

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan gangguan autoimun multisistem dengan manifestasi klinis yang luas di mana puncak onset yaitu antara usia remaja dan awal 40 tahun-an dengan rasio wanita dengan pria sebesar 9 : 1. Grup etnik tertentu, seperti keturunan Afrika atau Asia memiliki faktor risiko lebih besar daripada pasien dari Kaukasia. Tidak ada *single factor* sebagai penyebab LES, di mana faktor genetik, lingkungan, hormonal, infeksi dan abnormalitas molekul sel-sel imun dapat sebagai faktor predisposisi terjadinya LES (Cervera, *et al.*, 2009; Crispin, *et al.*, 2010).

Insiden tahunan LES di Amerika Serikat sebesar 5,1 per 100.000 penduduk, sementara prevalensi LES di Amerika dilaporkan 52 kasus per 100.000 penduduk, dengan rasio gender wanita dan laki-laki antara 9-14:1. Belum terdapat data epidemiologi LES yang mencakup semua wilayah Indonesia. Data tahun 2002 di RSUP Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta, didapatkan 1.4% kasus LES dari total kunjungan pasien di poliklinik Reumatologi Penyakit Dalam, sementara di RS Hasan Sadikin Bandung terdapat 291 Pasien LES atau 10.5% dari total pasien yang berobat ke poliklinik reumatologi selama tahun 2010 (Yoga, *et al.*, 2011).

Etiologi penyakit LES saat ini masih belum jelas. Abnormalitas yang sangat jelas pada imunitas *innate* dan adaptif yang dicetuskan oleh faktor genetik dan lingkungan telah jelas memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit ini. Meskipun begitu, peranan neutrofil (tipe sel imun yang jumlahnya

paling banyak) pada patologi penyakit ini masih belum jelas. Lebih dari 10 tahun terakhir, studi tentang keterlibatan neutrofil pada inisiasi dan terjadinya LES serta hasil kerusakan organ yang berkali-kali ditemukan pada pasien dengan penyakit ini telah dilakukan (Kaplan, 2011).

2.1.1 Patogenesis LES

Perkembangan LES secara khusus berhubungan dengan gangguan pada imunitas adaptif dan *innate* (Denny, F.M. *et al*, 2010). Patogenesisnya sangat kompleks dan belum terlalu jelas. Berbagai faktor seperti genetik, hormon, dan lingkungan diketahui mempunyai peran penting dalam mekanisme penyakit tersebut. Kombinasi semua faktor tersebut mengakibatkan disregulasi sistem imun seperti gangguan mekanisme klirens dan gangguan aktivitas supresi sel-sel imun oleh sel-sel supresor sehingga terjadi aktifitas limfosit B berlebihan yang menyebabkan pembentukan berbagai antibodi. Menurut Jianxin *et al*. (2009), sel B pasien LES lebih sensitif terhadap stimulasi sitokin seperti IL-6. Jumlah sel B didapatkan meningkat di darah tepi pada setiap tahapan aktivasinya. Gagalnya supresi terhadap sel B mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan penyakit berlangsung terus. Defek pada regulasi imun seperti klirens sel-sel apoptotik dan kompleks imun menjadi kontributor terjadinya LES. Deposisi kompleks antigen-antibodi (kompleks imun) akan menimbulkan gangguan pada berbagai organ dan jaringan. Mekanisme tersebut mendasari semua kelainan patologi utama yang terjadi pada LES seperti inflamasi, vaskulitis, dan vaskulopati (Mok *and* Lau, 2003; Kalim *et al*, 2011).

Beberapa gen juga diketahui meningkatkan kerentanan terhadap LES, baik gen *major histocompatibility complex* (MHC) maupun non MHC. Gen HLA klas I terutama HLA DR2 dan DR3 paling sering dilaporkan berkaitan dengan

LES pada berbagai ras, dengan risiko relatif untuk terjadinya LES antara 2-5 kali (Kalim *et al*, 2011). Beberapa kasus LES dilaporkan memiliki kaitan dengan defisiensi *single gene* (misalnya komponen komplemen C1q dan C4) namun banyak kasus dihasilkan dari kombinasi efek dari banyak gen (Tsokos, 2011).

Pada penderita LES kelainan imunologis yang utama adalah produksi autoantibodi. *Antibodi antinuclear* (ANA) adalah antibodi yang paling sering ditemukan pada penderita LES (>95%). Antibodi *double stranded DNA* (anti dsDNA) dan antibody anti Sm merupakan antibodi yang spesifik untuk LES sehingga dimasukkan dalam kriteria klasifikasi dari LES. Titer antibodi anti dsDNA seringkali berubah sesuai dengan waktu dan aktivitas penyakit, sedangkan titer antibodi anti Sm biasanya konstan. Antibodi anti dsDNA lebih sering mengendap di ginjal, sehingga diduga kompleks imun DNA antibodi anti DNA merupakan mediator inflamasi yang utama pada kerusakan ginjal (Mok *and* Lau, 2003).

Diduga terbentuknya kompleks imun (DNA dan anti-DNA) merupakan ciri imunopatologis lupus. Antibodi yang mengikat nukleosom (DNA dan histon) dapat terjadi di ginjal dan membentuk kompleks imun *in situ*. Baik kompleks imun yang dibentuk dalam sirkulasi atau *in situ* berperan dalam terjadinya kerusakan ginjal, kulit, pleksus koroid di otak dan jaringan lainnya (Anolik, 2007).

Pada pasien LES juga ditemukan defek pada produksi sitokin. Penurunan produksi IL-1 dan IL-2 dapat berpengaruh terhadap fungsi sel T dan sel B. Di samping itu ditemukan pula penurunan respon sel T regulator terhadap IL-2 yang mengakibatkan fungsinya menurun sehingga fungsi sel Th seakan lebih meningkat. Sebaliknya hiperreaktivitas sel B dapat disebabkan oleh hipersensitivitas sel Th terhadap IL-2 (Anolik, 2007). Pola sitokin serta sinyal

transduksi yang abnormal mungkin juga berperan penting dalam patogenesis LES (Cervera *et al*, 2009).

2.1.2 Manifestasi Klinis LES

Manifestasi klinis penderita LES sangat heterogen antara lain: *skin rash* (*malar rash*, *discoid rash*, *rash* pada kulit setelah terpapar sinar matahari); fotosensitivitas; *oral ulcers* (terjadi pada mulut atau hidung dan bertahan dari beberapa hari sampai lebih dari sebulan); artritis; serositis (pleuritis atau perikarditis); glomerulonefritis: darah atau protein pada urin, atau tes dengan hasil fungsi ginjal yang buruk. Di Amerika Serikat, kurang lebih 35% orang dewasa dengan LES mempunyai kecenderungan klinis nefritis pada saat diagnosis, dengan total estimasi 50–60% nefritis berkembang selama 10 tahun perjalanan penyakit (Bevra, *et al.*, 2012); gejala neurologis; tes darah yang abnormal (Crispin, *et al.*, 2010; Ginzler dan Tayar, 2013).

Pada penyakit yang sudah lanjut dan berbulan-bulan sampai tahunan akan menunjukkan manifestasi klinis yang lebih spesifik dan lengkap serta cenderung melibatkan multiorgan. Manifestasinya bisa ringan sampai berat sehingga dapat mengancam jiwa (Yuriawantini *et al*, 2007).

2.1.3 Diagnosis LES

Perjalanan penyakit LES yang ditandai dengan eksaserbasi akut dan remisi memerlukan pemantauan yang ketat akan aktifitas penyakitnya. Evaluasi aktivitas penyakit ini berguna sebagai panduan dalam pemberian terapi. Ada beberapa metode untuk menilai derajat aktivitas penyakit, antara lain SLEDAI (*LES Disease Activity Index*) atau MEX-SLEDAI.

Diagnosis LES ditegakkan berdasarkan gambaran klinik dan laboratorium. *American College of Rheumatology* (ACR), revisi tahun 1997, mengajukan 11

kriteria untuk klasifikasi LES, dimana bila didapatkan 4 kriteria saja maka diagnosis LES sudah dapat ditegakkan (lihat Tabel 1).

Tabel 2.1 Kriteria Diagnosis LES dari *American College of Rheumatology*, modifikasi 1997 (Cervera *et al*, 2009; Tsokos, 2011)

Kriteria	Definisi
Ruam malar	Ruam pada pipi dan hidung, kadang berbentuk seperti kupu-kupu
Ruam diskoid	Ruam yang tampak kemerahan, meninggi, <i>disk-shaped patches</i>
Fotosensitivitas	Ruam pada kulit akibat reaksi terhadap sinar matahari
Ulkus di mulut	Sariawan di mulut atau nasofaring, biasanya tidak nyeri
Arthritis	Nyeri dan bengkak pada dua atau lebih dari sendi
Serositis	Inflamasi pada selaput paru-paru (pleuritis) atau inflamasi pada selaput jantung yang menyebabkan nyeri dada yang semakin berat saat inspirasi (perikarditis) yang terekam oleh EKG atau ada efusi perikardial
Gangguan pada ginjal	Proteinuria persisten > 0,5 gram/hari atau <i>celluler casts</i> pada urin
Gangguan neurologis	Kejang atau psikosis
Gangguan hematologi	Anemia hemolitik (dengan retikulositosis), leukopenia (<4000/mm ³), limfopenia (<1500/mm ³), atau trombositopenia (<100.000/mm ³)
Gangguan imunologis	Anti-double-strand DNA, anti-Sm, antifosfolipid positif Tes serologi syphilis positif palsu

Antibodi antinuklear abnormal	Tes ANA positif
Empat dari 11 kriteria harus dipenuhi untuk diagnosis LES	

Bila dijumpai 4 atau lebih kriteria di atas maka diagnosis LES memiliki sensitifitas 85% dan spesifitas 95%. Bila hanya 3 kriteria dan salah satunya ANA(+) maka sangat mungkin LES dan diagnosis bergantung pada pengamatan klinis. Bila ANA(-) maka kemungkinan bukan LES. Apabila hanya tes ANA (+) dan manifestasi klinis lain tidak ada maka belum tentu LES serta diperlukan observasi jangka panjang.

Pada Rekomendasi Perhimpunan Reumatologi Indonesia Untuk Diagnosis dan Pengelolaan Lupus Eritematosus tahun 2011, disebutkan bahwa:

- Test ANA merupakan test yang sensitif, namun tidak spesifik untuk LES
- Test ANA dikerjakan hanya jika terdapat kecurigaan terhadap LES
- Test Anti dsDNA positif menunjang diagnosis LES, namun jika negatif tidak menyingkirkan diagnosis LES

Penyakit LES yang berat dapat mengancam jiwa apabila didapatkan kondisi berikut :

- a. Jantung : endokarditis, vaskulitis arteri koroner, miokarditis, tamponade jantung, hipertensi maligna
- b. Paru-paru : hipertensi pulmonal, perdarahan paru, pneumonitis, emboli paru
- c. Gastrointestinal : pankreatitis, vaskulitis mesenterika
- d. Ginjal : nefritis proliferatif dan atau membranous
- e. Kulit : vaskulitis berat, ruam difus disertai ulkus atau blister
- f. Neurologi : kejang, *acute confusional state*, koma, stroke, mielopati transversa

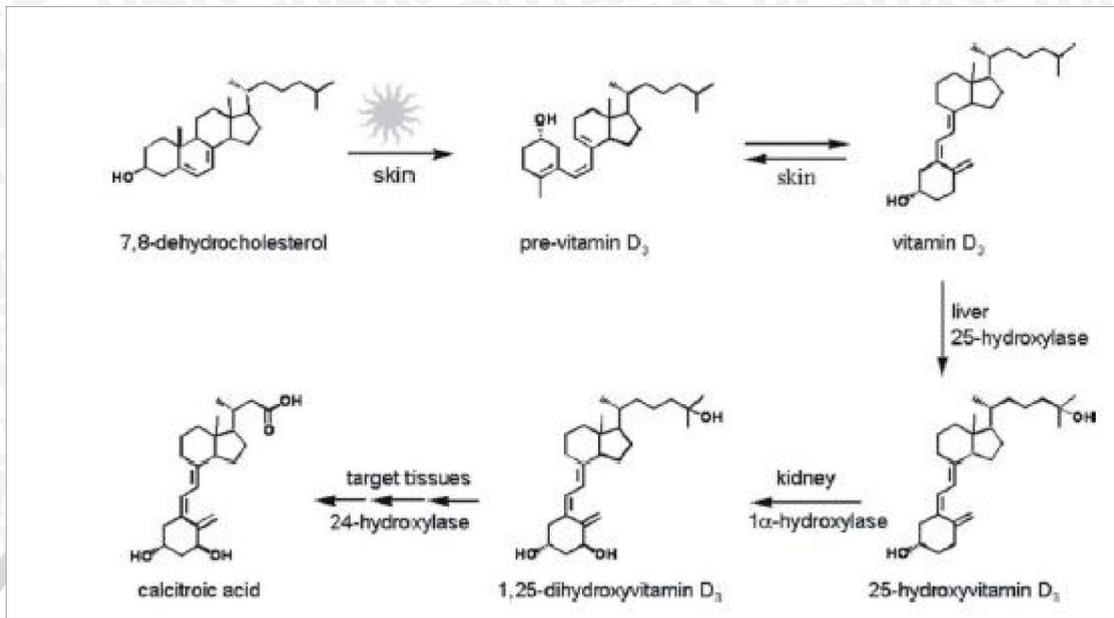
g. Hematologi : anemia hemolitik, neutropenia, trombositopenia, purpura trombotik trombositopenia, trombosis vena atau arteri.

2.2 Vitamin D

Vitamin D sebagai vitamin yang larut lemak diklasifikasikan sebagai secosteroid dan memiliki struktur molekul mirip dengan steroid. Vitamin ini diperoleh dari makanan, suplemen, dan sintesis endogen di kulit. Vitamin D telah banyak dihubungkan dengan pembentukan tulang . Kini, vitamin D banyak dipromosikan mampu menurunkan risiko kanker dan penyakit autoimun (Marshall, 2008). Kemampuan metabolit aktif vitamin D [1,25(OH)2D3] mengaktifkan VDR (*vitamin D receptor*) untuk mentranskrip (atau menekan) 913 gen dan memiliki kemungkinan mempengaruhi ekspresi 27.091 gen menimbulkan perubahan paradigma dalam memandang vitamin ini (Marshall, 2008).

2.2.1 Farmakokinetik Vitamin D

Terdapat 2 bentuk dari vitamin D yaitu vitamin D₃ atau kolekalsiferol dan vitamin D₂ ergokalsiferol. Keduanya dapat ditemukan pada makanan atau suplemen, tetapi hanya vitamin D₃ yang diproduksi di kulit (Bikle, 2009; Kamen *et al.*, 2010). Di kulit, senyawa 7,8-dehidrosikolesterol (provitamin D) melalui reaksi fotolisis non enzimatis akan dirubah menjadi previtamin D₃ dengan perantara sinar ultraviolet (gambar 1). Selanjutnya previtamin D₃ ditransformasi menjadi vitamin D₃ (kolekalsiferol) (Bikle, 2009; Kamen *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Synthesis, activation, and catabolism of vitamin D (Ginanjari *et al.*, 2007).

Vitamin D₂ dan vitamin D₃ yang berasal dari makanan bergabung dengan kilomikron dan ditransport melalui sistem limfe ke sirkulasi vena. Vitamin D di kulit atau yang berasal dari makanan dapat disimpan di sel lemak dan dilepaskan dari sel tersebut. Vitamin D di sirkulasi terikat pada protein spesifik pengikat vitamin D (*vitamin D binding protein/VDBP*), yang selanjutnya dibawa ke hati, di mana vitamin D diubah oleh vitamin D-25-hidroksilase menjadi 25-hidroksivitamin D [25(OH)D]. Bentuk 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] di sirkulasi inilah yang digunakan untuk menentukan status vitamin D. Bentuk vitamin D ini [25(OH)D] secara biologis inaktif dan harus diubah di ginjal menjadi bentuk aktif berupa 1,25-dihidroksivitamin D [1,25(OH)₂D] oleh 25-hidroksivitamin D-1α-hidroksilase (1-OHase). (Bikle, 2009; Kamen *et al.*, 2010). Sel-sel pada sistem imun juga mengekspresikan enzim 1α-OHase sehingga mampu menghidroksilasi 25(OH)D dari sirkulasi menjadi 1,25(OH)₂D. Bentuk 1,25(OH)₂D pada sel-sel imun akan

bekerja secara autokrin atau parakrin. Selanjutnya bentuk vitamin D ini dari sirkulasi menuju sel target dan berikatan dengan *vitamin D receptor* (VDR) dalam sitoplasma yang lalu masuk ke nukleus dan mengalami heterodimerisasi dengan *the retinoid X receptor* (RXR). Kemudian kompleks 1,25(OH)₂D-RXR-VDR akan berikatan dengan vitamin D response elements (VDRE) yang berlokasi di DNA (Kamen *et al.*, 2010).

Akhirnya, enzim 24-hydroxylase yang banyak terdapat di ginjal dan intestin, akan mengkatalisa 1,25(OH)₂D₃ menjadi metabolit inaktif yakni *calcitroic acid*. Kemudian zat tersebut akan diekskresi dalam kandung empedu (bilier) (Mora *et al.*, 2008).

2.2.2 Farmakodinamik Vitamin D

Vitamin D sebagai sistem endokrin merupakan komponen penting dari interaksi ginjal, tulang, hormon paratiroid, dan usus halus (*intestine*) dalam memelihara konsentrasi normal kalsium ekstraseluler untuk menjaga proses fisiologis dan integritas sistem skeletal. Di ginjal, efek utama 1,25(OH)₂D sebagai kontrol hemostasis melalui mekanisme supresi oleh *1β-hydroxylase* dan stimulasi oleh *24-hydroxylase* pada tubulus proksimal ginjal. Di intestin, peran vitamin D penting dalam proses absorpsi kalsium dan fosfat dari makanan. Di tulang, vitamin D berperan dalam pembentukan dan memelihara mineralisasi tulang. Pada hormon paratiroid, vitamin D berperan sebagai modulator fungsi paratiroid terutama pada kondisi hiperparatiroid pasien dengan penyakit ginjal kronik (Ginanjar *et al.*, 2007).

Dosis vitamin D yang diperlukan untuk menghasilkan berbagai efek yang bermanfaat > 20µg/hari, sedikit lebih tinggi daripada dosis sebelumnya yang biasa dipakai yakni 5 – 10 µg/hari. Berdasarkan *Food & Nutrition Board* (FNB)

Adequat Intake (AI) sebesar 5 – 15 µg atau 200 – 600 IU vitamin D untuk dewasa dengan usia >19 tahun. *Tolerable Upper Intake Level* (UL) sebesar 50 µg (2000 IU) untuk vitamin D3. *European Commision Scientific Committe on Food* (SCF) menentukan dosis vitamin D3 sebesar 50 µg, sedangkan *United Kingdom Expert Group on Vitamin & Minerals* (EVM) menetapkan penggunaan dosis 25 µg/hari. Anak-anak diberikan dosis sebesar 37.5 µg/kg/hari. Maksimum NOAEL (*no observed adverse effect level*) sebesar 250 µg/hari. Efek toksisitas timbul pada penggunaan 700 hingga ≥ 1600 nmol/L (Hatchcock *et al*, 2007).

Secara *in vitro*, Hewison *et al.* (2003) menggunakan $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sebesar 10^{-8} hingga 10^{-7} M dalam eksperimennya yang meregulasi diferensiasi dan fungsi sel dendritik. Efek inhibisi maksimal yang diperoleh adalah pada konsentrasi 10^{-8} M.

Pada eksperimen yang dilakukan oleh Hertting *et al.* (2010) yakni bahwa vitamin D dapat meningkatkan *cathelicidin-mediated* efek antibakterial pada sel-sel epitel kandung kemih, digunakan $1,25\text{D}_3$ (BioXell) sebesar 10^{-8} M dan 25D_3 sebesar 10^{-7} M. Dosis itu dipakai untuk menghasilkan respon CAMP (ekspresi gen *cathelicidin* pada manusia) gen yang konsisten pada *cell line* sel kandung kemih.

2.2.3 Pemanfaatan Vitamin D

Provitamin D terutama ditemukan pada makanan yang berasal dari hewan. Vitamin D alami ditemukan pada minyak ikan (yang juga merupakan sumber vitamin A), telur, mentega, hati, ikan makarel, salmon, sardin dan hering. Saat ini telah banyak terdapat makanan yang disuplementasi dengan vitamin D, terutama hasil olahan susu dan sereal (Ginanjar *et al*, 2007).

Selain fungsi klasik yang telah disebut pada bab sebelumnya, vitamin D ternyata juga memiliki peran dalam supresi pertumbuhan sel, regulasi apoptosis, modulasi respon imun, regulasi fungsi dan diferensiasi kulit, regulasi sistem renin angiotensin, regulasi sekresi insulin, kontrol fungsi otot, dan kontrol fungsi sistem saraf pusat (Ginanjar *et al.*, 2007).

2.2.4 Pemanfaatan Vitamin D di Bidang Immunologi

Vitamin D memiliki efek sebagai imunomodulator terhadap sel-sel imun, seperti limfosit T, limfosit B, granulosit, monosit, dan sel dendrit. Masing-masing sel imun tersebut mengekspresikan VDR dan memproduksi enzim *1 α -Oxase* dan *24-hydroxylase* sehingga mereka mampu memproduksi 1,25(OH)₂D aktif secara lokal (Kamen *et al.*, 2010).

Bentuk 1,25(OH)₂D berperan sebagai agen immunosupresif pada sel limfosit. Pemberian vitamin D juga terbukti dapat menurunkan sitokin – sitokin pro inflamasi (Schleithoff *et al.*, 2006). Beberapa sitokin yang terlibat dalam fungsi sel T adalah target langsung bagi kerja 1,25(OH)₂D. Terjadi pergeseran dari fenotip T *helper* (Th)1 menjadi lebih tolerogenik ke fenotip T *helper* (Th)2. Interferon (IFN)- γ dan IL-2 akan menurun sedangkan IL-5 dan IL-10 akan meningkat. Metabolit 1,25(OH)₂D juga mendorong perkembangan sel Th2 melalui efek langsung pada sel CD4 (Kamen *et al.*, 2010). Vitamin D memiliki efek langsung pada sel B dan menghambat produksi immunoglobulin. Paparan 1,25(OH)₂D secara *in vitro* mengganggu diferensiasi limfosit B (Kamen *et al.*, 2010).

Bentuk 1,25(OH)₂D ini juga berperan sebagai agen immunosupresif pada sel neutrofil yang merupakan sel granulosit. Vitamin D dapat menurunkan produksi mediator inflamasi dan intermediet reaktif oksigen pada neutrofil. Hal tersebut dimungkinkan karena vitamin D dapat menginduksi gen 5 – LOX dan

mensupresi COX-2 yang akan mengkatalisa produksi *anti-inflammatory eicosanoids* seperti lipoksin dan menurunkan sintesis prostaglandin. Rasio 5-LOX/COX-2 inilah yang dikontrol oleh vitamin D untuk menekan reaksi berlebih dari netrofil (Hirsch *et al*, 2011).

Hal paling baru dari 1,25(OH)₂D adalah perannya dalam mempertahankan sel dendrit dalam kondisi yang imatur. Sel dendrit adalah *antigen-presenting cell* (APC) yang dapat membuat sel T dalam keadaan imatur atau kondisi imunologik, tergantung dari antigennya dan status maturitas sel dendritnya. Pemberian 1,25(OH)₂D menghasilkan penurunan ekspresi dari molekul kostimulasi CD40, CD80, CD86 dan IL-12 dan peningkatan IL-10. Kombinasi dari efek sel T tersebut menyebabkan supresi dari peningkatan sel T (Ginanjar *et al*, 2007).

Disebutkan bahwa efek yang lebih kuat pada 1,25(OH)₂D dalam meningkatkan imunitas selular daripada imunitas humoral telah diajukan sebagai salah satu mekanisme kunci bagaimana vitamin D dapat memberikan efek yang menguntungkan dalam penyakit autoimun. Data terbaru menyatakan bahwa hampir bisa dipastikan target untuk respon imun adaptif pada 1,25(OH)₂D adalah sel dendrit. Dengan menekan pematangan sel dendrite dan meningkatkan ekspresinya pada sitokin khusus seperti IL-10, 1,25(OH)₂D dapat meningkatkan tolerogenesis melalui supresi pada perkembangan sel Th1 dan induksi Treg (Ghoreishi *et al*, 2009).

2.2.5 Vitamin D [1,25(OH)₂D₃] dan LES

Selain peran utamanya dalam metabolisme kalsium dan tulang, 1,25-(OH)₂D₃ memiliki efek imunomodulator yang potensial pada banyak tipe sel imun, termasuk sel imunitas *innate* dan adaptif. Efek yang menguntungkan dari

1,25-(OH)₂D₃ telah terlihat pada berbagai model penyakit autoimun, diantaranya tikus model *systemic lupus erythematosus* (LES) (Zhang *et al*, 2009).

Sejumlah penelitian pada pasien LES telah dilaporkan adanya kaitan antara vitamin D dengan berbagai manifestasi klinis dan abnormalitas respon imun. Kamen *et al.*, (2006) melaporkan bahwa kadar 25(OH)D₃ 124 pasien LES ras Kaukasia yang baru terdiagnosis nampak lebih rendah daripada 240 kontrol sehat dengan usia, jenis kelamin dan kebiasaan merokok yang sama ($p=0.04$). Dari sejumlah 67% subyek LES dengan defisiensi vitamin D tersebut ditunjukkan bahwa ras Afrika Amerika mempunyai rata-rata kadar vitamin D (15.9 ng/ml) yang lebih rendah daripada ras Kaukasia (31.3 ng/ml). Kadar vitamin D yang sangat rendah (<10 ng/ml) didapatkan pada 22 pasien LES yang mempunyai manifestasi nefritis dan fotosensitif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa defisiensi vitamin D merupakan faktor risiko untuk LES dan memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran vitamin D dalam prevensi atau pengobatan pasien LES (Marco *et al*, 2010).

2.3 Neutrofil

Neutrofil adalah leukosit yang paling banyak ditemukan dalam tubuh manusia, mempunyai masa hidup yang pendek, dan diproduksi di sumsum tulang. Sebagai bagian dari imunitas *innate*, neutrofil memediasi inflamasi dengan beberapa tahap yaitu inisial adesi, ekstrasvasasi dan migrasi, dan destruksi. Untuk mengeliminasi mikroba, terdapat beberapa proses yang terjadi termasuk fagositosis, *reactive oxygen species* (ROS), produksi substansi mikroba dari granula sitoplasma, dan formasi *neutrophil extracellular traps* (NETs) yang disebut NETosis. Masa hidup neutrofil yang memanjang dapat menyebabkan

perkembangan penyakit dengan kerusakan jaringan, hal ini dapat terjadi karena respon adanya sitokin atau agen proinflamasi khusus lain pada jaringan yang terinfeksi dan mengalami inflamasi (Kaplan, 2011).

2.3.1 Peran, Fenotip, dan Fungsi Neutrofil pada LES

Meskipun respon neutrofil yang menyimpang telah diketahui pada berbagai kondisi inflamasi kronis dan autoimun, peran neutrofil pada LES sampai saat ini masih belum jelas. Secara sederhananya, LES dideskripsikan sebagai suatu sindrom autoimun sistemik yang dicirikan oleh produksi kompleks imun dan autoantibodi untuk berbagai antigen nuklear. Gambaran LES sesuai dengan keadaan kronis di mana autoimunitas subklinis mendahului perkembangan manifestasi klinis yang jelas secara sekunder dari kerusakan jaringan akibat imun. Percepatan aterosklerosis juga merupakan gambaran yang mencolok pada LES dan menunjukkan penyebab umum morbiditas dan mortalitas (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013).

Beberapa abnormalitas kualitatif neutrofil pada LES telah dilaporkan, yaitu induksi agregasi neutrofil oleh serum pasien LES meningkat dibandingkan serum normal; kemampuan fagositosis neutrofil pada LES lebih rendah dibandingkan neutrofil normal; pembersihan material apoptosis dengan fagositosis secara menyimpang; penurunan respon terhadap sitokin seperti IL-8; dan pemendekan telomer prematur. Selain itu, neutrofil pada pasien LES teraktivasi secara intravaskular (diduga dilakukan oleh nukleosom), mengekspresikan molekul adesi secara berlebihan, dan cenderung membentuk agregat. Peningkatan level protein yang disintesis dan dikeluarkan neutrofil yang teraktivasi berhubungan dengan aktifitas penyakit dan adanya autoantibodi yang melawannya (Kaplan, 2011).

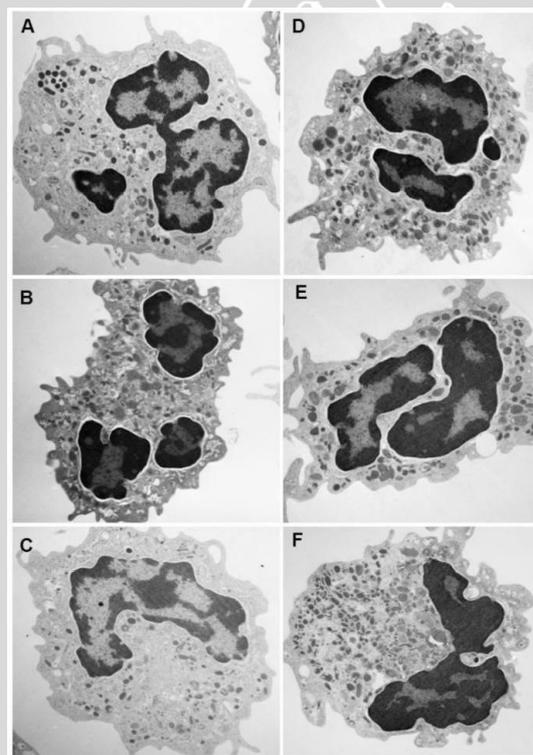
2.3.3 Neutropenia pada LES

Mekanisme terjadinya neutropenia pada pasien LES yaitu termasuk autoantibodi reaktif neutrofil yang memusnahkan sel; autoantibodi *neutralizing* melawan *growth factors* yang beraksi terhadap neutrofil seperti G-CSF; supresi sumsum tulang; peningkatan apoptosis neutrofil dan nekrosis sekunder; dan kemungkinan kematian akibat NETosis. Namun pengamatan neutropenia dan peningkatan neutrofil yang menginduksi kerusakan jaringan pada pasien LES sulit untuk dihubungkan. Salah satu kemungkinannya adalah proporsi neutrofil yang menginfiltrasi organ mengalami NETosis atau apoptosis, sehingga berkontribusi pada terjadinya neutropenia dan kerusakan organ serta disregulasi imun (Kaplan, 2011).

2.4 Low-Density Granulocytes (LDGs)

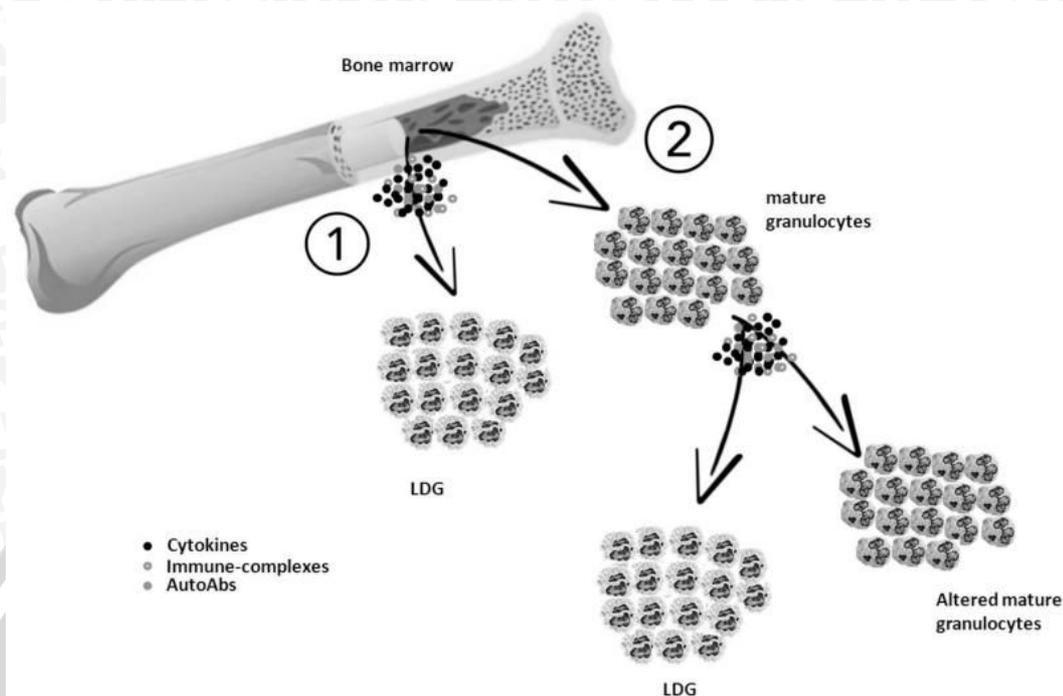
Pada LDGs ekspresi mRNA berbagai protein *immunostimulatory bactericidal* dan alarmin ada pada granula primer, relatif pada normal density pada LES dan neutrofil kontrol. Level mRNA yang mengkode neutrofil serin protease paling tinggi pada tahap promyelocytic saat diferensiasi di sumsum tulang dan diturunkan regulasinya saat sel ini matang, hal ini menunjukkan bahwa LDGs memiliki fenotip imatur lebih daripada neutrofil. Menariknya, dan berlawanan dengan LDGs, profil gen neutrofil densitas normal pada pasien LES dewasa tidak berbeda dengan yang pada kontrol sehat. Pada studi yang dilakukan Nakou et al, regulasi *granulopoiesis-related genes* sebagian besar meningkat pada LES. Ekspresi gen yang meningkat ini termasuk beberapa '*early granulopoiesis genes*' yang regulasinya juga meningkat pada studi LDGs *gene array*. Observasi ini didukung studi sebelumnya yang menunjukkan bahwa profil

ekspresi gen granulosit PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) yang diobservasi pada pasien pediatri dengan LES konsisten dengan pasien yang dilaporkan karena granulosit imatur yang banyak (myeloblas dan promyelosit). Profil ekspresi gen granulosit PBMC yang meningkat ini bertepatan dengan adanya neutrofil imatur di sampel darah tepi. Penemuan ini mendukung bahwa LDGs dapat menunjukkan penyimpangan imatur yang berasal dari sumsum tulang yang mungkin menetap atau menyebar di darah dan atau jaringan lain pada pasien dengan LES. (Kaplan, 2011; Borregaard, 2010).



Gambar 2.2 Analisis morfologi *low-density granulocytes* lupus dengan mikroskop elektron

Keterangan: Pada gambar 2.2 disajikan gambaran dari *normal-density granulocytes* (A-C) dan *low-density granulocyte* (D-F) menggunakan *Transmission electron microscopy* (TEM) yang diisolasi dari pasien dengan LES. Dalam gambar ini terlihat berbagai jenis granul dalam sitoplasma. Daerah *Heterochromatic* (gelap) dan *euchromatic* (lebih terang) terdefiniskan dengan jelas di kedua sel. Lobus *nuclear* terdefiniskan secara jelas dalam *normal-density granulocytes*, sedangkan LDGs menunjukkan inti kurang berlobus (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013).



Gambar 2.3 Skema representasi kemungkinan asal LDGs pada LES

Keterangan: (1) Tingginya kadar sitokin, kompleks imun, autoantibodi dan / atau molekul tak dikenal lainnya dapat mempengaruhi perkembangan neutrofil di sumsum tulang dan mempromosikan perubahan ekspresi gen dan morfologi *nuclear*. (2) Atau, neutrofil matang terkena molekul tersebut dengan level tinggi sehingga mengubah ekspresi gen, kemampuan untuk kembali (*homing*) ,dan fenotipnya sehingga menghasilkan subpopulasi patogen yang menyimpang (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013).

2.4.1 Peran *LDGs* pada Patogenesis LES

Berbagai sitokin jumlahnya berlebih pada LES, termasuk *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF yang penting untuk produksi neutrofil dalam memenuhi kebutuhan yang meningkat selama infeksi tetapi tidak mutlak diperlukan untuk *granulocytopoiesis*) atau IFN I, yang dapat meningkatkan mobilisasi prekursor neutrofil dari sumsum tulang atau menghambat diferensiasinya menjadi granulosit yang matang. IFN I disintesis lebih tinggi pada neutrofil lupus daripada neutrofil kontrol dan meningkat signifikan pada kelompok LDG. LDGs menginduksi sitotoksitas sel endotel dan menyintesis IFN I pada

level yang cukup untuk mengganggu kapasitas sel progenitor endotel untuk berdiferensiasi menjadi sel matur (Kaplan, 2011; Denny, M.F, *et al.*, 2010).

Beberapa studi menunjukkan adanya neutrofil abnormal yang terisolasi dari *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) pada pasien LES dewasa dan pediatri. Adanya LDGs pada fraksi sel *LES-derived mononuclear* ditentukan dengan imunohistokimia dan mikroskopis. Pada tahun 2010, Kaplan melakukan studi untuk mendeskripsikan kapasitas fungsional peran patogenik dari LDGs yang diisolasi pada pasien LES dewasa, dan mencari potensinya pada manifestasi klinis LES. LDGs dipisah berbatasan dengan monosit dengan *flow cytometry* menggunakan skala dual-log dari depan dan sisi intensitas pencar. LDGs dibedakan dari monosit atas dasar tingginya marker neutrofil CD15 dan rendahnya ekspresi CD14. Selanjutnya LDGs yang diturunkan oleh LES menunjukkan adanya CD10 dan CD16 dan sedikit MHC kelas II dan CD86 (Kaplan, 2011).

Tingginya LDGs dalam darah perifer meningkatkan prevalensi keterlibatan kulit dan vaskulitis. Sebaliknya, tidak ada hubungan kuat yang ditemukan antara usia, durasi penyakit, dan/atau penggunaan obat immunosupresif dengan adanya LDGs (Kaplan, 2011)

2.5 Flow Cytometry

2.5.1 Definisi

Salah satu metode untuk mengukur jumlah dan jenis sel PMN bisa dengan metode *flow cytometry*. *Flow cytometry* (FCM) adalah suatu teknik yang cepat dan merupakan analisis optik dari sel-sel individu. Pengukuran dilakukan oleh suatu susunan detektor dimana sel mengalir dalam suatu aliran cairan

melalui suatu pancaran sinar laser. Pada saat sampel diperiksa, cahaya disebarkan oleh sel-sel, tingkat cahaya yang disebarkan memberikan informasi mengenai struktur dan ukuran sel. Fluoresensi juga dapat dihasilkan dari absorpsi dan re-emisi cahaya oleh zat kimia yang secara alami ada dalam sel (autofluorescence) atau telah ditambahkan ke dalam sampel sebelum analisis dilakukan (Putra, 2012).

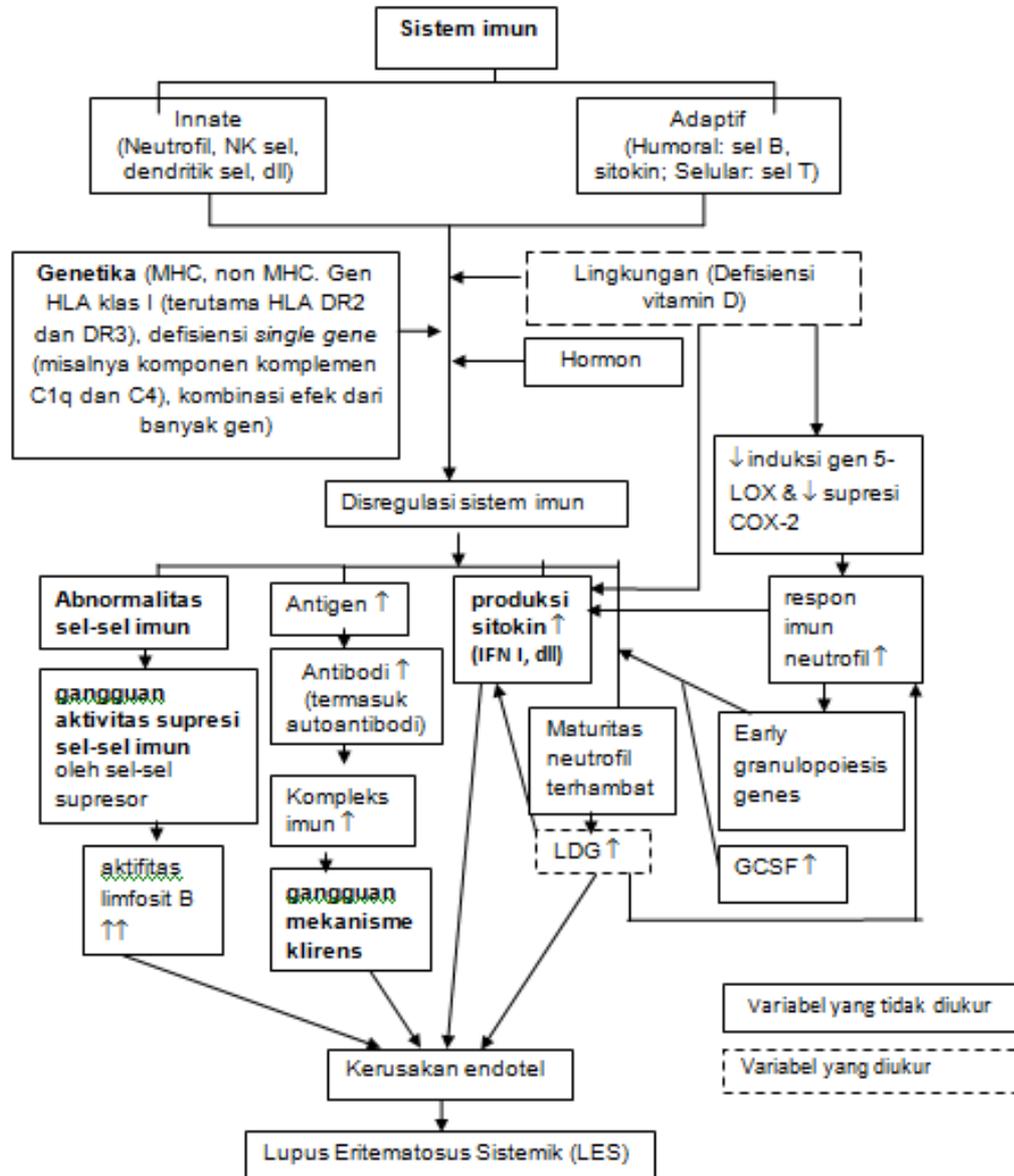
Flow cytometry memiliki banyak keuntungan dibandingkan pengukuran sel yang konvensional yaitu:

1. Dapat mengukur 10.000 sel/detik dan mampu mengukur > 100.000 sel. Pengukuran oleh mikroskop hanya beberapa ratus sel saja. FCM dapat mendeteksi sel-sel yang langka.
2. *Flow cytometry* menggunakan detektor-detektor elektronik yang sangat sensitif untuk mengukur intensitas cahaya yang disebarkan atau fluoresensi pada lumen tertentu. Dengan mengkalibrasi instrumen menggunakan sampel yang diketahui ukuran atau intensitas fluoresennya, maka dimungkinkan untuk pengukuran kuantitatif.
3. Jenis *flow cytometry* yang komersial, mengukur 5 - 10 parameter yang berbeda (misalnya ukuran, protein content, DNA content, lipid content, sifat antigenik, aktivitas enzim dan lain-lain) yang dapat dikumpulkan dari setiap sel, sehingga jenis sel yang berbeda dapat dibedakan (Putra, 2012).

2.5.2 Gambaran *Flow Cytometry* LDGs

Kemurnian fraksi LDG adalah 95%, dan sel diidentifikasi dengan perwarnaan CD15-FITC, CD14-PE, dan CD10-PE/cy5 menggunakan *flow*

cytometry. LDGs diidentifikasi sebagai CD15+/CD14lo atau CD10+/CD14lo. (Denny, F.M.*et al*, 2010).



Gambar 2.4 Konsep Teori Penelitian