

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Autoimunitas

Autoimunitas didefinisikan sebagai respon imun yang menyerang antigen jaringan sendiri yang disebabkan oleh mekanisme normal yang gagal berperan untuk mempertahankan *self-tolerance* sel B, sel T atau keduanya. Penyakit autoimun adalah kerusakan jaringan atau gangguan fungsi fisiologis yang ditimbulkan oleh respon autoimun. Perbedaan tersebut penting oleh karena respon imun dapat terjadi tanpa disertai penyakit atau penyakit yang ditimbulkan oleh mekanisme lain, seperti infeksi (Abbas, 2004; Baratawidjaja, 2010).

Dalam populasi, sekitar 3,5% individu menderita penyakit autoimun, 94% dari jumlah tersebut berupa penyakit Grave (hipertiroidism), diabetes melitus tipe 1, anemia pernisirosa, artritis reumatoid, tiroiditis, vitiligo, sklerosis multipel dan Lupus Eritematosus Sistemik (LES). Penyakit ditemukan lebih banyak pada wanita (2,7x dibanding pria) diduga karena peran hormon. LES mengenai wanita 10 kali lebih sering dibanding pria. (Baratawidjaja, 2010)

Faktor yang menjadi dasar pada perkembangan autoimun adalah adanya kerentanan terhadap suatu gen yang diturunkan, yang dapat berkontribusi terhadap gagalnya sistem toleransi imun diri sendiri, selain itu adanya pemicu dari lingkungan seperti infeksi yang dapat mengaktivasi sel limfosit reaktif. Etiologi autoimun sendiri sampai saat ini masih belum diketahui karena penyakit autoimun pada manusia sering kali bersifat heterogen dan multifaktor, antigen sendiri yang menginduksi dan yang menjadi target pada reaksi autoimun sering

kali tidak diketahui, dan manifestasi klinis dari penyakit autoimun itu sendiri munculnya lama setelah reaksi autoimun yang pertama (Abbas, 2004).

2.1.1 Kriteria Autoimunitas.

Untuk membuktikan bahwa autoimunitas merupakan sebab penyakit tertentu, diperlukan sejumlah kriteria yang harus dipenuhi. Ada 6 butir yang diperlukan untuk menentukan kriteria autoimunitas.

Tabel 2.1. Kriteria Autoimun		
No.	Kriteria	Catatan
1	Autoantibodi atau sel T autoreaktif dengan spesifitas untuk organ yang terkena ditemukan pada penyakit	Kriteria ditemukan pada kebanyakan penyakit endokrin autoimun. Lebih sulit ditemukan pada antigen sasaran yang tidak diketahui seperti pada AR. Autoantibodi lebih mudah ditemukan dibandingkan sel T autoreaktif, tetapi autoantibodi dapat juga ditemukan pada beberapa subyek normal
2	Autoantibodi dan atau sel T ditemukan di jaringan cedera	Benar pada beberapa penyakit endokrin, LES, dan beberapa glomerulonefritis
3	Ambang autoantibodi atau respons sel T menggambarkan aktivitas penyakit	Hanya ditemukan pada penyakit autoimun sistemik akut dengan kerusakan jaringan progresif cepat seperti pada LES, vaskulitis sistemik, atau penyakit anti glomerulus membran basal
4.	Penurunan respon autoimun memberikan perbaikan penyakit	Keuntungan imunosupresi terlihat pada beberapa penyakit, terbanyak imunosupresan tidak spesifik dan berupa anti inflamasi
5.	Transfer antibodi atau sel T ke pejamu sekunder menimbulkan penyakit autoimun pada resipien	Pada manusia dengan transfer transplasental antibodi IgG autoreaktif selama kehamilan trimester terakhir dan dengan timbulnya penyakit autoimun pada resipien transplan sumsum tulang bila donor memiliki penyakit autoimun
6.	Imunisasi dengan autoantigen dan kemudian induksi respon autoimun menimbulkan penyakit.	Banyak protein self menginduksi respon autoimun pada hewan bila disuntikan dengan ajuvan yang benar. Lebih sulit dibuktikan pada manusia, tetapi imunisasi rabies dengan jaringan otak mamalia yang terinfeksi (tidak infeksius) dapat menimbulkan ensefalomyelitis autoimun.

2.1.2 Faktor Imun yang Berperan pada Autoimunitas

A. *Sequestered* Antigen.

Sequestered antigen adalah antigen sendiri yang karena letak anatominya, tidak terpajan dengan sel B atau sel T dari sistem imun. Dalam keadaan normal, *Sequestered* antigen dilindungi dan tidak ditemukan untuk dikenal sistem imun. Perubahan anatomik dalam jaringan seperti inflamasi (sekunder oleh infeksi, kerusakan iskemia atau trauma) dapat memajukan *Sequestered* antigen dengan sistem imun yang tidak terjadi pada keadaan normal. Contohnya protein lensa intraokular dan sperma. Inflamasi jaringan dapat pula menimbulkan perubahan struktur pada self antigen dan pembentukan determinan baru yang dapat memacu reaksi autoimun.

B. Gangguan Presentasi

Gangguan dapat terjadi pada presentasi antigen, infeksi yang meningkatkan respon *Major Histocompatibility Complex* (MHC), kadar sitokin yang rendah (misalnya TGF- β) dan gangguan respon terhadap IL-2. Pengawasan beberapa sel autoreaktif diduga bergantung pada sel Ts atau Treg. Bila terjadi kegagalan sel Ts atau Treg maka sel Th dapat dirangsang sehingga menimbulkan autoimunitas.

C. Ekspresi MHC-II abnormal

Sel β pankreas dengan *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM) mengekspresikan kadar tinggi MHC-I dan MHC-II, sedang subyek sehat sel β mengekspresikan MHC-I yang lebih sedikit dan tidak mengekspresikan MHC-II sama sekali. Ekspresi MHC-II yang tidak pada tempatnya itu yang biasanya hanya diekspresikan pada APC dapat mensensitasi sel Th terhadap peptida

yang berasal dari sel β atau tiroid dan mengaktifkan sel β atau Tc atau Th1 terhadap self antigen.

D. Aktivasi sel B poliklonal

Autoimunitas dapat terjadi oleh karena aktivasi sel B poliklonal oleh virus (Ebstein Barr Virus), LPS (Lipopolisakarida) dan parasit malaria yang dapat merangsang sel B secara langsung yang menimbulkan autoimunitas. Antibodi yang dibentuk terdiri atas berbagai autoantibodi.

E. Peran CD4 dan Reseptor MHC

Sel T mengenal antigen melalui TCR dan MHC serta peptida antigenik. Untuk seseorang menjadi rentan terhadap autoimunitas harus memiliki MHC dan TCR yang dapat mengikat antigen sel sendiri.

F. Keseimbangan Th1 – Th2

Penyakit autoimun organ spesifik terbanyak terjadi melalui sel T CD4. Ternyata keseimbangan Th1-Th2 dapat mempengaruhi terjadinya autoimunitas. Th1 menunjukkan peran pada autoimunitas sedang pada beberapa penelitian Th2 tidak hanya melindungi terhadap induksi penyakit, tetapi juga terhadap proses progres penyakit.

G. Sitokin pada Autoimunitas

Beberapa mekanisme kontrol melindungi efek sitokin patogenik, diantaranya adalah adanya ekspresi sitokin sementara dan reseptornya serta produksi antagonis sitokin dan inhibitornya. Gangguan mekanismenya meningkatkan regulasi atau produksi sitokin yang tidak benar sehingga menimbulkan efek patofisiologik. IL-1 dan TNF telah mendapat banyak perhatian sebagai sitokin yang menimbulkan kerusakan. Kedua sitokin ini menginduksi

ekspresi sejumlah protease dan dapat mencegah pembentukan matriks ekstraselular atau merangsang penimbunan matriks yang berlebihan.

2.2 Lupus Eritematosus Sistemik

Lupus Eritematosus Sistemik merupakan gangguan autoimun multisistem dengan manifestasi klinis yang luas. Puncak onset 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 resiko lebih besar daripada pasien dari Kaukasia. Tidak ada *single factor* sebagai penyebab LES, dimana 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). Prevalensi LES dilaporkan berkisar 12.2 per 100.000 penduduk dengan angka mortalitas dan morbiditas yang cukup tinggi terutama di negara sedang berkembang (Shakra, 2008). Peneliti lain bahkan melaporkan prevalensinya berkisar antara 20 – 150 kasus per 100.000 populasi, dengan prevalensi tertinggi di Brazil (Tsokos, 2011).

Penyakit LES ini ditandai oleh produksi antibodi terhadap komponen-komponen inti sel yang berhubungan dengan manifestasi klinis yang luas. Etiologi dan patogenesis penyakit ini sampai saat ini masih belum jelas. Hilangnya toleransi imun, banyaknya antigen, meningkatnya sel T *helper*, terganggunya supresi sel B dan perubahan respon imun dari Th1 ke Th2 menyebabkan hiper-reaktivitas sel B dan terbentuknya autoantibodi (Mok *and* Lau, 2003).

2.2.1 Patogenesis LES

Patogenesis LES 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 bahwa sel B pasien LES lebih sensitif terhadap stimulasi sitokin seperti IL-6 (Jianxin *et al.*, 2009). 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.

Gangguan 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 dkk., 2011).

Beberapa gen juga diketahui meningkatkan kerentanan terhadap LES, baik gen *major histocompatibility complex* (MHC) maupun non MHC. Gen HLA kelas I terutama HLA DR2 dan DR3 paling sering dilaporkan berkaitan dengan LES pada berbagai ras, dengan resiko relatif untuk terjadinya LES antara 2 -5 kali (Kalim dkk., 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).

2.2.2 Manifestasi Klinis LES

Manifestasi klinis penderita LES sangat heterogen antara lain *skin rash*, fotosensitivitas, *oral ulcers*, arthritis, serositis (pleuritis atau perikarditis), glomerulonefritis, gejala neurologis (misalnya kejang), anemia hemolitik, leukopenia, dan trombositopenia (Crispin *et al.*, 2010). 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).

Perjalanan aktivitas penyakit LES yang ditandai dengan eksaserbasi dan remisi, memerlukan pemantauan yang ketat akan aktivitas penyakitnya. Evaluasi aktivitas penyakit ini berguna sebagai panduan dalam pemberian terapi. Indeks untuk menilai aktivitas penyakit seperti SLEDAI, MEX-SLEDAI, SLAM, BILAG Score, dsb. Dianjurkan untuk menggunakan MEX-SLEDAI. MEX-SLEDAI lebih mudah diterapkan pada pusat kesehatan primer yang jauh dari tersedianya fasilitas laboratorium canggih (Kasjmir *et al.*, 2011). Tabel MEX-SLEDAI dapat dilihat pada halaman lampiran.

2.2.3 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 (*SLE 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 2.2).

**Tabel 2.2 Kriteria Diagnosis LES dari *American College of Rheumatology*,
modifikasi 1997**

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 persisten > 0,5 gram/hari atau <i>cellular 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 (Cervera <i>et al</i> , 2009; Tsokos, 2011)	

Bila dijumpai 4 atau lebih kriteria di atas maka diagnosa LES memiliki sensitifitas 85% dan spesifitas 95%. Bila hanya 3 kriteria dan salah satunya ANA(+) maka sangat mungkin LES dan diagnosa 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.

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.

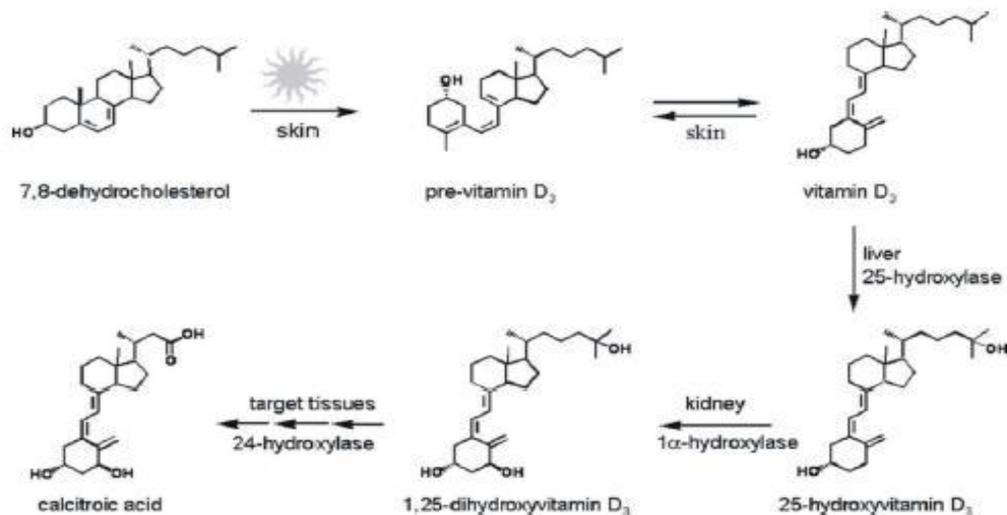
2.3 Vitamin D

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 resiko kanker dan penyakit autoimun (Marshall, 2008). Kemampuan metabolit aktif vitamin D $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$

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).

2.3.1 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 2.1). Selanjutnya previtamin D₃ ditransformasi menjadi vitamin D₃ (kolekalsiferol) (Bikle, 2009; Kamen *et al.*, 2010).



Gambar 2.1. Sintesis, Aktivasi, dan Katabolisme dari 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, dimana 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-1 α -hidroksilase (1-OHase) (Bikle, 2009; Kamen *et al.*, 2010). Sel-sel pada sistem imun juga mengekspresikan enzim 1 α -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.*, 2010).

2.3.2 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 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sebagai kontrol hemostasis melalui mekanisme supresi oleh *1 β -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 > 20 μg /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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hari}$. Maksimum NOAEL (*no observed adverse effect level*) sebesar 250 $\mu\text{g}/\text{hari}$. Efek toksisitas timbul pada penggunaan 700 hingga ≥ 1600 nmol/L (Hatchcock *et al.*, 2007).

Secara *in vitro*, Hewison 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 dendritic (Hewison *et al.*, 2003). Efek inhibisi maksimal yang diperoleh adalah pada konsentrasi 10^{-8} M. Pada eksperimen yang dilakukan oleh Hertting yakni bahwa vitamin D dapat meningkatkan *cathelicidin-mediated* efek antibakterial

pada sel-sel epitel kandung kemih, digunakan $1.25D_3$ (BioXell) sebesar 10^{-8} M dan $25D_3$ sebesar 10^{-7} M (Hertting *et al.*, 2010). Dosis itu dipakai untuk menghasilkan respon CAMP (ekspresi gen *cathelicidin* pada manusia) gen yang konsisten pada *cell line* sel kandung kemih.

2.3.3 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 (Ginanjari *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 (Ginanjari *et al.*, 2007).

2.3.4 Pemanfaatan Vitamin D di Bidang Imunologi

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 -Ohase* 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 invitro mengganggu diferensiasi limfosit B (Kamen *et al.*, 2010).

Bentuk 1,25(OH)₂D ini juga berperan sebagai agen immunosupresif pada sel netrofil yang merupakan sel granulosit. Vitamin D dapat menurunkan produksi mediator inflamasi dan intermediet reaktif oksigen pada netrofil. 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 antigenya 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 (Ginancar *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 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ adalah sel dendrit. Dengan menekan pematangan sel dendrite dan meningkatkan ekspresinya pada sitokin khusus seperti IL-10, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dapat meningkatkan tolerogenesis melalui supresi pada perkembangan sel Th1 dan induksi Treg (Ghoreishi *et al*, 2009).

2.3.5 Vitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] dan Lupus Eritematosus Sistemik (LES)

Selain peran utamanya dalam metabolisme kalsium dan tulang, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ memiliki efek imunomodulator yang potensial pada banyak tipe sel imun, termasuk sel imunitas *innate* dan adaptif. Efek yang menguntungkan dari $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ telah terlihat pada berbagai model penyakit autoimun, diantaranya tikus model *systemic lupus erythematosus* (SLE) (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 melaporkan bahwa kadar $25(\text{OH})\text{D}$ 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 menunjukkan bahwa ras Afrika Amerika mempunyai rata-rata kadar vitamin D (15.9 ng/ml) yang lebih rendah daripada ras Kaukasia (31.3 ng/ml) (Kamen *et a.l*, 2006). 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 resiko untuk LES dan memerlukan penelitian lebih

lanjut untuk mengetahui peran vitamin D dalam prevensi atau pengobatan pasien LES (Marco *et al.*, 2010).

2.4 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

2.4.1 Definisi NETs

Neutrophil extracellular traps (NETs) adalah ikatan antara kromatin dengan protein granular dan protein tertentu pada sitoplasma yang membentuk jaring dan berfungsi menangkap patogen. NETs dikeluarkan oleh sel darah putih bernama netrofil. Jaring- jaring ini kemungkinan merupakan pertahanan terakhir untuk mengontrol infeksi mikroba. Pengeluaran kromatin ini menghasilkan kematian sel yang unik yang bernama NETosis (Brinkmann *et al.*, 2012).

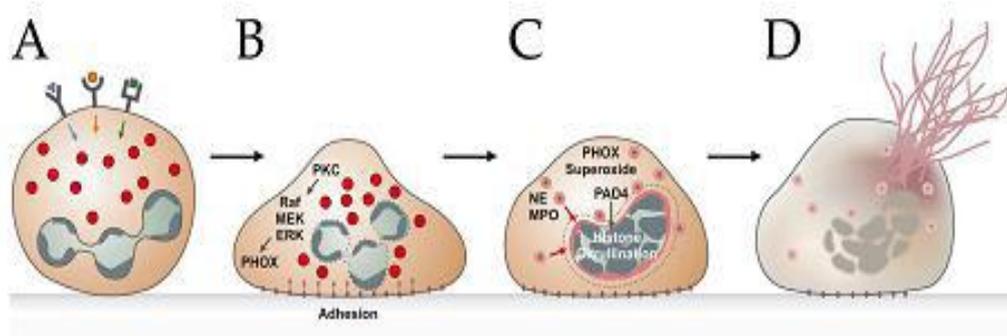
Netrofil sebagai penghasil NETs merupakan suatu bentuk diferensiasi akhir dari sel darah putih golongan polimorfonuklear yang memiliki masa hidup singkat pada peredaran darah. Sel ini akan aktif jika ada rangsangan kemotaktif yang diproduksi pada daerah infeksi. Selain melakukan fungsinya sebagai fagositosis yang mengeliminasi patogen pada fagosom, netrofil juga terbukti mampu mengeluarkan NETs pada jaringan ekstraseluler (Brinkmann *et al.*, 2004). Proses "*trapping*" ini dapat mencegah penyebaran patogen dari lokasi infeksi awal dan inaktivasi factor virulen. Netrofil elastase (NE) pada NETs mampu merusak faktor virulen dari *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, dan *Yersinia enterocolitica* (Weinrauch *et al.*, 2002; Brinkmann *et al.*, 2004). NETs juga mengandung Cathepsin G dan proteinase 3 yang mampu merusak faktor virulen dari berbagai patogen (Averhoff *et al.*, 2008). Selain itu, NETs mengandung beberapa protein yang mampu membunuh maupun menghambat mikroba yang terdiri dari enzim (lisozim, protease), peptide antimikroba

(Bactericidal Permeability-Increasing Protein / BPI, defensins), *ion chelators* (calgranulin), dan yang menarik adalah dengan adanya histon. Aktivitas antimikroba dari NETs secara keseluruhan merupakan kombinasi dari berbagai komponen tersebut.

Secara ultrastruktur, NETs terdiri dari flamen halus dengan diameter 17 nm yang tersusun rapat dan kemungkinan dimodifikasi dengan nukleosom (Brinkmann *et al.*, 2004). Struktur kerangka ini memiliki domain globular dengan diameter 50 nm yang dibentuk oleh protein granular. Pada mikroskop electron, NETs terlihat seperti awan dan dapat menempati ruang 10–15 kali lebih besar dari sel yang memproduksinya (Urban *et al*, 2009).

2.4.2 Mekanisme Pembentukan NETs

Untuk melepaskan NETs, netrofil aktif harus mengalami beberapa tahapan perubahan morfologis. Pada menit – menit awal, netrofil memipih dan menempel pada substratum. Pada beberapa jam kemudian, nucleus kehilangan bentuk lobusnya, kromatin mengalami dekondensasi, dan di lapisan membran nucleus secara progresif saling melepaskan diri. Secara bersamaan granula netrofil mengalami disintegrasi. Setelah satu jam, membran nukleus mengalami disintegrasi membentuk vesikel, nukleoplasma dan sitoplasma bersatu menjadi masa yang homogen. Pada tahap akhir, netrofil membulat dan mengalami kontraksi hingga membran sel pecah dan kandungan dalam netrofil dikeluarkan pada ruang ekstraseluler membentuk NETs seperti pada gambar 3 (Brinkmann *et al*, 2012).



Gambar 2.2. Proses Pembentukan NETs (Brinkmann *et al.*, 2012).

Terbentuknya NETs oleh netrofil dapat terjadi karena adanya infeksi bakteri, jamur, dan virus (Fuchs *et al.*, 2007). Pembentukan NET juga dapat dipicu oleh hidrogen peroksida seperti ROS, antibodi, kompleks antibodi antigen (Romo *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2011), dan komponen mikroba seperti lipopolisakarida atau lipofosfoglikan (Costa *et al.*, 2009).

Pembentukan ROS dapat terjadi melalui kompleks NADPH oksidase atau fagositik oksidase (PHOX) yang dapat diinduksi secara baik oleh PMA yang secara langsung menstimulasi PKC. Pada rangkaian selanjutnya akan dihasilkan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida inilah yang menjadi substrat untuk salah satu enzim terbanyak pada granul netrofil mieloperoksidase (MPO) yang akan menghasilkan asam hipoklorous (HOCl) (Brinkmann *et al.*, 2012).

MPO bersama dengan NE dari granula azurofilik dapat mempengaruhi segregasi antara eukromatin dan heterokromatin pada proses pembentukan NETs. NE yang dilepaskan akan memasuki nukleus dan akan mendegradasi histon H1 dan mengolah *core histones*. MPO juga bermigrasi ke nukleus lebih lambat daripada NE dan mempercepat dekondensasi dari kromatin sebagai bahan dari pembentukan NETs (Papayannopoulos *et al.*, 2010).

2.4.3 Hubungan NETs dalam Patogenesis LES

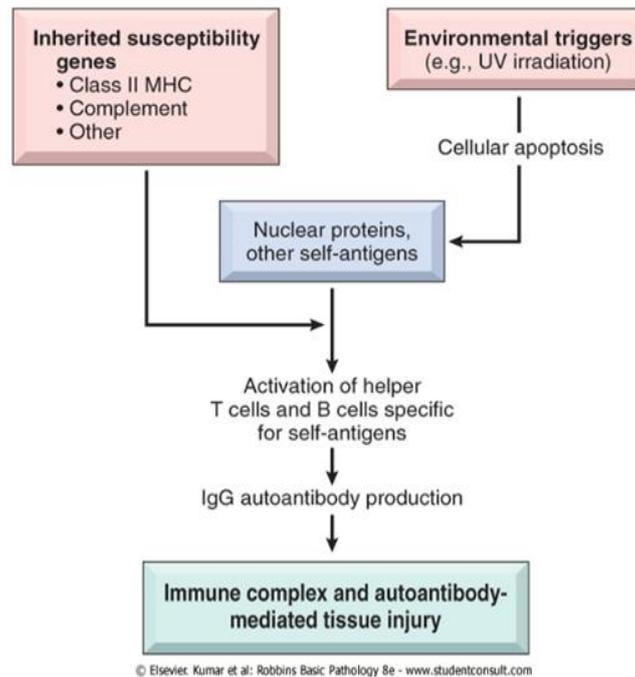
Pada pasien LES terutama pasien wanita, sering ditemukan antibodi terhadap DNA, histon, dan protein netrofil yang merupakan komponen dari NETs. Netrofil dari pasien LES memiliki kemampuan lebih dalam memproduksi NETs terutama sebagai respon terhadap kompleks antibodi (Craft, 2011; Romo *et al.*, 2011). Pada PBMC pasien LES, ditemukan jenis netrofil yang abnormal yang disebut *low-density granulocytes* (LDGs). LDGs memiliki kemampuan yang tinggi untuk mensintesis neutrophils extracellular traps (NETs), yang mampu mengeluarkan substansi bakterisidal protein imunostimulasi, dan autoantigen seperti LL-37, IL-17, dan dsDNA (Lande *et al.*, 2011).

LDGs ini memiliki peran penting pada patogenesis lupus dengan cara merusak sel endotel dan meningkatkan sintesis sitokin proinflamasi dan Interferon (IFN) tipe I. Peningkatan apoptosis sel endotel ini memiliki korelasi yang kuat terhadap terbentuknya kegagalan fungsi vaskuler dan dapat sebagai predisposisi terbentuknya atherosklerosis. Proses yang paling berperan adalah melalui NETosis yang mampu meningkatkan kemampuan untuk membunuh endotel dan menstimulasi sintesis IFN- α oleh *plasmacytoid dendritic cells* (PDCs) (Villanueva *et al.*, 2011). Aktivasi PDCs ini diperantarai melalui TLR-9 yang diaktivasi oleh NETs dan menjadi perantara respon imun alami menuju sistem imun adaptif. Hal inilah, yang menjadikan NETs mampu menginisiasi respon autoimun (Romo *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2011).

Sebagai bukti lain bahwa NETs berperan pada patogenesis LES, terdapat hubungan yang kuat antara mutasi DNase1 (Yasutomo *et al.*, 2001) atau DNase1like 3 (Al Mayouf *et al.*, 2011) yang merupakan enzim pendegradasi NETs. Selain itu pada studi kohort di Eropa, menurunnya degradasi NETs pada

oleh karena DNase1 inhibitors atau titer tinggi dari antibodi antiNET dapat ditemukan pada subpopulasi LES (Hakkim *et al.*, 2010). Kegagalan dalam degradasi NETs ini juga dapat meningkatkan aktivasi komplemen dan deposisi dari protein komplemen C1q, yang dapat menghambat DNase1 (Leffler *et al.*, 2012).

Selain efek yang sudah dijelaskan, netrofil dapat mengeluarkan IL-17 melalui proses NETosis pada kulit dan darah perifer dari pasien psoriasis (Lande *et al.*, 2011). IL-17 ini dapat berperan pada patogenesis SLE melalui kapasitasnya dalam mengamplifikasi inflamasi lokal dengan meningkatkan rekrutmen sel-sel imunitas alami dan stimulasi respon adaptif sel B. IL-17A terbukti terdeteksi pada level mRNA pada LDGs dan netrofil normal. Hal ini menguatkan bahwa pembentukan NETs memiliki hubungan yang kuat dengan patogenesis LES melalui berbagai efeknya (Villanueva *et al.*, 2011). Secara skematis patogenesis dari penyakit autoimun (Lupus Eritematosus Sistemik) dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2.3. Model dari Patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik.

Pentingnya sel apoptosis sebagai sumber antigen diri sendiri masih bersifat spekulatif. Serta bagaimana pengaruh gen dalam memicu aktivasi limfosit menjadi lebih reaktif juga masih belum diketahui (Robbins,2007)

Hubungan antara patogenesis LES yang digambarkan di atas dengan pembentukan NETs sebagai suatu respon imun serta hubungan kadar vitamin D terhadap sistem imun non-spesifik (*innate*) dan spesifik (adaptif) akan dijelaskan pada gambar 2.4.

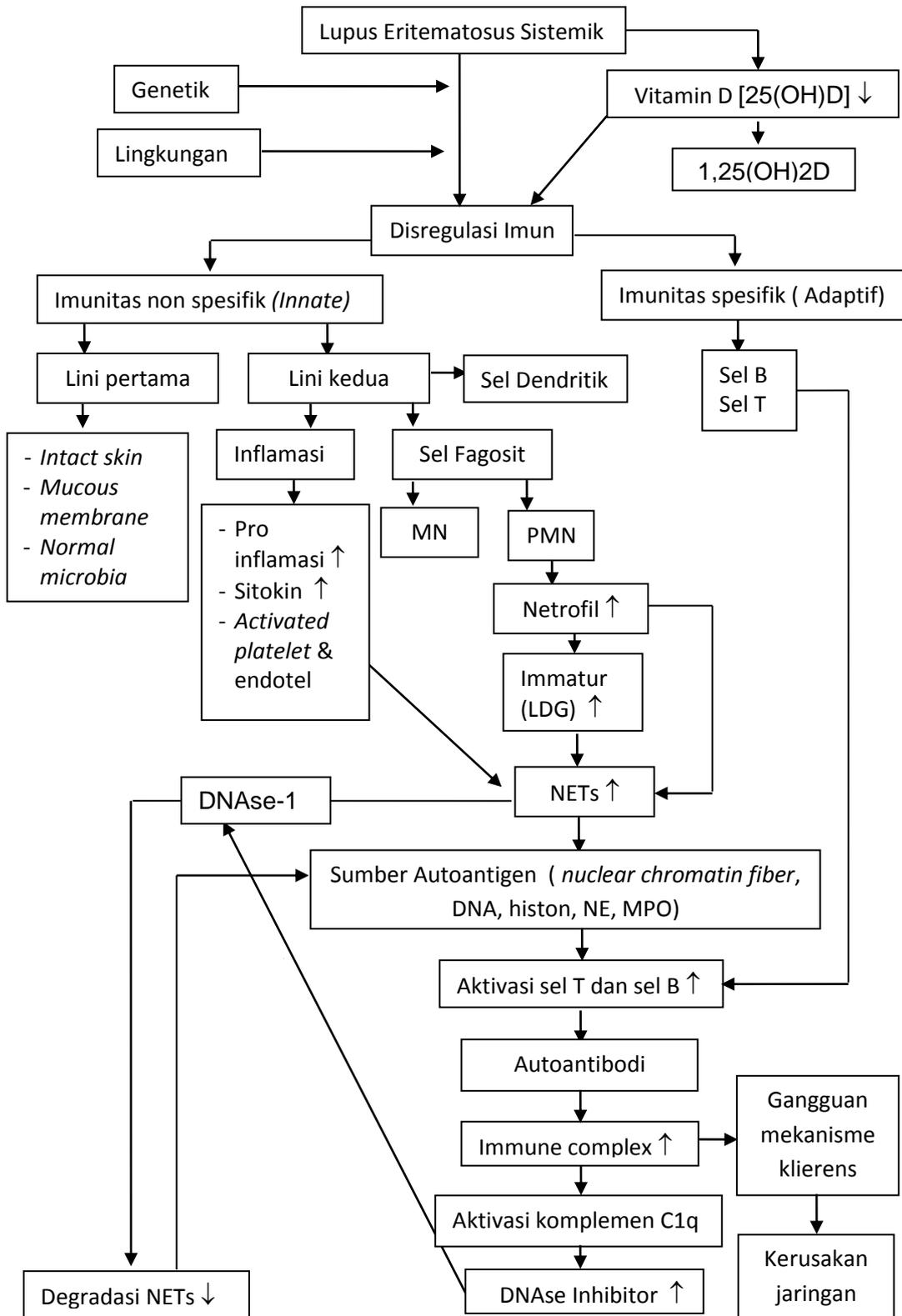
2.5 MPO-DNA

Myeloperoxidase (MPO) adalah salah satu protein yang melimpah didalam neutrofil, sekitar 5% dari total berat kering sel tersebut. MPO tersimpan didalam granul azurofilik dan dilepaskan ketika neutrofil terstimulasi. MPO mengkatalisa oksidasi dari klorida dan ion halida yang lain didalam hidrogen peroksida untuk

menghasilkan asam hipoklorus dan produk reaktif lainnya yang memediasi aksi antimikroba yang efisien (Metzler *et al.*, 2011)

MPO memegang peranan penting dalam respon antimikroba pada netrofil. Pada penelitian yang dilakukan Metzler menunjukkan bahwa netrofil dari donor yang defisiensi total MPO gagal untuk membentuk NETs, hal tersebut mengindikasikan bahwa MPO dibutuhkan dalam pembentukan NETs. Sebaliknya, netrofil dari donor yang defisiensi parsial MPO masih dapat membentuk NETs, dan hambatan secara farmakologis pada MPO hanya menunda dan mengurangi pembentukan NETs. Produk ekstraselular dari MPO tidak membantu dalam pembentukan NETs, dugaan bahwa MPO berkerja secara sel autonom (Metzler *et al.*, 2011).

NETs itu sendiri terdiri dari DNA, histon, *neutrophil elastase (NE)*, myeloperoxidase (MPO), *human neutrophil protein (HNP)* dan protein granular lain (Villanueva *et al.*, 2011). Ketika NE dan MPO keluar dari granul azurofilik netrofil, NE dan MPO bermigrasi ke nukleus menyebabkan dekondensasi dari kromatin. Selanjutnya netrofil pecah, eksternalisasi protein granular netrofil untuk membentuk suatu jaring untuk menangkap patogen yang disebut NETs. (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Eksternalisasi MPO-DNA terbukti merupakan salah satu cara mengukur NETs. MPO-DNA meningkat tinggi setelah pemberian PMA pada netrofil orang normal. MPO-DNA dapat diukur menggunakan metode Elisa selain dengan imunoflouresense (Caudrillier *et al.*, 2012). Secara skematis, konsep teori pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Hubungan NETs dan Vitamin D dalam Sistem Imun Tubuh terhadap

Patogenesis LES