini terutama menyerang wanita usia reproduktif dengan rasio wanita dibanding pria adalah 8:1 hingga 9:1 (Mok and Lau, 2003; Zhu *et al.*, 2007). Prevalensinya pun bervariasi antara 12,5 hingga 39 per 100.000 populasi. Begitu juga insidensinya bervariasi antara 1,8 sampai 7,6 kasus per 100.000 orang per tahun. Secara keseluruhan, prevalensi dan insiden lebih tinggi pada wanita dibanding pria (Rus, 2007). Data terakhir yang ada di Indonesia adalah penelitian dari Kalim (2000) yang menunjukkan bahwa penderita LES di Indonesia mempunyai harapan hidup yang masih rendah yakni 5 tahun 70% dan 10 tahun 50% (Kalim, 2000).

### 2.1.2 Epidemiologi LES

Prevalensi LES diberbagai Negara sangat bervariasi antara 2.9/100.000-400/100.000. dalam 30 tahun terakhir. Menurut The Lupus Foundation of America perkiraan sekitar 1,5 juta kasus terjadi di Amerika dan setidaknya terjadi lima juta kasus di dunia. Setiap tahun terjadi sekitar 16 ribu kasus baru lupus. LES telah menjadi salah satu penyakit reumatik utama di dunia. LES lebih sering ditemukan pada ras tertentu seperti bangsa Negro, Cina dan mungkin juga Filipina. Faktor ekonomi dan geografi tidak mempengaruhi distribusi penyakit. Di Indonesia, jumlah pasien LES 200.000 pasien dari perkiraan sekitar 5 juta orang yang terkena LES di Dunia (Wardoyo, 2006). Prevalensi Systemic Lupus Erythematosus (LES) di masyarakat berdasarkan survei yang dilakukan oleh Kalim dkk, 2000, di Malang memperlihatkan angka sebesar 0,5% terhadap total populasi.

LES dapat ditemukan pada semua usia, namun paling banyak pada usia 15-40 tahun (masa reproduksi). Frekuensi pada wanita dibandingkan dengan pria yaitu berkisar (5,5-9) : 1 (Isbagio *et al.*, 2009). Wanita lebih sering terkena penyakit LES dibandingkan dengan laki-laki. Hal tersebut dapat disebabkan karena faktor hormonal, dimana meningkatnya angka kejadian penyakit LES sebelum periode menstruasi atau selama kehamilan mendukung dugaan bahwa hormon, khususnya estrogen menjadi pencetus penyakit LES. Namun menurut data kemenkes tahun 2016, hingga saat ini belum diketahui secara pasti peran hormon yang menjadi penyebab besarnya prevalensi LES pada perempuan pada periode tertentu.

### 2.1.3 Etiopatogenesis LES

Etiopatologi dari LES belum diketahui secara pasti namun diduga melibatkan interaksi yang kompleks dan multifaktorial antara variasi genetik dan

faktor lingkungan. Interaksi antara jenis kelamin, status hormonal dan aksi Hipotalamus-Hipofisis-Adrenal (HPA) juga mempengaruhi kepekaan dan ekspresi klinis LES. Respon imun yang terpapar faktor eksternal atau lingkungan seperti radiasi ultraviolet atau infeksi virus dalam periode yang cukup lama bisa menyebabkan disregulasi sistem imun. Gangguan dalam mekanisme pengaturan imun seperti gangguan pembersihan sel-sel apoptosis dan pembentukan kompleks imun yang merupakan kontributor yang penting dalam perkembangan penyakit ini. Selain itu juga terjadi hilangnya toleransi imun, sehingga meningkatkan beban antigenic dan bantuan sel T yang berlebihan, mengakibatkan peralihan respon imun dari T helper 1 (Th1) ke Th2. Hal tersebut menyebabkan hiperaktifitas sel B dalam memproduksi autoantibodi patogenik (Isbagio *et al.*, 2009)

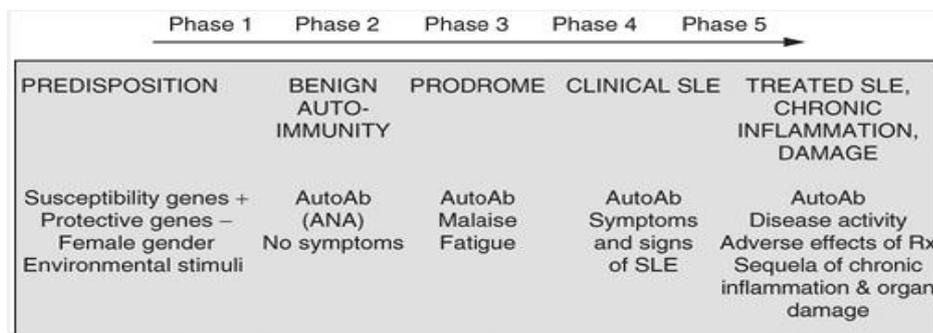
Terdapat banyak bukti bahwa patogenesis LES bersifat multifaktoral seperti faktor genetik, faktor lingkungan, dan faktor hormonal terhadap respons imun. Faktor genetik memegang peranan pada banyak penderita lupus dengan resiko yang meningkat pada saudara kandung dan kembar monozigot. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa banyak gen yang berperan terutama gen yang mengkode unsur-unsur sistem imun. Diduga berhubungan dengan gen respons imun spesifik pada kompleks histokompatibilitas mayor kelas II, yaitu HLA-DR2 dan HLA-DR3 serta dengan komponen komplemen yang berperan dalam fase awal reaksi ikat komplemen ( yaitu C1q, C1r, C1s, C4, dan C2) telah terbukti. Gen-gen lain yang mulai ikut berperan adalah gen yang mengkode reseptor sel T, imunoglobulin dan sitokin. (Isbagio, *et al.*, 2009)

Studi lain mengenai faktor genetik ini yaitu studi yang berhubungan dengan HLA (*Human Leucocyte Antigens*) yang mendukung konsep bahwa gen MHC (*Major Histocompatibility Complex*) mengatur produksi autoantibodi spesifik. Penderita lupus (kira-kira 6%) mewarisi defisiensi komponen

komplemen, seperti C2, C4, atau C1q. Defisiensi komplemen dapat merusak pelepasan kompleks imun oleh sistem fagositosis mononuklear sehingga membantu terjadinya deposisi jaringan. Defisiensi C1q menyebabkan sel fagosit gagal membersihkan sel apoptosis sehingga komponen nuklear akan menimbulkan respon imun (Manson and Isenberg, 2001).

#### 2.1.4 Patofisiologi dan Aktivasi Respon imun pada Pasien LES

Menurut Hahn (2007), individu akan menderita LES melalui beberapa tahapan yang panjang (Gambar 2.1). Gejala akan muncul dalam hitungan bulan sampai tahun.



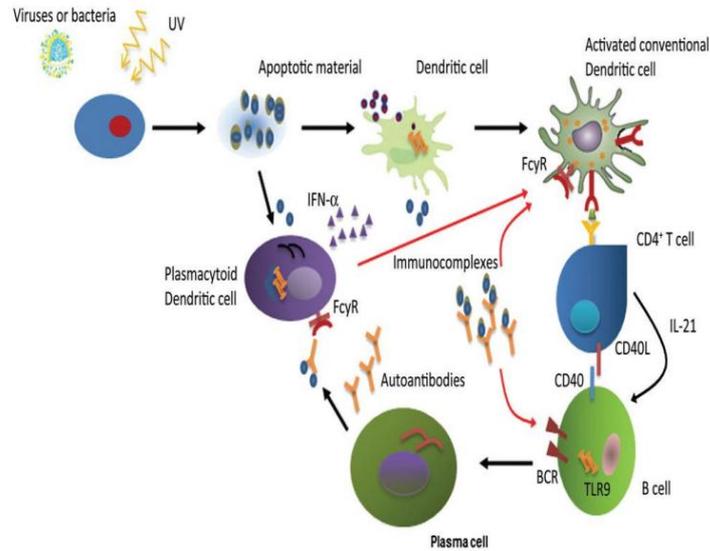
**Gambar 2.1. Lima fase pada Lupus eritematosus sistemik (Hahn, 2007)**

Meskipun patogenesis penyakit ini masih belum jelas namun terdapat bukti-bukti adanya disregulasi sistem imun yang melibatkan sel T, sel B, monosit, serta sel T regulator. Dimana dimulai dari berbagai macam pencetus termasuk lingkungan, genetik, neuroendokrin, dan jenis kelamin (Bertsias *et al.*, 2012). Pencetus tersebut akan mengakibatkan disregulasi respon imun dengan hilangnya *self-tolerance* secara global sehingga terjadi sel T yang autoreaktif, gangguan supresi sel B dan peralihan respons imun dari *T helper 1* (Th1) ke Th2 yang menyebabkan hiperaktivitas sel B dan memproduksi autoantibodi patogenik (Choi *et al.*, 2012).

Autoantibodi merupakan kelainan imunologis yang menjadi dasar pathogenesis dari LES. Meskipun autoantibodi merupakan efektor utama pada

LES, namun tidak cukup menimbulkan gejala penyakit, sehingga penumpukan autoantibodi di jaringan membutuhkan aktivasi sistem komplemen dan atau mediator inflamasi lainnya, serta kemotaksis limfosit dan polimorfonuklear, pelepasan sitokin, kemokin, enzim proteolitik, sehingga menyebabkan kerusakan organ (Hahn, 2013). Ketidakseimbangan sitokin ini sangat berperan dalam patogenesis LES (Guiducci *et al.*, 2010)

Autoantibodi adalah suatu antibody yang dapat menyerang antigen diri sendiri yang terdapat di dalam tubuh (Wallace, *et al.*, 2007). Autoantibodi akan menyerang selfantigen, khususnya antigen nucleus ataupun antigen yang terdapat disitoplasma ketika antigen tersebut terpapar ke ekstraseluler. Terpaparnya antigen-antigen tersebut ke ekstraseluler terjadi karena adanya gangguan klirens dari apoptosis. Sel yang terapoptosis normalnya akan dieliminasi dengan cepat oleh sistem imun sehingga tidak menginduksi terjadinya respon imun atau inflamasi. Imunopatogenesis LES dapat dijelaskan melalui berbagai tahapan, seperti ditunjukkan pada gambar 2.2



**Gambar 2.2 Immunopatogenesis LES**

Produksi autoantigen mengalami peningkatan selama terjadi apoptosis baik terkait dengan paparan sinar ultraviolet dan atau spontan akan mengawali stimulasi respon sistem imun *innate* dan adaptif. Nukleosom mengandung ligan endogen yang dapat mengikat *pathogen associated molecule pattern* yang bergabung dengan *blebs* apoptosis yang memicu aktivasi sel dendritik untuk memproduksi interferon dan memicu sel B untuk memproduksi autoantibodi (Bertsias *et al.*, 2012).

Sel makrofag atau monosit, sel dendritik dan sel limfosit B berproses dan mempresentasikan antigen (APC). Sel-sel pada sistem imun *innate* diaktifasi melalui jalur TLR (*toll like receptors*) oleh protein DNA atau RNA. Sel dendritik teraktivasi, berubah dari tolerogenik menjadi sel dendritik pro inflamasi yang mensekresi sitokin inflamasi (IFN $\alpha$ ), sel makrofag/monosit mensekresi TNF- $\alpha$  dan IL-1, IL-12, serta IL-23. Sitokin tersebut merupakan hasil aktivasi sel T efektor yang membantu sel B membuat imunoglobulin G yang bersifat autoantibodi, menginfiltrasi jaringan dan bersifat sitotoksik. Aktivasi sel limfosit B secara langsung oleh DNA/RNA melalui jalur TLR dan IFN $\alpha$ , dibantu oleh sel T untuk mensekresi autoantibodi juga maturasinya menjadi sel plasma oleh BlyS (*B-lymphocyte stimulator*) atau BAFF (*B cell-activating factor*), IL-6, dan beberapa sitokin lainnya (Hahn, 2013).

Pada pasien LES juga ditemukan defek pada produksi sitokin. Penurunan produksi IL-1 dan IL-2 berpengaruh terhadap fungsi sel T dan sel B. Terdapat bukti bahwa sel B pasien LES lebih sensitif terhadap stimulasi sitokin seperti IL-

6. Jumlah sel B didapatkan meningkat di darah tepi pada setiap tahapan aktivasinya. Sintesis dan sekresi autoantibodi pada pasien LES diperantarai oleh interaksi antara sel T helper dan double negative T cells dengan sel B. Terjadi kegagalan fungsi dari aktivitas supresi sel T suppressor dan sel NK terhadap aktivitas sel B. Sel T dan sel NK pada pasien LES tidak mampu mengatur sintesis dari imunoglobulin poliklonal dan produksi autoantibodi. Disamping itu ditemukan pula penurunan respon sel T terhadap IL-2 yang mengakibatkan fungsinya menurun sehingga fungsi sel Th seakan lebih meningkat. Sebaliknya hiper aktivitas sel B dapat disebabkan oleh hipersensitivitas sel Th terhadap IL-2 (Mok and Lau, 2003; Dean *et al.*, 2000).

Saat ini ditemukan bahwa IL-10 juga memegang peranan penting dalam patogenesis LES. IL-10 merupakan sitokin dari Th2 yang bekerja sebagai stimulasi yang kuat dari proliferasi dan diferensiasi sel B dan mediator yang penting dari aktivasi sel B poliklonal pada LES. Produksi IL-10 dan konsentrasi IL-10 plasma lebih tinggi pada pasien LES dan ini berkorelasi dengan aktivitas penyakit. Pada pasien LES juga terjadi kegagalan dalam produksi IL-12. Sehingga diduga adanya disregulasi dari keseimbangan IL-10 dan IL-12 memegang peranan penting terhadap gagalnya respon imun selular pada pasien LES (Mok and Lau, 2003; Dean *et al.*, 2000).

Pada pasien LES terjadi gangguan proses klirens dari sel yang terapoptosis ini sehingga bagian akhir dari sel terapoptosis yang disebut dengan *apoptotic bodies* akan ditemukan banyak pada jaringan tubuh pasien LES (Shao dan Cohen, 2011). Apoptotic bodies ini mengandung berbagai macam self antigen dan dapat menginduksi berbagai macam sinyal yang kemudian akan dikenali oleh sistem imun dan autoantibody sehingga membentuk kompleks imun. Diduga terbentuknya kompleks imun ini merupakan inti dari imunopatologis LES. Pembersihan dari kompleks imun oleh sistem fagosit-makrofag juga

mengalami gangguan sehingga akan menghambat eliminasi kompleks imun dari sirkulasi dan jaringan. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya penumpukan kompleks imun tersebut di sendi, ginjal, kulit, pleksuskoroid di otak, dan jaringan lainnya yang tentu saja dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan jaringan secara sistemik (Anolik, 2007).

Meningkatnya apoptosis pada LES menyebabkan meningkatnya kebocoran antigen intraseluler yang dapat merangsang respon autoimun dan berpartisipasi dalam pembentukan kompleks imun. Dalam keadaan normal sel-sel yang mengalami apoptosis akan dimakan oleh makrofag pada fase awal dari apoptosis tanpa merangsang terjadinya inflamasi dan respon imun. Terjadinya defek pada *clearance* dari sel-sel apoptosis diduga akibat dari defek dalam jumlah dan kualitas dari protein komplemen seperti C2, C4 atau C1q. Beberapa studi menunjukkan bahwa terjadinya autoantibodi pada LES akibat 2 perubahan mayor yaitu meningkatnya apoptosis limfosit dan monosit dalam sirkulasi dan kesalahan dalam pengenalan autoantigen yang dilepaskan selama apoptosis (Ballestar *et al.*, 2006).

### **2.1.5 Manifestasi Klinis LES**

Karakteristik LES berupa timbulnya abnormalitas sistem imun secara luas disertai kelainan banyak organ (Zhu *et al.*, 2007). Tanda utama LES adalah tingginya produksi autoantibodi terhadap antigen inti, seperti double-strand DNA (ds-DNA) dan kromatin, yang mengakibatkan kerusakan organ yang diperantarai antibodi (Zhu *et al.*, 2007; Lauwerys, 2003). Penderita LES umumnya mengeluh lemah, demam, malaise, anoreksia dan berat badan menurun. Manifestasinya bisa ringan, berat, bahkan sampai dapat mengancam jiwa (Wallace, 2007; Zhu *et al.*, 2007). Kematian biasanya disebabkan karena gagal ginjal atau oleh infeksi akibat pemberian imunoterapi (Baratawidjaja, 2003).

Wallace (2007) menggolongkan manifestasi klinis LES menjadi beberapa golongan, yaitu Gejala sistemik: demam, penurunan berat badan; Muskuloskeletal: arthritis, arthralgia, nodul subkutan, mialgia; Cardiorespiratory: miokarditis, kardiomegali, lupus pneumonia, pleurisy; Genitourinaria: sindroma nefrotik; Gastrointestinal: disfagia, nausea, diare, perdarahan; Hemic-lymphatic: anemia, adenopati, leucopenia; Serologis: hipoalbumin, positif palsu VDRL, ANA, anti-dsDNA, anti-SSA. Gejala yang muncul adalah bervariasi pada tiap pasien. LES sering juga mengalami overlap dengan gejala penyakit lain seperti skleroderma dan arthritis reumatoid. Pasien yang sedang mengonsumsi obat tertentu (hydralazine, procainamide) akan memberikan gambaran klinis yang samar.

#### **2.1.6 Autoantibodi Pada LES Dan Kaitannya Dengan Manifestasi Klinis**

Autoantibodi merupakan bagian integral dari proses klasifikasi dan deteksi beberapa penyakit yang diperantarai oleh autoimun. Antibodi antinuklear (ANA) ditemukan 40 tahun yang lalu dan diduga terdapat kaitan yang erat dengan LES. Antibodi antinuklear bukan hanya merupakan satu jenis antibodi, tetapi terdapat berbagai antibodi yang berbeda yang berkaitan dengan penyakit dan manifestasinya. ANA adalah antibodi terhadap inti sel baik membran inti maupun DNA. Target antigen sangat heterogen dan bervariasi dalam satu penyakit. Bervariasinya peranan biologi dari berbagai antibodi antinuklear maka tidak mungkin memperkirakan *outcome* klinis pasien hanya berdasarkan profil autoantibodi saja. Beberapa antibodi antinuklear (ANA) dikatakan spesifik berkaitan dengan manifestasi klinis aktivitas LES dapat dilihat pada tabel 2.1.

**Tabel 2.1 Antinuklear antibodi spesifik (Shmerling, 2003)**

<b>Antibodi Antinuklear Spesifik</b>
<b>Anti-ds-DNA</b> (anti-double-stranded DNA), specific for SLE, associated with activity of SLE and lupus nephritis
<b>Anti-Sm</b> (anti-Smith), specific for SLE, correlation with disease activity uncertain
<b>Anti-RNP</b> (also called anti-snRNP, or anti-small nuclear ribonucleoprotein), present in SLE, correlates with myositis, esophageal dysmotility, Raynaud's phenomenon, sclerodactyly, interstitial lung disease; a defining auto-antibody in mixed connective-tissue disease
<b>Anti-Ro</b> , associated with SLE, Sjögren's syndrome, neonatal lupus, photosensitive rash, subacute cutaneous lupus erythematosus
<b>Anti-La</b> , present in SLE (may be associated with reduced risk of nephritis), Sjögren's syndrome, neonatal lupus

ANA tes merupakan penapisan awal yang efektif pada pasien dengan gambaran klinis LES. Lebih lanjut pada pasien dengan ANA positif perlu dilakukan pemeriksaan jenis autoantibodi yang lebih spesifik seperti anti-dsDNA. Pada kriteria diagnosis LES menurut ACR 1982 disebutkan titer abnormal ANA tetapi tidak disebutkan nilai batas tersebut. Secara umum bisa dikatakan semakin tinggi titer ANA semakin berarti terutama pada pasien muda. Apabila ANA negatif maka kemungkinan LES sangat kecil. ANA negatif didapatkan pada 2% pasien LES dengan metode pemeriksaan yang saat ini ada yaitu yang menggunakan *human tissue culture cell* sebagai substrat, sedang apabila dengan menggunakan *rodent tissue substrate*, LES dengan ANA negatif bisa sampai 5%. Pada pasien LES dengan ANA negatif ini ternyata apabila diperiksa dengan ELISA yang sensitif didapatkan anti Ro dan La positif hampir 100%. Pada LES yang sebelumnya ANA positif bisa menjadi negatif saat remisi. Hal ini didapatkan pada 10-20 kasus terutama pasien yang mengalami gagal ginjal. Menghilangnya ANA pada pasien yang sebelumnya positif tidak bisa diasumsikan bahwa perjalanan LES sudah selesai. Hingga saat ini belum diketahui kaitan antara

tingginya titer ANA dengan manifestasi klinis, aktivitas penyakit maupun kecenderungan untuk terjadi kekambuhan. Metode pemeriksaan yang sering digunakan untuk pemeriksaan ANA adalah *indirectimmunofluorescence* dan ELISA. ANA yang paling memiliki makna klinis adalah IgG (Rahman. 2004; Sumariyono, 2003). Antibodi antinuklear juga positif pada sebagian kasus sindrom sjogren, scleroderma, *mixedconnective-tissue disease* dan LES yang diakibatkan oleh obat. Beberapa penyakit non rheumatik yang juga sering menunjukkan tes yang positif terhadap antibodi antinuklear meliputi penyakit infeksi seperti HIV, hepatitis virus. Penyakit tiroid oleh karena autoimun misalnya *graves disease, hashimoto thyroiditis* (Shmerling. 2003).

ANA tes yang positif pada pasien tanpa gejala klinis LES memerlukan interpretasi yang hati-hati. Dilakukannya skrining asimtomatik lebih sering memberi hasil yang *false positif* daripada *true positif* dan tidak memberikan perbaikan *outcome klinis* dan sebagian besar dari mereka ternyata tidak pernah menjadi LES. Sampai saat ini masih belum jelas bagaimana memperkirakan bahwa orang dengan hasil tes ANA positif tanpa gejala klinis yang cukup akan berkembang menjadi LES dan tidak ada terapi spesifik yang dapat dilakukan untuk pencegahan (Shmerling. 2003).

### **2.1.7 Diagnosis LES**

Diagnosis LES dapat ditegakkan berdasarkan gambaran klinik dan laboratorium. Kriteria kriteria terbaru LES adalah dari *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) tahun 2012. Kriteria SLICC 2012 adalah kriteria yang lebih kompleks dan dapat digunakan bila kriteria ACR tidak dapat mengklasifikasikan LES. Kriteria SLICC 2012 dijelaskan lebih lanjut pada Tabel 2.2. Diagnosis LES tegak jika didapatkan lebih dari sama dengan 4 kriteria (sedikitnya 1 kriteria klinis ditambah 1 kriteria laboratorium) atau jika didapatkan

biopsy ginjal lupus nefritis ditambah ANA atau anti-DNA yang positif (Petri *et al.*, 2012).

**Tabel 2.2 Kriteria SLICC 2012**

<b>Kriteria Klinis</b>	<b>Kriteria Imunologi</b>
1. Acute Cutaneous Lupus	1. ANA
2. Chronic Cutaneous Lupus	2. Anti-DNA
3. Ulkus mulut atau hidung	3. Anti-Sm
4. Alopesia tanpa skar	4. Antifosfolipid Ab
5. Artritis	5. Kadar komplemen yang rendah (C3, C4, CH50)
6. Serositis	6. Direct Coomb Test (Tidak dihitung jika ada hemolytic anemia)
7. Ginjal	
8. Neurologis	
9. Hemolytic anemia	
10. Leukopenia	
11. Trombositopenia	

### **2.1.8 Penatalaksanaan Penyakit LES**

Terapi LES menggunakan obat-obat immunosupresan dan steroid yang merupakan pengobatan standar yang hingga saat ini ternyata masih belum menunjukkan hasil memuaskan bahkan pemberian steroid dalam jangka panjang dapat menimbulkan banyak masalah pada pasien LES (Guiducci *et al.*, 2010). Selain itu, pengobatan LES terbaru dengan menggunakan agen biologis memang menunjukkan hasil yang lebih baik tetapi harga untuk obat tersebut masih sangat mahal dan tidak terjangkau oleh sebagian besar pasien LES di Indonesia. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode pengobatan maupun pencegahan baru yang dapat menginduksi dan memperbaiki regulasi sistem

imun terhadap *self antigen* sehingga meminimalkan resiko pengobatan konvensional dan memperbaiki kondisi klinis pasien LES secara maksimal (Kalim *et al*, 2013).

Metode terapi lain yang kini juga sedang dikembangkan untuk pasien autoimun adalah pemberian vaksin. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Uyttenhove tahun 2006 menunjukkan bahwa pemberian 10 µg vaksin kinoid IL-17A yang dikonjugasikan dengan OVA ternyata mampu menginduksi antibodi yang protektif terhadap IL-17A pada mencit autoimun ensefalitis. Antibodi anti-IL-17A tersebut juga dibuktikan mampu menginduksi netralisasi sitokin IL-17A secara bermakna.

## **2. 2 dsDNA**

Saat ini sudah ditemukan beberapa macam autoantibodi yang terdapat pada pasien LES, salah satunya adalah *double stranded DNA* (anti-dsDNA) Terbentuknya antibodi dsDNA ini berasal dari sel yang mengalami apoptosis (kematian). Pada pasien lupus biasanya didapatkan 70% positif, tetapi terkadang pada penderita lupus *dsDNA*-nya negative (Mok and Lau, 2003). Autoantibodi merupakan bagian integral dari proses klarifikasi dan deteksi beberapa penyakit yang diperantai oleh autoimun. Autoantibodi akan menyerang *self antigen*, khususnya antigen nucleus ataupun antigen yang terdapat di sitoplasma ketika antigen tersebut terpapar ke ekstraseluler bersama *Major Histocompatibility complex* (MHC) kelas-II. Terpaparnya antigen-antigen tersebut ke ekstraseluler terjadi karena adanya gangguan klirens dari apoptosis. Dalam keadaan normal, sel yang terapoptosis akan dieliminasi dengan cepat oleh makrofag pada sistem imun sehingga tidak menginduksi terjadinya respon imun atau inflamasi. Pada pasien LES, ditemukan terjadinya gangguan proses klirens dari sel yang terapoptosis ini sehingga bagian akhir dari sel terapoptosis yang disebut dengan *apoptotic bodies* akan ditemukan banyak pada jaringan tubuh

pasien LES (Shao dan Cohen, 2011). *Apoptotic bodies* ini mengandung berbagai macam *self antigen* dan dapat menginduksi berbagai macam sinyal yang kemudian akan dikenali oleh sistem imun dan autoantibodi sehingga membentuk kompleks imun. Diduga terbentuknya kompleks imun ini merupakan inti dari imunopatologis LES. Pembersihan (*clearance*) dari kompleks imun oleh sistem fagosit-makrofag juga mengalami gangguan pada LES sehingga akan menghambat eliminasi kompleks imun dari sirkulasi dan jaringan. Hal ini diduga akibat dari penurunan jumlah CR1 yang merupakan reseptor untuk komplemen dan terjadi gangguan fungsi dari reseptor pada permukaan sel. Gangguan *clearance* ini juga diduga akibat dari ketidakadekuatan fagositosis IgG2 dan IgG3 (Munoz *et al.*, 2005).

### **2.2.1 Self antigen dsDNA pada LES**

Penelitian terdahulu yang dilakukan *Christensen et al.*, (2005) menunjukkan bahwa *self antigen* dsDNA yang menjadi penyusun kompleks imun dapat memicu aktivasi plasmacytoid sel dendritik pada pasien LES sehingga terbentuk autoantibodi dsDNA. Normalnya, *self antigen* dsDNA bersifat non-immunogenik dan didegradasi ketika berada pada lingkungan ekstraselular. Namun, ketika *self dsDNA* bergabung dalam kompleks imun yang terdiri dari HNP dan LL37, *self antigen* dsDNA ini memiliki kemampuan untuk mengakses kompartemen intraselular dari plasmacytoid sel dendritik dan memicu aktivasi reseptor Toll-like, TLR7 dan TLR9 dan mengaktifkan sel B membentuk autoantibodi. Meskipun mekanisme ini masih belum bisa dijelaskan secara tepat (Means, 2005).

*Self-dsDNA* menjadi immunogenik dan memicu TLR9 di pDCs dengan cara membentuk kompleks dengan HNP dan peptida LL37 antimikroba (Zanetti, 2004). DsDNA, HNP dan LL37 dirilis oleh neutrofil yang mengalami NETosis dan melepaskannya dalam jumlah yang banyak pada ruang ekstraselular dalam

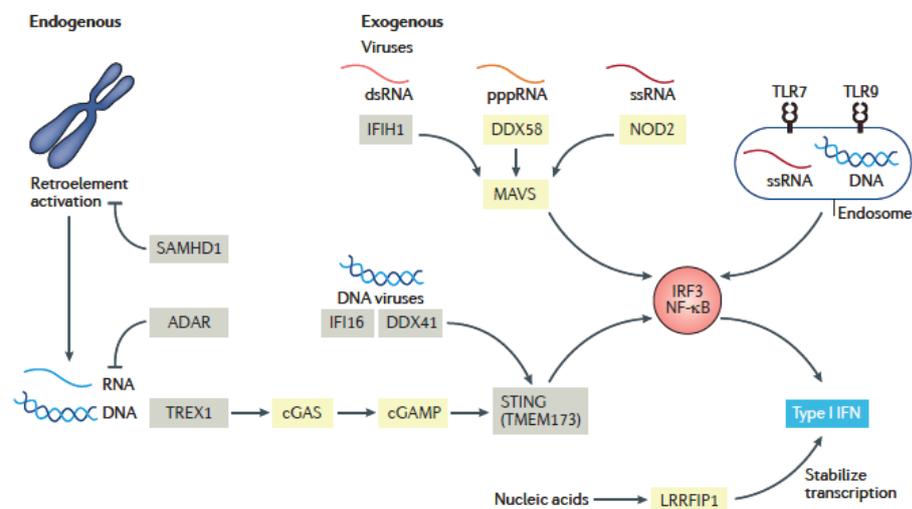
bentuk seperti-jaring yang disebut dengan NET (Neutrofil Extracellular Trap) dan terekspresi tinggi dalam darah pasien LES (Bennet *et al*, 2003). HNP dan LL37 adalah peptida yang diperlukan self dsDNA untuk terlindungi dari degradasi ekstraseluler (Lande *et al*, 2007). NET yang dirilis oleh neutrofil dalam jumlah yang banyak pada pasien LES tersebut langsung mengaktifkan pDC untuk menghasilkan IFN- $\alpha$  dan menginduksi terbentuknya autoantibodi (Brinkmann *et al*, 2007).

Akumulasi debris akan memicu TLRs dan sensor asam nukleat. Sel-sel yang mengekspresikan TLR diantaranya sel B, beberapa sel T, sel dendritik (DC), makrofag, serta beberapa sel non imun diantaranya sel epitel dan fibroblast. Disregulasi dari pembersihan debris-debris apoptosis menjadi karakteristik penyakit LES sehingga terjadi paparan dari antigen tubuh sendiri. Beberapa jalur telah berevolusi untuk mencegah aktivasi sistem imun dalam melawan debris-debris seluler endogen, salah satunya adalah sel-sel apoptosis akan dilapisi dengan komponen komplemen C1q, protein C-reaktif, pentraxin 3, dan serum amyloid P, yang meningkatkan fagositosis tanpa stimulasi imun (Gaipl *et al.*, 2004; Janko *et al.*, 2011). Selain itu, terdapat jalur yang melibatkan DNase I yang mana berkontribusi dalam degradasi kromatin (Gaipl *et al.*, 2004). Akan tetapi telah terbukti beberapa mutase genetik pada keluarga penderita LES diantaranya mutasi pada DNase I serta PRKCD yang mengkode enzim kinase C $\delta$  (enzim yang mengaktivasi pada banyak jalur apoptosis) (Belot *et al.*, 2013). Selain itu pada pasien dengan LES dan pada mencit model lupus diketahui aktivitas DNase I mengalami penurunan (Wilber *et al.*, 2003).

Mencit model lupus ini masih kontroversial karena tidak semua respon peran TLR, sama dengan yang kita pelajari di LES pada manusia. Sel apoptosis akan sebagian besar akan dibersihkan oleh sel-sel didalam kompartemen retikuloendotelial (RES) (Dieker *et al.*, 2015). Transfer TLR ke endosome

diregulasi oleh protein trafficking unc-93 homologue B1 (UNC93B1). Didalam plasmacytoid DCs (pDCs), UNC93b1 membawa kompleks DNA besar ke endosome awal dimana terdapat TLR9 dan IRF7 yang berperan pada ekspresi IFN. DNA monomer kecil akan dibawa ke endosom akhir dimana terdapat TLR9 yang berperan sebagai reseptor untuk DNA yang mengandung motif sekuen *unmethylated* CpG, dan terdapat NF- $\kappa$ B yang berperan pada ekspresi sitokin proinflamasi (Honda *et al.*, 2005).

Pasien LES aktif memiliki lebih banyak sel B dan monosit yang mengekspresi TLR9 dibandingkan pasien LES dengan aktivitas penyakit yang lebih rendah serta jumlah ini berkorelasi dengan peningkatan kadar antibodi *anti-dsDNA* (Papadimitraki *et al.*, 2006). Oleh sebab itu hubungan TLR9 pada LES lebih kompleks dibandingkan TLR7.



### Gambar 2.3. Sensor asam nukleat pada LES

Respon imun terhadap asam nukleat pada LES:

Vesikel-vesikel dan berespon primer pada endositosis asam nukleat sebagai pembatas dari TLR. Asam nukleat endogen dikenali oleh sensor-sensor sitoplasma.

Terjadi induksi ekspresi IFN tipe I dan sitokin-sitokin inflamasi yang lain melalui dua faktor transkripsi yaitu IRF3 dan NF- $\kappa$ B yang responsible (Tsokos *et al.*, 2016).

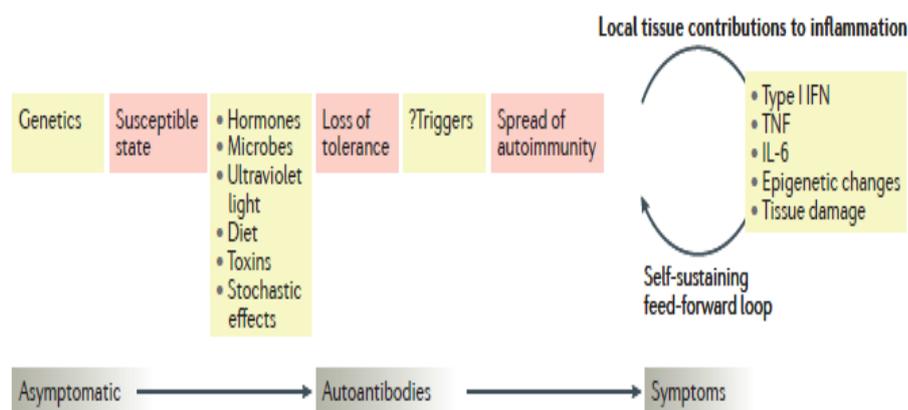
Produksi IFN tipe I maupun sitokin inflamasi yang mana akibat aktivasi dari asam nukleat dikenali sensor yang terdapat pada sitosol adalah mekanisme awal pertahanan tubuh. Selain itu sensor asam nukleat pada sitosol juga mengenali infeksi virus, mendeteksi ligan-ligan endogen dan meningkatkan inflamasi yang tidak tergantung adanya infeksi. Jalur ini menstimulasi gen protein IFN yaitu STING yang dikode oleh TMEM173 (Ishikawa and Barber, 2008). STING akan mengaktifkan NF- $\kappa$ B atau IRF 3 yang akan meningkatkan produksi IFN tipe 1 (Hornung *et al.*, 2009).

Pertahanan tubuh tambahan akibat adanya efek dari asam nukleat endogen adalah adanya enzim nuklease yang mendegradasi asam nukleat. Sensor-sensor ini bekerja didalam sitoplasma berkomplemen fungsinya dengan TLR endosomal. Mencit model lupus mendukung peran kunci dari jalur-jalur ini untuk mempelajari etiopatogenesis dari LES (Choubey, 2012).

### **2.3 Toleransi Sistem Imun**

Toleransi imunologis adalah salah satu mekanisme normal yang dimiliki oleh sistem imun. Secara normal sistem imun dapat bereaksi terhadap berbagai macam jenis mikroba (*non self antigen*) namun tidak bereaksi melawan antigen yang berasal dari tubuh sendiri (*self antigen*). Hal ini dikarenakan sel limfosit memiliki kemampuan untuk mengenali *self antigen* yang didapatkannya saat proses menuju maturasi. Mekanisme ini sangat penting dalam menjaga keseimbangan sistem tubuh. Apabila mekanisme ini gagal, maka akan terjadi suatu autoimunitas, yaitu sistem imun dari individu dapat menyerang sel dan jaringan dari individu itu sendiri. Penelitian tentang induksi toleransi dewasa ini banyak dilakukan untuk menemukan cara yang aman untuk mentoleransi pasien autoimun terhadap *self antigen* mereka. Hal ini biasanya dilakukan dengan memberikan serangkaian panjang suntikan alergen yang di formulasi khusus atau *self antigen* untuk mengembalikan regulasi imun (Abbas *et al.*, 2014).

Hilangnya toleransi imun, banyaknya antigen, meningkatnya sel T helper, terganggunya supresi sel B dan perubahan respon imun dari Th1 ke Th2 menyebabkan hiperreaktivitas sel B dan terbentuknya autoantibodi. (Mok and Lau, 2003). LES umumnya merupakan kondisi hilangnya toleransi imun dan produksi autoantibodi yang terus menerus yang berlangsung seumur hidup (Gambar 2.4) (Tsokos *et al.*, 2016).



**Gambar 2.4 Patogenesis LES**

Perkembangan penyakit LES dipengaruhi oleh beberapa factor, diantaranya adalah r genetik dan lingkungan berperan pada perkembangan penyakit ini. Perubahan genetic, deposisi imun kompleks dan autoantibodi yang menyebabkan inflamasi kronis sehingga terjadi kerusakan jaringan jaringan dan organ ireversibel (Tsokos *et al.*, 2016).

Kelainan sel T dan sel B telah lama dijelaskan pada LES dan dianggap penting dalam proses penyakit (Tsokos *et al.*, 2016). antigen langsung dikenali dan melalui reseptor IgM permukaan untuk protein yang membentuk kompleks dengan asam nukleat, dan sel B dapat merespons asam nukleat. Begitu autoantibodi terbentuk, sel B juga dapat mengambil asam nukleat melalui reseptor Fc dan reseptor sel B yang mengenali Fc (faktor rheumatoid) (Leadbetter *et al.*, 2002). Setelah diaktifkan, sel B ini matang, berkembang dan mulai mengeluarkan lebih banyak antibodi, yang meningkatkan respon imun adaptif. Autoantibodi yang diidentifikasi pada LES umumnya memiliki afinitas

tinggi dan merupakan antibody IgG yang bermutasi secara somatik (Tsokos *et al.*, 2016).

Defek pada jalur *Toll-like Receptor* (TLR) pengenalan asam nukleat mengendalikan retrovirus endogen, mengenali patogen virus dan pertahanan melawan bakteri intraselular, dewasa ini diketahui memiliki peran penting pada patogenesis LES, karena sangat terkait dengan produksi interferon tipe I (IFN) dan keduanya meningkatkan kerentanan penyakit dan secara langsung menyebabkan LES (Tsokos *et al.*, 2016). Selain itu, IFN Tipe I dan sitokin inflamasi lainnya meningkatkan diferensiasi sel B dan hilangnya toleransi (Leadbetter *et al.*, 2002).

#### **2.4 Escalating Dose Immunotherapy EDI**

EDI adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjeksikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek toleransi. Pemberian dosis yang bertahap dan meningkat ini untuk menghindari efek-efek yang merugikan dari yang paling ringan seperti gatal-gatal sampai yang paling berat, syok anafilaksis (Lee , 2008).

Tujuan utama dari terapi penyakit autoimun adalah membatasi respon imun terhadap self-antigen tanpa menurunkan kemampuan sel imun untuk mengenali antigen asing (*non-self*). Injeksi *self-antigen* dengan dosis yang bertahap dapat menginduksi sel regulator pada respon imun yaitu T-Reg untuk mensupresi Sel T yang autoreaktif (Sakaguchi, 2000). Metode EDI merupakan suatu metode yang berpeluang besar sebagai terapi penyembuhan penyakit autoimun meskipun penelitian tentang ini baru sedikit. Pengobatan autoimun hanya bersifat mengontrol manifestasi klinis sehingga membuat banyak peneliti bidang imunologi yang mengembangkan metode ini. Penelitian yang dilakukan Seddon dan Mason pada penyakit autoimun thyroiditis dengan menginjeksi

autoantigen thyroid ternyata mampu menginduksi T-reg. Penelitian lain yang dilakukan oleh Thorstenson menunjukkan bahwa oral dan injeksi antigen ovalbumin mampu menginduksi T-Reg (Sakaguchi, 2000).

EDI *Antigen-Specific Immunotherapy* lain yang telah dikembangkan adalah terhadap autoimun *Multiple Sclerosis*. Injeksi subkutan *Myelin Basic Protein* mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada T-reg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- $\beta$  yang bekerja menekan sel imun autoreaktif. Induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator menunjukkan efektivitas imunoterapi baik pada tikus maupun manusia (Tarzi *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009; Foustari *et al.*, 2010). Selama proses imunoterapi, stimulasi kronis pada sel CD4 dengan pemberian peptida antigen mengubah program transkripsi (Anderson *et al.*, 2006) dengan sel Th1 patogen yang berubah menjadi anergi, sekresi IL10, sel dengan fenotip regulator yang mampu mencegah autoimunitas (Gabrysova *et al.*, 2009). Penggunaan metode terapi ini terhadap penurunan progresivitas penyakit LES belum pernah dilakukan. Mengingat banyaknya sitokin yang mengalami kelainan dan banyak berperan dalam patogenesis LES, maka perlu dieksplorasi lebih lanjut lagi mengenai penggunaan metode EDI-Antigen-Specific Immunotherapy menggunakan autoantigen dsDNA dalam menurunkan progresivitas dari penyakit LES (Kawamoto, 2004).

Desensitasi adalah suatu prosedur yang dilakukan pada penderita yang dipapar alergen dengan dosis kecil yang semakin meningkat dengan tujuan untuk menghambat reaksi alergi yang dialaminya. Mekanisme efek ini mungkin karena terjadinya pergantian respon dari sel CD4+TH1 dan perubahan antibodi yang dihasilkan, dari IgE menjadi IgG. Terapi desensitisasi dilakukan jika penderita tidak memberi respon terhadap obat-obatan maupun terhadap perbaikan lingkungan, atau selalu terpapar alergen tertentu. Sudah disetujui bahwa menggunakan metode peningkatan dosis yang bertahap ini akan

meminimalisir risiko efek samping dari imunoterapi yang bervariasi mulai dari gejala yang ringan hingga anafilaksis. Banyak faktor-faktor yang mempengaruhi efek dari imunoterapi antigen spesifik baik antigen dirisendiri ataupun antigen asing. Faktor tersebut diantaranya pemilihan antigen (protein atau peptida), dosis antigen, dan frekuensi pemberian (Larche and Wraith, 2005). Pada prakteknya, imunoterapi menggunakan antigen yang spesifik menggunakan peningkatan dosis yang bertahap pada awal terapi kemudian mempertahankan pada dosis tinggi yang mencapai desensitisasi (Burks *et al.*, 2013).

Penelitian terbaru dilakukan oleh Burton *et al.*, 2014 pada *Autoimmune Encephalomyelitis Model* (EAE) dari *Multiple Sclerosis* dengan pemberian terapi menggunakan protein MBP (Myelin Basic Protein). Dosis MBP yang diberikan bertahap dari 0.08 µg, 0.8 µg, 8 µg, 800 µg dengan konsentrasi masing-masing 0.01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml dan 100 µg/ml, membuktikan keamanan imunoterapi menggunakan antigen spesifik dengan metode *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI).

Penelitian tersebut membuktikan aktivasi sel T CD4 yang berlebihan dapat dihindari dengan memberikan imunoterapi dengan dosis rendah terlebih dahulu sehingga mampu menginduksi sel menjadi anergi. Dengan menggunakan metode EDI, mampu menginduksi IL10 tanpa meningkatkan sitokin inflamasi lainnya. Fenotip sel T CD4 yang diinduksi EDI j dibandingkan dengan sel yang diinduksi dengan dosis antigen yang sama berulang-ulang, menunjukkan efek anergi sel, supresi sel, dan peningkatan ekspresi IL10. Akan tetapi pada metode EDI, IL10 menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibanding dengan metode pemberian antigen berulang-ulang dengan dosis yang sama. Dengan demikian, pemberian antigen dengan dosis yang bertahap lebih baik dalam menginduksi

toleransi sel serta meminimalisir efek samping yang mungkin terjadi (Burton *et al.*, 2014).

Hal tersebut karena pemberian imunoterapi antigen spesifik dengan menggunakan metode EDI terbukti dapat menginduksi diferensiasi sel T regulator dengan adanya fenotip sel T yang mensekresi IL-10 dan dapat memicu molekul kostimulator negatif dan faktor-faktor transkripsi yang diekspresikan sel T CD4. Molekul costimulatory negative yang dimaksud, diantaranya adalah PD-1, LAG-3, TIM-3 and TIGIT. Beberapa dari molekul-molekul tersebut berhubungan dengan kelelahan sel T, PD-1 dan LAG-3 disebut marker sel anergi yang lebih baik dibanding lainnya. Molekul-molekul lainnya dikatakan sebagai molekul marker dari sel Tr1 yang mensekresi IL10 karena pada TIGIT dan TIM-3 lebih menunjukkan adanya fenotip sel yang dapat mensekresi IL-10 karena adanya imunoterapi. Sedangkan faktor transkripsi yang berhubungan dengan ekspresi IL10, diantaranya Maf, Ahr dan Nfil3. (Burton *et al.*, 2014).

## **2.5 Sel T-helper 1 (Th1)**

Sel naif yang terpajan dengan antigen akan berkembang menjadi sel Th0 yang dipengaruhi oleh mekanisme autokrin dari IL-2 untuk berproliferasi yang akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2 (Abbas, 2007). Diferensiasi Th1 terutama dipacu oleh sitokin IL-12 dan IFN- $\gamma$  dan terjadi sebagai respon terhadap mikroba yang mengaktifkan sel dendritik, makrofag, dan sel NK (Abbas, 2012). Proses diferensiasi Th1 melibatkan reseptor sel T, IL-2 dan T-bet, STAT1, STAT4 sebagai faktor transkripsi (Abbas, 2007). IL-12 yang dilepas makrofag dan sel dendritik menginduksi perkembangan Th1 melalui jalur yang STAT4 dependen. Faktor transkripsi T-bet yang diproduksi sebagai respons terhadap IFN- $\gamma$  meningkatkan respons Th1 (Bratawidjaya, 2012).

Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan

meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8+. Jadi Th1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th1 memproduksi limfosit T yang meningkatkan pengambilan dan aktivasi neutrofil. Fungsi utama Th1 sebagai pertahanan dalam melawan infeksi terutama oleh mikroba intraseluler, mekanisme efektor ini terjadi melalui aktivasi makrofag, sel B, dan sel neutrophil (Bratawidjaya, 2012).

## **2.6 Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ )**

Sitokin berperan penting dalam patogenesis LES. Sitokin adalah faktor terlarut yang berperan dalam diferensiasi, maturasi dan aktivasi berbagai sel imun. Sitokin juga menyebabkan respon inflamasi lokal yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan jaringan (Yap dan Lai, 2010). Pelepasan dan fungsi abnormal berbagai sitokin terjadi pada pasien LES maupun hewan coba baik in vitro maupun in vivo. Sitokin-sitokin tersebut dapat memiliki efek pro inflamasi maupun anti inflamasi, atau keduanya tergantung pada lingkungan spesifiknya (Su *et al.*, 2012).

Berbagai macam sitokin yakni IL-1, IL-6, IFN $\gamma$  dan IL-17 yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th17 sebagai mediator inflamasi mengalami peningkatan, sedangkan sitokin-sitokin anti inflamasi seperti TGF- $\beta$  dan IL-10 diketahui kadarnya menurun. Ketidakseimbangan sitokin ini sangat berperan dalam patogenesis LES (Guiducci *et al.*, 2010). IL-10 merupakan sitokin imunoregulasi yang berperan penting dalam reaksi imun dan inflamasi. IL-10 menghambat kapasitas APC dari monosit dan makrofag dengan melakukan down regulasi MHC II, molekul kostimulasi dan adesi, juga menghambat produksi

IFN $\gamma$  dari limfosit T sehingga menghambat secara langsung proliferasi sel T CD4 $^{+}$  dengan akibat merusak respon imun seluler dan terjadi ketidakseimbangan Th1/Th2 (Su *et al.*, 2012).

Sel Th1 memproduksi IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-12 dan diduga berperan pada kerusakan jaringan dari beberapa penyakit inflamasi kronis autoimun seperti rheumatoid arthritis. Sel Th2 mengeluarkan IL-4, IL-5, IL-13 yang memediasi aktivasi sel B dan produksi antibodi, dan berperan pada penyakit autoimun lain seperti lupus. Hal ini diketahui juga bahwa kedua jalur ini saling menghambat satu sama lain (Zen *et al.*, 2010). Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) mengaktifkan makrofag pada tempat peradangan, memberikan kontribusi untuk aktivitas sel-T sitotoksik, kapasitas antivirus, dan hubungan sangat kuat dengan respon Th1. Hal tersebut mengakibatkan diferensiasi sel T naif menjadi sel Th1 dan memicu Th1 berdiferensiasi secara autokrin. Sinyal IFN- $\gamma$  menginduksi fosforilasi STAT1 yang mengarah ke ekspresi dari Th1-lineage-specific transcription factor T-bet dan ekspresi IFN- $\gamma$  berikutnya. Karena pada kenyataannya efek Th1-mediated dapat menjelaskan banyak penyebab dari penyakit autoimun, IFN- $\gamma$  menjadi archetypal inducer autoimunitas organ-spesifik (Jager and Kuchroo, 2010). IFN- $\gamma$  mungkin berkontribusi terhadap penyakit autoimun dengan menginduksi produksi IgG2a dan IgG3 antibodi isotype yang mengaktifkan komplemen dan lebih jauh lagi dengan mengaktifkan makrofag dan mendukung terjadinya peradangan jaringan. Namun, pada model percobaan autoimun seperti experimental autoimmune encephalomyelitis dan collagen-induced Arthritis (Jager and Kuchroo, 2010), defisien IFN- $\gamma$  pada mencit lebih rentan; Oleh karena itu, peran IFN- $\gamma$  tidak bersifat proinflamasi. Studi terbaru mendeteksi beragam mekanisme yang melalui IFN- $\gamma$  dapat menghambat jalur inflamasi yang terkait autoimun (Kelchtermans, 2008).

Peran IFN- $\gamma$  dalam LES dianalisis dalam beberapa model mencit. Sel T-helper mengekspresikan IFN- $\gamma$  yang korelasinya dengan usia dan perkembangan penyakit pada tikus NZB / W F1. Selain itu pengobatan tikus NZB / W F1 dengan rekombinan IFN- $\gamma$  mempercepat perkembangan penyakit, sementara pemberian antibodi monoklonal terhadap IFN- $\gamma$  menghasilkan remisi dari penyakit. Selanjutnya, tikus NZB / W F1 yang mengalami defisiensi IFN- $\gamma$  terjadi penurunan glomerulonefritis dan penurunan konsentrasi serum antibodi *anti-dsDNA*. Pengobatan dengan cDNA encoding IFN- $\gamma$ R/Fc dapat mengurangi manifestasi dari penyakit (Lawson *et al.*, 2000). Khususnya pada tikus Mrl/lpr yang mengalami defisiensi IFN- $\gamma$  dapat mencegah kematian dini dan mengurangi angka kejadian limfadenopati seerta glomerulonefritis. Namun, pengobatan tikus Mrl/lpr dengan rekombinan IFN- $\gamma$  menyebabkan efek dikotomis. Sementara pengobatan pada usia dini terbukti dapat menjadi pelindung, sedangkan pengobatan yang terlambat dapat mempercepat manifestasi penyakit (Nicoletti *et al.*, 2000)

Pada model lupus yang diinduksi pristandimana mencit BALB / c mengalami defisiensi IFN- $\gamma$  terlindungi dari penyakit ginjal (Richards *et al.*, 2001). Beberapa penelitian tentang model lupus menunjukkan bahwa ketidakseimbangan terhadap dominasi Th1 berperan dalam percepatan penyakit (Tucci *et al.*, 2008). Pada pasien LES yang mengalami gangguan keseimbangan dari mekanisme yang mengatur sel-sel Th1 dan Th17 dengan meningkatkan ekspresi sel Th17 sejauh ini masih tahap diteliti (Shah *et al.*, 2010) yang mana sebagian sudah terbukti akan mengalami perparahan dengan penggunaan glukokortikoid (Prado *et al.*, 2011).

Peran kompleks IFN- $\gamma$  di LES didasari oleh studi klinis yang kontradiktif yang menemukan korelasi antara tingkat IFN- $\gamma$  serum dan aktivitas penyakit dan korelasi antara ekspresi IFN- $\gamma$  dan tingkat keparahan lupus nephritis sementara

yang lain menunjukkan penurunan tingkat IFN- $\gamma$  pada lupus nefritis (Uhm *et al.*, 2003). Meskipun demikian, antibodi monoklonal manusia terhadap IFN- $\gamma$ , sedang diselidiki dalam sebuah studi fase pada pasien LES (Cava *et al.*, 2010).

## **2. 7 Peran Sel Dendritik pada Patogenesis Pasien LES**

Sel dendritik adalah antigen presenting (APC) yang berperan penting dalam regulasi respon imun adaptif. Sel dendritik mampu menangkap antigen, memprosesnya, dan mempresentasikannya ke permukaan sel dengan molekul kostimulator (Wieder *et al.*, 2003). Sel dendritik mengekspresikan CD80, CD86 (B7. 1 dan B7. 2) dan CD40 yang merupakan molekul kostimulator (Kapsenberg, 2003). Keberadaan sel dendritik hanya 1%-3% dari peripheral blood mononuclear cells (PBMC), tetapi di distribusikan di dalam berbagai jenis jaringan (Ferreira *et al.*, 2010).

Menurut Rossi dan Young (2005) ada 2 subset sel dendritik di perifer yang diidentifikasi berdasarkan ekspresi CD11c, yaitu CD11c+ myeloid dendritic cells (M-DC) dan CD11c-plasmacytoid dendritic cells (P-DC) (Rossi dan Young, 2005). Kelainan genetik pada penderita LES dapat mengakibatkan disregulasi dari fungsi sel dendritik, meliputi proses pengambilan antigen, maturasi, dan kemampuan presentasi (Monrad *et al.*, 2008). Sel dendritik memiliki peranan dalam menginduksi imun toleran baik sentral maupun perifer (Maddur *et al.*, 2010). Gangguan pada imun toleran merupakan awal dalam menginisiasi perkembangan penyakit autoimun seperti LES

## **2. 8 Ketidakseimbangan Sel T Regulator pada Penyakit LES**

Sel Treg merupakan subpopulasi dari sel limfosit T yang berperan dalam menghambat aktivitas sel imun, toleransi imunologik sehingga dapat menghambat proses autoimun. Sel Treg ini dapat diidentifikasi pada darah perifer melalui berbagai macam marker permukaan, yaitu CD4+ CD25+ dan marker intraseluler forkhead box P3 (FoxP3) (Elias *et al.*, 2008). Sel Treg

memiliki fungsi supresif terhadap respon inflamasi dengan cara memproduksi sitokin TGF- $\beta$  dan IL-10 di mana kedua sitokin ini dibuktikan dapat menurunkan aktivitas dari sel imun lainnya (Afzali *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan juga membuktikan bahwa sel Treg ini berperan secara langsung dalam menghambat aktivitas sel Th1, Th2, Th17, dan aktivitas dari sel B (Xu *et al.*, 2003).

Aktivasi dari sel Treg ini dimediasi oleh sitokin TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  yang berikatan dengan reseptor TGF- $\beta$  pada sel T naif sehingga mengaktifasi faktor transkripsi STAT5. Fosforilasi dari STAT5 ini akan mengakibatkan aktivasi dari faktor transkripsi FoxP3 yang merupakan penanda dari diferensiasi sel Treg. Sel Treg yang telah aktif akan mengekspresikan marker CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> dan menghasilkan sitokin TGF- $\beta$  dan IL-10 (Elias *et al.*, 2008).

Pada kondisi inflamasi yang kronis seperti LES, terjadi peningkatan kadar sitokin IL-6 yang dihasilkan oleh berbagai macam sel imun, seperti makrofag dan sel T. Sitokin ini dapat menghambat aktivasi dari FoxP3 sehingga proses diferensiasi sel Treg juga dapat terhambat. TGF- $\beta$  sendirian akan mengaktifasi STAT5 yang mengakibatkan aktivasi FoxP3 dan diferensiasi sel T naif menjadi sel Treg. Akan tetapi, TGF- $\beta$  bersama-sama dengan IL-6 justru akan mengaktifasi STAT3 yang malah menginduksi terbentuknya faktor transkripsi retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) dan ROR $\alpha$  (Kimura *et al.*, 2010).

Kedua faktor transkripsi ini justru akan menghambat pembentukan faktor transkripsi FoxP3 sehingga proses diferensiasi sel T naif menjadi sel Treg akan terhambat dan menyebabkan terbentuknya transkripsi dari IL-17 yang merupakan marker dari sel Th17. Pembentukan sel Th17 karena adanya IL-6 ini justru akan merangsang semakin parahnya proses inflamasi sehingga dikatakan bahwa keseimbangan antara Treg dan Th17 merupakan hal yang penting dalam patogenesis LES kronis (Ma *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Peningkatan

aktivitas Th17 beserta penurunan aktivitas Treg akibat IL-6 ini berkorelasi positif dengan tingkat keparahan pada pasien LES (Shah *et al.*, 2010).

Pasien dengan LES juga diketahui mengalami perubahan subset populasi sel T. Th17 adalah subset sel T CD4+ yang ditemukan menginfeksi ginjal pasien dengan lupus nefritis dan lesi jaringan kulit pada pasien LES (Crispin *et al.*, 2008). Sel T CD4- CD8- tampaknya menjadi sumber primer ekspresi IL17 pada LES (Apostolidis *et al.*, 2011). Sel T tersebut ditemukan berkembang pada pasien LES begitu pula terjadi pada hewan coba dan berkontribusi pada hilangnya toleransi imun (Crispin and Tsokos, 2009) karena sel tersebut mengekspresikan IL-1 $\beta$  dan IFN $\gamma$ , dan mempromosikan diferensiasi sel B dan produksi antibody (Tsokos *et al.*, 2016). Oleh karena itu, agen yang dapat menyeimbangkan peran Th17 dan Treg merupakan target yang potensial untuk memperbaiki gejala LES.

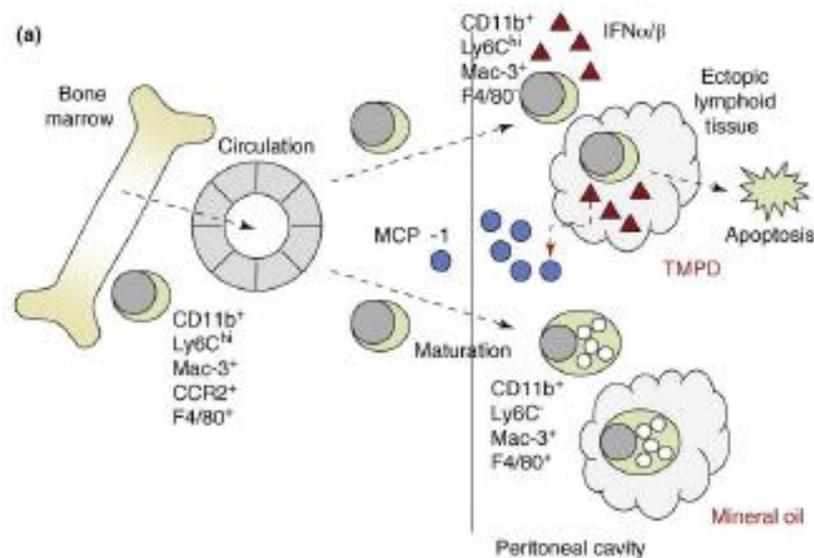
## **2.9 *Pristane***

*Pristane* atau Tetramethylpentadecane (TMPD) merupakan alkanin isoprenoid yang terdapat pada tumbuhan dan organisme laut (alga, plankton) yang dapat menginduksi LES pada hewan bila diberikan secara intraperitoneal. Pristan dapat memicu autoantibodi dan manifestasi klinis LES (Calvani *et al.*, 2005). Injeksi pristan intraperitoneal pada mencit strain BALB/c akan mengakibatkan glomerulonefritis, arthritis, ANA dan berbagai autoantibodi lupus seperti anti-dsDNA dan anti-Sm. Produksi autoantibodi karena pristan ini melalui jalur signal IFN 1 yang merupakan mediator kunci LES dan menghubungkan respon imun innate dan adaptif. Peningkatan IFN 1 terjadi pada pasien LES (Reeves *et al.*, 2009).

### **2.9.1 Patogenesis Lupus Akibat Induksi *Pristane***

Tetramethylpentadecane (TMPD) atau sering dikenal dengan nama pristan merupakan zat yang berperan untuk menginduksi LES pada hewan.

Hingga saat ini bagaimana *pristane* dapat menginduksi terjadinya lupus pada mencit masih belum banyak diketahui. Hal penting yang mungkin berkontribusi terhadap patogenesis adalah induksi sitokin inflamasi oleh *pristane*. Salah satu teori yang dikemukakan oleh beberapa peneliti adalah melalui jalur peningkatan kadar IFN-I. Peningkatan kadar IFN-I merupakan mediator kunci pada LES. Famili IFN-I meliputi IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  yang keduanya berikatan dengan kompleks reseptor IFNAR. Tingginya kadar IFN-I pada serum pasien LES telah ditemukan sejak 30 tahun yang lalu dan telah dikenal bahwa “*interferon signature*” berhubungan dengan lupus. Produksi autoantibodi karena TMPD ini melalui jalur signallinf dari IFN 1. Sumber utama dari IFN 1 adalah monosit imatur yang mengekspresikan ly6C pada permukaannya yang diproduksi melalui jalur TLR 7 dan Myd88. Jaringan limfoid ektopik juga memproduksi autoantibodi lupus sebagai respon terhadap TMPD (Reeves *et al.*, 2009).



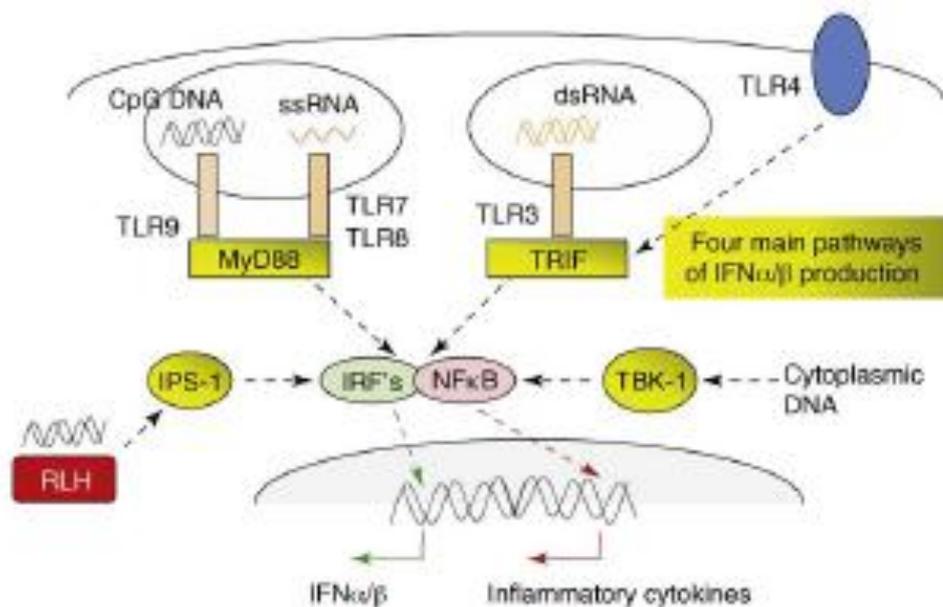
**Gambar 2. 5 Immunopatogenesis *Pristane* dalam Menginduksi Lupus**  
 Injeksi intraperitoneal *Pristane* atau TMPD dapat menstimulasi produksi IFN $\alpha$  dan IFN $\beta$  oleh sel monosit (Ly6Chi) imatur yang akan bertahan selama 3 hari sebelum mengalami apoptosis (Reeves *et al.*, 2009).

Injeksi intraperitoneal *pristane* atau TMPD dapat menstimulasi produksi IFN $\alpha$  dan IFN $\beta$  oleh sel monosit (Ly6Chi) imatur. Kemokin MCP-1 (CCL2) yang merupakan kemokin penginduksi IFN-I juga dihasilkan setelah injeksi intraperitoneal TMPD. TMPD juga menginduksi sel yang mengekspresikan petanda CD11b, Ly6Chi, Mac-3, F4/80, dan CCR2 (receptor dari MCP-1) yang terdapat pada monosit imatur dari sumsum tulang. Sel-sel ini memasuki sirkulasi dan direkrut ke dalam rongga peritoneum yang mengalami inflamasi. Pada mencit yang mendapat induksi *pristane*, sel monosit Ly6Chi menurunkan regulasi F4/80 dan mensekresi sejumlah besar IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ . Sel-sel ini juga masuk ke *ectopic lymphoid tissue* yang membentuk respon terhadap hidrokarbon. Sel ini bertahan selama 3 hari sebelum mengalami apoptosis. Pada mencit yang mendapat injeksi mineral oil yang lain, sel monosit Ly6Chi akan cepat mengalami maturasi menjadi sel CD11b+, Ly6C, Mac-3+, F4/80+ dengan berbagai *endocytic vacuoles*. Akan tetapi, tidak seperti pada monosit yang diinduksi oleh *pristane*, sel-sel ini tidak menghasilkan IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  (Reeves *et al.*, 2009).

Injeksi intraperitoneal *pristane* dilaporkan menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi IL-12, IL-6, dan TNF. Selanjutnya, *pristan* dan heksadekana memicu pelepasan sitokin inflamasi IL-1 $\alpha$  dan IL1 $\beta$  oleh mekanisme inflammasome-independent dan dependent. Peningkatan kadar serum IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  juga dijelaskan dalam darah perifer tikus setelah stimulasi dengan *pristan*. IL-1 dan inflammasome yang penting dalam penyakit autoimun biasanya dipicu oleh minyak hidrokarbon (Boeltz *et al.*, 2013).

Produksi IFN-I dan sitokin pro-inflamasi dapat distimulasi melalui empat jalur selular dengan protein adaptor dan signaling yang diantaranya melalui: TRIF (TLR 3 and 4), MyD88 (TLRs 7, 8, and 9), IPS-1 (Rig-I like helicases, RLH), dan TBK1 (Gambar 2. 6). Pengenalan endosomal dari *unmethylated* CpG pada DNA oleh TLR9 atau single stranded RNA oleh TLR7 atau TLR8 menyebabkan

ekspresi gen IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  melalui jalur adapter protein MyD88, beberapa kinase, dan faktor transkripsi *interferon regulatory factor* (IRF)-7. Sedangkan pengenalan endosomal dsRNA oleh TLR3 atau pengenalan lipopolysaccharide (endotoxin) oleh TLR4 menyebabkan ekspresi gen IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  melalui jalur yang melibatkan adapter protein TRIF, kinases, dan faktor transkripsi IRF-3. Disamping jalur endosomal, pengenalan cytoplasmic (viral) dsRNA oleh RIG-like helicases (RLH) Rig-I atau Mda5 juga mengaktifkan ekspresi gen IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$  melalui adapter protein IPS-1 dan faktor transkripsi IRF3 dan IRF7. Cytoplasmic DNA dideteksi oleh reseptor sitoplasma dan melalui sinyal kinase TBK-1. Keseluruhan jalur ini akan menjadi satu melalui aktivasi dari *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) (Reeves *et al.*, 2009).



**Gambar 2. 6 Mekanisme Aktivasi IFN- $\alpha$**

Produksi IFN-I dan sitokin pro-inflamasi dapat distimulasi melalui empat jalur selular dengan protein adaptor dan signaling yang diantaranya melalui: TRIF (TLR 3 and 4), MyD88 (TLRs 7, 8, and 9), IPS-1 (Rig-I like helicases, RLH), dan TBK (Reeves *et al.*, 2009).

Mekanisme lain yang dapat mendasari munculnya autoimunitas akibat pemberian *pristane* adalah adanya stimulasi dari apoptosis setelah injeksi *pristane*. Suatu penelitian menemukan bahwa injeksi *pristane* baik *in vivo*

maupun *in vitro* ternyata adapat menginduksi kematian sel melalui apoptosis melalui jalur mitokondria yaitu aktivase dari kaspase. Autoantigen nukleus yang dibentuk akibat *pristane* yang menginduksi apoptosis tersebut ditemukan dapat menginduksi sinyal pembentukan sitokin inflamasi yang menandai pembentukan dari suatu sindrom autoimunitas (Calvani, *et al.*, 2005).

### **2. 9. 2 Manifestasi Klinis Mencit Model Lupus yang Diinduksi *Pristane***

Pristan dapat memicu autoantibodi dan manifestasi klinis LES (Calvani *et al.*, 2007). Mencit strain BALB/c yang diberikan injeksi pristan menyebabkan gambaran yang memenuhi kriteria lupus yaitu artritis, ANA, *anti-dsDNA*, *anti-Sm*, *immune complex mediated glomerulonephritis*, *pulmonary capillaritis (pulmonary vasculitis)* dan didapatkan IFN tipe 1 pada darah perifer. Inflamasi pada perikardium dan pleura juga terjadi. Mencit dengan injeksi pristan memenuhi 4 kriteria ACR 1997 untuk penegakan LES, yaitu anti dsDNA, artritis, lupus nefritis, dan vaskulitis. Seperti LES pada manusia, LES pada mencit juga cenderung terjadi pada mencit betina. Injeksi pristan intraperitoneal pada mencit strain BALB/c akan menyebabkan glomerulonefritis, arthritis, ANA dan pembentukan berbagai autoantibodi lupus seperti anti-dsDNA dan anti-Sm. Pristan dapat menginduksi terbentuknya auto antibodi IgG yang menarget komponen inti sel diantaranya double-stranded (ds) DNA, single-stranded (ss) DNA, chromatin, Sm, RNP, Su, dan ribosomal P. *Pristane* juga menyebabkan terbentuknya hiper gamma globulinemia poliklonal seperti respon imunologi pada LES (Reeves *et al.*, 2009). Berikut ini beberapa autoantibodi yang diproduksi pada hewan model lupus dengan induksi pristan:

**Tabel 2.3 Autoantibodi pada Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristan  
(Reeves *et al.*, 2009)**

Autoantibody	Autoantigen	Nucleic acid component	Frequency in BALB/c mice	Frequency in B6 mice
Anti-Sm*	U1, U2, U4-U6, and U5 snRNPs (proteins B', B, D, E, F, G)	U1, U2, U4, U6, U5 small nuclear RNAs	20-40%	10%
Anti-RNP	U1 snRNP (proteins A, C, 70K)	U1 small nuclear RNA	50-90%	25%
Anti-ribosomal P*	Ribosomal P0, P1, P2 proteins	Ribosomal RNAs	0% <sup>a</sup>	20%
Anti-Su	Argonaute 2 protein	Micro-RNAs	50-70%	25%
Anti-dsDNA*	Native DNA	Native DNA	40%	0%
Anti-chromatin	DNA-histone complexes	DNA	60%	0%

\*specific for the diagnosis of SLE.

<sup>a</sup>BALB/cByJ 0%; BALB/cJ 5-10%.

Penelitian yang dilakukan oleh Cui *et al.* (2006) menunjukkan bahwa injeksi tunggal 0,5 mL *pristane* pada mencit strain BALB/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar autoantibodi anti-dsDNA dan ANA pada bulan ke-3 dan bulan ke-4. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa pada bulan ke-8 paska injeksi sebesar 87,5% mencit dideteksi mengalami peningkatan anti-dsDNA dan 47% mencit mengalami peningkatan ANA (Cui *et al.*, 2006). Penelitian lain yang dilakukan oleh Chowdhary *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa induksi *pristane* pada mencit juga akan meningkatkan produksi ANA pada 4 dari 11 mencit yang diinjeksi oleh *pristane* setelah 2 minggu paska injeksi. Pada penelitian tersebut tidak hanya didapatkan adanya peningkatan ANA saja tetapi juga didapatkan manifestasi glomerulonefritis dan juga *haemorrhagic pulmonary capillaritis* pada mencit yang diinjeksi oleh *pristane* (Chowdhary *et al.*, 2007).

Autoantibodi yang didapatkan meningkat ternyata bukan hanya ANA atau anti-dsDNA saja melainkan pada beberapa penelitian lain didapatkan bahwa autoantibodi lain juga meningkat pada mencit yang diinjeksi oleh *pristane*. Penelitian yang dilakukan oleh Satoh *et al.*, (2000) menemukan bahwa 100% mencit strain BALB/c yang diinjeksi oleh *pristane* mengalami peningkatan autoantibodi tersebut setelah diukur menggunakan ELISA. Penelitian lain yang

dilakukan oleh Mizutani *et al.*, (2005) hanya menemukan 40% hingga 43% peningkatan dari autoantibodi tersebut. Munculnya autoantibodi LES setelah diinduksi oleh *pristane*, meliputi anti-Sn, anti-dsDNA, dan anti ribosomal P. hampir ada pada semua strain mencit namun memiliki onset yang berbeda-beda.

## 2. 10 Kerangka Teori

