

Expression and Activation of NF- κ B p65 Subunit of Mononuclear Cell at Steroid Resistance Nephrotic Syndrome in Childhood Patients

Ekspresi dan Aktivasi Sub Unit p65 NF- κ B pada Sel Mononuklear Penderita Sindrom Nefrotik Resisten Steroid Anak

Brigitta Ida RV Corebima*, Krisni Subandiyah*, Loeki Enggar Fitri**

*Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSSA Malang

**Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Resistance to steroid therapy is a poor prognosis sign for nephrotic syndrome, but this mechanism is still unclear. NF- κ B has been reported to affect the glucocorticoid at the T cell through the transrepression in the glucocorticoid receptor. Until now, this study was still limited. The aim of this study was to show the difference expression and activation of NF- κ B p65 subunit between childhood SRNS and SSNS patient. Cross sectional study was conducted during January 2009 to December 2009 in the Saiful Anwar General Hospital and Biomedic Laboratory Brawijaya University. Expression and activation of NF- κ B p65 subunit were determine by immunochemistry staining by counting the amount of lymphocyte that express and activate NF- κ B p65 subunit among 200 lymphocytes under light microscope with 1000 magnification. Results was analyzed by independent *t* test with 95% CI ($p < 0,05$) and Pearson correlation. The result of this study revealed no significant difference of expression of NF- κ B p65 subunit between SRNS and SSNS ($p = 0,153$), but there was an increase activation of NF- κ B p65 subunit in the SRNS patients ($p = 0,000$). However, we did not find any correlation between expression and activation of NF- κ B p65 subunit ($r = 0,102$, $p = 0,668$). We conclude that increasing of activation of NF- κ B p65 subunit can cause resistance to steroid therapy but it is not related with the expression of NF- κ B p65 subunit.

Keywords : nephrotic syndrome, steroid resistancy, expression and activation NF- κ B p65 subunit

PENDAHULUAN

Sindrom Nefrotik Resisten Steroid (SRNS) merupakan salah satu penyebab gagal ginjal terminal yang sulit diatasi pada penderita berumur kurang dari 20 tahun. Walaupun persentase SNRS relatif kecil tetapi 50% penderita SNRS ini akan berkembang menjadi gagal ginjal terminal dalam waktu 1-4 tahun. Meningkatnya penderita yang resisten steroid selama pengamatan sindrom nefrotik pada anak merupakan masalah klinis yang serius (1,2). Sementara ini belum ada penjelasan yang pasti mengapa ada penderita sindrom nefrotik yang berespon terhadap steroid (SNSS) dan yang lainnya resisten steroid (SNRS). Respon terhadap terapi glukokortikoid adalah suatu indikator yang penting untuk perjalanan penyakit sindrom nefrotik (3).

Salah satu hipotesis patogenesis sindrom nefrotik idiopatik adalah karena disfungsi sel T. Ditemukan keterlibatan berbagai macam sitokin, antara lain *interleukin 2* (IL-2), IL-4, IL-12, *interferon gamma* (IFN- γ), dan *platelet-activating factor* (PAF) dalam patofisiologi sindrom nefrotik idiopatik (4). Ekspresi dari sitokin memerlukan regulasi dari *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) yang merupakan faktor transkripsi yang penting dalam ikatan DNA dengan protein (5,6).

Peningkatan ikatan DNA dari NF- κ B ditunjukkan pada sindrom nefrotik kelainan minimal yang kambuh, dengan ditemukan adanya hubungan positif

antara derajat proteinuria dan kenaikan ikatan DNA (7). Heterodimer subunit p65/p50 adalah bentuk NF- κ B yang tersering muncul pada sindrom nefrotik dibandingkan dengan subunit p50/50 (8,9). Sampai saat ini hanya ada sedikit penelitian tentang subunit p65 pada sindrom nefrotik dan terbatas pada ekspresinya saja atau aktivasinya saja yang berhubungan dengan resistensi steroid (7,10,11,12). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji peranan ekspresi dan aktivasi faktor transkripsi subunit p65 NF- κ B pada sindrom nefrotik resisten steroid pada anak.

METODE

Ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- κ B terhadap respon steroid diteliti pada sitoplasma dan nukleus limfosit penderita SNRS. Penelitian dilakukan di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSU Dr. Saiful Anwar Malang dan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, mulai bulan Januari 2009 sampai dengan Desember 2009. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Panitia Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya RSU Dr. Saiful Anwar Malang. Semua penderita sindrom nefrotik idiopatik dan orang tuanya mendapatkan penjelasan mengenai penelitian sebelum orang tua penderita menandatangani persetujuan (*informed consent*).

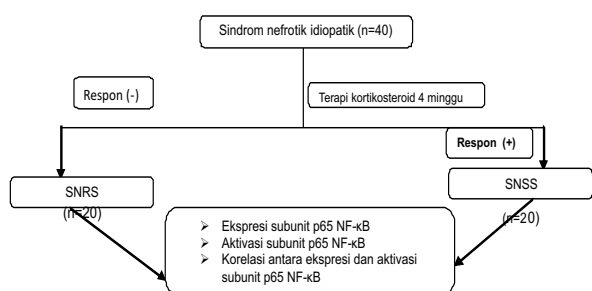
Penelitian ini menggunakan rancangan *cross sectional*. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya perbedaan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- κ B pada sindrom nefrotik resisten steroid dibandingkan dengan sindrom

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 3, Desember 2009; *Korespondensi*: Brigitta Ida RV Corebima, Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jln. Veteran, Malang. Tel. +628155503837, Email: brigitta_vebi@yahoo.com

nefrotik sensitif steroid pada anak.

Populasi penelitian adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik yang dirawat di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Kriteria diagnosis sindrom nefrotik sesuai dengan Studi Kolaboratif Penyakit Ginjal Anak di Indonesia (1989) dengan modifikasi *International Study of Kidney Diseases on Children (ISKDC) 1978*. Kriteria tersebut meliputi: edema, proteinuria masif (2+ atau pemeriksaan kuantitatif 40 mg/m²LPB/jam atau 1g/L dalam 24 jam/ Esbach), hipoalbuminemia 2,5 g/dL, hiperkolesterolemia (>250 mg/dL).

Pasien penelitian dibagi menjadi 2 kelompok, dengan kriteria inklusi: tergolong sindrom nefrotik idiopatik, penderita SNSS dan SNRS, usia antara 1 sampai 14 tahun.



Gambar 1. Kerangka konsep penelitian.

Sampel diambil berdasarkan *consecutive sampling*, dengan total sampel pasien SNRS 20 orang dan pasien SNSS 20 orang, sehingga total sampel 40 orang (Gambar 1).

Kelompok I adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik resisten steroid. Kriteria sindrom nefrotik resisten steroid adalah tidak terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Kelompok II adalah penderita sindrom nefrotik sensitif steroid. Kriteria sindrom nefrotik sensitif steroid adalah terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Adapun remisi adalah proteinuria negatif atau *trace* (proteinuria < 4 mg/m²LPB/jam) 3 hari berturut-turut dalam 1 minggu.

Sampel penelitian berupa darah vena pasien SNRS (kelompok I) dan SNSS. Limfosit diisolasi kemudian dilakukan pengecatan dengan menggunakan metode imunositokimia. Hasil pengecatan dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Ekspresi subunit p65 NF-κB dinyatakan dengan penghitungan jumlah sel limfosit yang tercatat kromagen DAB (coklat) pada sitoplasma per 200 sel limfosit (Gambar 4). Aktivasi subunit p65 NF-κB dinyatakan dengan penghitungan jumlah sel limfosit yang tercatat kromagen DAB (coklat) pada inti per 200 sel limfosit (Gambar 6). Hasil penghitungan tersebut dijadikan variabel numerik digunakan dalam bentuk mean/ rerata (SD). Data dianalisis dengan uji t-test dan uji korelasi Pearson dengan nilai interval kepercayaan 95% menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 17) for Windows*.

HASIL

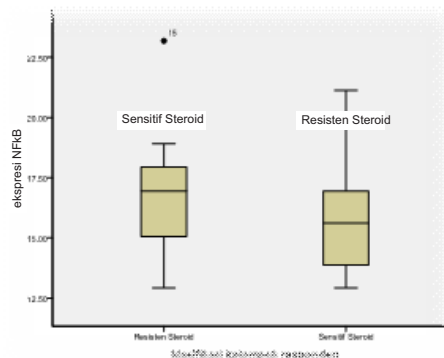
Karakteristik sampel penderita pada penelitian ini disajikan pada tabel 1. Tabel 1 menggambarkan karakteristik penderita sindrom nefrotik idiopatik yang menjadi sampel pada penelitian ini. Pada tabel tersebut terlihat karakteristik penderita yang menjadi sampel penelitian ini untuk jenis kelamin, umur dan berat badan tidak ada perbedaan yang bermakna.

Tabel 1. Karakteristik Penderita SNSS dan SNRS

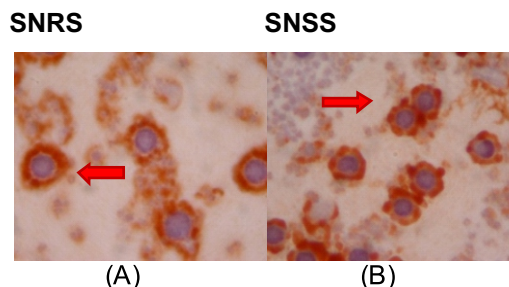
	SNRS (n=20)	SNSS (n=20)	p
Jenis kelamin			0,440
Laki-laki	12	14	
Perempuan	8	6	
Umur pasien (tahun)	5,9 th	7,4 th	0,127
Berat badan	23,9 kg	20 kg	0,231

Keterangan : dikatakan ada perbedaan bermakna jika nilai $P \leq 0,05$

Pada pengamatan kadar aktivasi subunit p65 NF-κB, didapatkan aktivasi yang lebih tinggi pada kelompok penderita anak dengan SNRS dibandingkan dengan kelompok SNSS dengan perbedaan yang bermakna ($p=0,000$).



Gambar 2. Perbandingan Ekspresi subunit p65 NF-κB pada Kedua Kelompok.

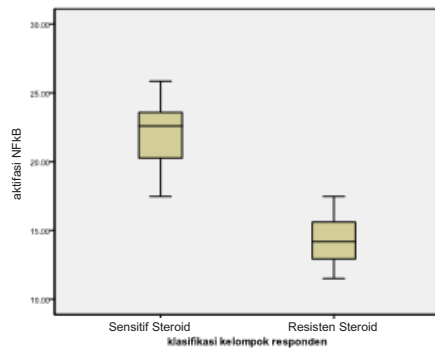


Gambar 3. Ekspresi Subunit p65 NF-κB pada Penderita SNRS (A) dan Penderita SNSS (B) dengan Teknik Imunositokimia.

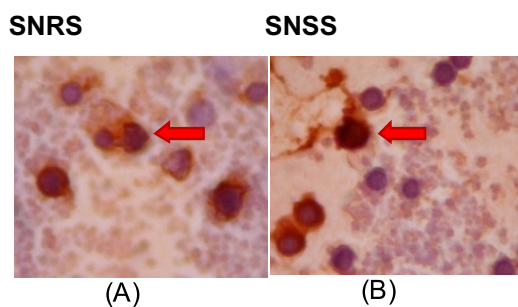
Keterangan : Panah merah menunjuk pada warna coklat pada sitoplasma yang menunjukkan ekspresi subunit p65 NF-κB di sitoplasma

Pada SNRS hubungan ekspresi subunit p65 NF-κB dengan aktivasi subunit p65 NF-κB jika dilakukan

analisa statistik korelasi Pearson menunjukkan tidak ada korelasi antara aktivasi subunit p65 NF- κ B dan ekspresi subunit p65 NF- κ B ($r=0,102$, $p=0,668$).

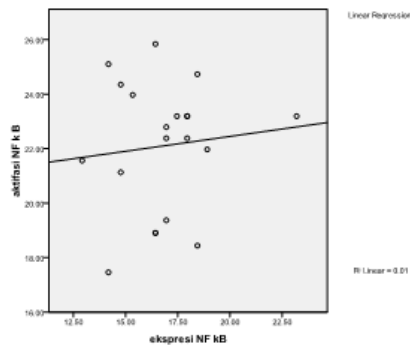


Gambar 4. Perbandingan Aktivasi subunit p65 NF- κ B pada Kedua Kelompok.



Gambar 5. Aktivasi Subunit p65 NF- κ B pada Penderita SNRS (A) dan Penderita SNSS (B) dengan Teknik Imunositokimia.

Keterangan : Panah merah menunjuk pada warna coklat pada sitoplasma yang menunjukkan aktivasi subunit p65 NF- κ B di nukleus.



Gambar 6. Hubungan antara Ekspresi subunit p65 NF- κ B dan Aktivasi subunit p65 NF- κ B.

Diskusi

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* untuk membuktikan adanya pengaruh ekspresi dan aktivasi subunit p65 terhadap resistensi steroid pada anak. Pada penelitian ini didapatkan 40 sampel dengan masing-masing kelompok 20 sampel, sehingga data dapat dianalisis sesuai rencana. Rerata umur subyek dalam penelitian ini tidak berbeda bermakna demikian juga jenis kelamin dan berat badan kedua kelompok tidak berbeda secara bermakna.

Penelitian menggunakan sel PBMC (*Peripheral*

Blood Mononuclear Cell) yang sebagian besar terdiri dari sel T. Banyak bukti yang menyatakan bahwa sel T berperan pada patogenesis sindrom nefrotik idiopatik. Oleh karena itu, respon pada terapi glukokortikoid mungkin terlibat pada *glucocorticoid receptor-mediated signaling pathway* pada sel T. Jika respon steroid pada sindrom nefrotik merupakan hasil kerja glukokortikoid pada sel T, maka sel T dari pasien dengan SNRS dan SNSS seharusnya menunjukkan beberapa perbedaan. Ada hipotesis bahwa sel T pada penderita SNRS memiliki beberapa aktivitas reseptor glukokortikoid yang diinduksi sinyal intraselular. Hipotesis yang mendasari adalah bahwa resistensi pada terapi glukokortikoid diperantarai oleh aktivasi faktor transkripsi dan produksi limfokin yang menginisiasi dan mempertahankan respon inflamasi yang diperantarai sebagian besar oleh sel T (11). Konsep aktivitas supresi kompetitif ini didukung oleh bukti bahwa pada beberapa kasus resisten steroid dapat teratasi dengan terapi glukokortikoid intravena dengan dosis yang sangat besar (13). Studi sebelumnya membuktikan beberapa mediator potensial resistensi sel T pada glukokortikoid. IL-2 dan IL-4 menginduksi resistensi glukokortikoid pada kultur limfosit normal (14,15). Penelitian lain menyebutkan didapatkan gangguan fungsi sel T regulator pada penderita SNRS (16).

Pada penelitian ini digunakan parameter NF- κ B subunit p65. Kelainan pada aktivasi NF- κ B banyak ditemukan pada pasien dengan kelainan imunologis seperti pasien *systemic lupus erythematosus* (SLE). Aktivasi NF- κ B menurun secara signifikan pada pasien dengan SLE (17). Salah satu hasil penelitian *in vivo* disebutkan bahwa hanya sub unit p65 yang bisa secara langsung berhubungan dengan DNA pada keadaan heterodimer dengan sub unit p50, dan bahkan pada kondisi homodimer dengan sub unit p65. Hal ini menunjukkan bahwa p65 lebih aktif untuk melakukan transkripsi jika dibandingkan dengan p50. Hasil penelitian tersebut menjelaskan adanya ketidaknormalan pada transkripsi gen maupun sitokin pada penderita kelainan imunologis (18). Penelitian dengan menggunakan sel Cos-1 yang mengandung GR dan beberapa NF- κ B menunjukkan pentingnya subunit p65 pada transrepresi oleh GR. Hanya sel-sel yang mengandung heterodimer p65/p50 atau homodimer p65 homodimer yang sensitif terhadap steroid. Sel yang hanya mengandung homodimer p50 tidak berespon terhadap steroid (19). Penelitian lain membuktikan bahwa pada pasien dengan SNSS relaps didapatkan peningkatan ekspresi heterodimer p65/p50 NF- κ B dan terdapat penurunan ekspresi NF- κ B ketika pasien mendapat terapi deksametason (20). Para peneliti tersebut yakin bahwa hambatan pada NF- κ B merupakan mekanisme potensial efek glukokortikoid pada anak dengan sindrom nefrotik.

Faktor transkripsi NF- κ B penting pada aktivasi banyak gen proinflamasi. Penelitian tentang hal ini telah dilaporkan pada asma dan kanker, dimana faktor transkripsi mempengaruhi kerja glukokortikoid (18,21). Namun penelitian tentang peran faktor transkripsi NF- κ B pada sindrom nefrotik hanya sedikit dan terbatas pada ekspresinya saja atau aktivasinya saja (7,10,11,12).

Penelitian sebelumnya tentang sindrom nefrotik menunjukkan penurunan ekspresi subunit p65 NF- κ B, sementara ekspresi subunit p50 adalah tidak didapatkan perbedaan signifikan, baik pada kelompok SNRS maupun SNSN (11). Sebaliknya penelitian lain mendapatkan peningkatan ekspresi NF- κ B & gen angiotensinogen berhubungan dengan R-FSGS, dan juga didapatkan peningkatan rasio NF- κ B:IkB (10). Sementara itu didapatkan dua penelitian tentang aktivasi subunit p65 NF- κ B yang hasilnya adalah didapatkan peningkatan ikatan NF- κ B-DNA⁷ dan pada penelitian lain didapatkan peningkatan aktivasi NF- κ B berhubungan dengan buruknya respon terhadap terapi kortikosteroid (12). Penelitian yang menghubungkan ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- κ B sampai saat ini belum dilakukan.

Pada penelitian ini, dibuktikan bahwa ternyata tidak terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok SNRS dan SNSN ($p=0,153$), sebaliknya ditemukan suatu fakta baru yang membuktikan bahwa perbedaan itu justru berada pada adanya perbedaan aktivasi subunit p65 NF- κ B antara kelompok SNRS dengan SNSN. Didapatkan peningkatan aktivasi yang sangat tinggi pada kelompok SNRS ($p=0,000$). Hal ini dapat dijelaskan karena mekanisme dasar aktivasi NF- κ B adalah perubahan heterodimer NF- κ B yang tertahan di sitoplasma oleh IkB. Jika ada sinyal yang mengaktivasi akan mengakibatkan IKK memfosforilasi IKB sehingga IKB mengalami ubiquinasi & degradasi melalui proteasom, sementara PKAc memfosforilasi subunit p65 NF- κ B. Proses aktivasi ini mengekspos NLS (*nuclear localization signal*) pada subunit p65, sehingga heterodimer NF- κ B menjadi teraktivasi dan berpindah ke nukleus dimana akan berinteraksi dengan elemen *kB-responsive elements* pada kromatin dan memodulasi transkripsi gen (22).

Penelitian ini membuktikan tidak ada korelasi antara ekspresi dan aktivasi subunit p65 NF- κ B ($r=0,102$, $p=0,668$), hal ini menunjukkan mungkin terdapat faktor-faktor lain yang mengaktivasi subunit p65 NF- κ B secara berlebihan, yaitu IKK, IKB, NLS, dan PKAc. Peningkatan yang signifikan dari aktivasi subunit p65 NF- κ B pada kelompok anak penderita SNRS, menunjukkan adanya proses aktivasi NF- κ B yang berlebihan sehingga membuat terjadinya proses transkripsi gen-gen sitokin inflamatori yang berlebihan. Peningkatan produksi sitokin proinflamasi mendasari mekanisme resistensi steroid (23). IL-2 merupakan salah satu sitokin pro inflamatori yang diregulasi oleh NF- κ B, dan didapatkan berlebihan kadarnya pada penelitian sebelumnya (11). Penelitian lain juga membuktikan bahwa pada limfosit penderita resisten steroid didapatkan tingginya aktivitas IL-2 yang signifikan dibandingkan dengan limfosit penderita sensitif steroid (14), namun peningkatan produksi sitokin proinflamasi lain juga masih perlu diteliti perannya. Penelitian ini adalah penelitian *in vivo*, sehingga dapat memberikan gambaran patofisiologi SNRS, tetapi hasil penelitian dipengaruhi banyak faktor.

Terdapat kelemahan pada penelitian ini, yaitu penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *cross sectional*, sehingga pengambilan

sampel data hanya dilakukan pada satu waktu saja dan beberapa sampel penelitian ini ada yang diambil darahnya setelah mendapat terapi siklofosamid sedangkan siklofosamid memiliki efek represi yang lebih kuat terhadap reaksi inflamasi sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Selain itu seharusnya juga dilakukan pengujian parameter lain, seperti IKK, IKB, NLS, dan PKAc karena semua parameter tersebut memiliki pengaruh pada proses aktivasi subunit p65 NF- κ B, sehingga dapat diketahui apakah perubahan yang terjadi pada subunit p65 NF- κ B terjadi karena ada pengaruh faktor lain atau tidak.

KESIMPULAN

Tidak ada perbedaan ekspresi subunit p65 NF- κ B pada kelompok dengan Sindrom Nefrotik Resisten Steroid dan Sindrom Nefrotik Sensitif Steroid. Didapatkan peningkatan aktivasi subunit p65 NF- κ B pada kelompok SNRS. Peningkatan aktivasi subunit p65 NF- κ B dapat menyebabkan resistensi steroid, namun tidak berhubungan dengan ekspresi subunit p65 NF- κ B.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Bagga A, Mantan M. *Nephrotic syndrome in children*. Indian J Med Res. 2005; 122: 13-28.
2. UKK Nefrologi. *Konsensus Tata Laksana Sindrom Nefrotik Idiopatik pada Anak*. Jakarta: 2008
3. Orth S, Ritz E. *The Nephrotic Syndrome*. NEJM. 1998; 23: 1202-11.
4. Cho, Hong EH, Lee TH, Ko CW. *Pathophysiology of minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrology. 2007; 12: S11S14.
5. Israel KG. *NF- κ B in life/death decisions: an introduction*. Cell Death and Differentiation. 2006; 13: 685-686.
6. Perkins. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Molecular Cell Biology* 2007; 8: 49-62.
7. Sahali. *Transcriptional and Post-Transcriptional Alterations of IkB α in Active Minimal-Change Nephrotic Syndrome*. J Am Soc Nephrol. 2001; 12: 164858.
8. Hernandez, Guerrero GC, Egido J. *In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry*. Kidney Int. 1999; 55:209-214.
9. Mezzano S, Barria M, Droguett MA, et al. *Tubular NF- κ B and AP-1 activation in human proteinuric renal disease*. Kidney International. 2001; 60: 136677.
10. Schachter. *Increased Nuclear Factor- κ B and Angiotensinogen Gene Expression in Posttransplant Recurrent Focal Segmental Glomerulosclerosis*. Transplantation. 2000; 70(7): 1107-10.
11. Aviles, Vehaskari VM, Manning J, Ochoe AC, Zea AH. *Decreased expression of T-cell NF- κ B p65 subunit in steroid-resistant nephrotic*

- syndrome*. *Kidney International*. 2004; 66: 607.
12. Hong Y, Ruo P, Jun H, Jun H. *Relations of NF- κ B Activity in the Kidney of Children with Primary Nephrotic Syndrome to Clinical Manifestations, Pathological Types, and Urinary Protein Types*. *China Med J*. 2005; 118(10): 854-6.
 13. Hodson EM, Willis NS, Craig JC. *Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007; 4: 1-61.
 14. Walker KB, Potter JM, House AK. *Interleukin 2 synthesis in the presence of steroids: a model of steroid resistance*. *Clin. exp. Immunol*. 1987; 68: 162-167.
 15. Kam JC, Szeffler SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY. *Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids*. *The Journal of Immunology*. 1993; 151(7): 3460-3466.
 16. Araya, Diaz, Wasserfall, et al. *T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome*. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24:16918.
 17. Wong HK, Kammer GM, Dennis G, Tsokos GC. *Abnormal NF- κ B Activity in T Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Decreased p65-RelA Protein Expression*. *J. Immunol*. 1999; 163:1682-1689.
 18. Ray A, Prefontaine KE. *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 752-56.
 19. McKay, Cidlowski JA. *Cross-Talk between nuclear factor- κ B and the steroid hormone receptors; mechanism of mutual antagonism*. *Mol Endo*. 1998; 12:4556
 20. Cao, Lu S, Zhao CDR. *Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome*. *Pediatr Nephro*. 2001; 16:7905.
 21. Ito K, Chung KF, Adcock IA. *Update on glucocorticoid action and resistance*. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(3): 522-43.
 22. McKay, Cidlowski JA. *Molecular Control of Immune/Inflammatory Responses: Interactions Between Nuclear Factor- κ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways*. *Endocrine Reviews*. 1999; 20(4): 435-59.
 23. Jain J, Loh C, Rao A. *Transcriptional regulation of the IL-2 gene*. *Curr. Opin. Immunol*. 1995; 7:333.