

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Diabetes nefropati

Diabetes nefropati adalah komplikasi mikro dan makrovaskuler dari diabetes mellitus, baik DM tipe 1 maupun DM tipe 2 dan dapat mengenai berbagai organ seperti nefropati, retinopati dan neuropati. Diabetes mellitus memperlihatkan peningkatan ekspresi *angiogenic growth factor* pada sejumlah jaringan akibat hiperglikemi dan iskemi jaringan.<sup>25,26</sup> Perjalanan alamiah nefropati diabetik merupakan sebuah proses dengan progresivitas bertahap setiap tahun. Diabetes fase awal ditandai dengan hiperfiltrasi glomerulus dan peningkatan GFR.

Hal ini berhubungan dengan peningkatan perkembangan sel dan ekspansi ginjal, yang mungkin dimediasi oleh hiperglikemia. Pengaruh genetik, lingkungan, faktor metabolik dan hemodinamik berpengaruh terhadap terjadinya proteinuria<sup>27</sup>. Selain itu, banyak faktor dilaporkan berperan dalam defektif autoregulasi diantaranya adalah VEGF (*vascular endothelial growth factor*) yang merupakan mitogen endotel dan faktor vasopermeabilitas potensial.<sup>12</sup> Diabetes nefropati yang selanjutnya disingkat DN adalah salah satu komplikasi mikrovaskuler yang serius. Diabetes nefropati terjadi karena adanya *Acute Kidney Injury* (AKI), merupakan keadaan yang disebabkan oleh gangguan oksigen dan nutrisi dari nefron. Patofisiologinya sangat kompleks, tergantung dari peranan vaskularisasi dan proses pada tubulus.<sup>14</sup>

Hiperglikemia memicu terjadinya kerusakan ginjal, sehingga menimbulkan perubahan hemodinamik, metabolisme, disfungsi endotel, aktivasi sel inflamasi, perubahan ekspresi faktor vaskular. Hiperglikemi melatarbelakangi individu dalam perkembangan mikroangiopati diabetes nefropati (DN). Perubahan menjadi DN ini menimbulkan gangguan *turnover* dinding pembuluh darah, dengan demikian mengganggu *remodeling*, ditandai dengan berubahnya *turnover* sel matriks dari organ sasaran. Kerusakan sel sasaran (*common molecul*) sebagai akibat dari glukotoksisitas akan mengaktifkan sitokin dan faktor mekanik.<sup>28</sup>

Empat jalur abnormalitas hiperglikemik yang merupakan patogenesis terjadinya nefropati diabetes adalah : 1). Teori jalur poliol (sorbitol) ; 2). Teori jalur pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs); 3). Teori jalur Protein kinase C (PKC); 4). Teori jalur heksosamin.<sup>28,29</sup>

Gangguan awal pada jaringan ginjal sebagai dasar terjadinya nefropati adalah terjadinya proses hiperfiltrasi-hiperperfusi membran basal glomeruli. Gambaran histologi jaringan pada DN memperlihatkan adanya penebalan membran basal glomerulus, ekspansi mesangial glomerulus yang akhirnya menyebabkan glomerulosklerosis, hyalinosis arteri eferen serta fibrosis tubulo interstitial, tampaknya berbagai faktor berperan dalam terjadinya kelainan tersebut. Peningkatan glukosa yang menahun (glukotoksisitas) pada penderita yang mempunyai predisposisi genetik merupakan faktor-faktor utama ditambah faktor lainnya dapat

menimbulkan nefropati. Glukotoksisitas terhadap basal membran dapat melalui jalur:

Jalur metabolik (*metabolic pathway*): Faktor metabolik diawali dengan hiperglikemia, glukosa dapat bereaksi secara proses non enzimatis dengan asam amino bebas menghasilkan AGE's (*advance glycosilation end-products*). Peningkatan AGE's akan menimbulkan kerusakan pada glomerulus ginjal. Terjadi juga akselerasi jalur poliol, dan aktivasi protein kinase C. Pada alur poliol (*polyol pathway*) terjadi peningkatan sorbitol dalam jaringan akibat meningkatnya reduksi glukosa oleh aktivitas enzim aldose reduktase. Peningkatan sorbitol akan mengakibatkan berkurangnya kadar inositol yang menyebabkan gangguan osmolaritas membran basal. . Aldose reduktase adalah enzim utama pada jalur poliol, yang merupakan sitosolik monomerik oxidoreduktase yang mengkatalisa *NADPH-dependent reduction* dari senyawa karbon, termasuk glukosa. Aldose reduktase mereduksi aldehyd yang dihasilkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*) menjadi inaktif alkohol serta mengubah glukosa menjadi sorbitol dengan menggunakan NADPH sebagai kofaktor. Pada sel, aktivitas aldose reduktase cukup untuk mengurangi *glutathione* (GSH) yang merupakan tambahan stress oksidatif. Sorbitol dehidrogenase berfungsi untuk mengoksidasi sorbitol menjadi fruktosa menggunakan NAD – sebagai kofaktor. mekanisme melalui produksi intraseluler prekursor AGE (*Advanced Glycation End-Product*) menyebabkan kerusakan pembuluh darah. Perubahan ikatan kovalen protein intraseluler oleh prekursor

dikarbonil AGE akan menyebabkan perubahan pada fungsi seluler. Sedangkan adanya perubahan pada matriks protein ekstraseluler mengakibatkan interaksi abnormal dengan matriks protein yang lain dan dengan integrin. Perubahan plasma protein oleh prekursor AGE membentuk rantai yang akan berikatan dengan reseptor AGE, kemudian menginduksi perubahan pada ekspresi gen pada sel endotel, sel mesangial, dan makrofag. Penjelasan: keadaan hiperglikemia menyebabkan peningkatan DAG (*Diacylglycerol*), yang selanjutnya mengaktifasi protein kinase-C, utamanya pada isoform  $\beta$  dan  $\delta$ . Aktivasi PKC menyebabkan beberapa akibat patogenik melalui pengaruhnya terhadap *endothelial nitric oxide synthetase* (eNOS), endotelin-1 (ET-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), dan aktivasi NF-kB dan NAD(P)H oxidase.<sup>28</sup>

Jalur poliol glukosa diubah menjadi sorbitol oleh enzim aldosa reduktase. Di dalam ginjal enzim aldose reduktase merupakan peran utama dalam merubah glukosa menjadi sorbitol. Bila kadar glukosa darah meningkat maka kadar sorbitol akan meningkat dalam sel ginjal dan menyebabkan berkurangnya mio-inositol, yang dapat mengganggu osmoregulasi sel sehingga sel tersebut rusak. Aldose reduktase dalam keadaan normal adalah untuk mengurangi efek toksik aldehida dalam sel, sedang dalam keadaan kritis aldose reduktase mengalami perubahan glukosa menjadi sorbitol dan juga merubah glukosa menjadi fruktosa, proses ini

membutuhkan NADPH, sebagai kofaktor regenerasi antioksidan intraseluler pada keadaan kritis.<sup>28</sup>

Produk AGEs merupakan reaksi antara glukosa dan protein yang akan meningkatkan produk glikosilasi dengan proses non enzimatis protein antara prekursor dikarbonil yang merupakan turunan glukosa intraseluler dengan amino dari protein intraseluler dan ekstraseluler. Terbentuknya AGEs dapat merusak sel, karena mengganggu struktur protein intrasel dan ekstrasel seperti kolagen. Adanya penimbunan ini dalam jangka panjang, akan merusak membran basalis dan mesangium yang akhirnya akan merusak seluruh glomerulus. Viberti mengemukakan gangguan hemodinamik dan hipertrofi mendukung adanya hipertensi glomeruler dan hiperfiltrasi.

Hiperfiltrasi akan menyebabkan terjadinya filtrasi protein, di mana pada keadaan normal tidak terjadi. Bila terjadi reabsorpsi tubulus terhadap protein meningkat, maka akan terjadi akumulasi protein dalam sel epitel tubulus dan menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi seperti endotelin-1, osteoponin dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Faktor ini akan merubah ekspresi dari sitokin proinflamasi dan fibrosis sitokin ke infiltrasi sel mononukleus, menyebabkan kerusakan tubulointerstisial dan terjadi *renal scarring/ renal injury*.

\ Jalur AGEs, precursor AGEs keluar secara difus dan memodifikasi molekul matriks ekstraseluler, mengubah sinyal matriks dan menyebabkan disfungsi sel.

Protein yang di modifikasi berikatan dengan reseptor AGE (RAGE) dan mengaktifkan sitokin inflamasi dan factor pertumbuhan .<sup>28</sup>

Jalur Protein kinase C (PKC), keadaan hiperglikemia berat dalam sel akan meningkatkan sintesis molekul diasil gliserol yang merupakan kofaktor penting aktifasi PKC. Hiperglikemia intrasel mengaktifasi PKC dan menimbulkan berbagai efek ekspresi gen.<sup>28</sup> Jalur heksosamin metabolisme hiperglikemia intrasel melalui jalur glikolisis, dimana glukosa 6 fosfat diubah menjadi fruktosa 6 fosfat dengan sinyal enzim *glutamine fructose 6 phosphat amidotranferase* (GFAT) menjadi glukosamin 6 fosfat, *uridin di phosphate* (UDP) dan N –asetil glukosamin. Bila N-asetil glukosamin berkonyugasi dengan residu faktor transkripsi serin dan treonin ,maka akan terjadi berbagai perubahan ekspresi gen.<sup>28</sup>

## **2.2 Mikroalbuminuria**

\ Terjadi kehilangan albumin dalam urine sebesar 30-300 mg/hari. Mikroalbuminuria juga dikenal sebagai tahapan nefropati insipien..<sup>5</sup> Albuminuria dapat merusak glomerulus, jaringan tubulus ginjal dan lainnya, yang dapat menyebabkan ginjal Fibrosis. Hal ini telah dibuktikan bahwa Albuminuria merupakan faktor berbahaya pertama independen menyebabkan Uremia. Kerusakan paling berbahaya Albuminuria adalah untuk ginjal racun, yang mengarah ke Uremia.

Pertama, efek toksik pada sel-sel tubular proksimal berbelit-belit disebabkan oleh Albuminuria. Ketika Albuminuria muncul, lebih banyak protein masuk ke

dalam sel epitel tubular ginjal. Hal ini dapat meningkatkan aktivitas lisosom yang dapat menumpahkan ke cytolymph tabung. Cell cedera yang disebabkan oleh alasan ini bisa merangsang peradangan terjadi dan cicatrice terbentuk.

. Kedua, Albuminuria dapat memperburuk kondisi iskemia interstitium tabung. Reabsorpsi Albuminuria dapat membakar energi ekstra besar, yang dapat menyebabkan iskemia sel-sel tubular ginjal tubular, dan kemudian dapat terluka.

Ketiga, Albuminuria dapat menyebabkan perubahan biologis ke sel tubular. Kebanyakan Penyakit Ginjal dengan Albuminuria memiliki masalah proliferasi sel yang berlebihan yang dapat menyebabkan Gagal Ginjal . Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa protein dapat menyesuaikan fungsi sel tubular, perubahan karakteristik pertumbuhan sel tubular serta ekspresi fenotipik protein matriks dan faktor sel, yang dapat menyebabkan basement tabung untuk mensekresikan PDGF, FN, dan MCP-1, mendorong proses dari Fibrosis ginjal.

Keempat, toksisitas mesangial dari Albuminuria: melalui pengamatan model Gagal Ginjal, akumulasi protein serum dapat ditemukan di mesangium glomerulus. Makromolekul ini deposit di wilayah mesangial dapat merusak sel mesangial cedera dan hiperplasia meningkatkan sintesis matriks mesangial, menyebabkan *Glomerular Sclerosis*.

Kadar AGEs dalam darah meningkat dalam perkembangan komplikasi mikrovaskuler pada *renal mesangial cell growth* yang terjadi selama diabetes nefropati. Ikatan AGEs dengan reseptor AGEs (RAGE) memicu timbulnya *reactive oxygen species* (ROS) dan aktivasi NF- $\kappa$ B terhadap sel target, endothelium, sel mesangial dan makrofag dengan respons peningkatan permeabilitas vaskuler, sehingga terjadi *transvascular albumin leakage* yang menimbulkan mikroalbuminuria. Deckert melaporkan bahwa heparan sulfat proteoglikan (HS-PG) berperan pada kebocoran albumin lewat glomerulus. HS-PG ini bermuatan listrik negatif dan disintesis dalam sel endotel, sel mesangial dan sel miomedial; berkurangnya densitas HS-PG pada glomerulus menyebabkan albuminuria. Shimamura dan Spiro mendapatkan densitas HS-PG berkurang 50% pada mikroalbuminuria.<sup>28</sup>

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *vascular endothelial growth factor* (VEGF) berpengaruh terhadap patogenesis terjadinya mikroalbuminuria pada pasien diabetes. VEGF meningkatkan permeabilitas kapiler pada berbagai organ dan berperan pada regulasi permeabilitas glomerulus pada ginjal. Ekspresi VEGF dibawah kontrol *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 $\alpha$ ), sehingga meningkat pada kondisi hipoksia.<sup>30</sup>

Mikroalbuminuria sebagai petanda diabetes nefropati, pada DMT1 dan DMT2 memiliki kesamaan pada patologi respons terhadap intervensi kontrol glukosa, terapi anti-angiotensin II, progresifitas menjadi gagal ginjal. Mikroalbuminuria diperiksa



adalah albumin dalam urin yang diukur dengan ELISA dengan *sheep anti-mouse albumin* seperti yang dituliskan pada petunjuk kerja. Pada gambar 3 tersebut di bawah, mikroalbuminuria merupakan petanda awal kerusakan ginjal penderita DM baik tipe 1 maupun tipe 2 yang bersifat reversibel. Hal tersebut disebabkan karena hiperfiltrasi glomerulus.

Penelitian awal yang dilakukan oleh Luiza dkk dilaporkan bahwa pada penderita DM tipe 1, progresifitas normoalbumin air kemih menjadi mikroalbuminuria adalah sebesar 10-15 % setelah di *follow up* selama 6-14 tahun, sedangkan DM tipe 2 setelah diikuti 6-9 tahun adalah sebesar 20-30%. Kurang lebih 85% kejadian *end stage renal failure* (ESRD) disebabkan karena diabetes nefropati yang timbul pada DM tipe 2. Mikroalbuminuria ditandai dengan ekskresi albumin dalam urin sebesar 30-300mg/24jam atau 20-200µg/menit.

Ginjal merupakan organ yang berperan dalam perubahan permeabilitas vaskuler sistemik, dimana glomerulus dan tubulus berperan pada terjadinya mikroalbuminuria. Ekskresi albumin dan permeabilitas vaskuler menjadikan ekskresi albumin dalam urin lebih sensitif terhadap proses inflamasi . Glomerulus menerima 25 % curah jantung dengan 70 kg albumin melewati ginjal selama 24 jam, 0,01% mengalami ultrafiltrasi glomerulus dan kemudian masuk tubulus renalis, difiltrasi dan direabsorpsi oleh tubulus proksimal melalui mekanisme endositotik berkapasitas rendah dan berafinitas tinggi, dan 10-30 mg per 24 jam terdapat dalam urin. Dengan asumsi 7gr albumin difiltrasi setiap 24 jam, dan meningkat 1 % pada kondisi

permeabilitas vaskuler sistemik sebagai respons inflamasi, maka dihasilkan tambahan 70 gram albumin pada filtrasi.<sup>32</sup>

### 2.3. VEGF

Vaskuler faktor pertumbuhan endotel, zat yang dibuat oleh sel-sel yang merangsang pembentukan pembuluh darah baru, proses yang disebut angiogenesis. VEGF juga bertindak sebagai mitogen untuk vaskuler endotel (dinding kapal) sel, merangsang sel-sel untuk membelah dan berkembang biak.

VEGF adalah polipeptida. ini secara struktural terkait dengan faktor pertumbuhan *platelet-derived* (PDGF). gen untuk VEGF ada di kromosom 6p12.

Epitel sel glomerulus atau podosit merupakan target utama pada *injury* glomerulus, pada diabetes nefropati. Permukaan podosit, seperti halnya membran basalis, di lapisi oleh molekul bermuatan negatif, termasuk *trans membrane molecule*, yang melekat pada sitoskeleton melalui molekul adaptor. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), juga dikenal sebagai faktor permeabilitas vaskular (VPF) atau vasculotropin, adalah homodimeric 34 - 42 kDa, glikoprotein heparin mengikat dengan ampuh kegiatan permeabilitas-meningkatkan angiogenik, mitogenik dan pembuluh darah spesifik untuk sel endotel. Urutan asam amino dari pameran VEGF primer struktural, serta urutan asam amino terbatas, homologi dengan rantai A dan B PDGF. Semua delapan residu sistein yang terlibat dalam

ikatan disulfida intra dan inter-rantai dilestarikan antara faktor-faktor pertumbuhan. Sebuah encoding cDNA protein yang memiliki homologi asam amino 53% urutan di wilayah PDGF-seperti VEGF telah diisolasi dari sebuah perpustakaan cDNA plasenta manusia. Protein ini, dinamakan faktor pertumbuhan plasenta (PlGF), kini diakui menjadi anggota dari keluarga VEGF faktor pertumbuhan. Berdasarkan homologi dengan VEGF, PlGF juga diusulkan untuk menjadi faktor angiogenik. Dua reseptor kinase tirosin telah digambarkan sebagai reseptor VEGF putatif. T-1 (kinase tirosin FMS-suka), dan KDR (kinase-memasukkan-domain-mengandung reseptor) protein telah terbukti mengikat VEGF dengan afinitas tinggi.

*In vitro*, VEGF adalah sel endotel mitogen kuat. Pada sel endotel kultur, VEGF dapat mengaktifkan C fosfolipase dan mendorong peningkatan cepat bebas  $Ca^{2+}$  sitosol. VEGF telah ditunjukkan untuk merangsang faktor von Willebrand pelepasan dari sel endotel dan menginduksi ekspresi faktor jaringan aktivitas dalam sel endotel serta monosit. VEGF juga telah terbukti chemotactic untuk monosit dan osteoblas. *Dalam vivo*, VEGF dapat menginduksi angiogenesis serta peningkatan permeabilitas mikrovaskuler. Sebagai faktor permeabilitas pembuluh darah, VEGF bekerja langsung pada endothelium dan tidak degranulate sel mast. Ini mempromosikan ekstravasasi fibrinogen plasma, yang mengarah ke deposisi fibrin yang mengubah tumor ekstraseluler matriks. Yang dimodifikasi ekstraseluler matriks kemudian mempromosikan migrasi makrofag, fibroblas dan sel endotel.. Berdasarkan *di vitro dan in vivo* properti, VEGF diharapkan dapat memainkan peran

penting dalam peradangan dan selama dan angiogenesis patologis normal, sebuah proses yang berhubungan dengan penyembuhan luka, perkembangan embrio, dan pertumbuhan dan metastasis tumor padat. Peningkatan kadar VEGF telah dilaporkan dalam cairan sinovial penderita rheumatoid arthritis dan sera dari pasien kanker.<sup>25,26</sup>

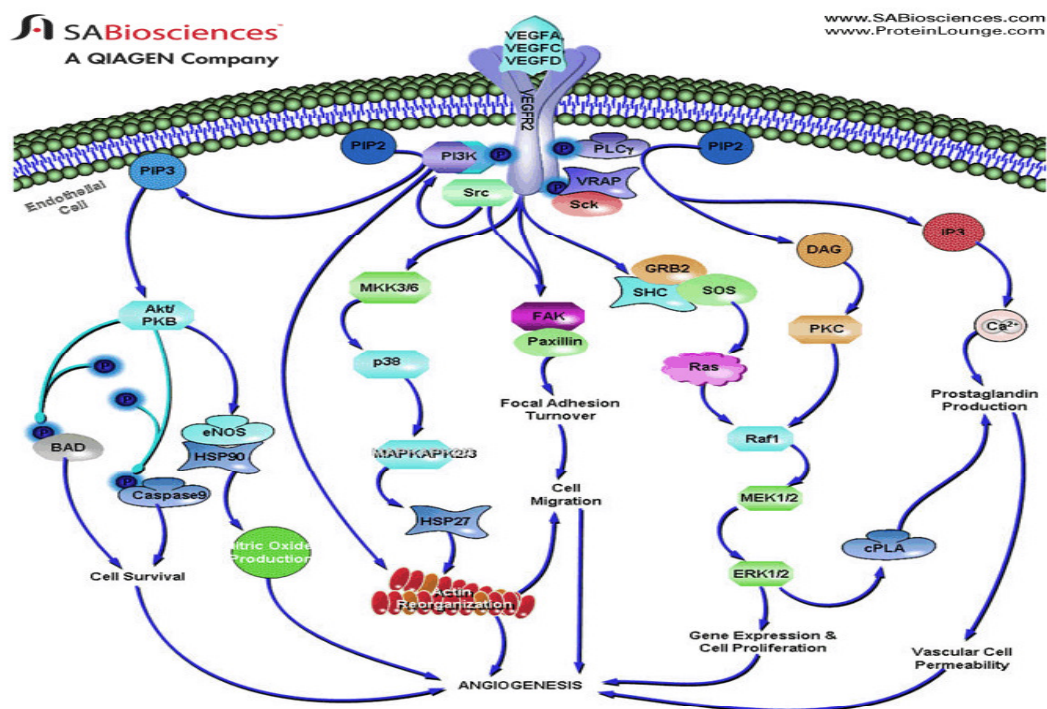
Berdasarkan pengetahuan mengenai kemampuan proliferasi, kehilangan podosit (protein podosit abnormal) dan kehilangan progresifitas sel berkontribusi terhadap proteinuri dan glomerulosklerosis baik pada DMT1 maupun DMT2.<sup>1,2</sup>

Podosit merupakan sumber utama VEGF, yang menunjukkan adanya postulat induksi peningkatan permeabilitas dan proteinuri. VEGF merupakan faktor *survival* dari sel endotel (podosit) pada lingkungan hipoksia. Kadar glukosa tinggi mengatur ekspresi VEGF pada berbagai sel, diantaranya sel tubulus proksimal. Sehingga tingginya kadar glukosa memodulasi progresifitas penyakit ginjal kronis, seperti diabetes nefropati. Protein VEGF pada supernatan di periksa dengan ELISA.<sup>52</sup>

Hipoksia meningkatkan ekspresi VEGF. *Injury ubulointerstisial* menyebabkan gangguan fungsi ginjal dan memegang peranan penting pada progresifitas penyakit ginjal kronik dalam hal ini diabetes nefropati. Hipoksia merupakan sebab utama perubahan patologis. Sel mengalami beberapa mekanisme sebagai reaksi pada keadaan hipoksia. Mekanisme ini antara lain meningkatkan ekspresi dari berbagai molekul protektif, seperti VEGF, GLUT-1 dan EPO (eritropoietin). Respons hipoksia seluler diatur oleh *hypoxia-inducible factor (HIF)/hypoxia responsible*

*elemen (HRE) system*, sebagai faktor untuk mendeteksi kerusakan akibat hipoksia karena induksi dari gen ini sehingga menyebabkan *injury* iskemia ginjal.<sup>45</sup>

VEGF sebagai faktor *survival* penting pada sel yang dihasilkan pada keadaan hipoksia, menstimulasi angiogenesis, membantu suplai vaskuler ke sel, sehingga mengurangi hipoksia. Pada ginjal, VEGF diproduksi oleh sel tubulus proksimal. Hipoksia dapat memperbesar angiogenesis *in vitro*, dan ekspresi VEGF tubulus berhubungan dengan densitas kapiler peritubuler pada model *remnant kidney*.<sup>45</sup>



Gambar 1..Jalur sinyal VEGF.<sup>66</sup>

Pembentukan pembuluh darah terjadi baik secara *in situ* diferensiasi prekursor sel endotel (angioblasts) dan asosiasi dari sel-sel untuk membentuk pembuluh yang disebut vaskulogenesis, atau pertumbuhan yang sudah ada sebelumnya, suatu

proses yang disebut angiogenesis. Vaskulogenesis menetapkan pleksus pembuluh darah utama dari embrio awal, sedangkan perkembangan pembuluh darah selama embriogenesis kemudian dan kehidupan orang dewasa terjadi terutama oleh angiogenesis. Angiogenesis adalah fitur yang tidak terpisahkan dari kecambah kapiler dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya.<sup>56</sup> Hipotesis mengatakan suasana kadar glukosa tinggi meningkatkan progresifitas dari *chronic kidney disease* dengan mengubah respon protektif VEGF ke hipoksia.<sup>56</sup> Hal ini biasanya terjadi pada orang dewasa, kecuali untuk situasi patologis (misalnya, penyembuhan luka, Retinopati Diabetika, Rheumatoid Arthritis, jantung Iskemia, Psoriasis, pertumbuhan tumor) dan selama proses fisiologis siklus haid khusus dalam sistem reproduksi wanita (misalnya, ovulasi, pertumbuhan endometrium, implantasi, *placentation*).<sup>56</sup> Setelah pembuluh darah telah dibentuk, sel-sel endotel mengalami perubahan jaringan khusus untuk menghasilkan berbagai fungsional berbeda sebagai organ. Proses ini membutuhkan bahwa sel-sel endotel menanggapi berbagai sinyal ekstraseluler yang mengaktifkan reseptor yang bertanggung jawab untuk pertumbuhan dan diferensiasi.<sup>25</sup> VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), angiopoietin dan ephrin adalah molekul kunci dalam promosi angiogenesis melalui pengaktifan VEGFR (VEGF reseptor), TIE dan ephrin disajikan pada sel endotel vaskuler, masing-masing. Sinyal VEGF memainkan peran utama dalam mempromosikan proliferasi dan diferensiasi dari keturunan endotel dari tahap awal pembangunan, sedangkan jalur angiopoietin/TIE2 bertindak sedikit kemudian untuk

mempromosikan perekrutan sel pendukung dan stabilisasi kapal.. Namun, pola kompleks dari pembuluh darah berkembang juga membutuhkan peran pembuluh darah spesifik untuk komponen jalur sinyal lainnya, termasuk ephrin, TGF-beta (*Transforming Growth Factor-Beta*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), FGF (fibroblast Pertumbuhan factor), dan Jalan Delta-Notch .<sup>25</sup>

VEGF adalah glikoprotein homodimerik heparin-mengikat yang bertindak melalui reseptor kinase endotel-spesifik tirosin, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1), dan VEGFR3 (Flt4). Selain VEGFA, keluarga VEGF faktor pertumbuhan saat ini terdiri dari lima anggota yang dikenal lainnya, yaitu PlGF (Placenta Growth Factor), VEGFB, VEGFC, VEGF-D dan VEGF homolognya virus orf. Tambahan heparin mengikat protein VEGF-seperti baru-baru ini telah diisolasi dari bisa ular. Gangguan pengkodean gen VEGF baik atau salah satu dari tiga reseptor dari keluarga VEGF, hasil dalam mematikan embrio karena kegagalan pengembangan pembuluh darah. VEGFR2 merupakan sinyal utama *transducing* VEGF reseptor untuk angiogenesis dan mitogenesis sel endotel. Setelah dimerisasi reseptor dan *autophosphorylation*, beberapa SH2 domain yang mengandung molekul transduksi sinyal diaktifkan baik secara langsung seperti PLC-gamma, VRAP (VEGF Lubang-Associated Protein), dan SCK, atau dengan mekanisme tidak langsung, seperti Src dan PI3K (Phosphatidylinositol 3 - kinase). Aktivasi PKC (Protein kinase-C) memainkan peran penting dalam VEGFA mitogenik sinyal melalui jalur Raf1-MEK-ERK. sinyal kelangsungan hidup Cell terutama dimediasi

melalui aktivasi PI3K-dimediiasi Akt / PKB (Protein kinase-B).. Aktivasi PI3K hasil akumulasi PIP3 (*Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Trisphosphate*), yang pada gilirannya menengahi membran penargetan dan fosforilasi Akt / PKB dengan mengikat (Pleckstrin homologi) domain PH-nya. target Hilir untuk Akt / jalur PKB termasuk protein BAD proapoptotic, FKHR1 (*Forkhead Transcription Factor-1*), dan caspase-9, yang menghambat fosforilasi apoptosis. Selain itu, VEGFA menginduksi ekspresi protein BCL2 antiapoptotik dan IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) anggota keluarga XIAP (*Xenopus Inhibitor of Apoptosis*), dan Survivin di HUVEC (umbilical Manusia Vein endotel) sel, menunjukkan bahwa protein ini juga memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup sel endotel.<sup>26</sup> PLC-Gamma mengkatalisis hidrolisis PIP2 (*Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate*), menciptakan IP3 (*Inositol Trisphosphate*) dan DAG (diasilgliserol), yang merangsang pelepasan Ca<sup>2+</sup> dari internal dan mengaktifkan PKC. VEGF-A-induced Ca<sup>2+</sup> mobilisasi yang terlibat dalam produksi jangka pendek Nitric Oxide dan ptg (Prostaglandin).. fosforilasi SHC mempromosikan pembentukan SHC-GRB2 (Growth Factor Lubang-Bound Protein-2)-SOS kompleks dan mendorong induksi PKC-bergantung dan Ras-independen dari jalur Raf1-MEK-ERK1 / 2 pada sel endotel sinusoidal dan sel-sel HUV.<sup>26</sup> umpan balik negatif untuk dampak mitogenik VEGF disediakan oleh cPLA2 aktivasi (fosfolipase A2-sitosol), dan biosintesis Prostaglandin. p38 jalur menyampaikan sinyal VEGF untuk mikrofilamen mendorong penyusunan ulang dari sitoskeleton aktin yang mengatur migrasi sel endotel dengan mempengaruhi modulasi aktivasi



MAPKAPK2 / 3 (*MAP kinase Activated Protein Kinase-2 / 3*) dan fosforilasi dari modulator polimerisasi F-aktin, HSP27 (*Heat Shock Protein-27*). Aktivasi FAK (*Focal Adhesi kinase*) dan Paxillin oleh VEGFA dalam sel HUVE melalui VEGFR2 mengarah ke perekrutan protein aktin-anchoring seperti Talin dan Vinculin ke plak adhesi fokus, yang penting untuk VEGFA-reorganisasi aktin diinduksi. VEGFA juga merangsang fosforilasi tirosin dari sitoplasma kinase FAK-terkait tirosin PYK2 (juga disebut RAFTK, "Terkait Adhesi Focal Tirosin kinase") dalam baris sel sumsum tulang endotel.<sup>26</sup> Meskipun VEGF dikenal sebagai faktor pertumbuhan yang kuat untuk angiogenesis terapeutik / vaskularisasi di kaki belakang dan iskemik miokardium, ia memiliki kegiatan lain yang dapat meningkatkan proliferasi dan permeabilitas sel endotel kapiler. Kegiatan ini dapat menghasilkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti angiogenesis tumor, kebocoran pembuluh darah, edema, dan radang. sitokin yang berbeda termasuk VEGFA, telah dilaporkan untuk memodulasi Kaposi Sarkoma (KS), tumor vaskuler utama umumnya terkait dengan HIV1 (*Human Immunodeficiency Virus*) dan HHV-8 (*Human Herpes Virus*) (Ref.7 & 8). Pada sel endotel, sistem sinyal VEGF-Flk1/KDR merupakan generator yang sangat penting dari NO (*Nitric Oxide*) melalui aktivasi efektor hilirnya PI3K, Akt kinase dan eNOS (*endotel Synthase NO*). NO mengatur hematopoiesis dan memodulasi AML (*Akut Myeloid Leukemia*) pertumbuhan sel.<sup>25,26,41</sup>

VEGF meningkatkan sintesis protein dan menginduksi hipertrofi sel epitel tubulus ginjal melalui peranan ERK1/2 MAPkinase, VEGF menstimulasi ERK fosforilasi yang diperlukan untuk induksi sintesis protein.

Pada ginjal normal, VEGF diekspresi kuat oleh podosit *binding site* yang berlokasi terutama pada sel endotel glomerulus. Karena lokasi anatominya yang strategis, maka VEGF berperan pada regulasi permeabilitas glomerulus dan pertumbuhan sel endotel glomerulus. Inhibisi aktifitas VEGF mencegah awal disfungsi ginjal pada ekperimental diabetes. Jadi VEGF memblokir ekspresi eNOS glomerulus.<sup>33</sup>

VEGF peranannya penting pada vaskulogenesis (*growth of new blood vessels*) dan angiogenesis (*growth of existing blood vessels*) pada perbaikan fungsi ginjal diabetes nefropati. Ekspresi VEGF seperti pada regulasi gen hipoksia (melalui HIF-1 $\alpha$  promoter respons elemen), angiotensin II dan TGF- $\beta$  juga dapat menginduksi ekspresi VEGF. Ekspresi VEGF diidentifikasi terdapat pada podosit, tubulus distal, dan duktus kolektifus. Ekspresi VEGF glomeruler akan meningkat pada respons diabetes awal, khususnya pada podosit, dan berperan pada glomerulus dan *total kidney hypertrophy*, seperti pada hiperfiltrasi. Sesuai dengan efek permeabilitas vaskuler, VEGF juga menjadi mediator jaringan ikat untuk *recruitment* dan aktivasi makrofag. Peningkatan ekspresi VEGF podosit, diperantarai oleh aktivasi AGE pada RAGE, dimulai dari *RAGE blockade inhibitor* terhadap podosit ekspresi VEGF, infiltrasi makrofag, dengan efek jangka panjang penurunan proteinuria terhadap

glomerulosklerosis pada db/db mice. Perubahan *onset* nefropati meningkatkan ekspresi VEGF di tubulus dan glomerulus. TGF- $\beta$  secara langsung merangsang produksi VEGF.

VEGF berperan pada patogenesis diabetes nefropati. Perubahan ekspresi VEGF pada ginjal tampak pada kelainan glomerular dan VEGF urin yang setara dengan berat ringannya diabetes nefropati. Secara *in vivo*, penghambatan VEGF oleh pemberian antibodi penetral VEGF pada tikus diabetes menyebabkan hiperfiltrasi dan supresi ekskresi albuminuri rata-rata.<sup>8,33</sup> VEGF juga merupakan kontributor pada terjadinya akumulasi matriks renal, dimana pemberian pengobatan dengan antibodi anti-VEGF menyebabkan kerusakan GBM penebalan (*thickening*) dan ekspansi mesangial.<sup>7</sup> Penemuan ini menunjukkan bahwa produksi VEGF pada diabetes mellitus dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler glomerulus dan eksaserbasi proteinuria. VEGF pada proteinuria menyebabkan VEGF serum berubah, berkaitan dengan risiko dan derajat albuminuria. Studi *in vitro*, terdapat hubungan antara parameter VEGF dan diabetes melitus tipe 2 (DMT2). Serum VEGF meningkat pada penderita dengan mikroalbuminuria. VEGF dapat dideteksi pada podosit dan glomerulus. Mekanisme peningkatan permeabilitas vaskuler oleh VEGF dijelaskan melalui stimulasi produksi nitrit oksida pada sel endotel dan peningkatan area filtrasi dipermukaan glomerulus oleh *augmentation glomerular capillary endothelial cell growth*.

#### 2.4. *Morinda citrifolia*. L atau mengkudu



Gambar 2. Buah mengkudu.<sup>65</sup>

Mengkudu termasuk dalam famili Rubiaceae dan mempunyai banyak spesies, di antaranya yang sudah dimanfaatkan di Indonesia adalah *M. citrifolia* dan *M. bracteata*. Selain buah dan daun, akar dan biji mengkudu juga sangat berpotensi untuk dikembangkan.<sup>1,10,20</sup>

Akar mengkudu dapat digunakan sebagai bahan obat maupun pewarna karena mengandung senyawa morindon dan morindin yang dapat memberikan warna merah dan kuning, juga biasa digunakan sebagai pewarna kain batik, biji mengkudu mengandung minyak yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku kosmetik, minyak gosok, dan bahan pembuat lilin.

Buah mengkudu mengandung berbagai senyawa yang penting bagi kesehatan. Hasil penelitian membuktikan bahwa buah mengkudu mengandung senyawa metabolit sekunder yang sangat bermanfaat bagi kesehatan, selain kandungan nutrisinya yang juga beragam seperti vitamin A, C, niasin, tiamin dan riboflavin, serta mineral seperti zat besi, kalsium, natrium, dan kalium..<sup>36</sup>

Beberapa jenis senyawa fitokimia dalam buah mengkudu adalah terpen, acubin, lasperuloside, alizarin, zat-zat antrakuinon, asam askorbat, asam kaproat, asam kaprilat, zat-zat skopoletin, damnakantal, dan alkaloid. Senyawa turunan antrakuinon dalam mengkudu antara lain adalah morindin, morindon dan alizarin, sedangkan alkaloid antara lain xeronin dan proxeronin (precursor xeronin). Xeronin merupakan alkaloid yang dibutuhkan tubuh manusia untuk mengaktifkan enzim, mengatur dan membentuk struktur protein.<sup>37</sup>

*Xeronin* dapat memodifikasi struktur molekular protein, sehingga *xeronin* memiliki aktifitas biologis yang luas. Pada saat protein seperti enzim, reseptor atau sinyal transduksi tidak dalam kondisi yang baik, maka tidak dapat bekerja dengan baik. *Xeronin* akan berinteraksi dengan protein dan membuatnya berlipat kali menjadi kondisi yang bagus dan fungsi yang baik. Jadi pada saat masalah sel dan struktur bermasalah, *xeronin* sangat bermanfaat. Hipotesis mengatakan efek farmako aktif enzim pada pengobatan tradisional *Morinda citrifolia* L adalah *xeronin*. Alkaloid ini penting pada pengaturan metabolik normal.<sup>39</sup>

Penelitian menggunakan *Tahitian noni juice* (TNJ) (1,5mg/ml) memiliki efek aktifasi *cannabinoid 2* (CB2) dan menghambat reseptor *cannabinoid 1* (CB1) yang tergantung pada konsentrasi. Pada pemberian TNJ *ad libitum* untuk 16 hari menurunkan produksi IL-4 dan meningkatkan produksi sitokin IFN- $\gamma$ . Produk komersial ini berasal dari buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang telah di komersialisasikan di Amerika sejak tahun 1990 dan meningkat pendistribusiannya

keseluruh dunia. Pengetahuan tentang fitokomia, farmakologi, dan aspek *safety* dari *Morinda citrifolia* dan hubungannya dengan berbagai kesehatan tubuh dan keuntungannya telah dibicarakan. Berdasarkan pemeriksaan toksikologi, *Morinda citrifolia* L diketahui aman.<sup>20</sup>

Peneliti lain menyelidiki mekanisme yang terlibat dalam efek imunomodulator dari mengkudu L. (noni) in vitro dan in vivo pada tikus. In vitro, Tahitian Noni Juice (TNJ) dan jus buah Noni konsentrat (NFJC) (1, 5mg/mL) *potently* mengaktifkan cannabinoid 2 (CB2), tetapi menghambat reseptor cannabinoid 1 (CB1) dengan cara yang tergantung konsentrasi. In vivo, pemberian oral TNJ ad libitum selama 16 hari penurunan produksi IL-4, tetapi meningkatkan produksi IFN-gamma. Hasil ini menunjukkan bahwa noni memodulasi sistem kekebalan tubuh melalui mengaktifkan dari reseptor CB2, dan menekan dari IL-4, tetapi meningkatkan produksi sitokin IFN-gamma.. Hal ini juga dapat memberi efek menguntungkan immunomodulation dalam kondisi yang melibatkan respon imun tidak memadai.

Polisakarida dalam mengkudu memiliki kemampuan untuk menginhibisi TNF- $\alpha$  dan bersifat antioksidan. *Polisakarida-rich fraction*, yang dihasilkan dari jus buah mengkudu melalui presipitasi etanol, menstimulasi pelepasan sitokin seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 dan IF- $\gamma$ , tetapi tidak pada IL-2. Polisakarida jenis sakarida ester asam lemak mempunyai kemampuan menginhibisi pada 0,46 -0,79 mg.<sup>41</sup> Rutinosa merupakan sakarida memiliki efek penting karena memperkuat kapiler. Hal ini

berarti rutinosa dapat member efek terhadap glomerulus ginjal yang tersusun dari kapiler. Penelitian lain membuktikan rutinosa merupakan antioksidan kuat yang memerangi radikal bebas.<sup>42</sup>

Polifenol menunjukkan kerja sebagai inhibitor ekspresi dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF), suatu pro-angiogenik mayor dan faktor proaterosklerotik, pada VSMCs melalui pencegahan aktivasi redoks-sensitif dari p38 MAPK-pathway. Pada studi tentang potensi inhibitor dari polifenol pada SMCs terlihat bahwa *presenting hydroxyl residu* pada posisi 3' dapat menghambat induksi  $-\text{PDGF}_{\text{AB}}$  dan ekspresi VEGF melalui pencegahan aktivasi p38 MAPK dan JNK. Polifenol memiliki keistimewaan aktifitas sebagai *radical scavenging*.<sup>43</sup>

Flavonoid adalah berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen ini akan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil dan berhenti melakukan gerakan ekstrim, sehingga tak merusak lipida, protein, dan DNA (materi genetik) yang menjadi target kerusakan selular.<sup>44</sup>

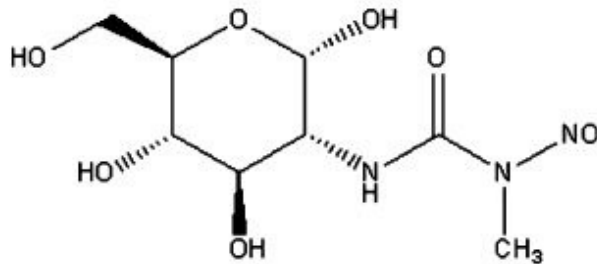
Vitamin C dan E merupakan antioksidan yang merangsang pertumbuhan sel endotel, menghambat pertumbuhan sel otot, mempengaruhi MAPK, dan mempertahankan redoks-homeostasis pada tingkat statis (*steady*) terutama penting dalam konteks regenerasi jaringan dan diketahui adanya peran ROS dan nutrisi antioksidan (vitamin C, E dan polifenol) pada redoks-homeostasis. Antioksidan dapat mempengaruhi jalur  $-\text{MAPK}$  melalui modulasi ROS, atau langsung

mengaktifasi MAPK. Antioksidan dan sitoprotektif protein mencegah ROS dalam menginduksi apoptosis sel ginjal dan DN. Penelitian menunjukkan target stress oksidatif, nitrosatif, dan apoptosis sel ginjal diketahui disebabkan oleh hiperglikemia melalui pemberian antioksidan atau sitoprotektif protein. Antioksidan yang diberikan pada binatang menunjukkan efek protektif pada pengembangan DN. Komponen endogenous antioksidan seperti glutathione, thioredoxin, dan biliverdin/bilirubin dan diit antioksidan, seperti vitamin C, E dan beta karoten dapat memperbaiki keseimbangan redoks. Sejumlah sel sebagai stress oksidatif secara signifikan menurun setelah pemberian antioksidanvitamin C pada tikus DMT2 dibanding dengan yang tidak diberi. Seperti vitamin C, vitamin E menormalkan diabetes-induksi disfungsi ginjal seperti volume glomerulus dan produksi TGF- $\beta$  pada STZ – induksi tikus diabetes. Kadar glukosa tinggi menginduksi formasi ROS, sel mesangial dan sel apoptosis tubulus proksimal, yang dapat diinhibisi pada model in vitro, menggunakan antioksidan taurin.<sup>34,45</sup>

Karotenoid, sebagai antioksidan memiliki efek protektif pada DN pada model mencit DMT2, terutama pada hiperglikemia, fokus pada sel mesangial. Akumulasi karotenoid pada mitokondria kultur sel mesangial manusia menunjukkan penurunan produksi ROS-modified protein pada mitokondria. Karotenoid mencegah progresifitas DN melalui efek ROS scavenging pada mitokondria sel mesangial dan diharapkan sangat bermanfaat pada pengelolaan DN.<sup>46</sup>



### 2.5. *STREPTOZOTOCIN (STZ)*:



Gambar 3. Rumus kimia *Streptozotocin*.<sup>47</sup>

#### *Streptozotocin*

*Streptozotocin* (2-deoxy -2- (3- (methyl-3-nitrosoureido) – Dglucopyranose, C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) adalah kombinasi dari glucosamine-nitrosourea. *Streptozotocin* toksik pada sel dengan merusak DNA, meskipun mekanisme lainnya juga berperan. Struktur *streptozotocin* cukup mirip dengan glukosa sehingga ditransportasikan ke dalam sel melalui protein transpor glukosa<sup>16</sup> GLUT2, tetapi hal ini tidak terjadi pada transpor glukosa yang lain. DNA yang rusak akibat pemberian *streptozotocin* akan menginduksi aktivasi Poli-adenosine diphosphat (ADP)-ribosylation, Poli ADP-ribosylation mengontrol deplesi seluler nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) dan adenosine triphosphat (ATP). Kemampuan ATP dephosphorylation setelah pemberian *streptozotocin* mensuplai sebuah substrat untuk menghasilkan oksidasi xantin dalam pembentukan radikal superoksida. Akibatnya, akan dihasilkan hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Selain itu, *streptozotocin* membebaskan sejumlah nitrit oksida yang menghambat kegiatan akonitase dan ikut serta dalam

kerusakan DNA. Sebagai akibat dari aksi *streptozotocin*, sel  $\beta$  akan mengalami kehancuran oleh karena nekrosis .

Aksi biokimia dan fisiologi: N-nitroso merupakan komponen yang bereaksi sebagai donor nitrit oksida pada pulau langerhans (*pancreas islets*), menginduksi kematian pada sel yang mensekresikan insulin (*insulin secreting cell*), membuat hewan coba menjadi diabetes, merupakan agen metilasi potensial DNA yang menginduksi kerusakan kromosom, sitotoksik pada *neuroendocrine tumors cell lines* yang mengekspresi *glucose transporter (GLUT2)*.<sup>48</sup>

*Streptozotocin (STZ)* menginduksi diabetes paling sering digunakan pada penelitian model binatang tikus. Hal ini karena lebih awal menimbulkan lesi mikroangiopati, seperti penebalan membrana basalis (*basement membrane (BM) thickening*).

Efek metabolik dari *streptozotocin* pada hiperglikemia, sedangkan keton dan *plasma free fatty acid* normal. Peneliti lain mengatakan keduanya menimbulkan destruksi sel beta dan tidak toksisitas ekstra-pankreatik. Namun demikian, dibandingkan dengan *aloxan*, *streptozotocin* lebih efektif dalam induksi diabetes pada binatang percobaan, dan lebih spesifik pada sel beta dan menginduksi organ lain secara reversibel, seperti ginjal dan medulla adrenal, dan tidak butuh dosis yang besar, melihat induksi *streptozotocin* tikus diabetes, memiliki parameter biokimia yang merupakan *diabetologist's armory* pada penatalaksanaan dan manajemen human DM, ia mencatat adanya kesamaan human status diabetes dari *streptozotocin*

–induced long term non ketonuri dan diabetes animal ketoasidosis, sesuai penatalaksanaan diabetes mellitus.<sup>49,51</sup>

## 2.6. Tikus *Sprague Dawley*

Tikus Sprague Dawley yang merupakan jenis outbred tikus albino serbaguna digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Tikus jenis ini pertama kali diproduksi oleh peternakan Sprague Dawley. Rata-rata ukuran berat tubuh tikus Sprague Dawley adalah 10.5. Berat badan dewasa adalah 250-300g bagi betina, dan 450-520g untuk jantan. Hidup yang khas adalah 2,5-3,5 tahun. Tikus diinduksi STZ menjadi tikus diabetes STZ menunjukkan peningkatan GFR pada single/nephron GFR, total renal plasma flow dan single nephron plasma flow, sesuai dengan penemuan pada nefropati human. Berbagai mekanisme diperkirakan terjadi pada hiperfiltrasi tikus diabetes diantaranya peningkatan ekspresi angiotensinase dengan stimulasi arteri, kontraksi otot polos mesangial yang akan meningkatkan tekanan intraglomerular dan eksek faktor pertumbuhan (VEGF).

Aktifitas mitogenik merangsang pertumbuhan mesangium dan otot polos, seluler hipertrofi dan mesangial kolagen sintesis, *renal glucose metabolism*, oksigen konsumsi, kontribusi hiperperfusi, aldose reduktase (AR) menginisial *polyol pathway*,<sup>(16)</sup> aktifitas renal kalikrein, produksi prostaglandin vasodilatator, reduksi ekspresi nitrit oksid sintesis pada *macula densa* dan peningkatan *atrial natriuretic*

*peptide* (ANP) pada sirkulasi. Meskipun demikian kontribusi masing-masing pada hiperfiltrasi dan glomerulopati tak jelas mana yang paling bertanggung jawab pada kegagalan fungsi ginjal pada berbagai penelitian binatang.<sup>16</sup>

Penelitian awal STZ- tikus diabetes, *polyol pathway* berhubungan dengan penurunan renal aktifitas ATPase ginjal. Hiperglikemi menyebabkan pengaturan intraseluler pool dari mioinositol, suatu precursor diasilgliserol (DAG), kofaktor pada aktivasi ATPase pada protein kinase C (PKC). Mioinositol deplesi berkorelasi pada kompetisi glukosa untuk masuk kedalam sel. Tetapi penelitian lain dengan mioinositol suplementasi memberikan hasil yang berbeda. Hiperfiltrasi tidak terkoreksi dan tidak berkaitan dengan perubahan aktivasi ATPase, kreatinin klirens, dan tidak terjadi tekanan glomerulus. Kesimpulan, nefropati disebabkan oleh hiperglikemia dimediasi oleh mekanisme turunnya mioinositol dan rendahnya aktifitas ATPase. Hiperglikemi terkait lesi adalah akhir dari jalur polioliol disebabkan glikasi glomulus dan komponen tubulus. Hal ini akan mempengaruhi stress oksidatif terkait produksi glikooksidasi dan produksi radikal reaktif oksigen selama persisten hiperglikemia.<sup>16</sup>