

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik (LES)

2.1.1 Definisi dan Prevalensi LES

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) atau lebih dikenal dengan *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE) merupakan penyakit autoimun kronis dan kompleks (Zhu, 2007). Etiologi dan patofisiologi penyakit ini masih belum jelas. Terdapat banyak bukti bahwa patogenesis LES bersifat multifaktor yang melibatkan faktor lingkungan, genetik, dan hormonal (Mok dan Lau, 2003). Penyakit ini terutama menyerang wanita usia reproduktif dengan rasio wanita dibanding pria adalah 8:1 hingga 9:1 (Mok dan Lau, 2003; Zhu, 2007). Prevalensinya pun bervariasi antara 12,5 hingga 39 per 100.000 populasi, berdasarkan studi internasional yang telah dilakukan. Begitu juga insidensnya bervariasi antara 1,8 sampai 7,6 kasus per 100.000 orang per tahun (Shakra, 2008).

Secara keseluruhan, prevalensi dan insiden lebih tinggi pada wanita dibanding pria, dan lebih banyak pada populasi orang Afrika di Amerika, Afro-Caribbean, dan Asia, dibanding dengan populasi Kaukasia (Rus, 2007). Secara umum, angka harapan hidup pasien LES dalam 10 tahun mengalami peningkatan hingga mencapai 90% pada tahun 2000 di negara maju. Akan tetapi, 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 Etiologi dan Patogenesis LES

Etiologi atau penyebab dari penyakit LES ini masih belum begitu dipahami dengan jelas. Akan tetapi, beberapa ahli menyebutkan bahwa terdapat berbagai faktor yang dapat mencetuskan terjadinya penyakit ini, meliputi paparan eksternal seperti sinar ultraviolet, obat, dsb., genetik, sistem neuroendokrin, jenis kelamin yang meliputi hormonnya (Mok dan Lau, 2003). Hingga saat ini patogenesis penyakit ini masih belum jelas namun terdapat beberapa bukti-bukti adanya penyimpangan sistem imun yang melibatkan kelainan dari sel T, sel B, sel monosit, maupun sel regulator. Akibat dari penyimpangan tersebut terjadi aktivasi sel B poliklonal, meningkatnya jumlah sel yang menghasilkan antibodi, produksi autoantibodi dan terbentuknya kompleks imun. Aktivasi sel B poliklonal tersebut akan membentuk antibodi yang tidak spesifik yang dapat bereaksi terhadap berbagai jenis antigen termasuk antigen tubuh sendiri. Gagalnya supresi terhadap sel B mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan penyakit berlangsung terus (Jianxin, 2009).

Kelainan imunologis yang menjadi dasar patogenesis dari LES adalah adanya produksi autoantibodi. Autoantibodi ini merupakan suatu antibodi yang dapat menyerang molekul *self* atau antigen sendiri yang terdapat di dalam tubuh. Antigen tersebut berada di dalam nukleus, sitoplasma, permukaan sel, dan dapat juga berupa molekul terlarut seperti *immunoglobulin G* (IgG) dan faktor koagulasi (Wallace. *et al.*, 2007).

Ditemukan banyak macam autoantibodi yang terdapat pada pasien LES, *antinuclear antibody* (ANA) adalah autoantibodi yang sering ditemukan pada

pasien LES. Antibodi terhadap *double stranded DNA* (anti-dsDNA) dan antibodi terhadap antigen Smith (anti-Smith/anti-Sm) merupakan autoantibodi yang spesifik untuk LES sehingga dimasukkan dalam kriteria klasifikasi LES. Antigen Sm tersebut merupakan suatu *small nuclear ribonucleoprotein* (snRNP) yang terdiri dari rangkaian uridin yang kaya molekul RNA dan berikatan dengan kelompok protein inti serta protein lainnya yang berhubungan dengan RNA. Anti-Sm berikatan dengan protein inti snRNP sedangkan anti-DNA berikatan dengan *conserved nucleic acid determinant* yang tersebar luas dalam DNA. Selain itu, terdapat pula autoantibodi lainnya pada pasien LES, seperti anti-Ro, anti-La, anti-reseptor NMDA, anti-nukleosom, anti-fosfolipid, anti- α actinin, dan anti-*complement 1q* (anti-C1q) dimana antibodi ini dilaporkan memiliki hubungan dengan manifestasi klinis pasien LES (Wallace, *et al.*, 2007).

Autoantibodi akan menyerang *self* antigen, khususnya antigen nukleus ataupun antigen yang terdapat di sitoplasma tersebut ketika antigen tersebut terpapar ke ekstraseluler. Terpaparnya antigen-antigen tersebut ke ekstraseluler terjadi karena gangguan klirens dari apoptosis. Sel yang terapoptosis normalnya akan dieliminasi dengan cepat oleh 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 *danger signal* yang kemudian akan dikenali oleh sistem imun dan autoantibodi 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 ginjal, kulit, pleksus koroid di otak, dan jaringan lainnya yang tentu saja dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan jaringan secara sistemik (Anolik, 2007; Wallace, *et al.*, 2007).

2.1.3 Manifestasi Klinis LES

Karakteristik umum LES biasanya ditandai dengan munculnya abnormalitas sistem imun secara luas disertai kelainan banyak organ (Zhu, 2007). Tanda utama LES adalah tingginya produksi autoantibodi terhadap antigen nukleus, seperti ds-DNA dan kromatin yang mengakibatkan kerusakan organ yang diperantarai antibodi (Zhu, 2007; Lauwerys, 2003).

Penderita LES umumnya mengeluh lemah, demam, malaise, artritis, anoreksia dan berat badan menurun. Penyakit yang sudah lanjut dan berbulan-bulan sampai tahunan barulah menunjukkan manifestasi klinis yang lebih spesifik dan lengkap serta cenderung melibatkan banyak organ. Manifestasinya bisa ringan, berat, bahkan sampai dapat mengancam jiwa (Wallace, 2007; Zhu, 2007). Kematian biasanya disebabkan karena gagal ginjal atau oleh infeksi akibat pemberian imunoterapi (Baratawidjaja, 2006).

Meskipun demikian, gejala yang muncul adalah bervariasi pada tiap pasien. LES sering juga mengalami *overlap* dengan gejala penyakit lain seperti skleroderma dan artritis reumatoid. Pasien yang sedang mengonsumsi obat tertentu (hydralazine, procainamide) akan memberikan gambaran klinis yang samar. Oleh karena itu, penyakit LES ini sering disebut dengan penyakit seribu wajah (Wallace, *et al.*, 2007).

2.1.4 Pengambilan Sampel pada Limpa Mencit Balb/c

Untuk mengetahui persentase dari sel Th1 maka diambil limpa mencit Balb/c model lupus. Fungsi limpa adalah sebagai pusat sirkulasi sistemik. Terdiri dari 2 fungsi dan kompartemen yang berbeda, yaitu pulpa merah dan pulp putih. Pulp merah adalah filter daerah yang menyingkirkan benda asing, eritrosit yang rusak dan tidak berguna. Red pulpa juga sebagai penyimpanan zat besi, eritrosit, dan trombosit. Pulp putih dibagi kedalam PALS, folikel, dan zona marginal. Pulp putih terdiri atas limfosit, makrofag, sel dendritik, sel plasma, arteriol, dan kapiler dalam kerangka reticular mirip dengan yang ditemukan dalam pulp merah. PALS terdiri dari PALS bagian dalam dan PALS bagian luar. PALS bagian dalam mengandung banyak sel T sehingga lebih mudah diwarnai daripada PALS bagian luar yang lebih banyak limfosit kecil (Cesta, 2006).

2.1.5 Peran Th1 pada Patogenesis LES

Sel T efektor CD4 dibedakan dalam beberapa subset atas dasar sitokin yang diproduksinya. Sel Th yang juga disebut sebagai sel T inducer merupakan subset sel T yang diperlukan dalam induksi respons imun terhadap antigen asing. Antigen ditangkap, diproses, dan dipresentasikan makrofag dalam konteks MHC-II ke sel CD4+. Selanjutnya sel CD4+ diaktifkan dan mengekspresikan IL-2R di samping memproduksi IL-2 yang autokrin dan merangsang sel CD4+ untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Sel CD4+ yang berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi beberapa subset yaitu TFH, Th1, Th2, Th9, Th17, dan Th22. IL-12 yang dilepas makrofag dan Sd juga menginduksi perkembangan Th1 melalui jalur yang STAT4 dependen. Faktor transkripsi T-bet yang diproduksi sebagai respons terhadap $\text{INF-}\gamma$ juga meningkatkan sel Th1 (Imunologi Dasar, 2010). IFN-I adalah

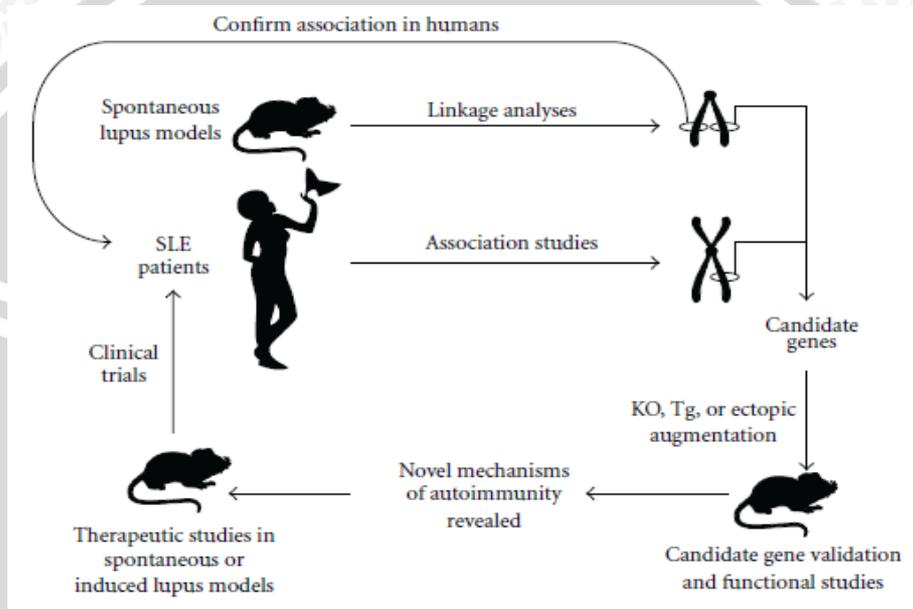
kunci mediator utama pada penyakit lupus. IFN-I terdiri dari IFN- α dan IFN- β . Peran IFN α yaitu mengubah sel dendritik imatur menjadi sel dendritik matur. Sel dendritik berperan sebagai APC, yang mempresentasikan antigen berupa DNA kepada Thelper dan CD4⁺. Melalui MHC kelas II, sel dendritik dapat mengaktifasi sel CD4⁺ salah satunya adalah sel Th1. Sehingga terjadi peningkatan Th1 yang dibantu dari peningkatan IFN- α . Peningkatan Th1 juga berasal dari peningkatan produksi sitokin IL-12 dikarenakan aktivasi Nf-kB Melalui jalur TLR7/8 dan TLR 9 hasil apoptosis tersebut menginduksi aktivasi dari NF-kB tersebut. Peran Th1 yaitu mampu meningkatkan IFN- γ yang dapat menstimulasi sel B. Selanjutnya sel B autoreaktif dapat meningkatkan antibodi (ANA dan dsDNA), sehingga terbentuk autoantibodi yang terdeposit di jaringan sebagai suatu kompleks imun (Perry, *et al.*, 2011).

LES dikarakteristikan dengan adanya produksi autoantibodi yang berlebihan, hiperaktivitas sel B, hipergamaglobunimia poliklonal, deposisi imun kompleks. Pada LES dapat ditemukan peningkatan sitokin Th1 (IL-2, IFN- γ) (Imonologi Dasar, 2010).

2.2 Hewan Model Lupus

Hewan coba atau hewan model adalah hewan yang sengaja dipelihara dan ditanamkan untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Hewan model merupakan objek hewan sebagai imitasi atau tiruan dari manusia atau spesies lain yang digunakan untuk menyelidiki fenomena biologis maupun patobiologis (Hau dan Hoosier, 2003).

Hewan model lupus telah lama dikembangkan dan telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian serta dapat diandalkan dalam mempelajari patogenesis dan terapi penyakit autoimun sistemik. Berikut ini gambar skematik yang menjelaskan integrasi antara hewan model lupus dan manusia dalam pengembangan penelitian lupus eritematosus sistemik (LES).



Gambar 2.2 Integrasi antara hewan model lupus dan manusia dalam pengembangan penelitian LES (Perry, *et al.*, 2011).

Penggunaan model murine LES telah berhasil mengidentifikasi beberapa gen kandidat baru dan beberapa dari gen tersebut berkaitan dengan LES pada manusia. Informasi lebih lanjut dalam model ini menunjukkan fakta bahwa gen ini awalnya tidak diidentifikasi dalam studi LES pada manusia. Di sisi lain, studi genom manusia baru-baru ini telah mengidentifikasi beberapa susunan gen yang berperan dalam patogenesis lupus. Dengan adanya hewan model, memungkinkan untuk dilakukan rekayasa genetika untuk mengidentifikasi gen novel yang kemudian dapat diperiksa menggunakan pendekatan gen kandidat untuk menemukan kerentanan alel manusia. Sebaliknya, gen yang diidentifikasi

pada studi manusia dapat diterjemahkan ke model murine rekayasa genetika dimana peran mereka dalam patogenesis lupus dapat diikuti (Perry, *et al.*, 2011).

Hewan model lupus yang telah ada saat ini mencakup strain hewan model lupus spontan dan hewan model lupus yang diinduksi. Hampir semua strain hewan model lupus memiliki persamaan dalam perkembangan glomerulonefritis dan produksi autoantibodi, khususnya antibodi antinuklear dan antiDNA. Namun hasil akhir yang sering diperiksa dalam studi eksperimental yang menunjukkan perbedaan spesifik dalam manifestasi klinis lupus pada beberapa organ spesifik antara lain seperti anemia hemolitik, artritis, dermatitis, dan vaskulitis (Stanford dan Peng, 2012).

2.2.1 Hewan Model Lupus Spontan

Hewan model lupus spontan atau disebut juga hewan model lupus klasik merupakan hewan coba yang dimanipulasi secara genetik sehingga timbul manifestasi klinis lupus. Strain mencit yang paling umum digunakan untuk mengembangkan lupus spontan antara lain perkawinan silang antara mencit F1 dan New Zealand Black and New Zealand White (NZB/W), mencit BMR dan *lpr*, mencit BXSB dan *Yaa*. Beberapa gen berkontribusi terhadap perkembangan LES pada mencit NZB/W, termasuk *major histocompatibility complex* (MHC) dan beberapa gen non-MHC. Selain memiliki latar belakang kerentanan genetik, strain BMR/*lpr* dan BXSB/*Yaa* masing-masing memiliki mutasi genetik tunggal yang mempercepat timbulnya LES. Pada strain BMR/*lpr* terjadi hilangnya fungsi mutasi *lpr* pada gen untuk Fas. Tanpa interaksi Fas-Fas ligan, apoptosis dari B dan T limfosit tidak terjadi, sehingga proliferasi limfosit yang besar akan memberikan kontribusi untuk percepatan timbulnya LES (Perry, *et al.*, 2011).

Secara umum, pada manusia dan kebanyakan hewan model LES, perempuan lebih rentan terhadap penyakit. Akan tetapi, hal ini justru terjadi sebaliknya pada mencit BXSB/*Yaa*, LES berkembang lebih awal dan lebih berat pada jantan dibanding betina. Meskipun latar belakang genetik mencit BXSB menurunkan kerentanan LES yang sama terhadap kedua jenis kelamin, mencit jantan strain ini memiliki mutasi gen *Yaa* yang berkaitan dengan kromosom Y-linked autoimunitas akselerator. Lokus mutan ini terdiri dari duplikasi setidaknya 17 gen dari kromosom X, termasuk *toll-like receptor 7* (TLR7). Lokasi mutasi pada kromosom Y inilah yang menjelaskan kerentanan laki-laki semakin meningkat dalam terjadinya LES. Seperti halnya pada manusia dengan LES, tidak ada gen tunggal dalam model spontan LES yang bertanggung jawab untuk terjadinya mencit LES (Rottman dan Willis, 2010).

Manifestasi klinis dan imunologi umum LES pada 3 strain ini meliputi: hiperaktivitas sel limfosit B dan T dimana interaksi satu sama lain dari kedua sel tersebut diperlukan untuk timbulnya LES, titer tinggi beberapa autoantibodi terhadap antigen inti sel, gangguan pembersihan imun kompleks, dan glomerulonefritis imun yang fatal (Perry, *et al.*, 2011). Mencit jantan BXSB/*Yaa* cenderung memiliki nefritis yang paling parah, diikuti oleh BMR/*lpr* dan NZB/W betina. Dalam proses pengembangan dua strain ini, sekitar 90% dari mencit mati pada usia 8 sampai 9 bulan versus 50% dari NZB/W betina. Selain menunjukkan hiperaktif atau abnormal respon sel B dan sel T, mencit BXSB/*Yaa* juga menunjukkan hiperplasia monositosis dan limfoid, namun hiperplasia limfoid tidak terlihat dalam BMR/*lpr*. Bahkan, hiperplasia limfoid bukan merupakan fitur lupus manusia dan dapat mengacaukan histopatologi. Disamping hiperplasia limfoid, ada beberapa fitur unik dari strain MRL/*lpr* dibandingkan dengan strain lainnya.

Strain ini memiliki titer autoantibodi spesifik yang tertinggi dan satu-satunya yang memproduksi antibody terhadap komponen inti *Smith* (Sm) dan *ribonucleoprotein*. Mencit MRL/lpr juga unik karena proporsi mencit ini mengembangkan ruam kulit, arthritis inflamasi, dan imunoglobulin (Ig) M faktor rheumatoid (Rottman dan Willis, 2010).

2.2.2 Hewan Model Lupus Induksi

Induksi lupus juga dapat dilakukan pada strain mencit normal yang tidak mengalami modifikasi genetik. Pembentukan mencit ini didasarkan pada teori bahwa lupus tidak hanya didapat dari faktor genetik saja melainkan juga dari faktor lingkungan. Pengembangan hewan model lupus dari strain mencit normal ini dapat dicapai dengan sejumlah metode, seperti manipulasi genetik gen tunggal (baik dengan overekspresi maupun delesi), injeksi serum autoimun atau limfosit dari mencit rentan LES, vaksinasi dengan debris apoptosis sel dendritik, imunisasi dengan antigen lupus prototipikal seperti DNA dan kompleks RNA-protein atau antigen lain yang dikenal untuk menginduksi lupus, atau suntikan *pristane* (minyak hidrokarbon) (Rottman dan Willis, 2010).

Strain yang mengembangkan penyakit lupus secara spontan atau model lupus yang diinduksi biasa digunakan untuk menguji agen farmakologis secara in vivo. Namun, untuk menguji efek dari gen tunggal dalam latar belakang genetik *strain* spontan membutuhkan waktu dan sumber daya untuk silang balik transgenik atau mencit *knockout* ke *strain* rentan LES. Induksi lupus dengan suntikan tunggal *pristane* menghasilkan penyakit dengan sebagian besar fitur lupus pada manusia. Karena *pristane* dapat menginduksi lupus di hampir semua strain, metode tersebut dapat menghemat waktu yang signifikan dalam

menentukan efek gen tunggal pada pengembangan lupus dalam transgenik dan *knockout* pada latar belakang konvensional. Selain itu, injeksi *pristane* dalam model spontan dapat digunakan untuk memperluas respon antibodi dan memperburuk nefritis. Meskipun model-model mencit LES terinduksi telah berguna, namun patogenesis terbentuknya LES akibat induksi bahan tersebut masih banyak diteliti hingga sekarang (Rottman dan Willis, 2010).

2.3 Pristane

Pristane (TMPD) adalah alkana isoprenoid yang ditemukan dalam jumlah kecil pada beberapa tanaman dan dianggap berasal dari metabolisme phytol, ubiquitous ester dari klorofil. Kadar yang relatif tinggi juga ditemukan di berbagai organisme laut, termasuk ganggang dan *zooplankton copepoda*, yang dapat mengubah phytol dari diet. Pristane dengan konsentrasi tingkat tinggi ditemukan pada hati berbagai hiu planktivorous. TMPD juga terdapat pada minyak mentah dan merupakan konstituen umum dari minyak mineral, produk sampingan dari distilasi fraksional minyak bumi yang mengandung rantai parafin, naftenat dan hidrokarbon aromatik dengan 15 karbon, dengan titik didih antara 300-600 °C.

Penggunaan pristane dalam bidang medis antara lain untuk obat (farmasi atau *food grade*) minyak mineral, yang bebas dari aromatik dan senyawa tak jenuh, yang digunakan sebagai obat pencahar, pelindung pelapis untuk makanan dan kosmetik. Paparan diet untuk mineral minyak diperkirakan sebesar 9-45 gram per tahun, beberapa di antaranya adalah diserap melalui usus. Absorpsi minyak mineral dari diet dianggap bertanggung jawab atas pembentukan "lipogranulomas" (lipidosis folikel) pada hati, limpa, kelenjar getah bening, dan organ lain. Pada tahun 1962, dilaporkan bahwa minyak mineral menginduksi

plasmacytomas pada mencit BALB/c setelah injeksi intraperitoneal (Reeves, *et al.*, 2009).

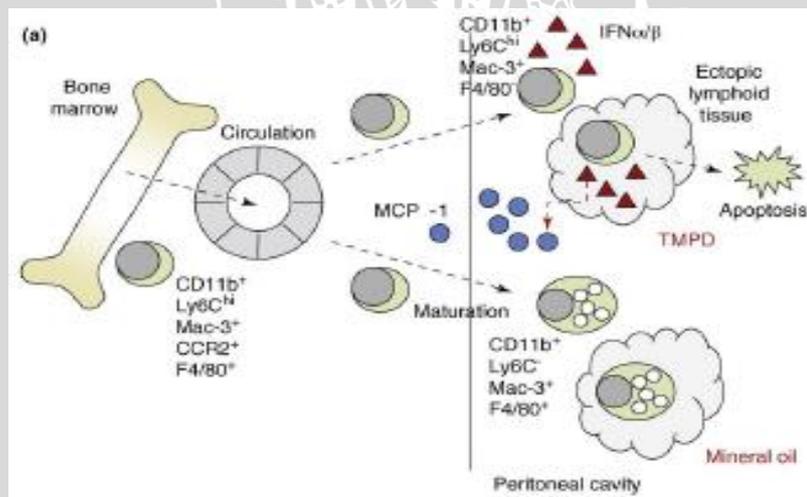
2.3.1 Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristane

Induksi hewan model dengan TMPD (2,6,10,14 -tetramethylpentadecane) atau lebih dikenal sebagai pristane, suatu alkana isoprenoid yang ditemukan tinggi konsentrasinya dalam minyak mineral, merupakan salah satu metode pengembangan murine model dari LES. TMPD ini akan menginduksi inflamasi kronis ketika dipaparkan kerongga peritoneal. Selama 15 tahun terakhir, telah ditemukan bahwa respon inflamasi terhadap TMPD menyebabkan manifestasi seperti penyakit lupus pada mencit. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa injeksi intraperitoneal pristane pada mencit BALB/c dapat menginduksi autoantibodi dengan karakteristik lupus, seperti antiribonucleoprotein (RNP) antibodi (anti-Su, anti-Sm, dan anti- U1RNP), anti-DNA, dan anti-histon, pada tingkat yang sebanding dengan yang ditemukan pada hewan model MRL/lpr. Mencit dengan induksi pristane juga memiliki deposisi kompleks imun pada ginjal menyebabkan proteinuria dan nefritis. Selain *strain* BALB/c, hampir semua *strain* mencit rentan, dan mampu memproduksi antibodi dan manifestasi lupus, hal ini membenarkan bahwa lingkungan yang memiliki peranan penting dalam perkembangan lupus (Perry, *et al.*, 2011).

2.3.2 Patogenesis Lupus Akibat Induksi Pristane

Hingga saat ini bagaimana pristane dapat menginduksi terjadinya lupus pada mencit masih belum banyak diketahui. 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- α dan IFN- β 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. Pada mencit NZB/W terjadinya glomerulonefritis, produksi autoantibodi ANA dan dsDNA dipercepat dengan pemberian IFN- α eksogen, sedangkan delesi dari gen IFNAR pada mencit NZB dan B6.Nba2 dapat menghambat produksi autoantibodi terhadap DNA, chromatin, RNP, Sm, Su, menghambat progresifitas penyakit dan meningkatkan tingkat survival (Rottman dan Willis, 2010).



Gambar 2.3.2 Immunopatogenesis pristane dalam menginduksi lupus

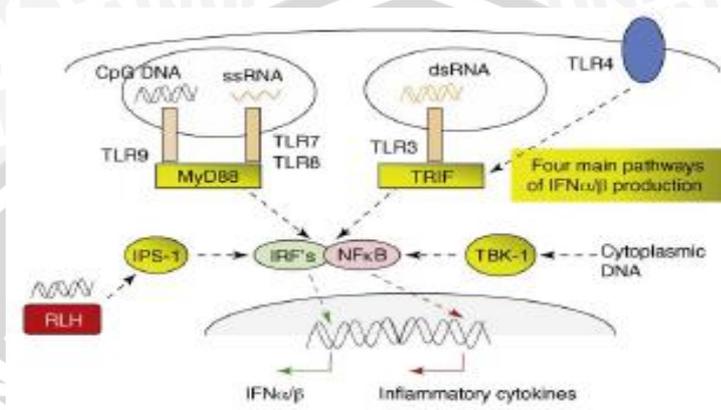
(Reeves et al., 2009)

Injeksi intraperitoneal TMPD dapat menstimulasi produksi IFN α dan IFN β oleh sel monosit (Ly6Chi) imatur. Kemokin MCP-1 (CCL2) yang merupakan kemokin penginduksi IFN-I juga dihasilkan setelah injeksi intraperitoneal TMPD

dan 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- α dan IFN- β . 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- α dan IFN- β (Reeves, *et al.*, 2009).

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. Pengenalan endosomal dari *unmethylated* CpG pada DNA oleh TLR9 atau single stranded RNA oleh TLR7 atau TLR8 menyebabkan ekspresi gen IFN- α dan IFN- β 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- α dan IFN- β 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- α dan IFN- β 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* (NFkB) (Reeves, *et al.*, 2009).



Gambar 2.3.3 Mekanisme aktivasi IFN-I (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 aktivasi 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).

2.4 Manifestasi Klinis Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristane

2.4.1 Arthritis

Pristane, heksadekana, squalene dan minyak mineral juga menyebabkan arthritis pada tikus Lewis dan Dark Agouti. Arthritis yang terjadi mungkin dimediasi

oleh TNF- α . Secara umum, lupus artritis tidak erosif, meskipun dalam beberapa kasus artritis erosif juga ditemukan pada kasus RA. Hal ini dianggap memiliki tumpang tindih sindrom dengan fitur dari kedua gangguan tersebut (Rottman dan Willis, 2010).

Manifestasi klinis pada *Pristane Induced Arthritis* (PIA) muncul antara 3-6 bulan setelah injeksi pristane, yaitu meliputi erythema dan edema pada telapak kaki serta gangguan pada sendi yang bersifat progresif selama 2 bulan (Morgan *et al.*, 2004). Selain itu arthralgia atau artritis pada manusia ditandai dengan adanya nyeri dan kaku. Artritis di LES dapat bermigrasi dan bersifat sementara; mungkin hadir pada saat tertentu tetapi dapat sembuh dengan sendirinya. Artritis pada LES cenderung memiliki lebih sedikit erosi dan cacat permanen dibandingkan dengan rheumatoid artritis. Terdapat kondisi klinis yang digambarkan sebagai "rhupus".

2.5 Manifestasi Imunologis Hewan Model Lupus Induksi Pristane

2.5.1 Produksi Autoantibodi Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristane

Berikut ini beberapa autoantibodi yang diproduksi pada hewan model lupus dengan induksi pristane :

Tabel 2.5.1 Autoantibodi pada Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristane (Reeves. et al., 2009)

Autoantibody	Autoantigen	Nucleic acid Component	Frequency in BALB/C mice
Anti-Sm*	U1, U2, U4-U6, and U5 snRNPs (protein B', B, D, E, F, G)	U1, U2, U4, U6, U5 small nuclear RNAs	20-40%
Anti-RNP	U1 snRNP (protein A, C, 70K)	U1 small nuclear RNA	50-90%
Anti-Ribosomal P*	Ribosomal P0, P1, P2 Proteins	Ribosomal RNAs	0%
Anti-Su	argonaute 2 protein	Micro-RNAs	50-70%
Anti-dsDNA*	Native DNA	Native DNA	40%
Anti-Chromatin	DNA-histones complexes	DNA	60%

*specific for the diagnosis of SLE

Penelitian yang dilakukan oleh Cui, *et al.* (2006) menunjukkan bahwa injeksi tunggal 0,5 mL pristane pada mencit Balb/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar autoantibodi anti-dsDNA dan kadar 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 kadar 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 kadar ANA saja tetapi juga didapatkan manifestasi glomerulonefritis dan juga *haemorrhagic*

pulmonary caplllaritis 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. Beberapa penelitian menemukan bahwa pristane dapat menginduksi kadar titer yang tinggi dari autoantibodi anti-Su dan anti-nRNP/Sm pada mencit Balb/c yang diinduksi oleh pristane 6 bulan paska injeksi. Penelitian yang dilakukan oleh Satoh, *et al.* (1995) menemukan bahwa 100% mencit 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 (Satoh, *et al.*, 1995; Mizutani, *et al.*, 2005).

Suatu studi yang menarik yang dilakukan oleh Satoh, *et al.* (2000) menunjukkan bahwa hampir seluruh strain mencit ternyata memiliki suseptibilitas terhadap munculnya autoantibodi LES setelah diinduksi oleh pristane, meliputi anti-Sn, anti-dsDNA, dan anti ribosomal P. Munculnya autoantibodi ini memang hampir ada pada semua strain mencit namun memiliki onset yang berbeda-beda. Dua strain mencit yang memiliki onset yang cepat dan paling menyerupai gambaran klinis LES pada manusia adalah mencit strain Balb/c dan SJL/J. Oleh karena itu, kedua mencit tersebut selalu digunakan dalam penelitian hewan coba lupus yang diinduksi oleh pristane (Satoh, *et al.*, 2000).

2.5.2 Produksi Sitokin pada Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristane

Ketika pristane diberikan kepada mencit NZB/WF1, manifestasi penyakit menjadi lebih cepat dan menyebabkan dihasilkannya dalam jumlah besar IL-12 dan autoantibodi anti-Sm, anti-Su, dan anti-RNP. Hal ini diperkuat oleh fakta bahwa defisiensi IL-12 mencegah produksi anti-RNP/Su IgG dan kejadian nefritis pada mencit yang diinduksi pristane. Penelitian mengungkapkan bahwa produksi autoantibodi yang berbeda dapat dirangsang oleh sitokin jalur yang berbeda dan berkontribusi berbeda terhadap kerusakan organ target (Perry, *et al.*, 2011).

Studi lain menyebutkan defisiensi IFN- γ secara signifikan melindungi mencit BALB/c yang diinduksi pristane dari produksi autoantibodi dan penyakit ginjal, sedangkan defisiensi IL-4 tidak memiliki efek. Dengan demikian, *pristane-induced lupus* mungkin disebabkan karena pergeseran keseimbangan antara subset sel Th1-Th2. Overekspresi dari IFN-I dan gen yang dirangsang oleh interferon telah disebutkan terkait erat dengan produksi ANA dan tingkat keparahan penyakit pada pasien LES. *Pristane-induced lupus* adalah satu-satunya hewan model yang menunjukkan tanda gangguan keseimbangan interferon. Penelitian *pristane-induced lupus* telah mengungkapkan bahwa defisiensi IFN-I reseptor (IFNAR $^{-/-}$ atau IFNAR2 $^{-/-}$) mampu menghambat pembentukan anti-RNP, anti-Sm, dan anti-dsDNA autoantibodi, mengurangi anti-ssDNA dan antihistone IgG, dan secara signifikan memperbaiki glomerulonefritis. IFN-I berkontribusi dalam produksi autoantibodi dengan cara meregulasi ekspresi TLR7/9 dan aktivasi dalam sel B. IFN-I juga tampaknya mengatur mediator autoantibodi lain.

Sel dendritik plasmatisoid (pDCs) merupakan sel yang telah diidentifikasi sebagai produsen utama IFN-I pada lupus manusia. Dilaporkan terjadi akumulasi sel pDC pada mencit setelah diinduksi oleh pristane. Pristane juga dapat menginduksi produksi IFN-I secara eksklusif melalui jalur TLR7/MyD88. Defisiensi TLR7 tidak hanya menghambat produksi IFN-I tetapi juga produksi autoantibodi dan penyakit ginjal. FcγR merupakan bagian Fc dari IgG dan ekstraseluler diusulkan untuk menengahi uptake kompleks imun yang kemudian mengaktifkan TLRs endosomal, seperti TLR7. Namun, IFN-I dan produksi autoantibodi yang tergantung FcγR. Oleh karena itu, modulasi TLR7 oleh pristane tidak bergantung pada kompleks imun. Mekanisme yang tepat dari *pristane*-dimediasi TLR7 aktivasi masih harus diidentifikasi (Perry, *et al.*, 2011).

