

**DISERTASI**

**PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK TERHADAP EKSPRESI  
mRNA GEN NF- $\kappa$ B, KADAR PROTEIN NF- $\kappa$ B SERUM DAN TNF-  $\alpha$   
SERUM PADA CEDERA STERIL MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c**

*Systemic Lidocaine Administration Influences NF- $\kappa$ B Gene  
Expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Protein Serum Levels On BALB/c Mice  
with Musculoskeletal Injury*



**RESIANA KARNINA**

**C013191041**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

**2021**

**PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK TERHADAP EKSPRESI  
mRNA GEN NF- $\kappa$ B, KADAR PROTEIN NF- $\kappa$ B SERUM DAN TNF- $\alpha$   
SERUM PADA CEDERA STERIL MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c**

***Systemic Lidocaine Administration Influences NF- $\kappa$ B Gene  
Expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Protein Serum Levels On BALB/c Mice  
with Musculoskeletal Injury***

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai Gelar Doktor

Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan Oleh:

**RESIANA KARNINA**

**C013191041**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

**2021**

DISERTASI

PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN NF- $\kappa$ B, PROTEIN NF- $\kappa$ B SERUM DAN TNF- $\alpha$  SERUM PADA CEDERA STERIL MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c

*Systemic Lidocaine Administration Influences NF- $\kappa$ B Gene Expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Protein Serum Levels On BALB/c Mice with Musculoskeletal Injury*

Disusun dan diajukan  
oleh

**Resiana Karnina**  
C013191041

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 25 November 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui  
Promotor,

**Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An., KIC., KAKV**  
Nip. 19670524 199503 1 001

Co. Promotor

**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)**  
Nip. 19570416 198503 1 001

Co. Promotor

**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,

**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
Nip. 19661213 199503 1 009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**  
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297  
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

3

### SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Resiana Kamina  
NIM : C013191041  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Pengaruh pemberian lidokain sistemik terhadap ekspresi mRNA gen NFkB, protein NFkB serum dan TNF alpha serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 Agustus 2021

Yang menyatakan,



Resiana Kamina

## ABSTRAK

**RESIANA KARNINA.** *Pengaruh Pemberian Lidokain Sistemik terhadap Ekspresi m-RNA Gen NF- $\kappa$ B Serum dan TNF- $\alpha$  Serum pada Cedera Steril Maskuloskeletal Mencit BALB/c* (dibimbing oleh Syafri Kamsul Arif, Mochammad Hatta, dan Agussalim Bukhari).

Penelitian ini bertujuan membuktikan efikasi injeksi lidokain sistemik sebagai obat antiinflamasi pada mencit BALB/c dengan cedera steril maskuloskeletal.

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental laboratorium prospektif pada hewan coba mencit BALB/c dengan menggunakan rancangan acak sederhana. Enam belas tikus BALB/c putih dewasa (jantan, sehat, 10—12 minggu, 35—40 gram berat badan, dan tidak cacat) dipilih dan dibagi menjadi dua kelompok, yakni kelompok yang diberi lidokain (2 mg/kg berat badan) dan kelompok yang diberi akuades steril. Kadar protein NF- $\kappa$ B dan TNF- $\alpha$  dideteksi dengan ELISA, sedangkan ekspresi m-RNA dari NF- $\kappa$ B dianalisis dan ditentukan dengan *real time* PCR kuantitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa cedera muskuloskeletal secara signifikan meningkatkan ekspresi m-RNA dan tingkat protein NF- $\kappa$ B dan protein TNF- $\alpha$ . Selain itu, kadar NF- $\kappa$ B (protein dan m-RNA) dan TNF- $\alpha$  (protein) pada tikus yang mengalami inflamasi akibat cedera muskuloskeletal menurun secara signifikan pada kelompok lidokain ( $p < 0,001$ ).

Kata kunci: lidokain, ekspresi m-RNA, protein NF- $\kappa$ B, protein TNF- $\alpha$



## ABSTRACT

**RESIANA KARNINA.** *Systemic Lidocaine Administration Influence NF- $\kappa$ B Gene Expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Protein Serum Levels on BALB/c Mice with Musculoskeletal Injury* (Supervised by Syafri Kamsul Arif, Mochammad Hatta, and Agussalim Bukhari)

The study aims to prove the efficacy of systemic lidocaine injection as an anti-inflammatory drug in BALB/c mice with sterile musculoskeletal injuries. The immune system can produce various inflammatory mediators to protect the body from stress and surgical trauma. However, this excessive inflammatory response will interfere with the body's immune system, causing systemic inflammatory response syndrome and multi-organ failure if allowed to continue. Lidocaine as an anti-inflammatory is used to treat surgical pain and pain arising from the disease process and treat ventricular arrhythmias.

The study used a prospective experimental Laboratory study on experimental animals of BALB/c mice using a simple randomized design. Sixteen adult white BALB/c mice (male, healthy, 10-12 weeks old, 35-40 grams body weight, and no disability) were selected and randomly divided into two groups: the group given lidocaine (2mg/kg body weight) and a group that was given sterile distilled water. NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  protein level were detected by ELISA, while mRNA expression of NF- $\kappa$ B was analyzed and determined by quantitative real-time PCR.

The results show that Musculoskeletal injury significantly increases the expression of both mRNA and protein levels of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  protein levels. In addition, the NF- $\kappa$ B (protein and mRNA) and TNF- $\alpha$  (protein) levels in rats experiencing inflammation due to musculoskeletal injury are significantly decreases in the lidocaine group ( $p < 0.001$ ).

**Keywords:** Lidocaine, mRNA expression, protein levels NF- $\kappa$ B, protein levels TNF- $\alpha$ .



## **PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN**

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Resiana Karnina

Nomor Mahasiswa : C013191041

Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan usulan penelitian ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Oktober 2021

Yang menyatakan,

Resiana Karnina

## TIM PENGUJI

1. Prof. DR. Dr. Syafri Kamsul Arif, SpAn., KIC., KAKV (Promotor)
2. Prof. Dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) (Ko-Promotor)
3. Dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) (Ko-Promotor)
4. Prof. DR. Yusminah Hala, MS (Penguji Eksternal)
5. Prof. Dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok (Tim Penguji)
6. DR. Dr. Hisbullah, SpAn, KIC., KAKV (Tim Penguji)
7. DR. Dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes (Tim Penguji)
8. Dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K)., Sp.S (Tim Penguji)
9. DR. Dr. Andi Takdir Musba, SpAn., KMN-FIPM (Tim Penguji)

## ABSTRAK

Pengaruh Pemberian Lidokain Sistemik Terhadap Ekspresi mRNA Gen NF- $\kappa$ B, Kadar Protein NF- $\kappa$ B Serum, dan TNF- $\alpha$  Serum Pada Cedera Steril Muskuloskeletal Mencit BALB/c

Sistem kekebalan tubuh dapat menghasilkan berbagai mediator inflamasi untuk melindungi tubuh dari stres dan trauma bedah. Namun, respon inflamasi yang berlebihan ini akan mengganggu sistem kekebalan tubuh, menyebabkan sindrom respon inflamasi sistemik dan kegagalan multi-organ jika dibiarkan berlanjut. Lidokain sebagai anti-inflamasi digunakan untuk mengobati nyeri bedah dan nyeri yang timbul dari proses penyakit dan mengobati aritmia ventrikel. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efikasi injeksi lidokain sistemik sebagai obat anti inflamasi pada mencit BALB/c dengan cedera steril muskuloskeletal.

Penelitian ini menggunakan studi eksperimental laboratorium prospektif pada hewan coba mencit BALB/c dengan menggunakan rancangan acak sederhana. Enam belas tikus BALB/c putih dewasa (jantan, sehat, 10-12 minggu, 35-40 gram berat badan, dan tidak cacat) dipilih dan dibagi secara acak menjadi dua kelompok: kelompok yang diberi lidokain (2 mg/kg berat badan) dan kelompok yang diberi akuades steril. Kadar protein NF- $\kappa$ B dan TNF- $\alpha$  dideteksi dengan ELISA, sedangkan ekspresi mRNA dari NF- $\kappa$ B dianalisis dan ditentukan dengan real-time PCR kuantitatif.

Cedera muskuloskeletal secara signifikan meningkatkan ekspresi mRNA dan tingkat protein NF- $\kappa$ B dan protein TNF- $\alpha$ . Selain itu, kadar NF- $\kappa$ B (protein dan mRNA) dan TNF- $\alpha$  (protein) pada tikus yang mengalami inflamasi akibat cedera muskuloskeletal menurun secara signifikan pada kelompok lidokain ( $p < 0,001$ ).

Kata kunci: Lidokain; ekspresi mRNA; protein NF- $\kappa$ B, protein TNF- $\alpha$ .

## **ABSTRACT**

### Systemic Lidocaine Administration Influences NF- $\kappa$ B Gene Expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ Protein Serum Levels On BALB/c Mice with Musculoskeletal Injury

The immune system can produce various inflammatory mediators to protect the body from stress and surgical trauma. However, this excessive inflammatory response will interfere with the body's immune system, causing systemic inflammatory response syndrome and multi-organ failure if allowed to continue. Lidocaine as an anti-inflammatory is used to treat surgical pain and pain arising from the disease process and treat ventricular arrhythmias. This study aims to prove the efficacy of systemic lidocaine injection as an anti-inflammatory drug in BALB/c mice with sterile musculoskeletal injuries.

This study used a prospective experimental laboratory study on experimental animals of BALB/c mice using a simple randomized design. Sixteen adult white BALB/c mice (male, healthy, 10–12 weeks old, 35–40 grams body weight, and no disability) were selected and randomly divided into two groups: the group given lidocaine (2 mg/kg body weight) and a group that was given sterile distilled water. NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  protein levels were detected by ELISA, while mRNA expression of NF- $\kappa$ B was analyzed and determined by quantitative real-time PCR.

Musculoskeletal injury significantly increased the expression of both mRNA and protein levels of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  protein level. In addition, the NF- $\kappa$ B (protein and mRNA) and TNF- $\alpha$  (protein) levels in rats experiencing inflammation due to musculoskeletal injury were significantly decreased in the lidocaine group ( $p < 0.001$ ).

Keywords: Lidocaine; mRNA expression; protein levels NF- $\kappa$ B, protein levels TNF- $\alpha$ .

## DAFTAR ISI

	halaman
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN .....	vii
ABSTRAK .....	ix
<i>ABSTRACT</i> .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
<b>A.    LATAR BELAKANG</b>	1
<b>B.    PERTANYAAN PENELITIAN</b>	7
<b>C.    HIPOTESIS</b>	7
<b>D.    TUJUAN PENELITIAN</b>	8
<b>E.    KEGUNAAN PENELITIAN</b>	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
<b>A.    INFLAMASI</b>	10
<b>B.    LIDOKAIN</b>	13
<b>C.    HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)</b>	28
<b>D.    TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs)</b>	49
<b>E.    NUCLEAR FACTOR KAPPA-<math>\beta</math> (NF-<math>k\beta</math>)</b>	54
<b>F.    TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	67
BAB III KERANGKA TEORI.....	82
BAB IV KERANGKA KONSEP.....	85
<b>BAB V METODE PENELITIAN .....</b>	<b>86</b>
<b>A.    RANCANGAN PENELITIAN</b>	86
<b>B.    LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN</b>	86
<b>C.    POPULASI DAN TEKNIK SAMPEL PENELITIAN</b>	86
<b>D.    INSTRUMEN PENGUMPULAN DATA</b>	88
<b>E.    ALUR PENELITIAN</b>	97
<b>F.    IZIN PENELITIAN DAN <i>ETHICAL CLEARANCE</i></b>	98

<b>G. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN KLASIFIKASI VARIABEL PENELITIAN</b>	99
<b>H. DEFINISI OPERASIONAL</b>	101
<b>I. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA</b>	104
BAB VI HASIL PENELITIAN .....	105
BAB VII PEMBAHASAN .....	130
BAB VIII SIMPULAN DAN SARAN .....	139
DAFTAR PUSTAKA.....	141
LAMPIRAN.....	154

## DAFTAR TABEL

### Nomor halaman

Tabel 2. 1 Fungsi Kompartemen Spesifik HMGB1.....	31
Tabel 2. 2 Aktivitas Biologi HMGB1 Ekstraseluler.....	42
Tabel 6. 1 Uji normalitas data ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B.....	106
Tabel 6. 2 Profil Ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal.....	107
Tabel 6. 3 Profil Ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain pertama.....	108
Tabel 6. 4 Profil Ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain ke-12.....	109
Tabel 6. 5 Uji normalitas data kadar protein NF- $\kappa$ B serum.....	111
Tabel 6. 6 Profil kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal.....	112
Tabel 6. 7 Profil kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain pertama.....	113
Tabel 6. 8 Profil kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain ke-12.....	114
Tabel 6. 9 Uji normalitas data kadar protein TNF- $\alpha$ serum .....	116
Tabel 6. 10 Profil kadar protein TNF- $\alpha$ serum pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal .....	117
Tabel 6. 11 Profil kadar protein TNF- $\alpha$ serum pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain pertama .....	118
Tabel 6. 12 Profil kadar protein TNF- $\alpha$ serum pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain ke-12 .....	119
Tabel 6. 13 Gambaran ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B dan kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada kelompok lidokain.....	121
Tabel 6. 14 Gambaran ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B dan kadar protein... ..	124
Tabel 6. 15 Gambaran kadar protein NF- $\kappa$ B serum dan protein TNF- $\alpha$ serum pada kelompok lidokain.....	127

## DAFTAR GAMBAR

	nomor halaman
<b>Gambar 2. 1</b> Struktur Kimia Lidokain.....	14
<b>Gambar 2. 2</b> Mekanisme kerja anestesi lokal pada inflamasi.....	22
<b>Gambar 2. 3</b> Mekanisme pelepasan HMGB1 dan isoform HMGB1.....	32
<b>Gambar 2. 4</b> HMGB1 sebagai pro inflamasi. HMGB1 adalah mediator pro inflamasi cepat pada cedera steril dan mediator lambat pada infeksi.....	46
<b>Gambar 2. 5</b> Ikatan HMGB1 dengan TLR4 dan RAGE. Ikatan dengan TLR4 akan mengaktifkan pelepasan sitokin dari makrofag dan monosit (kiri), sedangkan dengan RAGE akan memodulasi fungsi sel tumor dan endotel (kanan). ....	48
<b>Gambar 2. 6</b> Struktur, Lokasi dan spesifikasi TLRs mamalia. ....	52
<b>Gambar 2. 7</b> Target gen NF- $\kappa$ B yang terlibat dalam pengembangan dan perkembangan Inflamasi.....	60
<b>Gambar 2. 8</b> Jalur Kanonikal NF- $\kappa$ B. ....	62
<b>Gambar 2. 9</b> Jalur pensinyalan yang mengarah ke respons seluler utama TNF.....	77
<b>Gambar 3. 1</b> Kerangka Teori.....	82
<b>Gambar 4. 1</b> Kerangka Konsep.....	85
<b>Gambar 5. 1</b> Rancangan alur penelitian.....	97
<b>Grafik 6. 1</b> Dinamika mean ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada kedua kelompok penelitian .....	110
<b>Grafik 6. 2</b> Dinamika mean Protein NF- $\kappa$ B pada kedua kelompok penelitian .....	115
<b>Grafik 6. 3</b> Dinamika mean Protein TNF- $\alpha$ pada kedua kelompok penelitian .....	120
<b>Grafik 6. 4</b> Gambaran ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B dan kadar protein NF- $\kappa$ B pada kelompok lidokain. ....	123
<b>Grafik 6. 5</b> Gambaran ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B dan kadar protein TNF- $\alpha$ pada kelompok lidokain. ....	126
<b>Grafik 6. 6</b> Gambaran kadar protein NF- $\kappa$ B dan protein TNF- $\alpha$ pada kelompok lidokain. ....	129

## DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Arti dan keterangan
ADP	<i>Adenosine diphospat</i>
AIM2	<i>Absent in Melanoma 2</i>
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APAP	<i>acetaminophen</i>
ASK	<i>apoptosis-signaling kinase</i>
ATP	<i>Adenosine trifosfat</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>
cIAP	<i>inhibitor of cellular apoptosis proteins</i>
CLP	<i>cecal ligation dan puncture</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DD	<i>dimerization domain</i>
DNA	<i>Asam deoksiribonukleat</i>
dNTP	<i>Deoksiribonukelotida trifosfat</i>
ds-RNA	<i>double-stranded RNA</i>
EDTA	<i>Etilen Diamin Tetra Acetat</i>
Etk	<i>epithelial tyrosine kinase</i>
FADD	<i>Fas associated DD protein</i>
FAN	<i>factor associated with neutral SMase activation</i>
GABA	<i>Asam gamma-aminobutirat</i>

Singkatan	Arti dan keterangan
GPC-Rs	<i>G protein-coupled receptors</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Protein B1</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	<i>interferon-<math>\gamma</math></i>
I $\kappa$ $\beta$	<i>Inhibitor <math>\kappa\beta</math></i>
IKK	<i>komplek inhibitor <math>\kappa\beta</math> kinase</i>
IL	<i>interleukin</i>
IRF	<i>interferon respon factor</i>
JNKs	<i>C-Jun N-Terminal kinases</i>
LPS	<i>lipopolysaccharida</i>
MAMPs	<i>microbe associated molecular patterns</i>
MAP3Ks	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinases</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation protein 2</i>
mRNA	<i>masenger Ribonucleic acid</i>
MSU	<i>monosodium urate</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF- $\kappa\beta$	<i>Nuclear Factor Kappa-<math>\beta</math></i>
NIK	<i>NF-<math>\kappa\beta</math> inducing kinase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLRs	<i>NOD like receptor</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>

Singkatan	Arti dan keterangan
NTD	<i>N-terminal domain</i>
PABA	<i>para aminobenzoic acid</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PIP 2	<i>phosphatidylinositol 4,5 diphosphate</i>
PIP 3	<i>phosphatidylinositol 3, 4, 5 trifosfat</i>
PKR	<i>dsRNA-dependent protein kinase</i>
PLAD	<i>pre ligdan assembly domains</i>
PMN	<i>polymorphonuclear</i>
PRR	<i>reseptor pola-recognition</i>
RAGE	<i>Reseptor for Advanced Glycation End Produc</i>
RFLP	<i>Restriction Fragement Length Polymorphism</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motifs</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RLRs	<i>RIG-I- like receptors</i>
RNA	<i>Asam ribonukleat</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>sReverse Transcriptase-PCR</i>
SDS	<i>Sodium Deodesil Sulfat</i>
SODD	<i>Silencer of death domain</i>

Singkatan	Arti dan keterangan
TACE	<i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
TAK	<i>TGF<math>\beta</math> activated kinase</i>
TEG	<i>thrombelastography</i>
TGF $\beta$	<i>growth factor-beta</i>
TLRs	<i>Toll like receptor</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Faktor- <math>\alpha</math></i>
TRADD	<i>TNFR associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
TRAPS	<i>TNFR associated periodic syndrome</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGFR2	<i>vaskular endothelial growth receptor</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Trauma dan stres pembedahan akan merangsang sistem kekebalan tubuh memproduksi berbagai mediator inflamasi untuk fungsi proteksi atau perlindungan tubuh. Peradangan adalah respon alami yang diperlukan untuk melawan patogen dan trauma atau kerusakan jaringan dan dimanifestasikan oleh sistem kekebalan organisme (Vanpatten dan Al-Abed, 2018). Fraktur tulang Panjang yang berkaitan dengan cedera jaringan lunak berkontribusi dalam menimbulkan respon inflamasi (Loi dkk, 2016). Respon inflamasi berlebihan bila dibiarkan berlangsung terus akan mengganggu sistem imunitas tubuh menimbulkan *systemic inflammatory response syndrome* dan gagal multi organ (Andersson dan Tracey, 2011).

Pada studi yang dilakukan oleh Magna dan Pisetsky, 2014 menunjukkan bahwa HMGB1 dapat berinteraksi dengan beberapa reseptor dan sensor imun pada kondisi inflamasi, reseptor tersebut diantaranya adalah TLR4, TLR9, TLR2, RAGE. Ikatan tertentu antara HMGB1 dengan TLR4 dapat memicu aktivasi dari NF- $\kappa$ B dan produksi dari sitokin. Aktivasi pensinyalan NF- $\kappa$ B mengarah pada produksi berbagai sitokin inflamasi, kemokin, faktor transkripsi, yang memulai dan memodulasi reaksi inflamasi, dan mengatur respon host terhadap kerusakan jaringan (Lin dkk, 2016), selain itu NF- $\kappa$ B memainkan peran penting dalam mengatur kelangsungan

hidup, aktivasi dan diferensiasi sel imun bawaan dan sel T inflamasi (Zhang dan Deng, 2015; Liu dkk, 2017). *Nuclear factor-kappa  $\beta$*  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) telah lama dianggap sebagai jalur pensinyalan proinflamasi prototipikal, sebagian besar didasarkan pada aktivasi NF- $\kappa$  $\beta$  oleh sitokin proinflamasi seperti interleukin1 (IL-1) dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) (Lawrence, 2009). *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6 merupakan sitokin utama dalam reaksi inflamasi akut, dimana dibutuhkan waktu 4 sampai 6 jam untuk menimbulkan reaksi setelah adanya pemicu awal dan dapat berlangsung hingga 24 jam (Kumar dkk, 2013). Peningkatan kadar sitokin proinflamasi seperti interleukin (IL-1, IL-6) dan TNF- $\alpha$  akan memediasi respon sistemik dan memperburuk kegagalan organ (Haris HE dkk, 2012). *Nuclear factor-kappa  $\beta$*  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) mengatur respon inflamasi dan proses remodeling tulang pada sel pembentuk tulang dan resorpsi tulang. Bukti in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa NF- $\kappa$  $\beta$  merupakan target terapi potensial yang penting untuk gangguan tulang terkait peradangan dengan memodulasi proses inflamasi dan remodeling tulang secara bersamaan (Lin dkk, 2017).

Deksametason termasuk dalam obat steroid yang juga dikenal sebagai glukokortikosteroid, glukokortikoid atau kortikosteroid, dengan manfaat utamanya adalah efek immunosupresif, anti-inflamasi dan anti-alergi (Maślanka, 2014). Efek anti-inflamasi deksametason dengan cara menghambat ekspresi sitokin pro-inflamasi, kemokin dan *growth factors* serta meningkatkan produksi NO endotel, mengakibatkan penurunan penarikan dan migrasi neutrofil dan makrofag ke area inflamasi (Domagała

dkk, 2019). Terapi glukokortikoid memiliki beberapa efek pada densitas tulang. Efek ini telah dikenali setelah pemberian jangka pendek glukokortikoid melalui beberapa mekanisme. Glukokortikoid jangka pendek telah terbukti mengubah aktivitas osteosit dan osteoblas (Maresova dkk, 2013). Glukokortikoid juga menekan kapasitas osteoklas tulang dan meningkatkan resorpsi tulang (Snall dkk, 2015). Komplikasi dari paparan steroid, dilaporkan mempengaruhi osteonekrosis *collum femoralis* di 8 sampai 10% dari pengguna. Survei epidemiologi dari Jepang memperkirakan sekitar 2.500 sampai 3.300 kasus baru osteonekrosis non-trauma setiap tahun, 34,7% diinduksi dengan kortikosteroid (Kao dkk, 2017). Li dkk melakukan penelitian klinis menyatakan dexametason jangka pendek dosis 0,4 mg / kg / 24jam diberikan selama 5 hari pada pasien paska operasi fraktur mandibula, didapatkan deksametason menunda diferensiasi osteogenik dan pematangan kalus secara signifikan dari hari 1 hingga hari ke 10 (Snall dkk, 2015).

Obat anestesi lokal dikenal luas dan digunakan secara klinis selama lebih dari satu abad terutama karena sifat penghambat sarafnya. Namun data yang terkumpul menunjukkan bahwa anestesi lokal dapat bekerja pada jaringan non-neuronal juga. Obat anestesi lokal mempunyai efek pada sel-sel seperti monosit, netrofil dan sel mast. Anestesi lokal menginduksi mekanisme anti-inflamasi intraseluler yang dimediasi *Gq-protein-complex*, menonaktifkan granulosit yang terlalu aktif, menghambat pensinyalan reseptor NMDA manusia, menginduksi vasodilatasi, memiliki sifat

antimikroba, dan menunjukkan efek simpatolitik serta mempengaruhi sintesis dan pelepasan mediator inflamasi seperti eikosanoid, histamin, prostaglandin, dan sitokin (Papathanasiou, 2020).

Obat anestesi lokal memodulasi berbagai langkah kaskade inflamasi (Grosu dkk, 2015) dan memberi perlindungan pada barrier endotelial dengan mengurangi adhesi neutrofil dan hiperpermeabilitas endothelial yang dapat menyebabkan disfungsi organ utama (Piegeler dkk, 2014). Obat anestesi lokal dapat menghambat transportasi aksonal dan pelepasan beberapa sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  (He dkk, 2015). Lidokain adalah obat anestesi lokal tradisional (Wen dkk, 2017), tertua dan merupakan satu-satunya yang dapat diberikan secara intra vena dengan aman (Garutti dkk, 2014). Lidokain merupakan anestesi lokal golongan amida yang sudah lama digunakan dalam praktek klinik untuk mengatasi nyeri pembedahan maupun nyeri yang timbul dari proses penyakit, dan untuk mengatasi aritmia ventrikel (Zhang dkk, 2017), lidokain juga diketahui memiliki banyak kasiat lain termasuk sebagai anti inflamasi (Berger dkk, 2014; Zhang dkk, 2017).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Wen dkk, 2017 mereka menyimpulkan bahwa lidokain berperan sebagai antiinflamasi dengan menekan IL-1 $\beta$ , dan mekanismenya mungkin berhubungan dengan sebagian efek penghambatannya pada jalur sinyal inflamasom-NF-k $\beta$ -kaspase-1. Penelitian Wang dkk, 2013, menunjukkan pemberian lidokain sistemik mempunyai efek proteksi pada tikus sepsis dengan menghambat

ekspresi HMGB1 dan aktivasi NF- $\kappa$ B. Abusoglu dkk, 2013 menyebutkan pemberian lidokain sistemik mempengaruhi kadar peroksida lemak jaringan hati model tikus septik. Martins dkk, 2016 menyatakan bahwa ada korelasi positif antara ekspresi TNF- $\alpha$  dan IL-6 dalam hubungannya dengan NF- $\kappa$ B. Hasil penelitian menunjukkan korelasi yang signifikan dari sitokin-sitokin ini dengan perkembangan tumor, terkait dengan ekspresi NF- $\kappa$ B dan promodulasi sitokin, menunjukkan bahwa faktor biologis ini dapat digunakan sebagai penanda prediktif dan prognostik pada kanker payudara

Pada penelitian yang dilakukan Garutti dkk, 2014 menyatakan penggunaan lidokain intra vena menunjukkan penurunan yang signifikan pada kadar TNF- $\alpha$  dalam sampel plasma dan sampel *bronchoalveolar lavage* kelompok babi yang menjalani operasi reseksi paru dibandingkan dengan kelompok kontrol, pemberian Lidokain juga mengurangi perubahan inflamasi dan apoptosis yang diamati pada kelompok kontrol. Penelitian Wang dkk, 2014 menunjukkan pemberian lidokain sistemik intraoperatif pada wanita yang menjalani histerektomi radikal dalam anestesi umum telah terbukti menurunkan level serum dari HMGB1 dan berperan sebagai anti inflamasi. Penelitian Sirait dkk, 2018 menyebutkan pemberian lidokain secara sistemik efektif menghambat proses inflamasi dari mencit BALB/C yang mengalami cedera muskulo skeletal berupa patah tulang tertutup dengan menekan transkripsi mRNA HMGB1 dan translasi protein HMGB1, namun belum dilakukan penelitian yang menyangkut efek aktivasi lidokain terhadap NF- $\kappa$ B dan TNF- $\alpha$ .

Pada akhirnya dapat disimpulkan bahwa pemberian lidokain sistemik mempunyai efek anti inflamasi (Cruz dkk, 2017) karena mampu menghambat pelepasan sitokin pro inflamasi, menghambat aktifitas metabolik leukosit, dan pelepasan histamin (Berger dkk, 2014). Efek anti inflamasi dari lidokain mungkin dimediasi oleh inhibisi dari aktivasi NF- $\kappa$ B dan pelepasan sitokin (Wang dkk, 2013). Lidokain juga secara signifikan menurunkan level dari TNF- $\alpha$  dan mengurangi inflamasi (Garutti dkk, 2014). Mekanisme kerja lidokain sistemik sebagai obat anti inflamasi pada cedera steril pada tingkat sitokin pro inflamasi menjadi pintu masuk penelitian ini.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian lidokain sistemik sebagai anti inflamasi pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c dihubungkan dengan dinamika ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B, kadar protein NF- $\kappa$ B serum, dan protein TNF- $\alpha$  serum.

## **B. PERTANYAAN PENELITIAN**

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut diatas, maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Apakah pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c?
2. Apakah pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c?
3. Apakah pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan kadar protein TNF- $\alpha$  serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c?

## **C. HIPOTESIS**

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah.

1. Pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.
2. Pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.
3. Pemberian lidokain sistemik menghambat kenaikan kadar protein TNF- $\alpha$  serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.

## **D. TUJUAN PENELITIAN**

### **1. Tujuan umum**

Untuk melihat pengaruh pemberian lidokain sistemik terhadap ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B, kadar protein NF- $\kappa$ B serum, dan kadar protein TNF- $\alpha$  serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.

### **2. Tujuan khusus**

1. Mengetahui pengaruh pemberian lidokain sistemik terhadap ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.
2. Mengetahui pengaruh pemberian lidokain sistemik terhadap kadar protein NF- $\kappa$ B serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.
3. Mengetahui pengaruh pemberian lidokain sistemik terhadap kadar protein TNF- $\alpha$  serum pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c.

## **E. KEGUNAAN PENELITIAN**

### **1. Kegunaan Ilmiah**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah baru bahwa pemberian lidokain sistemik dapat digunakan sebagai anti inflamasi pada cedera steril muskuloskeletal mencit BALB/c dilihat dari penghambatan kenaikan ekspresi mRNA gen NF- $\kappa$ B, kadar protein NF- $\kappa$ B serum dan protein TNF- $\alpha$  serum.

### **2. Kegunaan Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan bahwa pemberian lidokain sistemik dapat digunakan dalam praktek klinik untuk mengatasi inflamasi yang dialami pasien-pasien yang menderita cedera steril muskuloskeletal.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. INFLAMASI**

Fungsi utama peradangan adalah pembersihan patogen dan pembentukan kembali homeostasis jaringan. Selain infeksi patogen, peradangan steril didefinisikan sebagai respon inflamasi yang disebabkan oleh trauma, cedera iskemia-reperfusi, atau cedera yang disebabkan oleh bahan kimia. Respon inflamasi akut pada jaringan yang rusak memulai pelepasan mediator kimia yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan leukosit infiltrasi melalui aktivasi endotelium lokal. Leukosit yang diinfiltrasi, termasuk neutrofil dan makrofag, dapat mengenali sel debris nekrotik dan mengeluarkan sitokin proinflamasi dan kemokin untuk lebih meningkatkan infiltrasi sel imun. Sel yang diinfiltrasi menelan jaringan yang rusak dan sel debris, dan mengeluarkan proteinase dan faktor pertumbuhan untuk memfasilitasi remodeling dan rekonstruksi jaringan. Keberhasilan pembersihan rangsangan inflamasi disertai dengan peningkatan antiinflamasi dan reparatif sitokin untuk menyelesaikan respon inflamasi dan membangun kembali homeostasis jaringan (Chen dan Nuñez, 2010). Namun, jika tidak terselesaikan, peristiwa ini dapat berkembang menjadi peradangan kronis ketika peradangan tetap menstimulasi di jaringan yang rusak. Hasil dari sekresi berkelanjutan dari sitokin yang meningkatkan kerusakan jaringan dan merusak homeostasis.

## 1. Inflamasi Akut Dan Inflamasi Kronik

Peradangan akut dimulai dengan pengenalan dari rangsangan inflamasi termasuk mikroorganisme atau puing-puing sel yang rusak melalui *pattern reseptor-recognition* (PRR). Ada beberapa kelas PRR yang mengenali beragam rangsangan dan memicu respons inflamasi hilir, termasuk *Toll like receptor* (TLRs), *NOD like receptor* (NLRs), *RIG-I-like receptors* (RLRs), *C-type lectin receptor* (CLR), dan tidak adanya reseptor seperti melanoma 2 (AIM2). PRR dapat mengenali *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) dari mikroorganisme. Pada peradangan steril, PRRs dapat mengenali *damage associated molecular patterns* (DAMP) dari jaringan yang rusak. Pengenalan PAMP dan DAMP dan aktivasi respon proinflamasi telah didokumentasikan dengan baik oleh Chen dan Nuñez (2010) dan Takeuchi dan Akira (2010). DAMP adalah protein intraseluler seperti protein *heat shock*, asam nukleat, dan sitokin intraseluler. Pelepasan DAMP dari sel nekrotik dengan integritas membran terganggu merupakan indikator kerusakan jaringan. Pengenalan dari DAMP via PRR dalam makrofag jaringan menyebabkan sekresi kemoattractan dan rekrutmen lokal neutrofil dan monosit atau makrofag yang bersirkulasi (Lindquist, 2017).

Respon peradangan dapat beralih dari peradangan akut ke kronis ketika stimuli bertahan (kerusakan jaringan, infeksi, dll). Peradangan kronis ditandai oleh infiltrasi makrofag dan limfosit, serta upaya perbaikan yang sedang berlangsung. Produksi sitokin inflamasi yang berlebihan dari

makrofag selama peradangan kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan fibrosis. Sebagai contoh pada pasien dengan operasi penggantian sendi, pelepasan partikel yang terus-menerus dari induksi biomaterial implan menginduksi peradangan kronis dan osteolisis periprostetik di daerah terbatas (Lin dkk, 2014).

## **2. Fungsi Proinflamasi dan Antiinflamasi Dari Makrofag**

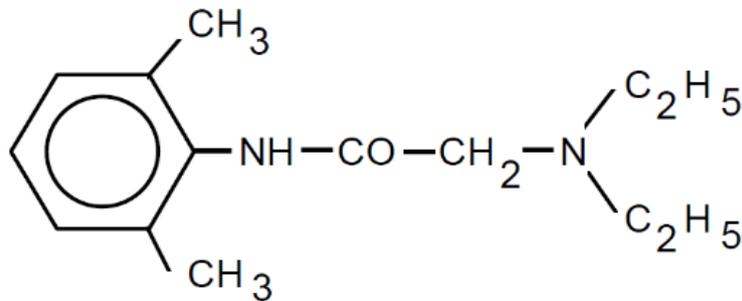
Makrofag merupakan regulator penting dari inisiasi, progresi, dan resolusi dari peradangan. Makrofag terpolarisasi dapat memperoleh bentuk fenotipe berbeda dengan proinflamasi (M1) atau antiinflamasi (M2) (Mantovani dkk, 2013). Aktivasi klasik dari makrofag dengan interferon- $\gamma$  dan atau lipopolisakarida mengarah ke polarisasi makrofag M1.

Makrofag M1 mensekresi sitokin proinflamasi (*tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), dll.), dan kemokin (*monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), protein inflamasi makrofag-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), dll.) Dalam jalur NF- $\kappa$ B dependen, yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dengan tambahan infiltrasi leukosit. Sebagai alternatif, makrofag yang terpapar IL-4 atau IL-13 dipolarisasi ke dalam makrofag M2, ditandai dengan peningkatan arginase-1 dan sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan IL-1 *receptor antagonist* (IL-1Ra). Interaksi antara jalur NF- $\kappa$ B dan makrofag polarisasi M2 masih belum jelas. M2 atau *M2-like macrophage* mampu memodulasi dan mengakhiri respons inflamasi dan sangat penting untuk perbaikan dan remodeling jaringan (Loi dkk, 2016). Dengan demikian,

peran biologis peradangan adalah untuk menghilangkan patogen dan benda asing serta memulai perbaikan dan renovasi jaringan. Garis silang makrofag dan sel-sel lain dalam lingkungan mikro jaringan melalui modulasi dari status inflamasi dan remodeling jaringan dapat menentukan status dari kondisi yang berkaitan dengan inflamasi seperti perbaikan dan remodeling tulang (Lin dkk, 2017)

## B. LIDOKAIN

Lidokain adalah obat anestesi lokal golongan amida yang sudah lama digunakan dalam praktek kedokteran untuk menghambat sensasi nyeri. Anestesi lokal terdiri dari bagian lipofilik dan hidropilik yang dihubungkan oleh rantai hidrokarbon. Bagian hidropilik disusun oleh amin tersier seperti *diethylamine* sedangkan bagian lipofilik disusun oleh cincin aromatik tidak jenuh seperti *para aminobenzoic acid* (PABA). Berdasarkan struktur tersebut anestesi lokal dapat diklasifikasikan menjadi golongan amino-ester dan amino-amida. Bagian lipofilik menentukan aktifitas anestesi dari obat anestesi lokal tersebut. Anestesi lokal bekerja dengan cara mengurangi permeabilitas membran sel pada saluran ion natrium, menghalangi depolarisasi, dan dengan demikian konduksi stimulasi saraf nyeri tidak terjadi. Saluran ion natrium disusun oleh satu subunit  $\alpha$  besar tempat dimana ion natrium lewat dan satu atau dua subunit  $\beta$  yang lebih kecil.



**Gambar 2. 1** Struktur Kimia Lidokain  
 (Dikutip dari: Miller, R. dkk. (2010) *Miller's Anesthesia*. 7 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.)

Lidokain pertama kali ditemukan oleh seorang ahli kimia berkebangsaan Swedia bernama Nils Lofgren pada tahun 1943. Lidokain [*2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) acetamide*] mempunyai rumus kimia yang terdiri dari tiga komponen dasar yaitu gugus amin hidrofil, gugus residu aromatik, dan gugus intermedier yang menghubungkan ke dua gugus tersebut. Gugus amin merupakan amin tersier atau sekunder, antara gugus residu aromatik dan gugus intermedier dihubungkan ikatan amida. Lidokain bersifat basa lemah dengan pKa 8, ikatan protein 64 %, kelarutan lemak 1%. Lidokain sampai saat ini masih menjadi obat terpilih untuk berbagai tindakan dalam bidang kedokteran karena lidokain mempunyai potensi anestesi yang kuat, mula kerja cepat, masa kerja cukup panjang, dan batas keamanan lebar. Penggunaan lidokain hanya efektif bila diberikan secara intravena. Pada pemberian parenteral lidokain cepat diabsorpsi oleh saluran cerna dan saluran pernapasan. Lidokain di hati mengalami dealkilasi oleh enzim oksidasi fungsi ganda menjadi

*monoethylglycine xylidide* dan *glycine xylidide* dan kemudian dimetabolisme menjadi *monoethylglycine* dan *xylidide*. Sebagian besar, 80% *monoethylglycine xylidide* berkasiat anti inflamasi (Miller dkk, 2010). Pada pemberian intravena kadar puncak plasma akan dicapai dalam waktu 3-5 menit dan waktu paruh 30-120 menit. Efek samping lidokain akan terjadi bila kadar konsentrasi plasma > 10 µg/ml. Dosis lidokain untuk tindakan pembedahan adalah 4-5 mg/kgBB, dosis dapat ditingkatkan sampai 7 mg/kgBB bila dicampur dengan adrenalin 1:200.000.

Pada praktek klinik, lidokain digunakan juga sebagai obat anti aritmia kelas I B (penyekat saluran natrium). Pada otot ventrikel jantung lidokain merupakan stabilator elektrofisiologi bermakna karena mampu mengurangi durasi potensial aksi, periode refrakter efektif, respon dan otomisasi membran sistim his-purkinje, tetapi kurang berefek pada atrium. Lidokain menempati reseptornya pada saluran natrium saat fase aktif (fase 0) atau fase inaktif (fase 2) karena pada ke dua fase inilah afinitas lidokain tinggi terhadap reseptornya. Dosis lidokain untuk terapi aritmia ventrikel (takikardi) 1-1,5 mg/kgBB bolus intravena kemudian diikuti dengan pemberian infus 1-4 mg/kgBB/jam.

Beberapa manfaat anestesi lokal selain analgetik yang pernah dilaporkan, (Thal dkk, 2016):

1. Efek antinosisepitif: menghambat saluran ion natrium membran saraf, menghambat pertukaran ion kalium, menghambat reseptor muskarinik presinaps, menghambat reseptor dopamin.
2. Efek antiaritmia: menghambat saluran ion natrium otot jantung
3. Efek antitrombotik: mengurangi trombosis vena dalam, mengurangi agregasi trombosit, mengurangi amplitudo maksimum dari *thrombelastography* (TEG).
4. Efek terhadap fungsi sistem saraf pusat: menghambat reseptor asetilkolin nikotinik medulla spinalis, menghambat saluran kalsium presinaps medulla spinalis, meningkatkan konsentrasi sinaps dopamin, meningkatkan neurotransmisi GABA, menghambat reseptor opioid, menghambat adrenoseptor  $\alpha$ , menghambat reseptor kolinergik muskarinik, menghambat ikatan substansi P dengan reseptor sel *natural killer*.

Menariknya, manfaat anti inflamasi yang didapat ini terjadi pada konsentrasi obat anestesi yang lebih rendah daripada dosis yang diperlukan untuk menghambat saluran natrium. Manfaat anti inflamasi lidokain pada respon inflamasi, khususnya terhadap sel-sel inflamasi *polymorphonuclear granulocytes* (PMN), makrofag, dan monosit bukan karena efek blokade anestesi lokal pada saluran natrium.

*PMN priming* dapat diuraikan sebagai respon potensial PMN setelah terpapar dengan *agent priming* seperti TNF- $\alpha$ , *platelet-activating factor*, IL-8, lipopolisakarida, atau faktor koloni yang menstimulasi faktor makrofag. *PMN priming* merupakan mekanisme yang mengatur fungsi PMN dan berperan penting dalam menstimulasi jalur inflamasi secara berlebihan yang menyebabkan jaringan rusak. Beberapa mekanisme yang diduga sebagai penyebabnya adalah karena anestesi lokal mampu menghambat beberapa sinyal *G protein-coupled receptors* (GPC-Rs) yang memperantarai respon-respon inflamasi seperti asam lisopospatidik dan tromboksan A2 maupun reseptor asetikolin muskarinik m1. GPC-Rs terdiri dari reseptor asetilkolin muskarinik M1-M5 yang mengatur banyak fungsi sistem saraf pusat dan perifer. Secara khusus sub tipe reseptor M1 dan M4 adalah target pengobatan terhadap berbagai gangguan sistem saraf pusat, seperti penyakit Alzheimer, skizofrenia, dan adiksi obat.

### **1. Mekanisme Kerja Anestesi Lokal**

Anestesi lokal mencegah transmisi impuls saraf dengan menghambat aliran ion natrium melalui saluran natrium pada keadaan potensial istirahat, neuron mempertahankan potensial (-70mV) didalam sel neuron dibandingkan dengan di luar sel. Pompa Na-K secara aktif mempertahankan potensial ini tetap terpelihara. Pompa aktif ini menggerakkan natrium (Na<sup>+</sup>) keluar dari sel neuron dan membawa kalium (K<sup>+</sup>) masuk kedalam sel sehingga terjadi perbedaan konsentrasi ion Na<sup>+</sup>

dan K<sup>+</sup> didalam dan di luar sel (Na<sup>+</sup> lebih tinggi di ekstrasel dan K<sup>+</sup> lebih tinggi di intrasel). Untuk pergerakan pasif, sel neuron lebih permeabel terhadap ion K daripada ion Na sehingga potensial listrik intraseluler lebih negatif dari ekstrasel. Dengan adanya rangsangan potensial listrik pada neuron maka akan terjadilah fase depolarisasi sepanjang akson dan aktivasi kanal natrium di membran sel yang menyebabkan reflek ion natrium ke dalam sel sehingga terjadi perubahan potensial membran dari -70 mV menjadi +35 mV. Molekul anestesi lokal masuk kedalam sel dan menutup kanal ion Na dari dalam sel, sehingga potensial aksi dicegah dan transmisi impuls sepanjang saraf tidak terjadi (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

Obat anestesi lokal mencegah transmisi impuls saraf (blokade konduksi) dengan menghambat pengiriman ion natrium melalui gerbang ion natrium selektif pada membrane saraf. Gerbang natrium sendiri adalah reseptor spesifik molekul obat anestesi lokal. Penyumbatan gerbang ion yang terbuka dengan molekul obat anestesi lokal berkontribusi sedikit sampai hampir keseluruhan dalam inhibisi permeabilitas natrium. Kegagalan permeabilitas gerbang ion natrium untuk meningkatkan perlambatan kecepatan depolarisasi seperti ambang batas potensial tidak tercapai sehingga potensial aksi tidak disebarkan. Obat anestesi lokal tidak mengubah potensial istirahat transmembran atau ambang batas potensial. Lokal anestesi juga memblok kanal kalsium dan potasium dan reseptor Nmethyl-D-aspartat (NMDA) dengan derajat yang berbeda-beda. Beberapa

golongan obat lain, seperti antidepresan trisiklik (amitriptyline), meperidine, anestesi inhalasi, dan ketamin juga memiliki efek memblok kanal sodium (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

Tidak semua serat-serat saraf dapat dipengaruhi oleh obat anestesi lokal, oleh karena sensitivitasnya sangat ditentukan oleh diameter dari akson, ada tidaknya myelin sehingga pada penggunaan blok spinal urutan saraf yang terblok adalah autonom, sensorik dan motorik. Sebaliknya pemulihannya dimulai dari saraf motorik, sensorik, terakhir adalah autonom (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

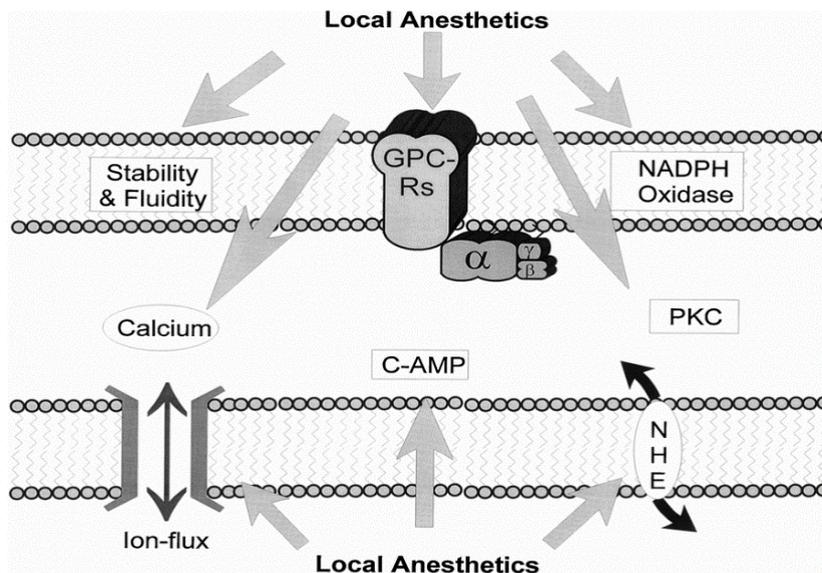
Teori ekspansi membran mendalilkan bahwa anestesi lokal diserap kedalam membran sel, memperluas membran dan menyebabkan penyempitan saluran natrium. Hipotesis ini sebagian besar telah memberi jalan kepada teori reseptor spesifik. Teori ini mengusulkan bahwa anestesi lokal berdifusi melintasi membran sel dan berikatan dengan reseptor spesifik pada pembukaan saluran natrium yang diberi tegangan. Afinitas anestesi lokal terhadap saluran  $Na^+$  yang diberi tegangan meningkat secara nyata dengan laju eksitasi neuron. Ikatan ini mengarah pada perubahan struktur atau fungsi saluran dan menghambat pergerakan ion natrium. Blokade kebocoran arus  $K^+$  oleh anestesi lokal kini juga diyakini berkontribusi pada blok konduksi dengan mengurangi kemampuan saluran untuk mengatur potensi membran (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

Atas dasar diameternya, serabut saraf dikategorikan menjadi 3 jenis. Serat tipe A adalah yang terbesar dan bertanggung jawab untuk melakukan tekanan dan sensasi motorik. Serat tipe B berukuran mielin dan ukuran sedang. Serat tipe C, yang mentransmisikan rasa sakit dan sensasi suhu, berukuran kecil dan tidak mengandung mielin. Akibatnya, anestesi memblokir serat tipe C lebih mudah daripada serat tipe A. Oleh karena itu, pasien yang telah memblokir sensasi nyeri masih merasakan tekanan dan memiliki mobilitas karena serat tipe A yang tidak diblokir (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

Beberapa teori berkaitan dengan aksi anestesi pada saraf. Namun, teori reseptor spesifik adalah teori yang paling banyak diterima. Satu fakta yang terbukti adalah bahwa anestesi mengganggu bagaimana impuls berjalan sepanjang saraf. Ini dilakukan dengan mengganggu masuknya ion natrium melintasi membran aksonal saraf perifer. Anestesi lokal berdifusi melintasi membran sel dan berikatan dengan reseptor spesifik pada pembukaan saluran natrium yang terdegagasi. Afinitas anestesi lokal terhadap saluran  $\text{Na}^+$  yang terjaga tegangannya meningkat secara signifikan dengan laju eksitasi neuron. Anestesi lokal bekerja selama fase depolarisasi generasi impuls saraf dengan mengikat protein struktural yang dikenal sebagai reseptor spesifik pada saluran natrium. Laju depolarisasi berkurang dan saraf tidak pernah mencapai potensi penembakan. Anestesi yang berbeda mengikat di berbagai lokasi di membran. Pada saraf mielin,

anestesi lokal memiliki akses ke membran saraf hanya di simpul Ranvier di mana saluran natrium berada (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).

Anestesi harus menembus 8-10 mm dari panjang saraf, sekitar tiga hingga empat node, untuk secara mendalam memblokir generasi impuls saraf karena impuls bisa cukup kuat untuk melewati satu atau dua node yang tersumbat. Ketebalan saraf juga memiliki efek pada berapa banyak anestesi lokal yang diperlukan untuk menutup tiga hingga empat node untuk mencapai anestesi mendalam. Oleh karena itu selubung saraf yang lebih tebal seperti yang ditemukan pada saraf alveolar inferior akan membutuhkan lebih banyak anestesi untuk mencapai penyumbatan saraf yang memadai. Selama tahap istirahat konduksi saraf, ion kalsium ( $\text{Ca}^{++}$ ) terikat pada situs reseptor dalam saluran ion membran sel. Selama depolarisasi, ion  $\text{Ca}^{++}$  dipindahkan dan dianggap sebagai faktor paling signifikan yang bertanggung jawab atas masuknya natrium ke dalam saraf. Anestesi lokal bekerja dengan bersaing dengan ion  $\text{Ca}^{++}$  untuk mengikat saluran ion ini selama depolarisasi lambat dan menutup (memblokir) saluran ini. Secara umum mekanisme anestesia lokal dapat disimpulkan dalam algoritma berikut ini (Butterworth, Mackey dan Wasnick, 2013).



**Gambar 2. 2** Mekanisme kerja anestesi lokal pada inflamasi.  
 (Dikutip dari: Hollmann, M. W. dan Durieux, M. E. (2000) “*Local Anesthetics and the Inflammatory Response*” *Anesthesiology*, 93(3), hal. 858–875.)

## 2. Farmakokinetik

Anestesi lokal adalah basa lemah dengan pKa sedikit diatas pH fisiologi. Pada pH fisiologis kurang dari 50% obat anestesi lokal terlarut dalam lemak dan tak mengalami ionisasi. Anestesi lokal yang memiliki pKa mendekati pH fisiologi memiliki onset yang lebih cepat karena rasio obat yang terionisasi dan dengan tidak terionisasi optimal. Disamping itu efek vasodilator dari obat anestesi lokal itu sendiri, dimana efek lidokain lebih besar daripada mepivakain mempercepat absorpsi sistemik dari obat sehingga mempercepat durasi dari obat tersebut. Sedangkan bupivakain dan etidokain memiliki faktor intrinsik yang serupa, namun konsentrasi plasma efek bupivakain setelah pemberiannya pada ruang epidural lebih tinggi daripada etidokain (Stoelting, 2021)

### **3. Absorpsi**

Absorpsi anestesi lokal tempat injeksi ke dalam sirkulasi darah dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya tempat injeksi obat dan besarnya dosis, penggunaan vasokonstriktor dan farmakologi dari obat. Membran mukosa (konjungtiva, mukosa trakea) memiliki barier yang lemah terhadap anestesi lokal dibandingkan dengan kulit yang intak sehingga pemberian melalui mukosa akan memberikan efek yang lebih cepat. Pada infiltrasi yang dalam (3-5 mm) akan memberikan durasi  $\pm 1-2$  jam. Absorpsi secara sistemik tergantung dari proporsi vaskular dari jaringan. Lidokain mudah diserap dari tempat suntikan, dapat melewati sawar darah otak. Kadarnya dalam plasma fetus dapat mencapai 60% kadar dalam darah (Stoelting, 2021).

Penggunaan vasokonstriktor (epinephrine 1:200.000) menimbulkan vasokonstriksi pada tempat injeksi sehingga jumlah obat yang diabsorpsi ke sirkulasi menurun sedangkan pengambilan oleh sel saraf akan meningkat sehingga meningkatkan kualitas analgesia dan durasi dari blok saraf serta mengurangi efek samping (semakin banyak yang diabsorpsi semakin besar resiko keracunan obat). Disamping itu epinephrine juga memperpanjang durasi dari lidokain dengan perangsangan reseptor  $\alpha$ -2 adrenergik. Penambahan epinephrine pada lidokain akan memperpanjang durasi lidokain sampai 50% sedangkan penambahan epinephrine pada bupivakain kurang bermanfaat karena durasi bergantung pada ikatan dengan protein (protein binding). Sifat dari obat itu sendiri juga berpengaruh

terhadap absorpsi obat tersebut. Lidokain yang memiliki efek vasodilatasi akan lebih cepat diabsorpsi sehingga durasi lebih pendek (Stoelting, 2021).

Pada saat dosis dari anestesi lokal ditingkatkan begitu pula efek anestesi meningkat, dan waktu dari onset blok akan lebih cepat. Dosis dari lokal anestesi dapat ditingkatkan dengan cara menambahkan volume atau dengan meningkatkan konsentrasi. Sebagai contoh peningkatan konsentrasi dari 0,125% menjadi 0,5 % dengan jumlah volume yang sama akan meningkatkan efek anestesi dan menambah lama blok sensoris, volume dari larutan anestesi lokal dapat mempengaruhi penyebaran anestesia (Stoelting, 2021).

#### **4. Distribusi**

Distribusi dari lidokain tergantung dari masing-masing organ yang dipengaruhi oleh perfusi jaringan dan koefisien parsial dari jaringan dan darah. Pada organ yang memiliki perfusi jaringan yang tinggi (otak, paru, hati, ginjal, dan jantung) obat ini akan cepat didistribusikan. Paru – paru mengekstraksi sebagian besar dari anestesi lokal. Kondisi ini menyebabkan ambang toksisitas anestesi local lebih rendah bila disuntikkan intraarterial daripada intravena. Koefisien partial dari jaringan dan darah memiliki kekuatan ikatan protein plasma akan mempertahankan anestesi lokal didalam darah, sedangkan kelarutannya dalam lemak akan memudahkan pengambilan oleh organ (Stoelting, 2021).

## 5. Metabolisme dan Ekskresi

Metabolisme dan ekskresi anestesi lokal bergantung dari struktur molekul yang menyusunnya. Golongan ester dimetabolisme oleh *pseudocholinesterase* (plasma *cholinesterase* atau *butyrylcholinesterase*) dengan reaksi hidrolisis. Reaksi ini sangat cepat dan metabolitnya mudah larut dalam air sehingga dapat diekskresikan lewat urin. Metabolisme prokain dan benzokain akan menghasilkan *paminobenzoic acid* (PABA) yang berperan dalam timbulnya reaksi alergi pada penggunaan anestetik lokal golongan ester (Stoelting, 2021).

Golongan amida dimetabolisme oleh enzyme p-450 mikrosomal di dalam hati (*N-deacylase* dan *hydroxylase*). Kecepatan dari metabolisme dari golongan ini tergantung pada masing – masing anestesi lokal tetapi secara keseluruhan lebih lambat dari golongan ester. Menurunnya fungsi hepar (sirosis) atau penurunan aliran darah hepar akan mengurangi kecepatan metabolisme dari anestesi lokal ini. Sehingga kemungkinan toksisitas sistemik akan meningkat. Sebagai contoh eliminasi waktu paruh dari lidokain akan meningkat 5 kali lipat pada pasien dengan disfungsi hepar dibandingkan dengan pasien normal. Penurunan metabolisme lidokain oleh hepar harus dapat diantisipasi terutama bila mendapat anestesi dengan zat volatil (Stoelting, 2021).

Lidokain termasuk anestesi golongan amida, dan didalam hati lidokain mengalami dealkilasi oleh enzim oksidase fungsi ganda (*mixed function oxides*) membentuk *monoethylglycine* dan *xylidide*, yang kemudian

dapat dimetabolisme lebih lanjut menjadi *aminoethyl glycine* dan *xylidide*. Kedua metabolisme ternyata masih memiliki efek anestesi lokal. Pada manusia 75% dari *xylidide* akan dieksresikan bersama urin dalam bentuk metabolit akhir, *4-hidroksi 2-6 dimetilanilin* (Stoelting, 2021).

Paru mampu mengekstraksi anestetik lokal seperti lidokain bupivakain, dan prilokain dari sirkulasi. Setelah pemberian anestesi lokal secara cepat ke dalam sirkulasi vena pengeluaran oleh paru akan membastasi konsentrasi obat yang mencapai sirkulasi sistemik yang didistribusikan ke arteri koroner dan ke sirkulasi serebral (Stoelting, 2021).

## **6. Efek Obat Anestesi Lokal Pada Inflamasi**

Wang dkk, 2013; Liu dkk, 2014 menyebutkan efek anti inflamasi lidokain dapat terjadi pada berbagai jenis sel PMN termasuk monosit, dan makrofag. Lidokain mampu menghambat pembentukan superoksida dan aktivitas leukosit. Pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* lidokain menunjukkan kemampuannya mengurangi respon inflamasi dan mempunyai efek anti infeksi. Lidokain juga dapat mengurangi agregasi trombosit, pelepasan histamin, melindungi permeabilitas pembuluh darah, sebagai pemulung radikal bebas untuk radikal hidroksil, dan *oxygen singlets*.

Penelitian Liu dkk, 2014 pada tikus sepsis setelah di induksi dengan injeksi *lipopolysaccharida* (LPS), pemberian lidokain sistemik memberikan efek perlindungan terhadap disfungsi ginjal dan hati tikus sepsis dengan menurunkan regulasi TLR4, menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan menurunkan kadar sitokin pro inflamasi IL-6 dengan menghambat jalur penanda TLR4.

Penelitian Wang dkk, 2011 membuktikan pemberian lidokain sistemik pada tikus sepsis yang diinduksi dengan cara *cecal ligation and puncture* (CLP) memberikan efek perlindungan terhadap cedera reperfusi iskemia dan peritonitis septik. Pada penelitian yang dilakukan Garutti dkk, 2014 menyatakan penggunaan lidokain intra vena menunjukkan penurunan yang signifikan pada kadar TNF- $\alpha$  dalam sampel plasma dan sampel *bronchoalveolar lavage* kelompok babi yang menjalani operasi reseksi paru dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian Wang dkk, 2013 menunjukkan pemberian lidokain sistemik mempunyai efek proteksi pada tikus sepsis dengan menghambat ekspresi HMGB1 dan aktivasi NF- $\kappa$ B. Efek anti inflamasi dari lidokain mungkin dimediasi oleh inhibisi dari aktivasi NF- $\kappa$ B dan pelepasan sitokin. Penelitian Sirait dkk, 2018 menyebutkan pemberian lidokain secara sistemik secara efektif menghambat proses inflamasi dari mencit BALB/C yang mengalami cedera muskuloskeletal berupa patah tulang tertutup dengan menekan transkripsi mRNA HMGB1 dan translasi protein HMGB1.

### **C. HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)**

HMGB1 dideskripsikan sebagai protein nuklir pengikat DNA, dan fungsi utamanya adalah sebagai ko-faktor nukleus dalam regulasi transkripsi. Sebagai ko-faktor nukleus, HMGB1 diketahui memiliki peran sebagai molekul pengantar pesan intraseluler, dilepaskan dari sel tertentu ke ekstraseluler untuk berefek pada reseptor sel tertentu. Peran lain dari HMGB1 adalah sitokin pro-inflamasi yang berkontribusi penting dalam banyak kasus inflamasi steril, infeksi termasuk sepsis. Ikatan HMGB1 dengan reseptor permukaan sel imun, akan mengaktifkan respon intraseluler untuk mengatur fungsi imunitas sel termasuk kemotaksis dan modulasi sistem imun (Yang dkk, 2013).

HMGB1 adalah anggota pertama dari keluarga *high mobility group box* (HMGB). Keluarga HMGB terdiri dari HMGB 1, 2, dan 3. HMGB4 diidentifikasi sebagai anggota baru dari kelompok HMGB, namun identik dengan HMGB3 sehingga kemudian disebut sebagai HMGB3. Struktur semua protein kelompok HMGB sangat identik (>80% mirip). Ekspresi HMGB1 terdapat pada banyak tempat, hampir semua jenis sel mamalia yang diperiksa, ekspresi HMGB2 terbatas pada jaringan limfoid dan testis di hewan dewasa, sedangkan HMGB3 ekspresinya terbatas pada embrio dan sel punca hematopoetik. Diantara ketiga jenis protein HMGB, HMGB1 adalah protein inti non histon yang paling berlimpah, dan pada beberapa tingkatan tertentu terdapat juga di sitoplasma.

HMGB1 adalah suatu protein dengan berat molekul 25 kDa dari 215 asam amino. Protein tersebut terbagi menjadi tiga bagian, dua bagian ikatan DNA bermuatan positif yang disebut kotak A dan B, serta satu bagian ujung yang bersifat asam bermuatan negatif dibentuk oleh 30 asam glutamat dan aspartat, dan sekitar 20 % sisanya adalah lisin. Struktur kotak A dan B adalah heliks, sebagian ditutupi ujung yang terlipat diatas protein. Terdapat dua sinyal pembawa nukleus dibagian proksimal kotak A dan kotak B dan dapat berikatan dengan nukleus *exportin CRM1*. Pada pemotongan kotak A dan B HMGB1, diperlihatkan bahwa aktivitas sitokin ekstraseluler terdapat di kotak B, aktivitas ini dapat dihambat oleh protein kotak A. Rangkaian primer HMGB1 sangat identik pada semua mamalia, lebih dari 98,5% mirip antara manusia dan tikus. HMGB1 memiliki 3 sistein, 2 berada diposisi 23 dan 45 kotak A dan 1 di posisi 106 kotak B. Posisi sistein 106 di kotak B perannya sangat diperlukan sitokin, oksidasi atau mutasi selektif residu ini akan menghapus aktivitas sinyal HMGB1 untuk melepas sitokin. HMGB1 juga mengandung dua NLS (*nuclear localization signal*), satu terletak di protein kotak A aa 28-44 dan yang lain terletak di kotak B aa 179-1850 (Andersson dan Tracey, 2011; Li dkk, 2014).

Empat residu lisin berada di *nuclear localization signal* (NLS1), dan lima lainnya berada di NLS2. HMGB1 sangat rentan pada modifikasi asetilasi, menghasilkan nukleus dan pelepasan HMGB1. Di nukleus, HMGB1 menunjang struktur kromatin melalui ikatan DNA dengan rangkaian yang nonspesifik dan terlibat dalam regulasi transkripsi gen. Secara

intraseluler, HMGB1 terlibat dalam autofagi dan pada *dsRNA dependent protein kinase* (PKR) aktivasi inflamasi. Pada permukaan sel, protein terekspresi di membran trombosit yang teraktivasi saat awal neuron, terlibat dalam pertumbuhan neurit selama perkembangan dan regenerasi sel saraf.

HMGB1 ekstraseluler telah menjadi perhatian terkait perannya yang terlibat dalam berbagai respon imun, berperan sebagai alarm sinyal prototipik karena HMGB1 memiliki fungsi spesifik. Penelitian fungsi struktural HMGB1, mengungkapkan bahwa aktivitas sitokin mengekspresikan respon inflamasi sedangkan anti sitokin sendiri berperan sebagai antagonistik HMGB1 spesifik, tetapi mekanismenya masih tetap belum dimengerti. HMGB1 mengandung residu sistein pada posisi 106, sensitif pada modifikasi yang bergantung pada reaksi redoks. Penemuan terbaru menunjukkan bahwa redoks dan modifikasi asetil secara langsung mengontrol sitokin dan aktifitas kemotaksis HMGB1 (Andersson dan Tracey, 2011).

**Tabel 2. 1 Fungsi Kompartemen Spesifik HMGB1**

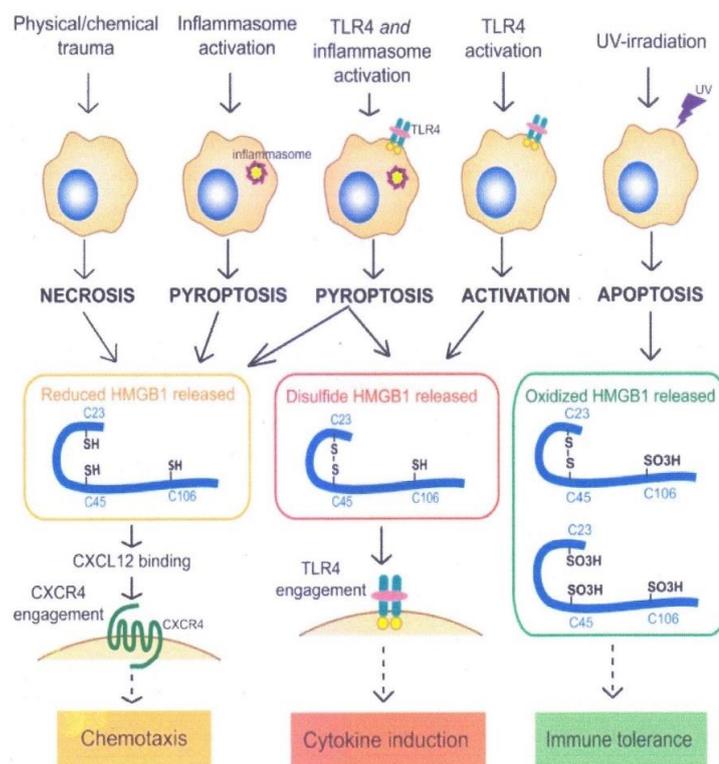
<b>Nukleus</b>	Pengikat DNA: regulasi transkripsi Stabilisasi kromatin Kumpulan Kromosom Replikasi Sel Perbaikan DNA
<b>Intraseluler</b>	PKR/aktivasi peradangan Autofagi: C106 dibutuhkan untuk induksi autofagi Sistein-sistein, ikatan disulfida dibutuhkan untuk induksi autofagi Sebagai jalan pelepasan Formasi vesikel
<b>Ekstraseluler</b>	Ikatan membran memproduksi neurit Aktivasi trombosit Ekstraseluler: proangiogenik Antibakterial Penurunan seluruh sistein : inflamasi Menyerupai kemokin : kemotaksis Semua sistein yang teroksidasi: non inflamasi Sistein dan ikatan disulfida: inflamasi, menyerupai sitokin, menginduksi sitokin Hiperasetilasi lisin: inflamasi, induksi sitokin

(Dikutip dari: Yang, H. *et al.* (2013) "The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis," *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), hal. 865–873.)

## 1. Aktivitas Sitokin HMGB1

HMGB1 adalah mediator sitokin patogenesis pada kondisi inflamasi. Sebagai bagian dari respon imun yang aktif, HMGB1 dapat disekresikan secara aktif dari berbagai jenis sel termasuk makrofag, sejumlah sel-sel *natural killer* (NK), sel-sel dendrit (DCs), sel-sel endotelial, dan trombosit. HMGB1 dapat dilepaskan secara pasif dari sel-sel nekrotik, trauma, dan cedera secara signifikan ke ekstraseluler. Meskipun sel apoptosis dapat melepaskan jumlah HMGB1 lebih sedikit dibanding sel nekrotik, makrofag yang diselimuti sel apoptosis dapat menginduksi pelepasan HMGB1 secara aktif. Piroptosis, sel nekrotik yang kematiannya diprogramkan dan di induksi oleh kaspase-1, telah di demonstrasikan

sebagai alur penting untuk pelepasan HMGB1 secara aktif yang dikontrol oleh *dsRNA-dependent protein kinase* (PKR) dan inflammasom. Aktivasi Inflamosom pengatur kaspase-1, memediasi piroptosis dan melepaskan IL- $\beta$ , IL-18, dan HMGB1 (Magna dan David S. Pisetsky, 2014).



**Gambar 2. 3** Mekanisme pelepasan HMGB1 dan isoform HMGB1 (Dikutip dari: Magna, M. dan Pisetsky, D. S. (2014) "The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases," *Molecular Medicine*. University of Michigan, 20(1), hal. 138–146.)

Seperti yang terlihat pada gambar diatas, berbagai mekanisme pelepasan (nekrosis, piroptosis, aktivasi makrofag, dan apoptosis) dapat menyebabkan pelepasan HMGB1 bentuk redoks berbeda. Sel nekrosis dan piroptosis melepaskan bentuk thiol semua atau tereduksi sepenuhnya; bentuk ini dapat mengikat kemokin CXCL12 dan memberi isyarat melalui

reseptor CXCR4 untuk merangsang kemotaksis. Kombinasi piroptosis dengan stimulasi ligan TLR4, menyebabkan pelepasan HMGB1 tereduksi dan HMGB1 ikatan disulfida C23 dan C45 dan C106 dalam bentuk thiol. Bentuk HMGB1 ini merangsang produksi sitokin melalui sinyal TLR4. Aktivasi makrofag juga melepaskan sitokin HMGB1 bersamaan dengan aktivasi TLR4. Sel apoptosis melepaskan HMGB1 teroksidasi penuh, dengan sistein bentuk sulfonat, tidak dapat menstimulasi sitokin atau memicu kemotaksis; ekspresi sel-sel apoptosis bentuk HMGB1 teroksidasi dapat memicu toleransi (Magna dan David S Pisetsky, 2014).

Pemberian HMGB1 pada hewan normal akan menghasilkan respon inflamasi sistemik, termasuk demam, penurunan berat badan, anoreksia, cedera paru-paru akut, disfungsi sawar epitel, artritis, dan kematian. Terapi HMGB1 antagonis atas dasar antibodi, HMGB1 antagonis spesifik lainnya, atau obat-obat farmakologi, telah terbukti dalam skala besar berhasil dalam mengobati kondisi yang berkaitan dengan penyakit inflamasi preklinik, mengurangi berat penyakit dan mengurangi efek kematian.

## **2. HMGB1 adalah mediator penting penyebab kematian pada radang steril dan infeksi**

Respon inflamasi bisa juga disebabkan oleh gangguan pada luka steril atau infeksi. Selama infeksi, imunitas bawaan diaktivasi oleh produk molekular asing seperti *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs),

*lipopolysaccharide* (LPS), *double-stranded* (dsRNA), dan CpG-DNA. Selama trauma steril atau iskemia, sel yang sama teraktivasi oleh pemaparan *damage associated molecular patterns* (DAMPs) endogenus, yang termasuk *heat shock protein*, asam urat, aneksin, dan IL- $\alpha$ . DAMPs dan PAMPs menginduksi kaskade yang sama pada inflamasi, kerusakan jaringan, kegagalan berbagai organ. HMGB1 dilepaskan oleh aktivasi sel imun dan luka atau sel nekrotik, berperan penting pada respon host pada kedua tipe gangguan dengan demikian menjadi mediator kritis di akhir rangkaian morbiditas dan mortalitas selama infeksi dan luka steril (Yang dkk, 2013; Magna dan David S Pisetsky, 2014).

HMGB1 adalah penjaga universal untuk mediasi asam nukleat pada respon imun bawaan HMGB1 dan anggota keluarga dari HMGB 2, dan 3 menjadi sensor universal bagi asam amino sitosolik. HMGB1 terlibat dalam kompleks yang mengandung DNA dalam merespon imun melalui TLR9. HMGB1 berikatan dengan semua asam nukleat imunogenik yang diperiksa dan memediasi respon imun melalui stimulasi transkripsi tipe 1 IFN, IL-6, dan RANTES dari sel-sel imun atau fibroblas embrio tikus. Tentu saja, kekurangan ekspresi HMGB1 banyak mengurangi respon imun saat di stimulasi dengan DNA/RNA mirip virus yang dibandingkan oleh kontrol WT. Penghentian ketiga protein HMGB ini akan menghambat respon pada stimulasi asam nukleat viral dibandingkan dengan penghentian salah satu HMGBI, menunjukkan bahwa protein HMGB1 berbagi fungsional yang sama. Protein HMGB1 berperan penting dalam pengaturan sentinel

universal dalam aktivasi asam nukelat merespon kekebalan bawaan tetapi masih dengan mekanisme yang belum terpecahkan. Reseptor yang memediasi aktivitas HMGB1 keluarga dari reseptor HMGB1 sekali terlepas ke lingkungan ekstraselular, HMGB1 berikatan dengan reseptor sel permukaan untuk menimbulkan respon inflamasi. Reseptor yang memediasi signal HMGB1 yaitu *Reseptor for Advanced Glycation End Product* (RAGE), TLR2, TLR4, dan TLR 9, antigen makrofag-1, syndecan-3, CD24-Siglec-10, CSCR4, dan sel T Ig mucin-3; TLR4 adalah reseptor primer yang dibutuhkan untuk promosi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan kerusakan jaringan. Terpisah dari interaksi reseptor secara langsung, HMGB1 mungkin membentuk heterokompleks dengan molekul lain, seperti IL-1, CCL12, DNA, RNA, histon, atau LPS, yang menghasilkan respon sinergistik dibandingkan semua produk hasil komponen individual. Sinyal kompleks ini dari reseptor resiprok untuk molekul pasangan HMGBI sebagai modus aksi, HMGB1 berperan pada formasi heterokompleksnya sendiri, menginisiasi respon kekebalan bawaan, termasuk aktivitas kemotaksis dan pelepasan sitokin proinflamasi, menyebabkan demam, disfungsi sawar epitel, dan inflamasi kronis dan akut (Andersson dan Tracey, 2011; Yang dkk, 2013).

### 3. Peran MD-2 pada HMGB1-TLR4

Aktivitas TLR4 (*toll-like receptor 4*) dan interaksinya dengan ligan bergantung pada kolaborasi molekular dengan protein adaptor ekstraselular *myeloid differentiation protein 2* (MD-2). Penelitian Biacore (He dkk, 2018) dengan menggunakan biosensor resonansi plasmon permukaan, mengobservasi bahwa HMGB1 seperti halnya LPS, mengikat MD-2 dengan afinitas tinggi ( $K_d$  nyata - 8 nM), dimana ia tidak berikatan dengan TLR4 sendiri. Penginduksi HMGB1 non sitokin, dihasilkan dengan pembentukan mercury thiolat C106, oleh substitusi sistein, atau oleh modifikasi redoks, tidak mengizinkan interaksi pengikatan HMGB1 dengan MD-2, produksi TNF, atau translokasi NF- $\kappa$ B nuklear di makrofag. Hasilnya menunjukkan bahwa HMGB1 seperti LPS, perlu berikatan dengan komponen MD-2 dari kompleks TLR4/MD-2 untuk menginduksi sitokin, sehingga tingkat redoks sistein HMGB1 yang mengontrol interaksi ikatan ini (Harris dkk, 2012)

Percobaan yang dilakukan untuk menghentikan MD-2 dengan transfeksi siRNA spesifik yang menargetkan MD-2 sebagai sel mirip makrofag RAW 264,7 atau sel monositik manusia THP-1. Pengurangan pelepasan TNF secara signifikan dan aktivasi NF- $\kappa$ B dengan stimulasi HMGB1 diobservasi dengan membandingkan dengan sel transfeksi dengan kontrol siRNA, mendukung bahwa MD-2 membutuhkan, untuk mode ini, sinyal HMGB1 dalam makrofag/ monosit. Eksperimen peningkatan fungsi mengkonfirmasi bahwa MD-2 cukup untuk mengembalikan induksi HMGB1

melepas IL-8 ginjal embrionik manusia 293 sel mengekspresi TLR4 berlebihan. Hasil ini mengungkapkan bahwa MD-2 penting untuk respon induksi TLR4 oleh HMGB1 selain itu, semua sistein dalam HMGB1 penting untuk interaksi penempatan MD-2.

#### **4. Batasan HMGB1**

HMGB1 adalah protein murni yang diekspresikan oleh sel-sel imun bawaan dalam merespon produk patogen dan sel steril yang mati, menempati peran sentral dalam patogenesis peradangan dalam sistem kekebalan. Kerusakan sel inang akan mengaktifkan respon pertahanan tubuh dasar (imunitas bawaan) untuk bisa membedakan respon yang dihasilkan oleh mikroba dan patogen (Kang dan Kim, 2011).

Kemajuan biologi molekuler mengungkapkan bahwa sitokin spesifik adalah mediator patogen penting dan secara selektif melemahkan tanda-tanda klinis dan gejala inflamasi dari penyakit. Inflamasi dapat digambarkan sebagai reaksi tubuh melawan kejadian-kejadian yang berbahaya seperti cedera jaringan atau adanya invasi patogen. Pelepasan mediator vasoaktif dari sel mast (histamin, leukotrin), trombosit, dan komponen plasma (bradikinin) menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah akan mengarah pada tanda-tanda peradangan klasik kemerahan (rubor) dan panas (kolor). Edema akan menyebabkan pembengkakan (tumor), dan interaksi mediator inflamasi dengan sistem sensoris menimbulkan nyeri (dolor). Inflamasi lokal bila berlanjut terus akan

menimbulkan respon sistemik yang disebut sebagai reaksi fase akut di ikuti peningkatan protein fase akut (protein C reaktif, faktor komplemen C3, fibrinogen, dan albumin serum), dan aktivasi sistim mediator (kinin, komplemen, lipid, dan sitokin). Pelepasan sitokin lokal interleukin (IL-1, IL-6, dan TNF) memicu respon inflamasi dan kemotaksis netrofil ditempat cedera. *Tumor necrosis factor* (TNF), IL-1, dan IL-6 telah menjadi andalan pengobatan berbasis sitokin inflamasi di klinik. Sitokin inflamasi ini telah diidentifikasi sebagai target terapi dalam patofisiologi endotoksemia, demam, sepsis, dan penyakit autoimun (Harris, Andersson dan Pisetsky, 2012).

Meluasnya penggunaan antagonis penetralisir HMGB1 pada model penyakit praklinis secara langsung terlibat mengatur molekul imunitas bawaan dan adaptif pada saat sehat dan sewaktu menderita arthritis, radang usus, iskemia steril, luka trauma, kanker, dan infeksi. HMGB1 adalah protein struktural yang tinggal dalam nukleus, berfungsi untuk menstabilkan struktur DNA dan memodulasi aktivitas transkripsi. Fitur struktural utama HMGB1 adalah dua domain ikatan DNA, daerah homolog terdiri dari 80 asam amino panjang yang diistilahkan sebagai protein kotak A dan B, dan domain C terminal terdiri dari asam aspartat dan glutamat. Penemuan eksploitasi terapi sitokin yang merusak setelah infeksi dan cedera mengungkapkan bahwa HMGB1 secara aktif disekresi sitokin, diproduksi oleh sel makrofag dan sel inflamasi lain dalam menghadapi invasi (Harris, Andersson dan Pisetsky, 2012).

Secara biologis HMGB1 aktif diekspresikan pada membran plasma atau dilepas sel-sel inflamasi, in vivo menumpuk selama infeksi dan cedera; mengubah metabolisme dan aktivitas imunologi hematopoietik, epitel, dan sel-sel saraf; memperantarai demam, anoreksia, respon fase akut, dan sindrom kebocoran pembuluh darah. Sinergi aktifitas HMGB1 dipengaruhi oleh sitokin dan molekul patogen yang diturunkan, pemberian obat yang menghambat aktivitas HMGB1 (antibodi, protein antagonis, inhibitor rilis) pada hewan iskemia dan penyakit inflamasi menghalangi perkembangan cedera jaringan dan menekan respon inflamasi (Harris dkk, 2012).

## **5. Jalur Pelepasan HMGB1**

Pelepasan HMGB1 ke dalam sirkulasi melalui dua jalur yaitu invasi patogen atau cedera steril, salah satu bersifat aktif dan lainnya pasif. Pelepasan pasif diprakarsai oleh kerusakan integritas selular yang terjadi seketika. Sekresi aktif HMGB1 diprakarsai oleh transduksi sinyal seluler melalui interaksi reseptor membran plasma dengan produk ekstraseluler, terjadi lebih lambat. Sekresi aktif HMGB1 terjadi ketika monosit, makrofag, sel-sel *natural killer*, sel dendrit, sel endotel, trombosit, dan sel-sel imunologis kompeten lain terpapar dengan *microbe associated molecular patterns (MAMPs)*, *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*, dan secara endogen berasal dari mediator inflamasi termasuk TNF $\alpha$ , IL-1, dan IFN- $\gamma$  (Harris dkk, 2012; Wang dkk, 2014).

Sel-sel lain yang bisa dirangsang untuk mengeluarkan HMGB1 secara aktif termasuk neuron, astrosit, sel eritroleukemia, sel-sel neuroblastoma, dan sel-sel tumor. Kebanyakan sel, termasuk monosit dan makrofag, menyusun ekspresi protein HMGB1 dan mRNA dalam kondisi basal. Setelah makrofag diaktivasi dengan liposakarida (LPS) kadar HMGB1 mRNA meningkat selama beberapa jam dan tetap tinggi selama 24-48 jam. Sekresi aktif HMGB1 ke ekstraseluler dimulai 8-12 jam setelah ligasi reseptor *Toll-like* (TLRs) dan terus meningkat selama 18-36 jam, rangkaian waktu secara signifikan lebih lambat dibandingkan dengan TNF dan IL-1, prototipe sitokin proinflamasi awal. Pelepasan HMGB1 dari kematian sel terprogram terjadi melalui dua cara (Andersson dan Tracey, 2011; Kim dkk, 2011):

- a) Secara langsung dari sel apoptosis
- b) Melalui aktivasi monosit setelah terpapar sel apoptosis.

Bukti mengungkapkan bahwa sel yang mengalami apoptosis melepas sejumlah besar HMGB1 tetapi secara imunologi tidak aktif. Artinya, secara signifikan gagal merangsang pelepasan TNF dari respon makrofag dibandingkan dengan pelepasan HMGB1 secara pasif selama nekrosis sel. Jawaban penting untuk dikotomi ini terletak dalam senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan oleh sel apoptosis mitokondria yang menekan aktivitas inflamasi HMGB1 dengan membakar sistein posisi 106, residu kritis diposisikan dalam kotak imunostimulan domain kotak B imunostimulan dari protein *full-length*. Mekanisme ini memberikan pemahaman mengapa

apoptosis gagal mengaktifkan respon inflamasi signifikan karena secara eksperimen menghalangi langkah oksidasi HMGB1 (mencegah deaktivasi imunogenik) mengubah peristiwa apoptosis, menjadi peristiwa yang secara imunologis menstimulasi proinflamasi (Harris dkk, 2012).

Sudah diketahui bahwa HMGB1 endogen (berasal dari sel-sel nekrotik) diperlukan untuk menstimulasi pelepasan TNF monosit dan subjek *High Mobility Group Box 1 recombinant* (rHMGB1) untuk kondisi oksidasi ringan secara imunologis menjadi tidak aktif menjelaskan bahwa C 160 penting dalam mekanisme inflamasi molekuler yang dimediasi HMGB1. Dengan demikian, HMGB1 endogen menempati peran fungsional penting sebagai molekul sinyal pemberi informasi ke sel-sel lain bahwa kerusakan atau invasi telah terjadi (Li dkk, 2014; Liu dkk, 2014).

## **6. Respon Inflamasi Seluler dan Reseptor HMGB1**

HMGB1 dikelompokkan sebagai mediator proinflamasi klasik karena:

- a. Pelepasan dari HMGB1 dirangsang oleh cedera dan infeksi
- b. HMBG1 Mengaktifkan sel-sel imuno kompeten untuk menghasilkan TNF- $\alpha$ , IL 1, dan respon proinflamasi lain
- c. Menjadi perantara demam, anoreksia, dan sindrom penyakit in vivo
- d. Aktivasi secara sinergis meningkat dengan adanya agonis TLR eksogen dan sitokin proinflamasi
- e. Secara khusus menjadi target terapi menguntungkan pada inflamasi steril dan sindrom penyakit infeksi yang dihubungkan

peningkatan kadar HMGB1. Ringkasan respon inflamasi seluler HMGB1 dapat dilihat pada tabel dibawah.

**Tabel 2. 2** Aktivitas Biologi HMGB1 Ekstraseluler

<b>Sel-sel Target</b>	<b>Respon Seluler Terhadap HMGB1 (referensi)</b>
Makrofag/ Monosit	Induksi sitokin, kemokin, dan sintesis metalloproteinase, migrasi transendotel monosit
Sel-sel Dendritik	Pematangan dan migrasi kelenjar getah bening, peningkatan imunogenisitas antigen, sekresi mediator proinflamasi
Neutrofil	Aktivasi, kemotaksis
Trombosit	Aktivasi prokoagulan HMGB1 membran permukaan sel
Limfosit T	Proliferasi limfosit T, polarisasi Th1
Limfosit B	Bantuan nuklir rekombinasi VDJ, potensial aksi kompleks HMGB1-DNA-IgG
Sel Epitel	Hiperpermeabilitas menyebabkan disfungsi sawar GIT dan saluran respirasi, efek bacterial
Sel Endotel	Proangiogenik, meningkatkan regulasi adesi molekul
Sel Otot Polos	Migrasi, proliferasi, reorganisasi sitoskeleton
Sel Punca P. Darah	Proliferasi, migrasi transendotelial
Kardiomyosit	Merekrut dan aktivasi sel-sel prekursor untuk perbaikan, efek inotropik (-)
Osteoklas	Migrasi, peningkatan osteoklastogenesis dan sintesis TNF melalui interaksi HMGB1 dengan promotor TNF
Neurons	Perkembangan neurit selama embryogenesis
Astrofit	Aktivasi proinflamasi, pelepasan glutamate
Sel-sel Mikroglial	Aktivasi proinflamasi, pelepasan glutamate
Sel-sel Tumor	Proliferasi, induksi enzim proteolitik untuk invasi, memfasilitasi metastasis

(Dikutip dari: Harris, H. E., Andersson, U. dan Pisetsky, D. S. (2012) "HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease," *Nature Reviews Rheumatology*, 8(4), hal. 195–202.)

Salah satu perbedaan HMGB1 dari sitokin proinflamasi konvensional (misalnya, TNF- $\alpha$  dan IL-1) adalah bahwa HMGB1 memunculkan respon inflamasi seluler dan biologis melalui sinyal transduksi reseptor yang

sebelumnya telah diidentifikasi untuk berinteraksi dengan molekul asing. Tidak seperti TNF dan IL-1, keluarga reseptor membran plasma serumpun secara jelas disebut bahwa HMGB1 berinteraksi dengan beberapa reseptor yang tampaknya tidak berhubungan tetapi sebelumnya telah diidentifikasi kemampuan mereka untuk sinyal aktivasi transduksi dari eksogen (TLR2, TLR4, dan TLR9) dan ligan endogen (RAGE). Para imunologis menduga bahwa secara biokimia kebutuhan fungsional keluarga reseptor sitokin dibatasi pada persiapan terbatas sitokin serumpun yang dikejutkan dengan realitas bahwa HMGB1 khusus memodulasi respons selular melalui reseptor yang dapat diaktifkan dengan eksogen, ligan, benda asing.

Hal ini mengungkapkan bahwa HMGB1 adalah protein yang mampu mengaktifkan rekaman seragam berbagai respon inflamasi terhadap kerusakan infeksi atau steril. Seperti yang dibahas secara rinci di bawah, peran sentral HMGB1 dalam menjembatani besarnya respon inflamasi terhadap sindrom klinis yang terkait dengan cedera steril dan infeksi diungkapkan dengan mengamati hilangnya aktivitas proinflamasi setelah pemberian antagonis HMGB1 dan dengan menghapus HMGB1 atau reseptor melalui teknik gugus genetik (Ueda dan Yoshida, 2010).

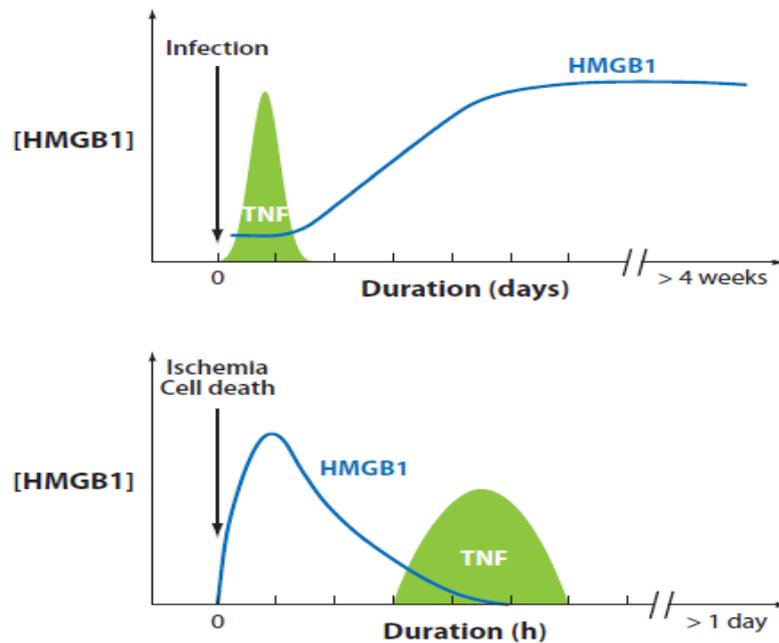
Reseptor pertama yang terlibat sebagai pengikat HMGB1 adalah *receptor for advanced glycation end product* (RAGE), transmembran, permukaan sel, multi ligand anggota keluarga besar imunoglobulin. HMGB1 memberi sinyal melalui RAGE menjadi perantara kemotaksis dan stimulasi

pertumbuhan sel, diferensiasi sel-sel imun, migrasi imun dan sel otot halus, dan meningkatkan regulasi permukaan sel termasuk RAGE dan TLR4. HMGB1 secara fisik berinteraksi dengan RAGE, tetapi interaksi dengan TLR4 diperlukan untuk aktivasi pelepasan HMGB1 dari sitokin makrofag karena makrofag RAGE gugur dan TLR2 mengalahkan makrofag menghasilkan TNF bila terpapar HMGB1, tapi TLR4 tidak mengalahkan makrofag (Ueda dan Yoshida, 2010).

Ikatan HMGB1 pada TLR4-MD2 sebagai ukuran resonansi permukaan plasmon dan sinyal transduser yang merangsang makrofag melepas TNF. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan sistein redoks-sensitif posisi 106, dan substitusi posisi ini mencegah HMGB1 mengikat TLR4. TLR4 adalah reseptor utama HMGB1 ekstraseluler endogen dalam mediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan cedera jaringan. Sinyal ini mengaktifkan *IKK kinase* (IKK) - $\beta$  dan IKK- $\alpha$  (endotoksin aktif hanya IKK- $\beta$ ) dan translokasi nuklir aktif NF- $\kappa$ B. Ada perbedaan signifikan dalam HMGB1- dan endotoksin-dimediasi sinyal karena HMGB1 mengikat TLR4 dengan jauh lebih sedikit dibandingkan dengan afinitas LPS, dan aktivasi pola ekspresi gen berbeda dibandingkan pola ekspresi mediasi endotoksin. HMGB1 dan LPS baik secara signifikan meningkatkan translokasi nuklir NF- $\kappa$ B dan fosforilasi Akt dan p38 MAPK, tetapi LPS menyebabkan lebih tinggi aktivasi NF- $\kappa$ B dan pelepasan TNF dibandingkan dengan HMGB1. Selain itu, induksi Pelepasan TNF oleh HMGB1

menunjukkan profil kinetik bifasik, sedangkan endotoksin induksi tunggal merangsang pelepasan TNF monofasik (Harris dkk, 2012).

Penelitian pada hewan percobaan menunjukkan bahwa kadar HMGB1 meningkat secara signifikan pada cedera iskemia-reperfusi, meningkat dalam waktu 1 jam setelah reperfusi dan masih tetap tinggi sampai 24 jam. Pengobatan tikus *wild type (C3H/HeOuj)* dengan antibodi anti-HMGB1 signifikan melindungi kerusakan hati, tetapi penilaian antibodi gagal melindungi defek TLR4 (C3H/Hej) tikus, juga kurang mengalami kerusakan dibandingkan dengan tipe liar (C3H/Hej) tikus. Penanda atau sinyal HMGB1 melalui TLR4 diperlukan untuk cross-presentasi antigen pada tumor padat yang mengalami radiasi atau kemoterapi. Ekspresi TLR4 tubulus ginjal dari donor ginjal meninggalkan noda HMGB1 positif, secara langsung penanda HMGB1-TLR4 berimplikasi dalam pengembangan radang cangkok ginjal dan cedera steril manusia. Selain itu, jika HMGB1 pada TLR4 dalam fibroblas sinovial manusia dari pasien reumatoid arthritis (RA) dapat terungkap dengan uji kedekatan ligasi, menunjukkan bahwa molekul berinteraksi dalam lingkungan seluler inflamasi (Wang dkk, 2013; Yang dkk, 2013).



**Gambar 2. 4** HMGB1 sebagai pro inflamasi. HMGB1 adalah mediator pro inflamasi cepat pada cedera steril dan mediator lambat pada infeksi. (Dikutip dari: Andersson, U. dan Tracey, K. J. (2011) "HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection," *Annual Review of Immunology*, 29(1), hal. 139–162.)

Masih spekulatif apakah ikatan protein HMGB1 berpartisipasi dalam melepas sitokin dalam patogenesis infeksi dan cedera steril, termasuk TLR2, TLR9, CXCL12, thrombospondin, syndecan, TREM1 dan MAC1. HMGB1 dapat memfasilitasi ambilan DNA, dan bukti terbaru telah menempatkan mekanisme ini dalam konteks inflamasi. Ditetapkan prinsip bahwa HMGB1 memodulasi respon inflamasi terhadap ancaman steril dan infeksi melalui sinyal reseptor TLR4. HMGB1 juga mengikat CD24, membran protein diekspresikan oleh immunosit, pada gilirannya berhubungan dengan Siglec-10 untuk secara selektif menekan translokasi nuklir NF- $\kappa$ B yang disebabkan oleh HMGB1 dan dimediasi aktivasi TLR4,

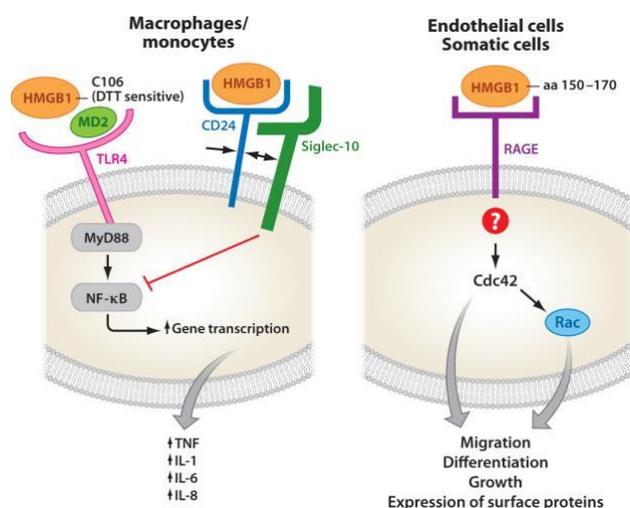
tetapi bukan patogen yang dimediasi aktivasi TLR. Bersama-sama, hasil ini menunjukkan bahwa penanda HMGB1 melalui TLR4, dalam konteks cedera steril atau infeksi, dapat dibedakan dipengaruhi oleh *cross talk* dari penanda HMGB1 melalui *CD24-Siglec-10* (Harris dkk, 2012).

## **7. Jalur HMGB1 terhadap NF- $\kappa$ B**

Reseptor pertama yang terlibat sebagai partner pengikat HMGB1 adalah *receptor for advanced glycation end product* (RAGE), transmembran, permukaan sel, multi ligan anggota kelompok besar immunoglobulin. HMGB1 memberi sinyal melalui RAGE menjadi perantara kemotaksis dan stimulasi pertumbuhan sel, diferensiasi sel-sel imun, migrasi imun dan sel otot halus, dan meningkatkan regulasi permukaan sel termasuk RAGE dan TLR4. HMGB1 secara fisik berinteraksi dengan RAGE, tetapi interaksi dengan TLR4 diperlukan untuk aktivasi pelepasan HMGB1 dari sitokin makrofag karena makrofag RAGE tertekan dan TLR2 menginaktivasi makrofag menghasilkan TNF bila terpapar HMGB1, tapi TLR4 tidak menginaktivasi makrofag (Ueda dan Yoshida, 2010).

Ikatan HMGB1 pada TLR4-MD2 sebagai ukuran resonansi permukaan plasmin dan sinyal transduser yang merangsang makrofag melepas TNF. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan sistein redoks-sensitif posisi 106, dan substitusi posisi ini mencegah HMGB1 mengikat TLR4. TLR4 adalah reseptor utama HMGB1 ekstraseluler endogen dalam mediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan cedera

jaringan. Sinyal ini mengaktifkan IKB kinase (IKK) - $\beta$  dan IKK- $\alpha$  (endotoksin aktif hanya IKK- $\beta$ ) dan translokasi nuklir aktif NF- $\kappa$ B. Ada perbedaan signifikan dalam HMGB1 dan *endotoksin-mediated signalling* karena HMGB1 mengikat TLR4 dengan jauh lebih sedikit dibandingkan dengan afinitas LPS, dan aktivasi pola ekspresi gen berbeda dibandingkan pola ekspresi mediasi endotoksin. HMGB1 dan LPS baik secara signifikan meningkatkan translokasi *nuclear* NF- $\kappa$ B dan fosforilasi Akt dan p38 MAPK, tetapi LPS menyebabkan aktivasi NF- $\kappa$ B lebih tinggi dan pelepasan TNF dibandingkan dengan HMGB1. Selain itu, induksi Pelepasan TNF oleh HMGB1 menunjukkan profil kinetik bifasik, sedangkan endotoksin induksi tunggal merangsang pelepasan TNF monofasik (Harris dkk, 2012).



**Gambar 2. 5** Ikatan HMGB1 dengan TLR4 dan RAGE. Ikatan dengan TLR4 akan mengaktifkan pelepasan sitokin dari makrofag dan monosit (kiri), sedangkan dengan RAGE akan memodulasi fungsi sel tumor dan endotel (kanan). (Dikutip dari: Andersson, U. dan Tracey, K. J. (2011) “*HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection,*” *Annual Review of Immunology*, 29(1), hal. 139–162.)

#### **D. TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs)**

*Toll-like receptors* (TLRs) adalah pola reseptor pengenal dalam mengawali respon kekebalan tubuh bawaan terhadap berbagai produk yang dihasilkan oleh mikroba patogen, *pathogen associated molecular patterns* (PAMPS) dan molekul-molekul endogen yang dilepaskan oleh sel-sel yang mengalami cedera atau mati, *damaged associated molecular patterns* (DAMPS). TLRs ditemukan pada setiap bentuk evolusi kehidupan mulai dari invertebrata hingga mamalia. Toll awalnya diidentifikasi sebagai gen *Drosophila* yang terlibat dalam pembentukan sumbu ventral dan dorsal embriogenesis lalat buah (*fruit fly*), namun diketahui bahwa protein Toll juga memperantai respon antimikroba. Bagian sitoplasma Toll hampir sama dengan bagian sitoplasma reseptor sitokin interleukin (IL-1) sehingga penemuan ini menjadikan Toll mamalia dinamakan *toll-like receptors* (Couture dkk, 2012; Abbas dkk, 2016).

TLRs adalah glikoprotein membran tipe I yang berfungsi sebagai pola pengenal reseptor. Reseptor-reseptor ini menyusun secara lengkap komponen sistem kekebalan bawaan. TLRs banyak mengandung leusin yang kaya sistein di ekstraseluler, pada bagian ekor sitoplasma terdapat *toll interleukin-1 receptor* (TIR) yang penting untuk sinyal, dan berikatan dengan ligan. TIR yang sama juga ditemukan pada sitoplasma reseptor sitokin IL-1 dan IL-8 (Abbas dkk, 2016).

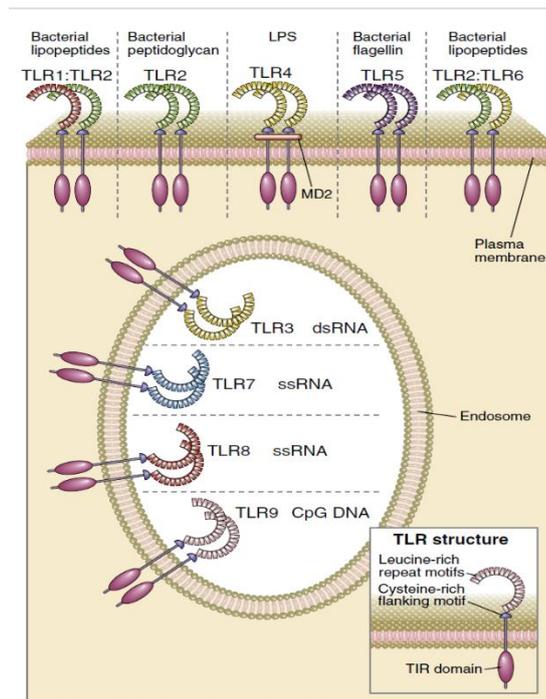
## 1. Klasifikasi TLRs

TLRs dapat diklasifikasikan menjadi TLRs ekstraseluler dan intraseluler. TLRs mamalia terdiri dari 13 jenis sedangkan TLRs manusia terdiri dari 9 jenis. TLRs ekstraseluler ditemukan di permukaan seluler dan membran plasma terdiri dari TLRs 1, 2, 4, 5, dan 6. TLRs ekstraseluler mampu mengenal berbagai komponen molekul yang dihasilkan mikroba yang berasal dari lingkungan seluler. TLRs intraseluler ditemukan di retikulum endoplasma dan endosome terdiri dari TLRs 3, 7, 8, dan 9. Fungsi utama TLRs intraseluler adalah untuk mendeteksi asam nukleat yang dihasilkan oleh virus meskipun juga dapat mengenal mikroba lainnya (Blasius dan Beutler, 2010).

TLRs mamalia terlibat dalam merespon berbagai macam molekul yang dihasilkan oleh mikroba patogen tapi bukan oleh sel-sel mamalia sehat. Ligan yang berbeda-beda tersebut dikenal oleh berbagai macam struktur TLRs dan termasuk semua jenis produk-produk yang dilepas oleh mikroorganisme, produk ini disebut *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Contoh produk bakteri ligan pengikat TLRs adalah *lipopolysaccharide* (LPS) untuk bakteri negatif gram, asam lipoikoid untuk bakteri positif gram dan flagelin suatu komponen protein flagella dari bakteri motil. Contoh asam nukleat yang merupakan ligan TLRs adalah RNA rantai ganda yang membentuk genom beberapa virus yang dihasilkan selama siklus kehidupan, namun bukan yang diproduksi sel-sel eukariotik. RNA rantai tunggal dibedakan dari transkrip RNA rantai tunggal sitoplasma

seluler karena berlokasi di endosome dan banyak mengandung guanosisin, uridin, dinukleotida *cytosine-guanine-rich oligonucleotide* (CpG) tidak bermielin.

TLRs mamalia juga terlibat dalam merespon berbagai endogen yang menggambarkan kerusakan sel, molekul-molekul endogen ini disebut *Damage-Associated Molecular patterns* (DAMPs). Contoh molekul inang yang melibatkan molekul TLRs adalah *heat shock protein* (HSP) suatu pendorong untuk menanggapi berbagai stres dan *high-mobility group box 1* (HMGB 1) suatu pengikat protein DNA berlimpah yang terlibat dalam transkripsi dan perbaikan DNA. HSP dan HMGB1 umumnya terdapat di intraseluler tetapi bila sel mengalami trauma atau rusak akan dilepas ke ekstraseluler, dari lokasi ekstraseluler mereka akan mengaktifkan sinyal TLR 2 dan TLR 4 sel-sel makrofag, dendrit, dan sel-sel imunologis lainnya (Couture dkk, 2012; Abbas dkk, 2016).



**Gambar 2. 6** Struktur, Lokasi dan spesifikasi TLRs mamalia.  
 (Dikutip dari Abbas, A., Lichtman, A. H. dan Pillai, S. (2016) *Cellular and Molecular IMMUNOLOGY*. 8 ed, hal. 51-85. Philadelphia: Elsevier Saunders.)

## 2. Jalur dan Sinyal TLRs

Jalur dan sinyal ini diinisiasi oleh ikatan ligan dan TLRs pada permukaan sel atau pada retikulum endoplasma atau endosome menjadikan dimerisasi protein TLRs. Dimerisasi ligan TLRs diprediksi membawa TIR dari ekor sitoplasma masing-masing protein yang berdekatan, diikuti dengan protein adaptor yang mengandung TIR memfasilitasi perekrutan dan pengaktifan berbagai protein kinase yang kemudian mengaktifkan faktor-faktor transkripsi yang berbeda.

Faktor transkripsi utama yang diaktifkan oleh jalur sinyal TLRs adalah *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), *activation protein 1* (AP-1), *interferon response factor 3* (IRF3), dan *IRF7*. NF- $\kappa$ B dan AP-1 merangsang ekspresi gen banyak molekul yang dibutuhkan untuk respon inflamasi termasuk sitokin inflamasi seperti TNF dan IL-1, kemokin seperti CCL2 dan CXCL8, dan molekul-molekul adesi endothelial seperti E-selektin. IRF3 dan IRF7 mempromosikan produksi interferon tipe I (IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ ) yang penting untuk merespon sistem kekebalan tubuh bawaan antivirus (Blasius dan Beutler, 2010; Furlani dkk, 2012).

Perbedaan kombinasi-kombinasi adaptor dan sinyal intermedia yang digunakan oleh TLRs yang berbeda pula, bertanggung jawab atas efek-efek yang umum timbul dan unik dari TLRs. TLRs permukaan sel mengikat adaptor MyD88 mengaktifkan NF- $\kappa$ B, dan sinyal TLRs adaptor yang digunakan disebut TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) mengaktifkan IRF3. Semua TLRs kecuali sinyal TLR3 melalui MyD88 yang mampu mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan menyebabkan respon inflamasi. Sinyal TLR3 melalui TRIF kemudian mengaktifkan IRF3 dan mengekspresikan interferon tipe I. Sinyal TLR4 melalui MyD88 dan TRIF dan keduanya mampu menginduksi respon (Couture dkk, 2012). TLR7 dan TLR9 sangat banyak ditemukan di dalam plasma sitoplasma sel-sel dendrit, sinyal MyD88 dependen, jalur bebas TRIF yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan IRFs. TLR7 dan TLR9 seperti TLR4 menyebabkan respon inflamasi dan antivirus.

## **E. NUCLEAR FACTOR KAPPA- $\beta$ (NF- $\kappa$ B)**

*Nuclear factor kappa- $\beta$*  (NF- $\kappa$ B) terdeteksi dalam berbagai jenis sel yang mengekspresikan sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, molekul adhesi sel, dan beberapa protein fase akut dalam kesehatan dan di berbagai kondisi penyakit (Park dan Hong, 2016). NF- $\kappa$ B diaktifkan oleh berbagai macam rangsangan seperti sitokin, radikal bebas oksidan, partikel inhalasi, iradiasi ultraviolet, dan produk bakteri atau virus. Aktivasi yang tidak tepat dari NF- $\kappa$ B telah dikaitkan dengan peristiwa inflamasi yang terkait dengan arthritis autoimun, asma, syok septik, fibrosis paru, glomerulonefritis, aterosklerosis, dan AIDS. Sebaliknya, penghambatan NF- $\kappa$ B yang lengkap dan persisten telah dikaitkan langsung dengan apoptosis, perkembangan sel imun yang tidak tepat, dan keterlambatan pertumbuhan sel (Park dan Hong, 2016).

NFKB1 atau NFKB2 terikat ke REL, RELA, atau RELB untuk membentuk kompleks NF- $\kappa$ B. Kompleks NF- $\kappa$ B dihambat oleh protein I $\kappa$ B (NFKBIA atau NFKBIB), yang menonaktifkan NF- $\kappa$ B dengan memerangkapnya dalam sitoplasma. Fosforilasi residu serin pada protein I $\kappa$ B oleh kinase (IKBKA atau IKBKB) menandai mereka untuk dihancurkan melalui jalur ubiquitinasi, sehingga memungkinkan aktivasi kompleks NF- $\kappa$ B. Kompleks NF- $\kappa$ B teraktivasi mentranslokasi ke dalam nukleus dan mengikat DNA pada motif pengikat kappa- $\beta$  seperti 5-prime GGGRNNYYCC 3-prime atau 5-prime HGGARNYYCC 3-prime (di mana H

adalah A, C, atau T; R adalah A atau G purin, dan Y adalah C atau T pirimidin) (Sun, 2011).

## 1. Kloning dan Ekspresi

NFKB1 pertama kali digambarkan saat berinteraksi dengan urutan cis-acting 11-bp dalam penambah rantai ringan imunoglobulin. Kompleks NF- $\kappa$ B memiliki 2 subunit pengikat DNA alternatif, p105 dan p52 / p100 (Sun, 2011) diisolasi dan diurutkan klon cDNA untuk subunit pengikat DNA faktor nuklir kappa-B (NF- $\kappa$ B). Kerangka pembacaan terbuka yang dikodekan sekitar 105 kD mengandungi pada N-terminal setengah dari semua 6 urutan peptida tryptic, menunjukkan bahwa protein 51-kD NF- $\kappa$ B diproses dari prekursor 105-kD. Wilayah ini menunjukkan homologi tinggi ke domain yang digunakan bersama oleh gen 'dorsal' *Drosophila* dan produk onkogen REL unggas dan mamalia. Kadar 3,8-kb mRNA sangat meningkat setelah stimulasi dengan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) atau phorbol ester.

## 2. Struktur Gen

(Chen dan Chen, 2013) menunjukkan bahwa NF- $\kappa$ B memiliki 24 ekson yang mencakup 156 kb.

### 3. NF- $\kappa$ B Sebagai Mediator Dari Gen Induksi ProInflamasi

Peradangan adalah respons pelindung dari inang terhadap infeksi dan kerusakan jaringan, ditandai dengan serangkaian reaksi, termasuk vasodilatasi dan rekrutmen sel imun dan protein plasma ke tempat infeksi atau cedera jaringan (Zhang dan Sun, 2015). Biasanya, peradangan bermanfaat bagi host dan dapat diatasi tepat waktu, namun respons inflamasi yang dideregulasi dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang berlebihan atau berlangsung lama, dan berkontribusi pada pengembangan penyakit radang akut atau kronis. NF- $\kappa$ B adalah pusat mediator induksi gen pro-inflamasi dan fungsi dalam baik sel imun bawaan dan adaptif (Liu dkk, 2017).

### 4. Kelompok Protein dari NF- $\kappa$ B

Kelompok faktor transkripsi dari NF- $\kappa$ B terdiri dari lima anggota p50 (NF $\kappa$ B1), p52 (NF $\kappa$ B2), RelA (p65), RelB, dan c-Rel (Huxford, Hoffmann dan Ghosh, 2011). Semua subunit NF- $\kappa$ B berbagi urutan terminal-N yang dikonservasi secara struktural yang mencakup 300 residu asam amino yang disebut *Rel homology domain* (RHD) ( Huxford dkk, 2011).

RHD bertanggung jawab untuk pengikatan DNA, dimerisasi, dan translokasi nuklear dari subunit NF- $\kappa$ B. RHD dapat dibagi menjadi tiga komponen struktural *N-terminal domain* (NTD), *dimerization domain* (DD), dan polipeptida *nuclear localization sequence* (NLS) semuanya memediasi berbagai aktifitas RHD dan pensinyalan NF- $\kappa$ B berikutnya (Huxford dkk,

2011). Pada akhir C-terminal dari RHD, lipatan DD sehingga dua lembaran  $\beta$  antiparalel membentuk struktur *immunoglobulin-like (Ig-like) structure*; salah satu lembar membentuk antar bagian untuk pembentukan subunit dimer sementara yang lain memediasi kontak DNA nonspesifik.

Demikian pula, NTD yang mengandung lipatan seperti Ig yang mengikat kedua basa DNA baik secara spesifik maupun *backbone* nonspesifik. Subunit RelA, RelB, dan c-Rel diproduksi sebagai protein matur sedangkan subunit p50 dihasilkan dari prekursor inaktif p105 dan p52 dari prekursor p100 melalui pemrosesan post translasional dalam proteasome (Lin, Pajarinen, Lu, Nabeshima, L. Cordova dkk, 2017; Banoth dkk, 2015). Produksi dari p50 bersifat konstitutif sementara produksi dari p52 diatur dan diinduksi pada aktivasi jalur NF- $\kappa$ B nonkanonik. Selain itu, protein NF- $\kappa$ B p105 dan protein p100 dibedakan dari protein Rel oleh domain *I $\kappa$ B-like inhibitory* yang berperan dalam pengikatan protein penghambat I $\kappa$ B.

Dalam keadaan istirahat, subunit NF- $\kappa$ B berada di sitoplasma sel yang terikat secara kovalen oleh sekelompok protein I $\kappa$ B yang mempertahankan subunit NF- $\kappa$ B dalam bentuk tidak aktif (Huxford dkk, 2011). Mekanisme yang mendasari efek penghambatan dari ikatan I $\kappa$ B telah dijelaskan dengan menentukan struktur kristal sinar-X dari I $\kappa$ B yang terikat pada p50: RelA dimer. Diperkirakan bahwa interaksi elektrostatik jarak jauh antara wilayah C-terminal regio PEST dari I $\kappa$ B  $\alpha$  dan NTD dari RelA menyebabkan perubahan konformasi yang tidak memungkinkan RelA

untuk mengikat DNA. Selain itu, I $\kappa$ B  $\alpha$  menyembunyikan peptida NLS dari p65, mencegahnya lokalisasi nuklear.

Degradasi protein penghambat ini diatur oleh kelompok dari kompleks kinase I $\kappa$ B: IKK1 (IKK $\alpha$ ), IKK2 (IKK $\beta$ ), dan IKK $\gamma$  (NEMO) (Chen dan Chen, 2013). Setelah diaktifkan oleh kaskade pensinyalan hulu, IKKs memfosforilasi penghambatan protein I $\kappa$ B yang mengarah ke ubiquitinasi mereka oleh *E3 ubiquitin-protein ligase* diikuti oleh degradasi dalam 26S proteasome. Setelah dirilis, subunit NF- $\kappa$ B kembali ke nukleus sebagai hetero atau homodimer dan mengatur transkripsi dari banyak gen dengan mengikat promotor gen dikenal sebagai situs B; saat ini lebih dari 500 gen target milik NF- $\kappa$ B telah diakui (Boston University). Dimer yang mengikat DNA melalui 10 loop fleksibel memanjang dari lipatan seperti Ig; mekanisme ini tidak seperti kebanyakan faktor transkripsi, yang menggunakan heliks alfa. Di luar skema pengikatan DNA yang unik ini, Dimer NF- $\kappa$ B mengatur sepanjang alur utama untuk putaran penuh untuk menciptakan struktur "kupu-kupu".

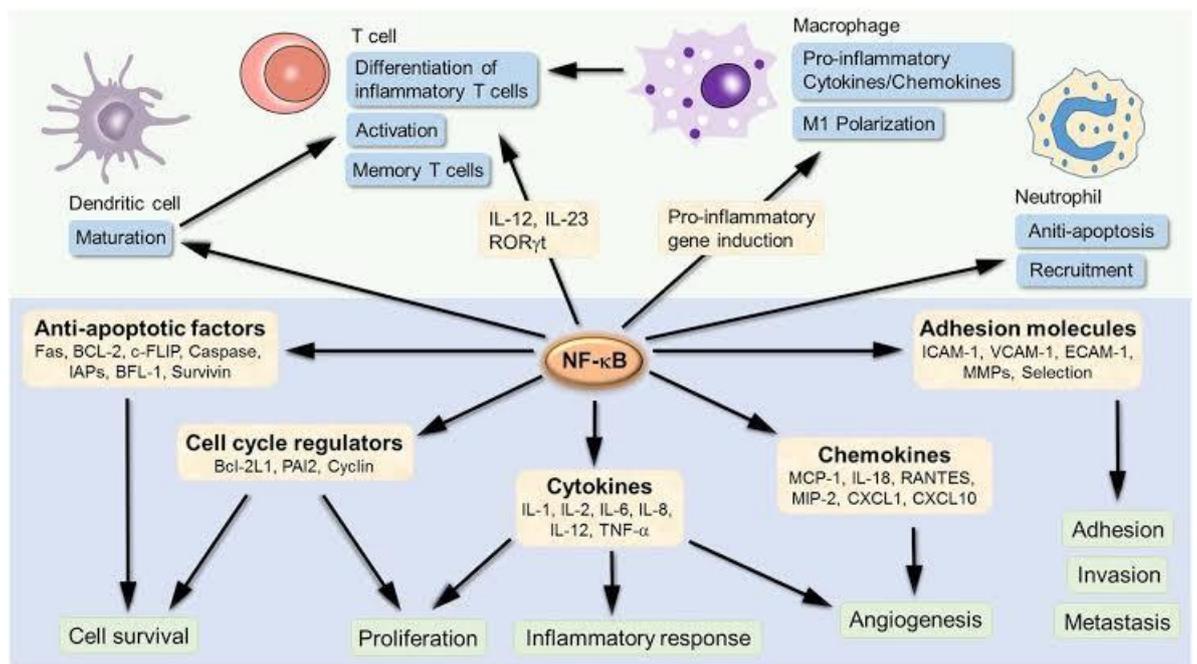
Bergantung pada komposisi dimer dari NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B dapat menginduksi atau menghambat transkripsi gen; kompleks yang mengandung fungsi RelA, RelB, dan c-Rel sebagai transkripsi promotor sementara p50 dan p52 mengurangi kebutuhan aktivasi domain transkripsi C-terminal yang diperlukan untuk menginduksi pembacaan gen dan dapat mengaktifkan transkripsi hanya ketika dipasangkan dengan NF- $\kappa$ B lainnya anggota keluarga (Hayden dan Ghosh, 2011); penurunan fungsi domain

aktivasi homodimer p50 sebagai supresi transkripsi. Jalur pensinyalan ini mengarah pada degradasi I $\kappa$ B dan pelepasan subunit NF- $\kappa$ B selanjutnya yang dikenal sebagai jalur kanonikal (klasik) NF- $\kappa$ B, sedangkan jalur kulminasi pada pembelahan dari p100 yang mengaktifkan p52 dikenal sebagai jalur nonkanonikal NF- $\kappa$ B (alternatif).

## 5. Aktifasi Dari NF- $\kappa$ B Dalam Inflamasi.

NF- $\kappa$ B merupakan karakteristik faktor transkripsi terbaik yang meregulasi inflamasi dan reaksi imunitas adaptif dan imunitas bawaan (Hayden dan Ghosh, 2011). Respon inflamasi ditandai dengan aktivasi koordinat berbagai jalur pensinyalan yang mengatur ekspresi pro dan mediator anti-inflamasi di sel jaringan tempat tinggal dan leukosit yang direkrut dari darah (Lin, Pajarinen, Lu, Nabeshima, L. A. Cordova dkk, 2017). Saat ini, sebagian besar pengetahuan kita tentang pensinyalan dalam peradangan diperoleh dari studi anggota kelompok reseptor IL-1 dan TNF dan *Toll Like Receptor* (TLRs) yang mengenali pola mikroba, yang termasuk dalam keluarga IL-1R. IL-1 dan TNF- $\alpha$  mewakili pola dasar sitokin proinflamasi yang dirilis dengan cepat pada cedera jaringan atau infeksi. TLR mengenali pola molekuler mikroba, karena nya dikenal sebagai *pattern recognition receptor* (PRRs). TLRs mewakili *germline encoded nonself* sistem pengenalan yang dirancang untuk memicu peradangan (Banoth dkk, 2015). Namun, ada beberapa acuan bahwa ligan endogen dapat memicu TLR selama cedera jaringan dan pada kondisi penyakit tertentu, yang

mungkin berperan mempromosikan peradangan tanpa adanya infeksi. Meskipun secara struktural berbeda, reseptor ini menggunakan mekanisme sinyal transduksi yang sama yang mencakup aktivasi I $\kappa$ B kinase (IKK) dan NF- $\kappa$ B.



**Gambar 2. 7** Target gen NF- $\kappa$ B yang terlibat dalam pengembangan dan perkembangan Inflamasi. (dikutip dari: Liu, T. *et al.* (2017) “NF- $\kappa$ B signaling in inflammation,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), hal. 17023)

## 6. Jalur Pensinyalan NF- $\kappa$ B

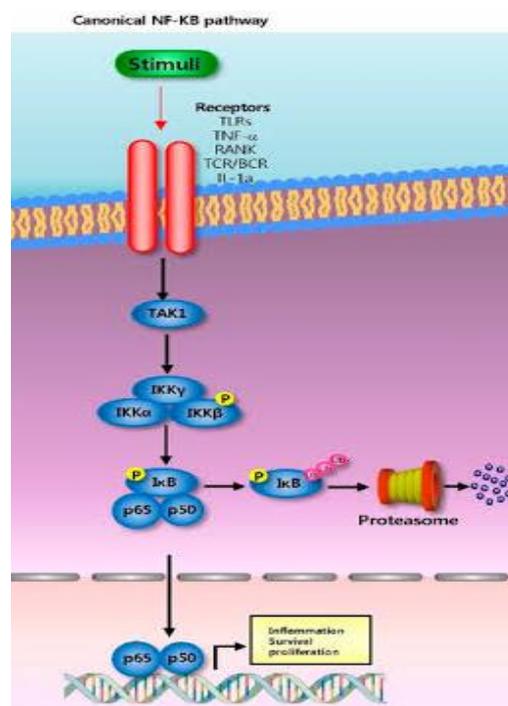
Dimer NF- $\kappa$ B yang diasingkan dalam sitoplasma oleh kelompok inhibitor, yang disebut I $\kappa$ Bs (Inhibitor dari  $\kappa$ B), merupakan protein yang mengandung banyak salinan dari urutan yang disebut sebagai pengulangan ankyrin, dalam sel yang tidak distimulasi. Protein I $\kappa$ B menutupi *nuclear localization signals* (NLS) dari protein NF- $\kappa$ B dan menjaga mereka diasingkan dalam keadaan tidak aktif dalam sitoplasma berdasarkan

pengulangan ankyrin domain (Tilstra dkk, 2011). Karena kehadiran ankyrin berulang di bagian C-terminal p105 dan p100 juga berfungsi sebagai protein I $\kappa$ B. Sebagian dari C-terminal yang merupakan bagian dari p100, sering disebut sebagai I $\kappa$ B $\delta$ , yang juga berfungsi sebagai inhibitor. Degradasi I $\kappa$ B $\delta$  sebagai respons terhadap rangsangan perkembangan, seperti yang ditransduksi melalui LT $\beta$ R, mempotensiasi aktivasi dimer NF- $\kappa$ B dalam NIK yang bergantung pada jalur non-kanonikal.

## 7. Jalur Kanonikal NF- $\kappa$ B

Jalur kanonikal NF- $\kappa$ B berasal dari NF- $\kappa$ B yang diaktifkan setelah degradasi I $\kappa$ B $\alpha$ , yang menghasilkan translokasi nuklear berbagai kompleks NF- $\kappa$ B, terutama dimer p50 / p65. Degradasi dari I $\kappa$ B $\alpha$  dimediasi oleh fosforilasi melalui I $\kappa$ B kinase (IKK), sebuah kompleks trimeric yang terdiri dari dua subunit katalitik, IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$ , dan subunit pengatur, IKK $\gamma$  (juga disebut *NF- $\kappa$ B essential modulator* atau NEMO). Ketika diaktifkan oleh sinyal, kinase I $\kappa$ B memfosforilasi dua residu serin yang terletak di domain pengaturan I $\kappa$ B. Ketika fosforilasi pada berbagai serines ini (contoh serines 32 dan 36 dalam I $\kappa$ B $\alpha$  manusia), molekul inhibitor I $\kappa$ B diproses oleh ubiquitinasi, yang kemudian menyebabkan mereka terdegradasi oleh struktur sel yang disebut proteasome. Dengan degradasi I $\kappa$ B, kompleks NF- $\kappa$ B kemudian masuk ke dalam nukleus di mana ia dapat 'menghidupkan' ekspresi dari beberapa gen yang memiliki situs pengikatan DNA untuk NF- $\kappa$ B (Shih dkk, 2011)

Aktivasi gen-gen ini oleh NF- $\kappa$ B kemudian mengarah pada respons fisiologis yang diberikan misalnya, peradangan atau respon kekebalan tubuh, respon kelangsungan hidup sel, atau proliferasi sel. NF- $\kappa$ B mengaktifasi ekspresi dari reseptor nya tersendiri I $\kappa$ B $\alpha$ . Sintesis terbaru I $\kappa$ B $\alpha$  kemudian menghambat kembali NF- $\kappa$ B dan membentuk loop umpan balik otomatis, yang menghasilkan tingkat aktivitas NF- $\kappa$ B yang beresilasi. Bukti genetik menunjukkan bahwa jalur NF- $\kappa$ B ini mengatur fungsi biologis penting, seperti organogenesis limfoid, kelangsungan hidup sel-B dan pematangan, aktivasi sel dendritik, dan metabolisme tulang (Park MH dkk, 2016).



**Gambar 2. 8** Jalur Kanonikal NF- $\kappa$ B.

(dikutip dari: Park, M. dan Hong, J. (2016) "Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches," *Cells*, 5(2), hal. 15)

## 8. Aktivator Dan Target Dari Jalur Kanonikal

Jalur pensinyalan kanonikal NF- $\kappa$ B terutama terlibat dalam identifikasi yang disebabkan oleh bahaya untuk kerusakan jaringan atau infeksi, dan diikuti oleh inisiasi dan perkembangan yang cepat dari suatu reaksi inflamasi dan fungsi antimikroba (Huxford dkk, 2011; Lin dkk, 2014). Dalam konteks kekebalan bawaan, jalur diaktifkan oleh sinyal yang berasal dari dua kelompok besar reseptor; reseptor untuk sitokin proinflamasi dan *pattern recognition receptors* (PRRs) untuk berbagai molekul sinyal bahaya (Kawai dan Akira, 2010; Hayden dan Ghosh, 2014). Sinyal hilir dari reseptor ini berkumpul untuk mengaktifkan kompleks kinase yang dibentuk oleh IKK1, IKK2, dan IKK $\gamma$ , dengan IKK2 memainkan peran kunci, yang mengarah ke pelepasan dan translokasi inti terutama dimer p50-RelA dan p50-cRel (Hayden dan Ghosh, 2011). Faktor-faktor ini mendorong transkripsi proinflamasi multiple sitokin, prostaglandin, kemokin, molekul adhesi endotel dan leukosit sebagai serta proteinase yang mengarah ke rekrutmen dan aktivasi sel inflamasi lebih lanjut, terutama neutrofil dan makrofag. Molekul efektor antimikroba, seperti *defensing* dan oksigen reaktif dan spesies nitrogen, juga diproduksi dan mesin penyajian antigen diinduksi untuk aktivasi selanjutnya dari sistem imun adaptif. Sebagai tambahan untuk transkripsi sinyal proinflamasi, sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan IL-1rA serta beberapa inhibitor jalur NF- $\kappa$ B, misalnya, protein I $\kappa$ B, diproduksi sehingga membatasi reaksi inflamasi dengan cara loop umpan balik autokrin (Yilmaz dkk, 2014).

Sitokin proinflamasi termasuk TNF- $\alpha$  dan IL-1 merupakan induser yang paling terkenal dan juga target jalur kanonikal NF-k $\beta$  (Hayden dan Ghosh, 2014). Pola dasar sitokin proinflamasi ini banyak diproduksi selama reaksi inflamasi dan memainkan peran kunci dalam beberapa kondisi inflamasi kronis. Mengikat sitokin ini ke reseptor *TNF receptor 1* (TNFR1, diekspresikan secara luas) dan TNF receptor 2 (TNFR2, diekspresikan pada sel imun), dan reseptor IL-1 tipe I (IL-1R1) mengaktifkan pensinyalan jalur NF-k $\beta$  tetapi juga jalur MAP kinase/AP-1 memperkuat reaksi peradangan.

Sel reseptor kedua yang mengaktifkan jalur kanonikal NF-k $\beta$  adalah PRRs yang menghantarkan sinyal bahaya yang berasal dari kerusakan jaringan dan menyerang patogen. Kelompok PRR pertama yang diakui dan paling terkenal adalah TLRs (Kawai dan Akira, 2010). Serangkaian reseptor ini mengenali berbagai struktur pengulangan molekuler yang dilindungi dengan baik yang diekspresikan pada berbagai patogen; yang paling terkenal contohnya termasuk TLR2 ligan *lipoteichoic acid* (LTA) dan TLR4 ligan *lipopolysaccharide* (LPS) yang keduanya merupakan komponen struktural mendasar dari dinding sel bakteri Gram positif atau Gram negatif. TLR juga mengenali virus yang dikonservasi (mis. RNA untai tunggal dan ganda, dikenali oleh TLR3, TLR7, dan TLR8) dan jamur (mis. zymosan, dikenali oleh TLR2) struktur. Sebagai tambahan *pathogen derived molecules* atau PAMPs, telah disarankan bahwa beberapa TLRs mengenali ligan endogen secara kolektif dikenal sebagai *alarmins*. Keluarga lain dari

PPRs, termasuk NLRs dan RLRs, mengaktifkan jalur kanonikal NF- $\kappa$ B dan diperantarai produksi IRF3 interferon tipe 1 (Kawai dan Akira, 2010, 2011). Tidak seperti TLR yang dibatasi untuk membran sel dan endosom, NLRs dan RLRs terletak pada sitoplasma sel ditempatkan secara optimal untuk mengenali struktur virus dan melengkapi mesin pengindraan sinyal bahaya pada sel.

## 9. Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme penting untuk mencegah peradangan yang berkepanjangan: Apoptosis neutrophil selama peradangan akut dan *activation induced cell death* (AICD) dari antigen spesifik sel T merupakan mekanisme penting yang membatasi peradangan dan respon imun. Seperti yang dijelaskan sebelumnya, NF- $\kappa$ B memiliki peran proapoptosis dalam neutrofil selama peradangan, yang dapat mewakili mekanisme anti-inflamasi yang penting untuk NF- $\kappa$ B selama peradangan akut. Namun, NF- $\kappa$ B juga telah terbukti sebagai inhibitor penting dari patogen yang menginduksi apoptosis pada makrofag, setidaknya secara *in vitro* (Varfolomeev, 2012). Dalam konteks ini, NF- $\kappa$ B mungkin memiliki peran proinflamasi dengan memungkinkan aktivasi makrofag yang lebih panjang. Hal ini akan meningkatkan resistensi bawaan terhadap infeksi dan juga memblokir patogen yang menginduksi inflamasi selama infeksi. Studi menunjukkan bahwa penghambatan Aktivasi NF- $\kappa$ B menurunkan ekspresi ligan Fas (CD95) pada sel T, yang diperlukan untuk AICD.

Eksresi berlebihan dari NF- $\kappa$ B endogen menghambat I $\kappa$ B $\alpha$ , terutama dalam sel T, juga memicu peran proapoptosis untuk NF- $\kappa$ B dalam timosit positif ganda. Studi-studi ini berlawanan dengan peran antiapoptotik NF- $\kappa$ B dalam menginduksi ekspresi Bcl-xL, TRAF1, TRAF2, c-IAP1, dan cIAP2. IKK $\beta$  juga terbukti menghambat apoptosis sel-T dalam percobaan radiasi chimera menggunakan sel hati embrio janin dari embrio *knockout* IKK $\beta$  (Varfolomeev, 2012). Studi menunjukkan keterlibatan NF- $\kappa$ B dalam pro- dan fungsi antiapoptotik dalam sel T. Penghambatan NF- $\kappa$ B menurunkan induksi FasL dan apoptosis pada sel T tetapi meningkatkan apoptosis yang dimediasi glukokortikoid. Glukokortikoid diproduksi di timus dan berfungsi untuk menginduksi apoptosis timus selama seleksi positif. Namun, Fas dan Interaksi FasL penting dalam AICD dan delesi sel T perifer. Data ini menunjukkan bahwa NF- $\kappa$ B menghambat apoptosis yang dimediasi glukokortikoid dan kelangsungan hidup selama seleksi positif.

Di sisi lain, NF- $\kappa$ B memiliki peran berbeda pada sel T perifer yang matur, merangsang apoptosis dengan meningkatkan ekspresi FasL, yang mungkin berkaitan dengan terminasi respon dari sel-T. FasL pada tikus *knockout* memberikan sebuah karakteristik model yang baik dari penyakit autoimun dikarenakan hiperaktivasi dari autoreaktif limfosit, menunjukkan pentingnya jalur ini dalam mengeliminasi sel-sel yang berpotensi patologis. Beberapa studi menyatakan bahwa aktivasi NF- $\kappa$ B juga mempunyai peran yang kontras dalam garis keturunan sel yang sama, tergantung pada konteks fisiologis.

## F. TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ )

*Tumor necrosis factor* (TNF) adalah sitokin proinflamasi multifungsi yang disekresikan terutama oleh monosit atau makrofag yang memiliki efek pada metabolisme lipid, koagulasi, resistensi insulin, dan fungsi endotel (Chu, 2013). TNF awalnya diidentifikasi dalam serum tikus setelah injeksi dengan *Mycobacterium bovis* strain *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) dan endotoksin. Serum dari hewan tersebut adalah sitotoksik atau sitostatik ke sejumlah garis sel tikus dan manusia yang ditransformasikan dan menghasilkan nekrosis hemoragik dan dalam beberapa kasus regresi lengkap tumor transplantasi tertentu pada tikus.

*Tumor necrosis factor* (TNF, juga dikenal sebagai TNF $\alpha$ ) diidentifikasi pada tahun 1975 sebagai glikoprotein yang diinduksi endotoksin, yang menyebabkan nekrosis perdarahan sarco-mas yang telah ditransplantasikan ke tikus. Faktor nekrosis human tumour telah dikloning pada tahun 1985, dan TNF rekombinan ditunjukkan untuk menginduksi nekrosis hemoragik dari sarkoma yang diinduksi metilcholanthrene yang ditransplantasikan pada tikus *syngeneic*. TNF terlibat dalam beragam kondisi inflamasi, infeksi dan kondisi keganasan, dan pentingnya TNF dalam inflamasi telah diperhatikan oleh keberhasilan antibodi anti-TNF atau pemberian dari *soluble TNF receptor* (TNFR) dalam mengendalikan aktivitas penyakit dalam rheumatoid arthritis dan kondisi peradangan lainnya (Chu, 2013)

## 1. Struktur Gen

Gen TNFA dan LTA memiliki struktur yang serupa; masing-masing bentang sekitar 3 kb dan berisi 4 ekson. Hanya ekson terakhir dari gen-gen ini, yang mengkode lebih dari 80% protein yang dikeluarkan, secara signifikan homolog (56%) (Chu, 2013).

## 2. Produksi Dari TNF

TNF diproduksi terutama oleh makrofag teraktivasi dan limfosit T sebagai protein 26 kDa, pro-TNF, yang diekspresikan pada plasma membran, di mana dapat dibelah dalam domain ekstraseluler oleh matriks metaloproteinase, yang menghasilkan pelepasan *soluble* 17 kDa dengan bentuk larut. Kedua membran terkait dan *soluble* TNFs aktif dalam bentuk trimeriknya, dan dua bentuk TNF mungkin memiliki aktivitas biologis yang berbeda. *TNF $\alpha$  converting enzyme* (TACE, juga dikenal sebagai ADAM-17) melepaskan mediasi TNF dari permukaan sel (Pozniak, White dan Khalili, 2014), tetapi terlibat dalam memproses beberapa membran sel yang terhubung dengan protein, termasuk reseptor TNF, yang dilepaskan oleh tindakannya untuk menghasilkan larut yang dapat menetralkan kerja dari TNF. TACE oleh karena nya dapat sebagai pro atau anti-inflamasi, tergantung pada apakah bertindak sebagai efektor (misalnya makrofag) atau target sel (misalnya endotel), masing-masing melepaskan ligan atau reseptor.

TNF biasanya tidak dapat dideteksi pada individu yang sehat, tetapi peningkatan kadar serum dan jaringan ditemukan pada kondisi inflamasi,

infeksi dan level serum berkorelasi dengan keparahan infeksi (Wallach, 2016). Walaupun sel-sel dari garis keturunan monosit / makrofag adalah sumber utama TNF dalam penyakit inflamasi, berbagai macam sel dapat menghasilkan TNF, termasuk sel mast, limfosit T dan B, *Natural killer Cell* (NK), neutrofil, sel-sel endotel, sel otot polos jantung, fibroblas dan osteoklas.

### 3. Transduksi Sinyal TNF

Jalur transduksi sinyal TNF sangat rumit dan masih belum sepenuhnya dipahami. Regulasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah komponen kunci dari transduksi sinyal TNF, tetapi pemetaan fisik skala besar dalam kombinasi dengan hilangnya fungsi analisis menggunakan RNA interferensi yang baru-baru ini mengidentifikasi 221 asosiasi molekul dan 80 interaksi yang sebelumnya tidak diketahui yang terlibat dalam modulasi dari jalur TNF- NF- $\kappa$ B saja (Wallach, 2016).

Semua respons yang diketahui terhadap TNF dipicu oleh pengikatan ke salah satu dari dua reseptor yang berbeda, yang ditunjuk TNFR1 (juga dikenal sebagai TNFRSF1A, CD120a, p55) dan TNFR2 (juga dikenal sebagai TNFRSF1B, CD120b, p75), yang secara berbeda diatur pada berbagai jenis tipe sel dalam jaringan normal dan berpenyakit. Ikatan ligan domain ekstraseluler dari reseptor TNF mengandung subdomain kaya sistein, karakteristik anggota kelompok dari *nerve growth factor / TNF receptor gene family*. Sebaliknya, domain intraseluler dari dua reseptor menunjukkan tidak ada urutan homologi dan tanpa aktivitas enzim intrinsik,

dan aktivasi jalur sinyal transduksi yang diaktifkan oleh rekrutmen dari protein sitosol melalui interaksi domain protein-protein spesifik. Kemampuan TNFR1 dan TNFR2 untuk berinteraksi dengan kedua molekul yang identik dan tidak terkait dapat menjelaskan pembagian dan berbagai fungsi mereka. Berdasarkan penelitian kultur sel dan studi dengan tikus *knockout* reseptor, baik pro-inflamasi dan jalur kematian sel yang diprogram yang diaktifkan oleh TNF, dan terkait dengan cedera jaringan, dimediasi dengan mediasi melalui TNFR1. Konsekuensi pensinyalan TNFR2 kurang dikarakterisasi dengan baik, tetapi TNFR2 telah terbukti memediasi sinyal yang mempromosikan perbaikan jaringan dan angiogenesis (Chu, 2013).

Sinyal TNFR1 dengan perekrutan dari *TNFR associated death domain protein* (TRADD). TNFR1 adalah protein transmembran tipe I, yang berada dalam sel istirahat sebagian besar diasingkan dalam aparatus golgi, dimana dapat dimobilisasi ke permukaan sel. Kelompok Golgi dari molekul TNFR1 secara signifikan masih belum jelas. Salah satu hipotesis adalah bahwa ia mungkin bertindak sebagai reservoir untuk meningkatkan densitas ekspresi reseptor permukaan, dengan demikian membuat sel menjadi peka terhadap aksi TNF. Ada dugaan bahwa pada sel-sel otot polos, dimana kelompok reseptor TNF Fas terutama melokalisasi ke Golgi, dari mana ia dapat ditranslokasi ke permukaan sel, sehingga sel-sel peka terhadap *Fas ligan induced killing* (Chu, 2013).

Eksresi permukaan TNFR1 ada yang sebagai trimers yang dikaitkan melalui *pre ligand assembly domains* (PLAD), yang berada di dalam domain membran distal yang kaya sistein. Dalam reseptor yang tidak distimulasi domain sitoplasma merupakan preasosiasi dengan protein sitoplasma yang disebut sebagai *Silencer of death domain* (SODD). SODD diduga mencegah pensinyalan konstitutif dari TNFR1, meskipun tikus dengan defisiensi kongenital pada ekspresi gen *sodd* dengan tampilan normal dari pensinyalan TNFR1. Baik TNFR1 dan SODD mengandung '*death domain*' (DD), yang merupakan motif protein yang berinteraksi dengan DD lain. SODD menggunakan DD-nya untuk mengikat DD yang terkandung dalam bagian sitosolik TNFR1, yang mencegah pensinyalan. Pengikatan TNF ke TNFR1 dapat menyebabkan pelepasan SODD, memungkinkan ikatan dari DD protein sitoplasmik yang berbeda yang mengandung *TNFR associated DD protein* (TRADD). TRADD memulai pensinyalan dengan merekrut dua protein tambahan, *receptor interacting protein-1* (RIP-1), suatu serin / treonin kinase yang berikatan dengan TRADD melalui DD-nya sendiri, dan *TNFR-associated factor-2* (TRAF-2) sebuah ligase ubiquitin E3 yang tidak mengandung DD. Dalam beberapa menit kompleks ini diinternalisasi, dan kompleks TRADD-RIP-1-TRAF2 dilepaskan dari TNFR1. Penghambat proses ini bisa mengganggu pensinyalan (Parameswaran dan Patial, 2010).

Peristiwa pensinyalan selanjutnya melibatkan rekrutmen dan aktivasi dari *mitogen activated protein kinase kinase kinases* (MAP3Ks) yang berbeda. RIP-1 dibutuhkan untuk mediasi rekrutmen dari MEKK-3 dan mentransformasikan *growth factor-beta* (TGF $\beta$ )-*activated kinase* (TAK) 1, yang pada gilirannya,  $\beta$ -subunit aktif dari kompleks inhibitor  $\kappa\beta$  (I $\kappa\beta$ ) kinase (IKK), yang mengarah ke fosforilasi protein I $\kappa\beta$ , signaling I $\kappa\beta$  ubiquitinasi dan degradasi yang diperantarai proteosom. Protein I $\kappa\beta$  sistosolik dari kompleks dengan faktor transkripsi kelompok NF- $\kappa\beta$ , menutupi sinyal lokalisasi nuclear dalam NF- $\kappa\beta$ , dan degradasi I $\kappa\beta$  memungkinkan NF- $\kappa\beta$  untuk memasuki nukleus dan memulai transkripsi gen.

TRAF2 juga dapat berkontribusi pada aktivasi NF- $\kappa\beta$ , baik melalui ikatan dari kompleks IKK dan melalui rekrutmen *inhibitor of cellular apoptosis proteins* (cIAP) -1 dan -2. cIAP memiliki inhibitor kaspase yang juga memiliki protein ligase ubiquitin (E3) aktivitas dan partisipasi dalam degradasi I $\kappa\beta$ . Kompleks TRADD – RIP-1 – TRAF-2 juga merekrut *apoptosis-signaling kinase-1* (ASK-1), MAP3K yang dikaitkan dengan TRAF2 dan aktivasi MAP2Ks, termasuk MEK-4 dan -6. Fosforilasi MEK ini dan mengaktifkan terminal *C-Jun N-Terminal kinases* (JNKs) dan p38 MAPKs. Fosforilasi JNK yang mengaktifkan regio terminal amino dari c-Jun, sebuah subunit dari faktor transkripsi *activating protein-1* (AP-1). Fosforilasi daerah terminal amino dari c-Jun oleh JNK sangat penting untuk interaksi protein dengan *cAMP- response- element- binding- protein-* [CBP]/p300 dan transkripsi gen. TNFR1 juga dapat berinteraksi dengan FAN (*factor*

*associated with neutral SMase activation*) untuk mengaktifkan sphingomyelinase netral, yang dapat menghasilkan ceramide dari kerusakan sphingomyelin membran plasma dan memulai apoptosis melalui jalur mitokondria (Weinlich dan Green, 2014).

Selain memediasi kelangsungan hidup sel dan sinyal pro-inflamasi melalui NF- $\kappa$ B dan AP-1, TNFR1 juga dapat menginisiasi jalur sinyal kematian sel. Hal ini melibatkan *Fas associated DD protein* (FADD) ke TRADD dan perekrutan pro-kaspase 8 selanjutnya oleh kompleks TRADD-FADD. Aktivasi autokatalitik dari ikatan pro-kaspase 8 mengaktifkan kaspase 8, yang menginisiasi apoptotik melalui pembelahan dan aktivasi dari pro-kaspase 3. Rekrutmen dan aktivasi dari pro-kaspase 8 dapat dihambat oleh cFLIP, dan peningkatan level cFLIP yang diinduksi oleh aktivasi NF- $\kappa$ B dapat mencegah aktivasi jalur kematian. TNFR1 mengaktifkan respons pensinyalan lain yang kurang didefinisikan dengan jelas pada tingkat molekuler. Hal ini termasuk jalur aktivasi dari ras-raf-MEK1-ERK1, 2 dan *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K), dimana fosforilasi lipid membran *phosphatidylinositol 4,5 diphosphate* (PIP2), mengubahnya menjadi *phosphatidylinositol 3, 4, 5 trifosfat* (PIP3). PIP3 mengaktifkan PDK-1, sebuah enzim yang memfosforilasi kinase Akt, dan juga mengaktifkan PDK-2, sebuah kompleks yang mengandungi *mammalian target of rapamycin* (mTOR), rictor dan *SAPK-interacting protein* (Sin)1, yang juga terlibat dalam pengaktifan Akt ERK-1, -2 dan Akt secara umum

berhubungan dengan kelangsungan hidup dan proliferasi sel (Parameswaran dan Patial, 2010)

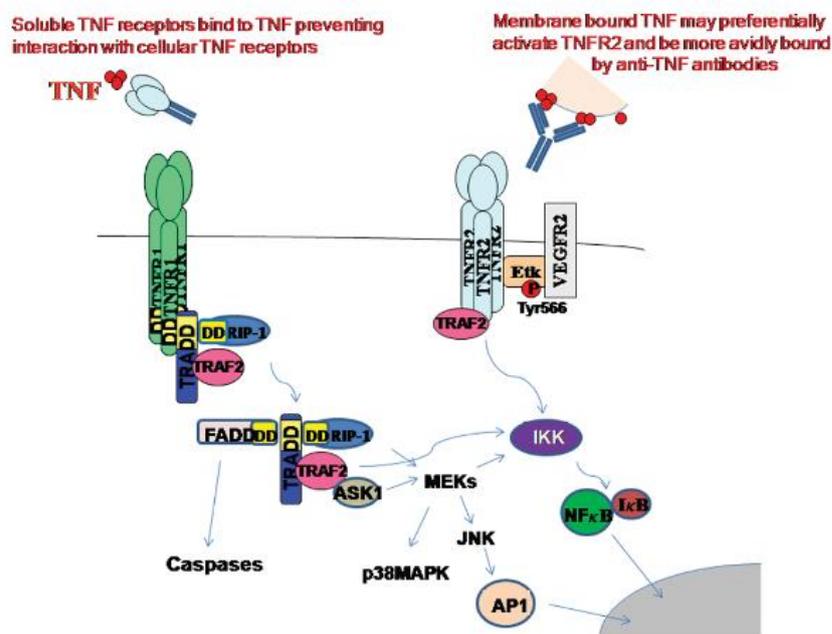
Jalur pensinyalan yang dimulai oleh TNFR2 masih didefinisikan dengan belum jelas, tetapi TNFR2 menunjukkan efek bersama dan berlawanan dengan TNFR1. TNFR2 tidak memiliki domain kematian intraseluler, tetapi dapat berinteraksi dengan TRAFs. TRAF1 pada awalnya diidentifikasi sebagai protein 45 kDa yang dapat di-immunopresipitated dengan TNFR2 manusia yang ditransfusikan ke murine interleukin-2-dependent sel T sitotoksik CT6, dan juga dari lysates sel CT6 oleh protein fusi GST yang dibutuhkan oleh regio TNFR2 manusia yang diperlukan untuk transduksi sinyal. Pada saat yang sama, TRAF2 diidentifikasi sebagai protein novel 56 kDa dengan menggunakan *two hybrid system* untuk mendeteksi protein yang berinteraksi secara langsung dengan domain sitoplasmic dari hTNFR2. Terlepas dari studi ko-immunopresipitasi, hanya interaksi yang sangat lemah antara TRAF1 dan domain sitoplasmik dari hTNFR2 atau mTNFR2 yang dapat dideteksi menggunakan *two hybrid system*. Kontradiksi yang tampak ini direkonsiliasi oleh pengamatan bahwa interaksi heteromer yang kuat terjadi antara TRAF1 dan TRAF2, dan bahwa TRAF1 dan TRAF2 dapat membentuk dimer homo dan heterotipik. Akibatnya, TRAF1 dan TRAF2 dapat berasosiasi dengan domain sitoplasma dari TNFR2 sebagai kompleks heterodimer dimana hanya TRAF2 yang berhubungan dengan reseptor secara langsung. Namun, terlepas dari aktivitas ikatan yang kuat dari TRAF2 yang inheren, *ligand dependent*

*activation* dari TNFR2 tidak tampak pada pengiriman sinyal kuat dari TRAF2 dependen, dan sejak TNFR2 telah ditemukan memiliki *TRAF2 binding site* dengan kemampuan pensinyalan inheren yang tinggi, yang ditunjukkan oleh T2bs-N, bersama dengan karboksil terminal *TRAF2 binding site* yang ditunjukkan oleh T2bs-C yang mencegah pengiriman sinyal dari T2bs-N. Hal ini dapat menunjukkan mekanisme untuk mengalihkan TRAF2 dari TNFR1 melalui T2bs-C tanpa menginduksi sinyal yang dimediasi TRAF2. Ikatan dari TNF ke TNFR2 juga dapat membatasi pensinyalan oleh c-IAP1 dependen dan degradasi dari TRAF2 dan ASK1, mengakhiri pensinyalan MAP3K (Parameswaran dan Patial, 2010).

TNFR2 juga dapat mengaktifkan endothelial/ *epithelial tyrosine kinase* (Etk), sebuah kinase sitosolik yang terlibat dalam adhesi sel, migrasi, proliferasi dan kelangsungan hidup, terlepas dari TRAF2. Etk adalah regulator baru dari sambungan sel epitel dan memediasi *TNF-induced phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) -Akt jalur angiogenik dalam sel endotel pembuluh darah melalui *Etk-mediated cross talk* dengan *vascular endothelial growth receptor 2* (VEGFR2). TNF mengaktifkan Etk melalui TNFR2 dengan jalan TRAF2-independen. TNFR2 berkaitan dengan bentuk Etk yang tidak aktif dalam mode ligand-independen melalui sekuens asam amino C-terminal 16 dari TNFR2 dan beberapa domain Etk. TNF diperkirakan menginduksi perubahan konformasional dalam TNFR2 yang memicu pembukaan Etk yang tidak aktif. Dalam sel endotel, TNF menginduksi perakitan kompleks trimolekuler yang terdiri dari TNFR2, Etk

dan *Vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2, juga dikenal sebagai KDR atau flk-1). Dalam kompleks ini, ada fosforilasi resiprokal yang terkoordinasi dari Etk dan VEGFR2, menghasilkan aktivasi PI3K. Penampilan Etk terfosforilasi merupakan indikasi pensinyalan dari TNFR2 (Parameswaran dan Patial, 2010).

Pemanfaatan mekanisme pensinyalan berbeda oleh TNFR1 dan TNFR2 konsisten dengan kemampuan masing-masing reseptor untuk memberi sinyal respons biologis yang berbeda dalam sel yang dikultur. Ligasi TNFR1 diperlukan dan cukup untuk menginduksi respon TNF sitotoksik dan pro-inflamasi, sedangkan TNFR2 dapat meningkatkan aktivasi sel, migrasi atau proliferasi. Dalam keadaan tertentu, TNFR2 dapat berkontribusi terhadap respons TNFR1, terutama pada konsentrasi rendah TNF1, konsisten dengan gagasan '*ligandpassing*', di mana TNFR2 menangkap TNF dan lolos ke TNFR1. Kerjasama antara reseptor dapat juga dijelaskan oleh pembentukan ligan yang diinduksi oleh *TNF receptor heterocomplex*.



**Gambar 2. 9** Jalur pensinyalan yang mengarah ke respons seluler utama TNF. (Dikutip dari: Bradley, J. R. (2008), J. R. (2008) "TNF-mediated inflammatory disease," *The Journal of pathology*, 214(2), hal. 149–60)

#### 4. Regulasi Dari Reseptor TNF

Sebagian besar jalur sel dan jaringan primer mengekspresikan kedua reseptor TNF, meskipun TNFR2 lebih sering diekspresikan pada sel-sel garis turunan hematopoietik. Jenis reseptor TNF menunjukkan pola ekspresi sel yang jauh lebih terbatas secara *in vivo*, dan sangat diregulasi oleh iskemik atau inflamasi cedera jaringan. Sebagai contoh, ginjal normal tampak sebagian besar tanpa molekul TNFR2, dan molekul TNFR1 pada dasarnya terbatas pada sel endotel mikrovaskuler dan glomerulus. Distribusi protein terbatas ini didukung oleh studi *in situ hybridization* untuk reseptor-encoding mRNA. Pada allografts ginjal yang mengalami penolakan atau iskemik injuri, TNFR1 menghilang dari endotelium dan terdapat ekspresi baru TNFR2 dalam sel epitel tubulus ginjal. Ekspresi yang

diatur dari reseptor TNF ini, yang dikenal secara luas pada berbagai jaringan, kemungkinan merupakan hasil dari perubahan sintesis dan pelepasan reseptor.

Sejumlah rangsangan, termasuk TNF, IL-1, IL-10 dan *tissue plasminogen activator* meningkatkan ekspresi dari TNFR2 melalui aktivasi transkripsi, sedangkan TNFR1 lebih sering di *down regulated* oleh berbagai stimulus. Kemungkinan dari perbedaan sintesis pada reseptor selanjutnya didukung oleh karakterisasi regio promotornya. *5'-regulatory region* dari TNFR1 memiliki fitur *housekeeping promotor*. Induksibilitas dari TNFR2 didukung oleh analisis dari regio promotornya, yang memiliki elemen respons cAMP dan elemen konsensus untuk sejumlah faktor transkripsi, termasuk NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF-1 dan GAS. Faktor tambahan yang diketahui mempengaruhi ekspresi reseptor TNF yang keluar dari permukaan sel. Proteins pengikat TNF, yang kemudian dikarakteristikan sebagai bentuk terlarut dari dua spesies molekular reseptor permukaan sel TNF, dan pertama kali dimurnikan dari urin manusia normal (Weinlich dan Green, 2014)

Mediator inflamasi diketahui menginduksi pelepasan TNFR1 dari sel endotel, dan nitrat oksida dan hidrogen peroksida telah terlibat dalam aktivasi metalloproteinase yang terlibat dalam pelepasan TNFR1. *TNF receptor associated periodic syndrome* (TRAPS) adalah sindrom autoinflamasi yang ditandai dengan episode demam, dengan peradangan lokal yang berat. TRAPS dikaitkan dengan mutasi heterozigot dalam

domain ekstraseluler dari TNFR1, yang terkait dengan reseptor misfolding, ketidakmampuan untuk membentuk reseptor larut dan pensinyalan yang lain (Wallach, 2016).

## **5. Efek biologis sel TNF dalam respons inflamasi**

Meskipun reseptor TNF diekspresikan secara berbeda pada berbagai sel dan jaringan, beberapa efek proinflamasi dari TNF dapat dijelaskan pada dasar efek TNF pada endotel vaskular dan interaksi endotel leukosit. Dalam merespon TNF, sel-sel endotel mengawali proses inflamasi dengan tampilan, temporal yang berbeda, spasial dan bentuk anatomis kombinasi berbeda dari molekul adhesi untuk leukosit, termasuk E-selectin, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) (Parameswaran dan Patial, 2010).

Dalam kombinasi dengan pelepasan kemokin (termasuk IL-8, MCP-1 dan IP-10), respon ini mengarah pada rekrutmen populasi yang berbeda dari leukosit independen pada pengenalan antigen. Selain itu, banyak fitur inflamasi klasik yang dapat dihasilkan oleh efek lokal TNF pada sel endotel. Ekspresi siklo-oksigenase 2 yang diinduksi TNF dapat meningkatkan produksi EC dari PGI<sub>2</sub> vasodilatasi yang mengakibatkan vasodilatasi, menyebabkan 'rubor' dan 'kalor' melalui peningkatan aliran darah lokal. 'Tumor' dapat dihasilkan dari peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang dimediasi oleh TNF, yang memungkinkan peningkatan transendotelial cairan dan molekul makro untuk menciptakan edema. Selain itu, ekspresi

protein pro-koagulan yang diinduksi TNF, seperti faktor jaringan, dan regulasi protein anti koagulan, seperti trombomodulin TNF, dapat menyebabkan trombosis intravaskular (Parameswaran dan Patial, 2010).

## **6. Fitur Umum Pensinyalan Kelompok TNF ke NF- $\kappa$ B**

Berbagai ligan yang relevan secara imunologis, dan reseptor-reseptornya dapat mengaktifkan jalur NF- $\kappa$ B. Hal ini termasuk, namun tidak hanya terbatas pada, *TNF receptor* (TNFR), *Toll like receptor* (TLR), reseptor IL-1 (IL-1R), dan kelompok reseptor antigen. Salah satu fitur yang mencolok dari semua reseptor ini, termasuk *TNF receptor family*, adalah kurangnya aktivitas enzimatik reseptor. Akibatnya, tindakan fisik dari pengikatan ligan harus ditransmisikan melintasi lipid bilayer dan diterjemahkan oleh protein adaptor ke dalam aktivasi kinase.

Bentuk terkini yang memegang ikatan ligan mempromosikan pembentukan dari reseptor oligomer / kompleks ligan. Pensinyalan *TNF family receptor* ke NF- $\kappa$ B melibatkan pengikatan serangkaian protein adaptor ke ikatan ligan kompleks reseptor, yang pada gilirannya merekrut dan mengaktifkan IKK. Protein adaptor ini dimiliki protein yang dideskripsikan dengan baik sebagai domain interaksi protein yang berpartisipasi dalam perakitan protein oligomer yang sangat kompleks yang menjembatani ligan / kompleks reseptor ke IKK. Interaksi domain protein adaptor yang penting untuk pensinyalan keluarga TNF ke NF- $\kappa$ B termasuk *death fold domain* (DD), RIP (*Receptor Interacting Protein*) *homotypic*

*interaction motifs* (RHIM), dan domain TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*).

Protein adaptor ini memediasi pensinyalan ke banyak jalur akhir. Di sini kita hanya akan membahas peran protein-protein ini dalam pensinyalan NF- $\kappa$ B. Perubahan konformasi reseptor, lokalisasi dan atau peningkatan aviditas yang disebabkan oleh ikatan ligan yang memfasilitasi ikatan protein adaptor melalui DD atau motif pengikat TRAF pada ekor sitoplasmik reseptor. Hasilnya adalah perekrutan anggota kelompok TRAF dan RIP menjadi kompleks protein besar. Oligomerisasi dari kompleks ini didukung oleh reseptor silang oleh ligan multimer, serta kemampuan protein: interaksi protein domain, seperti domain TRAF, untuk membentuk trimers dan oligomer tingkat tinggi. Kinase hulu yang mengarahkan aktivasi pensinyalan IKK dan NF- $\kappa$ B oleh kelompok sitokin TNF adalah NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) dan TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$  activated kinase; MAP3K7*). NIK memediasi aktivasi IKK $\alpha$  dan jalur nonkanonikal. Fungsi TAK1 di sebagian besar jalur kanonik bergantung pada NEMO, meskipun persyaratan untuk TAK1 di semua sinyal keluarga TNF ke kanonik NF- $\kappa$ B belum mapan. Setelah diaktifkan, IKK kinase (IKK-K) ini dapat memicu kaskade kinase tradisional di dalam dan di luar jalur NF- $\kappa$ B (Hayden dan Ghosh, 2014).