

PENGARUH PEMBERIAN OX-LDL TERHADAP AKTIVASI NF- κ B DAN PPAR γ SERTA APOPTOSIS PADA KULTUR HUVEC's

THE EFFECT OF OX-LDL ON NF- κ B AND PPAR γ ACTIVATION AND APOPTOSIS OF HUVEC's CULTURE

Wibi Riawan*, Samodijanti Wibowati*

* Lab. Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Oxidized LDL (ox-LDL) causes activation and dysfunction of endothelial cells through NF κ B activation after binding process of ox-LDL to LOX-1. One of ox-LDL components had been known as the activator of PPAR γ . This study was done to see the effect of ox-LDL on NF κ B and PPAR γ activation and apoptosis of HUVEC's culture. HUVEC's culture was divided into 3 groups : control (without any treatment) and 2 groups which were treated with ox-LDL 25 μ g/mL and 50 μ g/mL. Activation of NF κ B and PPAR γ were determined by immunodoublestaining using mouse monoclonal anti NF κ B and mouse monoclonal anti PPAR γ after 30 minutes exposure of ox-LDL. The expression of TNF α and apoptotic cell were determined by immunodoublestaining using TUNEL fragmented DNA labeling and goat polyclonal anti human TNF α after 24 hours exposure of ox-LDL. HUVECs culture that had been treated with 25 μ g/ml and 50 μ g/ml of ox-LDL, showing activation of NF κ B but not PPAR γ . This treated endotel showed apoptotic characteristic which had conformed with DNA fragmented. These cells also showed the increase of TNF α expression on the cytoplasm. Ox-LDL could increase translocation of NF κ B gen transcription to nucleus followed by the increase of TNF α that can cause apoptotic of the cells.

Key words: ox - LDL, Endothel, NF- κ B, PPAR γ , Apoptosis

PENDAHULUAN

Disfungsi endotel merupakan tahap awal aterosklerosis. Hiperkolesterolemia dapat menyebabkan akumulasi lipid pada pembuluh darah mengakibatkan perubahan struktural dan fungsional endotel. LDL (*low density lipoprotein*) peka terhadap oksidasi yang dapat terjadi pada sel endotel, sel otot polos dan makrofag. LDL teroksidasi (*Oxidized LDL*) menyebabkan aktivasi endotel dan perubahan dalam karakteristiknya. Efek aterogenik LDL teroksidasi didapatkan dari komponen lipid yang teroksidasi. Studi pada kultur sel menunjukkan efek proliferasif pada sel otot polos yang merupakan penyebab migrasi sel otot pada intima dan pada restenosis (1).

LDL dimodifikasi secara oksidatif oleh *cell-free system* yaitu *transitional metals* seperti *iron (Fe)*, dan *Copper (Cu)* dan oleh semua sel utama di dinding arteri seperti sel endotel, sel otot polos, dan monosit makrofag. Mekanisme oksidasi LDL *in vivo* yang fisiologis diperkirakan dimediasi oleh *superoxide*, *myeloperoxidase*, *15-lypxygenase*, *peroxynitrite*, dan *thiols*, melalui sistem yang berbeda. Secara *invitro*, oksidasi LDL oleh *ion metal (Cu²⁺)* terjadi melalui 3 fase: fase awal (*initial lag*) yaitu konsumsi

antioksidan endogen, kemudian fase propagasi dengan oksidasi cepat *unsaturated fatty acids* menjadi *lipid hydroproxides*, dan fase dekomposisi dimana *hydroperoxides* dirubah menjadi *reactive aldehydes*. Interaksi aldehyd ini dengan *positively charged ϵ -amino groups* dari residu lisin yang menyebabkan LDL lebih bermuatan negatif. Hal ini menyebabkan penurunan afinitas terhadap reseptor LDL dan meningkatkan afinitas pada *scavenger receptor* (2,3).

Disfungsi endotel yang disebabkan LDL-teroksidasi pada patogenesis aterosklerosis adalah melalui aktivasi LOX-1 (*lectin like ox-LDL receptor*). LOX-1, diidentifikasi sebagai reseptor untuk LDL-teroksidasi pada sel endotel, dapat diekspresikan pada makrofag dan sel otot polos. Ekspresi LOX-1 pada sel endotel vaskuler diinduksi oleh *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), angiotensin II dan *shear stress*. Ambilan LDL-teroksidasi melalui LOX-1 *in vivo* tidak menyebabkan akumulasi lipid tetapi menyebabkan aktivasi dan disfungsi sel endotel. *Superoxide anion*, *hydrogen peroxyde* dan homosistein dapat meningkatkan ekspresi LOX-1 (4,5).

Jalur signal untuk kerusakan endotel oleh LDL-teroksidasi antara lain melalui ROS yang dibentuk intraseluler, aktivasi protein kinase dan faktor transkripsi. Cominacini *et al* (2001), menunjukkan bahwa ikatan LDL-

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXII, No.1, April 2006
Korespondensi: Wibi Riawan; Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Unibraw; Jl. Veteran Malang 65145; Telp. (0341) 580993 ext. 128

teroksidasi ke LOX-1 mengawali aktivasi (NF- κ B), demikian juga dengan peningkatan pembentukan ROS (6).

NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang memainkan peranan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. NF- κ B pada keadaan normal berada dalam keadaan inaktif karena ikatan dengan Inhibitor κ B (I κ B) dan berada di sitoplasma. NF- κ B dapat diaktivasi oleh berbagai stimuli antara lain: sitokin, ROS, LPS, oxidized LDL dan COX, yang mengakibatkan pelepasan ikatan κ B sehingga NF- κ B masuk kedalam inti sel dan meregulasi berbagai mediator inflamasi, antara lain: TNF- α , IL-1, (VCAM), dan ICAM. Hal ini memicu terjadinya disfungsi endotel yang berakibat terjadinya aterosklerosis (7,8).

PPAR- γ merupakan faktor transkripsi yang penting dalam meregulasi ekspresi dan diferensiasi gen adiposit, sebagai regulator gen target yang terlibat pada metabolisme glukosa dan lemak. PPAR- γ terdiri 3 isoform, PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, PPAR- γ 3. Pada konsentrasi tinggi prostaglandin A,D,J dapat mengaktifasi PPAR terutama PPAR- γ dan 15d-PGJ₂ merupakan "potent activator". Obat-obatan antidiabet seperti Thiazolidinedione (TZD) atau "glitazone" (troglitazone, pioglitazone, ciglitazone dan englitazone) merupakan ligan PPAR γ (9). Diketahui bahwa golongan asam lemak, turunan dari eucosanoid dan 15D-PGJ₂ (15-deoxy-Prostaglandin J₂) merupakan ligan alamiah dari PPAR γ . Selain itu dinyatakan bahwa 9-hydroxy-(S)-10,12-octadecadienoic acid [9(S)-HODE, yang dikenal sebagai komponen penyusun ox-LDL merupakan aktivator PPAR γ (10). Pada penelitian ini akan diuji pengaruh pemberian ox-LDL terhadap aktivasi NF- κ B dan PPAR γ serta apoptosis pada kultur HUVEC's.

METODE

Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel penelitian ini adalah sebagian umbilikus (tali pusat) yang diambil dari wanita yang partus di rumah sakit yang sesuai dengan kriteria inklusi, yaitu kehamilan fisiologis dan eksklusi, yaitu kehamilan dengan pre-eklampsia/eklampsia, hipertensi, *post date*, *premature rupture membrane*, *grande multipara*, *gestasional diabetes* **Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs) (11).**

Umbilikus dibersihkan dari darah yang ada dengan dengan alkohol 70 % dan masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena. Kanula dimasukkan pada salah satu ujung vena (\pm 1 cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena dibersihkan / dibilas dengan 10 ml larutan PBSA melalui kanula yang telah terpasang dengan spuit 10 cc. Setelah bersih, ikat ujung umbilikus yang lain dengan ikatan yang kuat (atau diklem). Larutan *Collagenase* 0,15ng/ml dimasukkan dan

spuit dibiarkan menancap pada kanula. Selanjutnya umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua belah tangan dan didekatkan dengan Bunsen (agar mencapai suhu \sim 37 °C) selama 7 menit. *Collagenase* (yang telah mengandung endotel) dikeluarkan dari umbilikus dengan cara menyedot melalui spuit yang masih terpasang pada ujung kanula. Kemudian larutan *Collagenase* tersebut dimasukkan pada tabung sentrifuge steril 15 cc. Umbilikus dibilas dengan 8 cc larutan PBS A untuk membilas sel endotel yang masih tersisa. Kemudian larutan disedot kembali dengan ditambahkan ke dalam tabung sentrifuge. Larutan yang telah mengandung sel endotel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 4 ml medium kultur pada pellet dan diresuspensi dengan cara pipetting sehingga sel-sel endotel terpisah. Larutan dipindahkan ke dalam *well plate* diameter 35 cm² yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2%, ditambahkan medium sampai 2ml/medium kemudian dimasukkan pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37° C selama 20 menit. *Well plate* diambil dan sel endotel diamati dengan mikroskop *inverted* perbesaran 400x. Jika sel sudah menempel pada dasar well, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan larutan serum free 3 ml melalui filter 0,2 μ m. Serum free diambil dengan spuit steril dan digantikan dengan medium kultur 4 ml melalui filter 0,2 μ m. *Well plate* dimasukkan ke dalam inkubator sampai *monolayer* kurang lebih 3-4 hari dan medium diganti setiap 2 hari sekali. Sel endotel ditandai dengan gambaran sel berbentuk heksagonal atau *cobblestone* dengan inti eksentrik. Pada hari ke 3-4, setelah tercapai kondisi optimal dan konfluensi 80% maka HUVECs diinkubasi dengan dipapar LDL teroksidasi untuk melihat aktivasi NF- κ B dan PPAR γ serta ekspresi protein TNF- α dan kejadian apoptosis.

Perlakuan dengan LDL Teroksidasi

Cara pembuatan larutan LDL teroksidasi: dibuat larutan stok 2mg/ml atau 2000 μ g/ml. Untuk mendapatkan konsentrasi 50 μ g/ml maka diambil 0,05ml oksidasi LD untuk 2ml volume total medium.

Untuk mengetahui efek oxLDL terhadap aktivasi NF- κ B dan PPAR γ , TNF- α dan apoptosis, kultur sel endotel dipapar dengan 25 μ g/ml dan 50 μ g/ml LDL teroksidasi kemudian diamati setelah 30 menit untuk aktivasi NF- κ B dan PPAR γ , kemudian 24 jam untuk ekspresi TNF- α dan apoptosis.

Immunodoublestaining Menggunakan Monoclonal Anti p50/p65 dan Monoclonal Anti PPAR γ

Biakan sel dicuci dengan bufer HEPES selama 30 menit dan difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Dikering anginkan dan dicuci dengan PBS pH 7,4. Diaplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan dicuci dengan

PBS pH 7,4. Bloking menggunakan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan Mouse monoclonal anti p50-p65 human adsorbed 1ng/ml dan diinkubasi semalam. Dicuci dengan PBS pH 7,4, ditetesi dengan antibodi sekunder anti mouse IgG berlabel biotin dan diinkubasi selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan SA-HRP (*Strept-Avidin horse radish peroxidase*) selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 dan diaplikasikan substrat untuk HRP, yaitu DAB (*Diamono Benzidine*). Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4, diaplikasikan *doublestaining blocking* selama 30 menit dan selanjutnya diinkubasi dengan Mouse monoclonal anti PPAR γ human adsorbed 1ng/ml dan diinkubasi semalam pada 4°C. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan diinkubasi pada antibodi sekunder, anti mouse IgG berlabel AP (*alkaline phosphatase*) selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan diinkubasi pada substrat untuk AP, Fast Red selama 30 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH₂O. Dikeringkan dan ditutup *coverglass*. Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, NF- κ B teraktivasi akan tampak warna coklat pada inti sel sedangkan jika PPAR γ teraktivasi akan tampak warna merah pada inti sel.

Doublestaining DNA Terfragmentasi (TUNEL) dan Ekspresi TNF α (imunositokimia)

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan diinkubasi menggunakan 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi pada 3% H₂O₂ selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit diinkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labelling* selama 60 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi dengan Peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB – *Diamino Benzidine*) selama 20 menit pada suhu ruang. Sel dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Bloking spesifik protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan *goat poliklonal anti human TNF α* semalam pada suhu 4°C. Dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Diinkubasi menggunakan anti *goat AP conjugated* selama satu jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan diinkubasi pada substrat untuk AP, Fast Red selama 30 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit,

dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH₂O. dikeringkan dan ditutup *coverglass*. Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel sedangkan ekspresi TNF α ditunjukkan dengan warna merah pada sitoplasma sel.

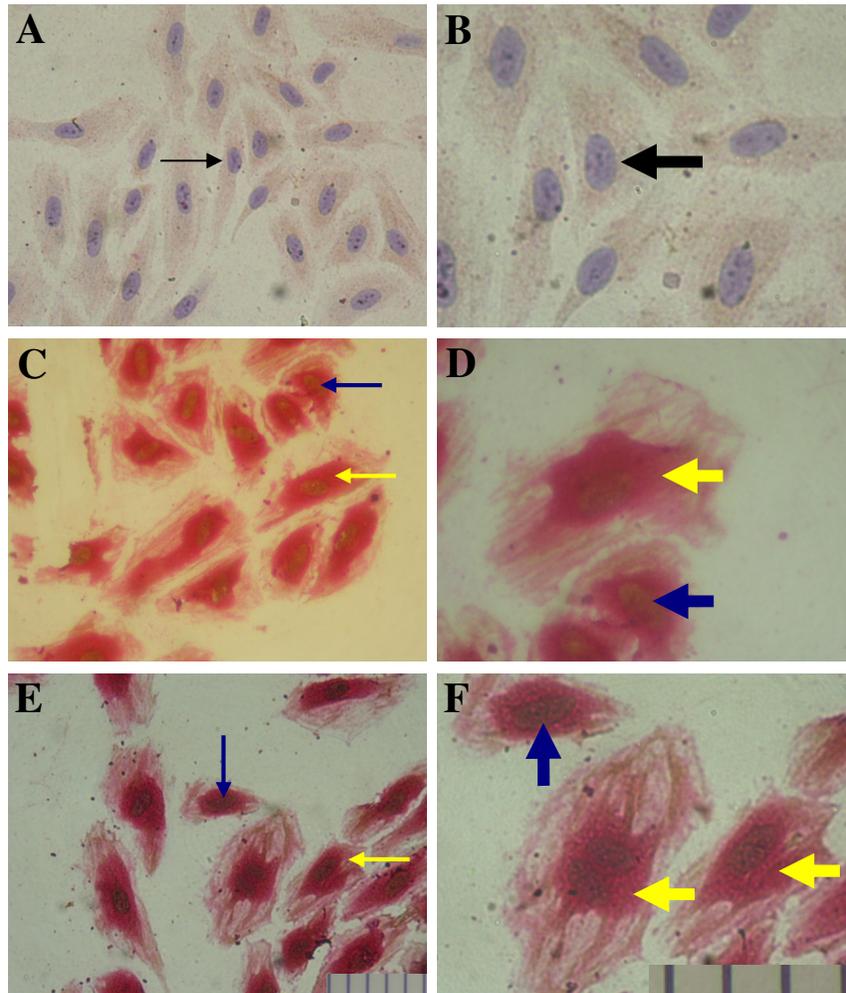
HASIL PENELITIAN

1. Aktivasi NF κ B namun tidak PPAR γ Kultur HUVEC's yang dipapar ox-LDL

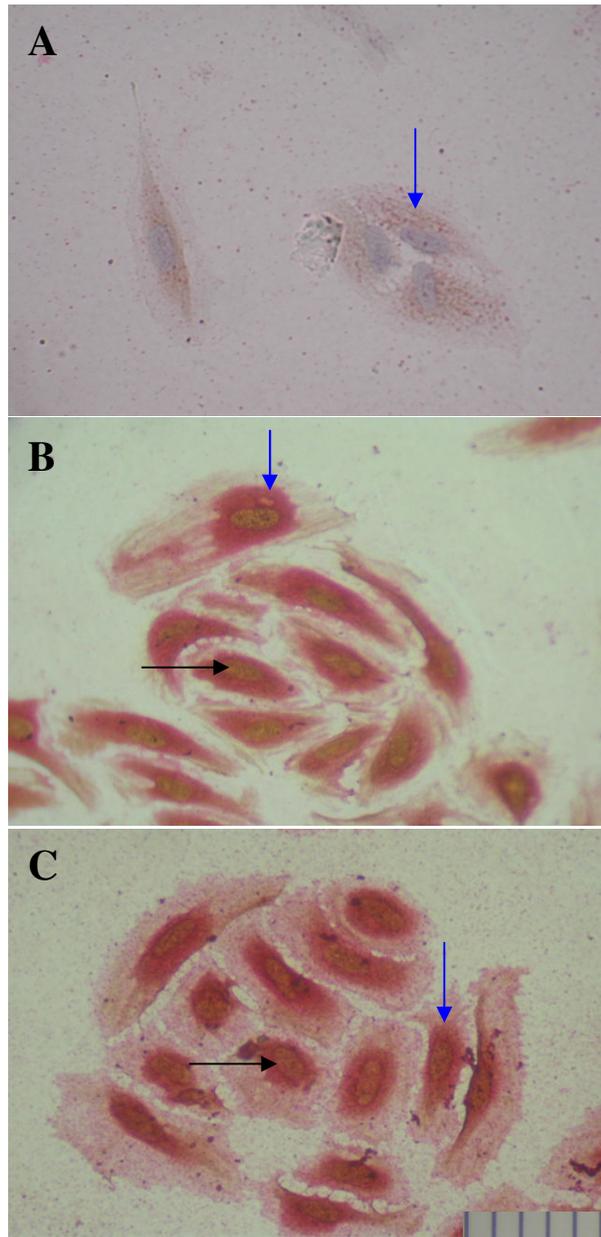
Pada penelitian sebelumnya pada tikus dengan diet asam lemak linoleat dan linolenat, didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan aktivasi PPAR γ sel endotel aorta secara signifikan. Pada penelitian ini, dengan induksi 25 ug/mL dan 50 ug/mL ox-LDL, dengan menggunakan dua antibodi *mouse monoclonal anti NF κ B* dan *mouse monoclonal anti PPAR γ* , tampak bahwa terjadi aktivasi NF κ B. Tampak inti berwarna coklat yang merupakan visualisasi dari cromogen DAB (*diaminobezidine tetracloride*). Dan hal ini tidak terjadi pada PPAR γ . PPAR γ , dengan visualisasi Fast Red, tampak berwarna pada sitoplasma sel dan tidak terjadinya translokasi PPAR γ pada sel endotel dengan induksi ox-LDL 25 ataupun 50ug/mL mengindikasikan tidak terjadi aktivasi PPAR γ .

2. Apoptosis dan Ekspresi TNF α

Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan terhadap kejadian apoptosis kultur HUVEC's yang diinduksi dengan ox-LDL 25 dan 50 ug/mL. Dengan menggunakan metode *doublestaining* yang memadukan pemulasan DNA terfragmentasi sistem TUNEL dengan imunositokimia menggunakan poliklonal anti TNF α . Tampak bahwa induksi ox-LDL 25 dan 50ug/mL menyebabkan apoptosis sel-sel endothel HUVEC's, yang ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel – yang merupakan visualisasi dari cromogen DAB – dan karena fragmentasi DNA pada sel-sel yang mengalami apoptosis dikenali oleh enzim dioxigenin. Dan peningkatan kejadian apoptosis pada kultur HUVEC's yang diinduksi dengan ox-LDL disertai dengan peningkatan ekspresi TNF α , yang tampak sebagai warna merah pada sitoplasma, yang merupakan visualisasi dari cromogen Fast Red.



Gambar 1. Kultur HUVEC's yang dipulas dengan metode *immunodoublestaining* menggunakan dua antibodi, *mouse monoclonal anti NFκB* dan *mouse monoclonal anti PPARγ* yang menggunakan substrat DAB (warna coklat) untuk NFκB dan Fast Red (warna merah) untuk PPARγ. Tampak bahwa dengan induksi ox-LDL dosis 25 ug/mL (panel C dan D) dan 50ug/mL (E dan F) terjadi aktivasi NFκB (tanda panah warna biru), namun tidak dengan PPARγ, tampak sebagai sitoplasma berwarna merah (tanda panah warna kuning) sedangkan hal ini tidak terjadi pada sel-sel HUVEC's kontrol (tanda panah berwarna hitam), panel A,B. Tampak bahwa terjadi peningkatan ekspresi PPARγ pada sitoplasma sel (tanda panah berwarna kuning) kelompok induksi ox-LDL 25 ug/mL dan 50 ug/mL. 1bar = 0,01mm



Gambar 2. Kultur HUVEC's yang dipulas dengan metode *doublestaining* DNA terfragmentasi (TUNEL) dan ekspresi $TNF\alpha$ (imunositokimia) yang menggunakan substrat DAB (warna coklat) untuk DNA terfragmentasi dan Fast Red (warna merah) untuk ekspresi $TNF\alpha$. Tampak bahwa dengan induksi ox-LDL dosis 25 ug/mL (panel B) dan 50ug/mL (C) terjadi apoptosis sel HUVEC's (tanda panah warna hitam) namun tidak dengan PPAR γ , (tanda panah warna biru) sedangkan hal ini tidak terjadi pada sel HUVEC's kontrol (A,B).

DISKUSI

Kerentanan terhadap aterosklerosis dihubungkan dengan peningkatan populasi spesifik dari apoprotein B yang meliputi peningkatan oksidasi LDL dan perubahan pada bentuk biologisnya. Oksidasi lipoprotein dapat dipotensiasi oleh tingginya jumlah substrat LDL-teroksidasi yang tersedia pada hiperkolesterolemia, oleh penurunan antioksidan alami yang berikatan dengan LDL (12,13).

Disfungsi endotel yang disebabkan LDL-teroksidasi pada patogenesis aterosklerosis adalah melalui aktivasi LOX-1 (*lectin like ox-LDL receptor*). Ambilan LDL-teroksidasi melalui LOX-1 *in vivo* tidak menyebabkan akumulasi lipid tetapi menyebabkan aktivasi dan disfungsi sel endotel. *Superoxide anion*, *hydrogen peroxyde* dan homosistein dapat meningkatkan ekspresi LOX-1 (4,5). Jalur signal untuk kerusakan endotel oleh LDL-teroksidasi antara lain melalui ROS yang dibentuk intraseluler, aktivasi protein kinase dan faktor transkripsi. Pada penelitian ini, adanya aktivasi NF κ B dapat dipastikan oleh pengaruh dari induksi ox-LDL dan ini tidak ditemui ada PPAR γ dan walaupun demikian terjadi peningkatan ekspresi PPAR γ dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan ox-LDL. Sesuai dengan Cominacini *et al* (2001) bahwa ikatan LDL-teroksidasi ke LOX-1 mengawali aktivasi NF- κ B, demikian juga dengan peningkatan pembentukan ROS. Dari fakta uji laboratorium dinyatakan bahwa efek dari LDL-teroksidasi dihambat oleh antibodi monoklonal terhadap LOX-1(6). Perlakuan HCAEC (*Human Coronary artery Endothelial Cells*) dengan LDL-teroksidasi berakibat pada aktivasi MAPK (*mitogen activated protein kinase*) dan NF- κ B dan ekspresi beberapa gen. Eksperimen lebih lanjut menunjukkan bahwa antisense terhadap LOX-1 mRNA menghambat jalur transduksi signal yang dipicu LDL-teroksidasi (5,6).

Schaiff *et al.* (2000) memberikan bukti bahwa beberapa ox-LDL endogenus, termasuk 9Shydroxy-10E,12S-octadecadienoic acid (9-HODE), 13Shydroxy-9Z, 11E-octadecadienoic acid (13-HODE) dan 15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid (15-HETE) merupakan ligan alamiah dari PPAR γ (14). Stimulasi dari ligan-ligan ini akan mengaktivasi PPAR γ dan mentranskripsi gen CD36, yang mengawali ambilan terus menerus dari ox-LDL sehingga terbentuk *foam cells*. Pada penelitian ini dengan perlakuan menggunakan ox-LDL pada kultur HUVEC's tidak menunjukkan adanya aktivasi pada PPAR γ , namun demikian penelitian terdahulu, didapatkan gambaran bahwa dengan induksi ox-LDL mengaktivasi PPAR γ makrofag jaringan dan hal ini tidak terjadi pada sel-sel

limfosit. Dari hasil ini dapat diasumsikan bahwa aktivasi PPAR γ oleh ox-LDL kemungkinan hanya terjadi pada sel sel makrofag dalam rangka melakukan ambilan atau proses fagositosis ox-LDL. Fakta pada sel-sel limfosit mendukung hal tersebut, dimana limfosit tidak melakukan fagositosis ox-LDL. Dalam kaitan tersebut, bahwa aktivasi PPAR γ berkaitan erat dengan diferensiasi dan proliferasi sel terutama pada sel-sel lemak dan makrofag (15).

Dinyatakan lebih lanjut oleh Martin *et al.* (2000) bahwa NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang memainkan peranan penting dalam menginduksi regulasi berbagai macam gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel (7). Dan hal ini didukung oleh Collins and Cybulsky (2001), NF- κ B pada keadaan normal berada dalam keadaan inaktif karena ikatan dengan Inhibitor κ B (I κ B) dan berada di sitoplasma (8). NF- κ B dapat diaktivasi oleh berbagai stimuli antara lain: sitokin, ROS, LPS, oxidized LDL dan COX, yang mengakibatkan pelepasan ikatan κ B sehingga NF- κ B masuk kedalam inti sel dan meregulasi berbagai mediator inflamasi, antara lain: TNF- α , IL-1, VCAM, dan ICAM. Hal ini memicu terjadinya disfungsi endotel yang berakibat terjadinya aterosklerosis Dengan menggunakan pewarnaan spesifik terhadap TNF α yang dipadu dengan pelabelan terhadap fragmentasi DNA untuk melihat apoptosis sel HUVEC's tampak sekali bahwa terjadi peningkatan ekspresi TNF α pada sitoplasma sel HUVEC's yang mengindikasikan terjadi peningkatan produksi TNF α seluler. Pada metode bahwa pemulasan TNF α menggunakan antibodi spesifik dilakukan 24 jam setelah paparan, yang berarti sehari setelah terjadi aktivasi NF κ B (NF κ B dipulas 30 menit setelah perlakuan ox-LPS), dapat dikatakan bahwa ekspresi TNF α dipengaruhi oleh aktivasi dari NF κ B. Yang hal ini mendukung pendapat dari Martin *et al.* (2000) dan juga Collins and Cybulsky (2001) (7,8).

Paparan radikal bebas dan radiasi, *shear stress*, pada pembuluh darah dapat menyebabkan peningkatan apoptosis yang lebih dini pada sel endotel (16). Posisi endotel antara jaringan dan pembuluh darah menunjang adanya paparan berkelanjutan yang mengarah pada meluasnya berbagai stimuli, beberapa diantaranya potensial untuk menginduksi apoptosis (kematian sel) pada sel tersebut. Stimuli yang berbeda dengan bermacam-macam reseptor dan jalan signal transduksi, mampu mengaktifkan jalur protease (caspase) yang akan mengarah pada program perusakan selular terhadap dirinya dengan pemecahan struktur selular pada sisi yang spesifik yang

terkontrol dan teratur (17). Menurut Munshi *et al.* (2000) kerusakan endotel dapat disebabkan oleh LPS melalui induksi apoptosis (18). Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah kompleks glikoprotein dinding luar sel bakteri gram negatif yang terlibat dalam kerusakan endotel. Studi terbaru menunjukkan bahwa LPS mengarah terjadinya apoptosis pada beberapa tipe endotel, meliputi HUVEC dan sel endotel mikrovaskuler manusia normal yang diperoleh dari organ paru. LPS mampu menyebabkan apoptosis pada konsentrasi antara 10-1000 ng/ml. LPS menginduksi apoptosis pada kultur sel endotel vena umbilical manusia (HUVEC's) setelah pemaparan lebih dari 12 jam dan apoptosis menjadi maksimal pada 18 jam, apabila diteruskan sampai pemaparan pada jam ke 24 maka sebagian akan didominasi kematian sel dengan bentuk nekrosis (17). Pada kejadian apoptosis, jelas kiranya bahwa salah satu jalur apoptosis adalah melibatkan protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam *TNF Receptor family*) beserta Fas ligand, yang disebut sebagai TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) yang membentuk jalur menuju apoptosis dan disebut sebagai *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway* (19). Jalur apoptosis melalui TNF α ini selanjutnya akan mengaktifasi cascade yang dimediasi oleh caspase-8 sampai akhirnya mengaktifasi caspase-3. Caspase 3 merupakan caspase efektor yang akan meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein kuncinya dan menginisiasi jalur caspase menjadi program kematian sel (1).

Penelitian ini, menunjukkan bahwa ox-LDL akan mengaktifasi NF κ B dengan terjadinya translokasi faktor transkripsi tersebut ke dalam inti sel yang dalam kondisi normalnya berada pada sitoplasma sel terikat pada I κ B dan walaupun ox-LDL juga merupakan ligan alamiah dari PPAR γ namun pada sel endotel dinyatakan bahwa induksi ox-LDL tidak menyebabkan aktivasi PPAR γ , yang hal ini berbeda dengan kondisi pada sel-sel makrofag, sehingga aktivasi PPAR γ dapat dihubungkan dengan proses pengambilan ox-LDL oleh makrofag via CD36. Aktivasi NF κ B akan menjadikan peningkatan transkripsi TNF α sebagai mediator inflamasi dan TNF α mengakibatkan peningkatan apoptosis sel-sel HUVEC's yang mendapatkan paparan ox-LDL melalui jalur TRAIL. Dalam penelitian ini jelas teramati bahwa ox-LDL mengaktifasi NF κ B, namun konfirmasi dengan EMSA akan sangat mendukung hasil ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Boatright, K.M, Guy S. Salvesen. *Mechanism of Caspase Activation*. Current Opinion in Cell Biology 2003; 15:725-731.
2. Napoli C, Lerman LO. *Involvement of oxidation-sensitive mechanisms in the cardiovascular effects of hypercholesterolemia*. Mayo Clin Proc. 2001;76:619-631
3. Navab M, Hamma SY, Reddy ST, Ng CJ, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM, *Oxidized lipid as mediators of coronary heart disease*. Curr Opin Lipidol 2002; 13: 363-072.
4. Kita T. *LOX-1, a possible clue to the missing Link Between hypertension and atherogenesis*. Circ res 1999; 84: 1113-1115.
5. Mehta J. *The role of LOX-1, a novel lectin like receptor for oxidized LDL, in atherosclerosis*. Can J Cardiol 2004; 20: 32B-36B.
6. Corminacini, L.A. Rigoni, A.F.Pasini, U.Gabrin, A.Davoli, M.Campagnola, A. Pastorino, V. Lo Cacio, and T. Sawamura. *The binding of oxidized LDL to ox LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production superoxides*. J Biol Chem 2001; 176: 13750-13755.
7. Martin R, Hoeth M, Schmid J. *The transcription factor NF-kB and the regulation of vascular cell function*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 ; 20 :1-4.
8. Collins T, Cybulsky M. *NF-kB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?*. J Clin Invest 2001 ;107:255-265.
9. Desvergne B ., Wahli W. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism*, Endocrine Reviews 1999; 20(5): p. 649–688
10. Marx M , Bourcier T , Sukhova GK, Libby P , Plutzky J. *PPAR γ Activation in Human Endothelial Cells Increases Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression PPAR γ as a Potential Mediator in Vascular Disease* ,Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999 ;19: 546-551
11. Freshney I. *Culture of animal cell: a manual of basic technique*. 2eds. New York: Alan R Liss Inc; 1987
12. Mertens A, Holvoet, P. *Oxidized LDL and HDL : antagonist in atherothrombosis*. Faseb J 2001; 15: 2073-2084.
13. Parthasarathy S. Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O. *Oxidants and antioxidants in atherogenesis : an appraisal*. J. Lipid Res 1999; 40: 2143-2157.
14. Schaiff, W.T, Carlson, M.G, Smith, S.D, Levi,R, Nelson, D.M and Sadowsky,Y. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g Modulates Differentiation of Human ssTrophoblast in a Ligand-Specific Manner*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2000; 85: 3874-3881.
15. Riawan, W. *Efek Pemberian asam linoleat dan linoleat pada Rattus norvegicus yang mendapat induksi ox-LDL*, Data tidak Dipublikasi. 2000
16. Dimmeler, S. *Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates The Apoptosis-Suppressive Effect of Shear Stress on E. cells*. University of Wzburg. Germany; 1999
17. Stefanec, T. *Endothelial Apoptosis*. Chest 2000; 117: 841-854
18. Munshi, N, Aaron Z, Fernandis, Rama P, cherla, In-Woo Park dan Ramesh K Ganju. *Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Endothelial Cells and Inhibition by Vascular Endothelial Growth Factor*. J. of Immunology 2000; 168: 5860-5866
19. Husada, J.J. *The Role of Apoptosis in Brain Injury*. Simposium Neuro Intensif Quality Hotel, Solo; 9-10 Oktober 2004

