

Ketamin Sebagai Inhibitor Kalsium Intraseluler pada *Human Umbilical Vein Endotel Cell* (HUVEC) Model Sepsis

Rudy Vitraludyono¹, Aswoco Andyk Asmoro¹, Edi Widjajanto¹

¹ Departemen Anestesiologi dan Terapi Intensif, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya/ RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia

ABSTRAK

Latar belakang: Sepsis berat dan syok sepsis memiliki angka kematian yang tinggi. Agen anestesi yang sering digunakan untuk pasien sepsis adalah ketamin. Perubahan kadar kalsium dalam sel berkontribusi dalam peningkatan respon imun dan kerusakan jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efek ketamin terhadap ekspresi kalsium intraseluler *Human Umbilical Vein Endotel Cell* (HUVEC) pada jam ke-3 pasca paparan LPS dibandingkan dengan HUVEC model sepsis.

Metode: Sebanyak 30 sumuran kulture HUVEC diberi perlakuan sesuai kelompok perlakuan. Kelompok P1 (HUVEC + LPS), kelompok P2 / Model sepsis (HUVEC + LPS + Monosit), kelompok P3 (HUVEC + LPS + Ketamin 50 µmol/L) dan kelompok P4/ Model sepsis + Ketamin (HUVEC + LPS + Monosit + Ketamin 50 µmol/L). Ekspresi kalsium intraseluler dianalisis menggunakan metode imunofluoresens 3 jam setelah pemberian Ketamin. Data hasil penelitian diuji statistic menggunakan uji T dua sampel bebas menggunakan *software* SPSS 18.0.

Hasil: Sepsis menyebabkan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler yang signifikan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Ketamin 50 µmol/L secara signifikan mampu menurunkan ekspresi kalsium intraseluler pada model sepsis secara signifikan. Selain itu, ketamin juga menunjukkan aktivitas penghambatan produksi kalsium intraseluler pada HUVEC yang hanya diinduksi LPS.

Kesimpulan: Pemberian Ketamin 50 µmol/L dapat menurunkan ekspresi kalsium intraseluler pada HUVEC yang dipapar LPS dan HUVEC model sepsis. Ketamin dapat digunakan sebagai imunoterapi sepsis dengan memodulasi konsentrasi kalsium intraseluler.

Kata kunci: immunomodulator, kalsium intraseluler, ketamin, sepsis

Korespondensi:

dr. Rudy Vitraludyono,
SpAn*

Departemen Anestesiologi dan
Terapi Intensif, Fakultas
Kedokteran, Universitas
Brawijaya/ RSUD Dr. Saiful
Anwar, Malang
e-mail:
dinoanestesi@gmail.com

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan proses yang diperlukan untuk menjaga homeostasis tubuh.¹ Inflamasi dikontrol oleh molekul pro-inflamasi dan molekul anti-inflamasi. Ketidakseimbangan antara molekul pro-inflamasi dan anti-inflamasi akan memunculkan patogenesis yang mendasari terjadinya sepsis.² Sepsis merupakan salah satu masalah kesehatan yang banyak diderita. Di seluruh dunia, tiap tahun terdapat 13 juta orang mengalami sepsis dan 4 juta di antaranya meninggal dunia. Sepsis berat dan

syok sepsis merupakan penyebab kematian yang paling tinggi. Jumlah penderitanya mencapai 46%.³ Hasil penelitian Sodik dkk.⁴ pada tahun 1996 menunjukkan jika terdapat 4.774 kasus penyakit dalam di mana 504 pasien didiagnosa sepsis dengan mortalitas 70,2 % Pada kasus sepsis, terjadi ketidakseimbangan regulasi dalam tubuh, salah satunya terjadi gangguan regulasi kalsium. Kalsium berperan penting dalam sebagian besar proses seluler. Pada kondisi trauma atau sepsis, konsentrasi kalsium sistemik menjadi rendah. Akan tetapi, konsentrasi kalsium intraseluler meningkat.

Peningkatan kalsium intraseluler paling banyak terjadi pada sel-sel imun. Penelitian yang telah dilakukan menjelaskan jika peningkatan kalsium intraseluler akan meningkatkan produksi sitokin dari makrofag atau monosit yang diinduksi oleh Lipopolisakarida (LPS). Peningkatan aktivitas imun tersebut menyebabkan peningkatan kebocoran vaskuler, syok, dan disfungsi organ yang lebih besar.⁵

Sel-sel endotel vaskuler merupakan sel pertama yang melakukan kontak dengan bakteri yang tersirkulasi. Sel-sel endotel memiliki kemampuan untuk mengenali bakteri patogen dan menginisiasi respon imun.² Oleh karenanya, endotel diduga merupakan target utama sepsis. Sepsis menyebabkan disfungsi endotel dan menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Peningkatan permeabilitas menyebabkan kebocoran cairan dari ruang intravaskuler. Kondisi ini sering menyebabkan hipovolemia, hipotensi dan gangguan perfusi.^{6,7}

Agen induksi anestesi yang paling sering digunakan untuk pasien dengan kondisi sepsis adalah Ketamin.⁸ Pada pasien pembedahan darurat, Ketamin meningkatkan *Mean Arterial Pressure* (MAP) dengan rata-rata 10% dari kondisi awal. Ketamin lebih menguntungkan dibandingkan thiopental ketika dibutuhkan stabilitas hemodinamik pada pasien.⁹ Ketamin juga memiliki kemampuan imunoinhibitor dengan menghambat faktor transkripsi protein aktifator-1 dan *nuclear factor-κB*.¹⁰ Ketamin menghambat masuknya kalsium intasel melalui blokade kanal kalsium tipe L.¹¹ Penelitian juga menjelaskan jika Ketamin dapat menghambat sitokin pro-inflamasi yang diinduksi oleh endotoksin tanpa mengganggu sitokin anti-inflamasi.¹² Ketamin dilaporkan dapat menghambat sitokin pro-inflamasi IL-6. Dengan demikian, Ketamin berguna bagi pasien dengan resiko terjadi bakteremia atau pada pasien kritis yang mengalami inflamasi akibat endotoksin.^{13,14} Berdasarkan penelitian tentang peran kalsium intraseluler dalam patogenesis sepsis dan keterlibatan ketamin-HCl, resusitasi awal pada sepsis berat harus tercapai dalam 6 jam pertama. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk meneliti perbandingan antara efek Ketamin 50 µmol/L terhadap ekspresi kalsium intraseluler pada *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC) yang dipapar LPS dibandingkan dengan HUVEC model sepsis pada jam ke-3 setelah pemberian Ketamin.

METODE

Penelitian ini menggunakan *true experimental design*. Penelitian dilaksanakan di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan secara eksperimental dengan metode eksplorasi laboratorium menggunakan *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC). Sampel HUVEC dikultur dalam 30 sumuran (*well*) dan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan di antaranya kontrol, Kelompok P1, kelompok P2, kelompok P3, dan kelompok P4. Kelompok P1 merupakan sampel HUVEC yang diberi LPS. Kelompok P2 (model sepsis) terdiri dari HUVEC, LPS, dan Monosit, kelompok P3 terdiri dari HUVEC, LPS dan Ketamin 50 µmol/L, kelompok P4 terdiri dari HUVEC model sepsis + Ketamin 50 µmol/L. Monosit yang digunakan merupakan THP-1 dari *The American Type Culture Collection* (ATCC, TIB-202). LPS yang digunakan berasal dari dinding bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 1000 ng/ml. Ketamin yang digunakan adalah Ketamin HCL produksi PT. Pfizer Indonesia dengan dosis 50 µmol/L.

Penelitian diawali dengan pembuatan kultur sel endotel yang diambil dari organ umbilikus. Umbilikus yang digunakan berasal dari bayi yang baru lahir dengan kondisi ibu sehat (Hb ≥ 10 gr/dl), persalinan *section caesaria* atau normal. Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan *clot* dengan kertas tissue yang disemprot dengan alkohol 70%. Masing-masing ujung umbilikus dipotong transversal sehingga terlihat dua arteri dan satu vena. Vena memiliki dinding yang tebal, lebih besar dan elastis. *Cannule* dimasukkan pada salah satu ujung vena (± 1 cm), kemudian diikat erat dengan benang. Vena dibersihkan/ dibilas dengan 10 ml larutan Phospat Buffer Saline A (PBS A) melalui *cannule* yang telah dipasang dengan spuit 20 ml. Setelah bersih, ujung umbilikus yang lain diikat dengan kuat. Larutan *collagenase* dimasukkan (seperti cara memasukkan PBS) dan spuit dibiarkan menancap pada *cannule*. Umbilikus dihangatkan dengan cara didekap dengan kedua tangan di dekat Bunsen *burner* selama 7 menit (untuk mencapai suhu 37 °C). *Collagenase* yang telah mengandung endotel dikeluarkan dari umbilikus dengan menggunakan spuit yang masih tertancap di *cannule*. Larutan *collagenase* dimasukkan dalam tabung *sentrifuge* steril 15 ml. Umbilikus dibilas dengan 10 ml PBS A untuk membilas sel endotel yang masih tersisa dan dimasukkan dalam tabung *sentrifuge*. Larutan dalam

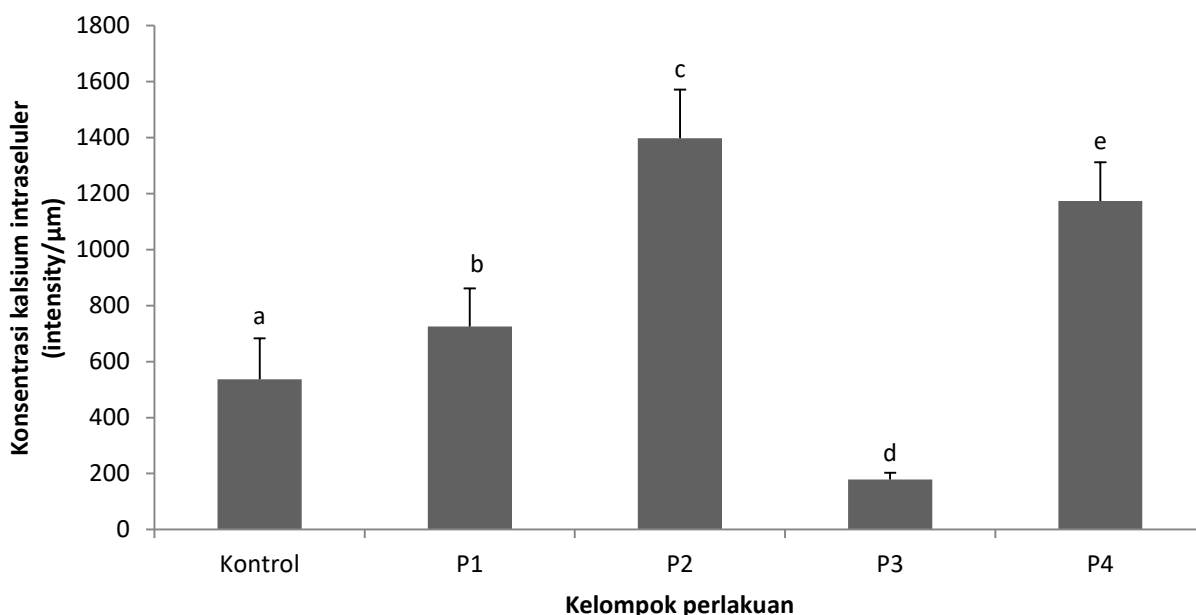
tabung *sentrifuge* disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 4 ml medium kultur. Pelet diresuspensi. Larutan dipindahkan dalam *tissue culture well* 24 cm² yang sebelumnya telah diisi *cover glass* yang dilapis gelatin 0,2 %. *Well* dimasukkan dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5%, suhu 37 °C selama 20 menit. *Well* diambil dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Apabila sel endotel telah teramati menempel pada dasar *well*, medium kultur diambil dan sel dibilas dengan 3 ml larutan *serum free* melalui filter 0,2 µm. *Serum free* diambil dan diganti dengan spuit steril dan diganti dengan 4 ml medium kultur melalui filter 0,2 µm. *Well* dimasukkan dalam inkubator sampai terbentuk monolayer (membentuk *cobblestone*). Inkubasi dilakukan kurang lebih 3-4 hari dan medium diganti tiap 2 hari sekali. Masing-masing *well* diisi dengan komponen kultur sel sesuai dengan kelompok perlakuan. Kalsium intraseluler diamati menggunakan imunofluoresens 3 jam setelah pemberian Ketamin. Data hasil penelitian diuji *statistic* menggunakan uji T dua sampel bebas menggunakan *software* SPSS 18.0.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi kalsium intraseluler HUVEC pada kelompok kontrol (536.2±146.8 intensity/µm) lebih rendah dibandingkan kelompok P1 (725.2±135.9

intensity/µm) (p=0,022). Rata-rata ekspresi kalsium intraseluler HUVEC pada kelompok P1 (725.2 ± 135.9 intensity/µm) lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok P2 atau HUVEC model sepsis (1.398 ± 173.1 intensity/ µm) (p<0,001). Rata-rata ekspresi kalsium intraseluler HUVEC pada kelompok P3 (17.6 ± 23.85 intensity/ µm) lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok P2 (model sepsis) (p<0,001). Rata-rata ekspresi kalsium intraseluler kelompok P4 (1.174 ± 137.5 intensity/µm) lebih rendah dibandingkan dengan P2/HUVEC model sepsis (1.398±173.1 intensity/µm) (p=0.016). Sepsis menyebabkan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Ketamin mampu menurunkan ekspresi kalsium intraseluler pada model sepsis secara signifikan. Selain itu, ketamin juga menunjukkan aktivitas penghambatan produksi kalsium intraseluler pada HUVEC yang hanya diinduksi LPS.

Berdasarkan analisis konsentrasi kalsium intraseluler menggunakan imunofluoresens, diketahui jika terdapat perbedaan warna yang muncul. Konsentrasi kalsium intraseluler berbanding lurus dengan pendaran warna hijau yang muncul pada hasil imunofluoresens. Pendaran warna hijau paling banyak terdapat pada kelompok P2 atau HUVEC model sepsis. Sementara itu, kelompok P3 memiliki pendaran warna hijau paling rendah dibandingkan kelompok lainnya (Gambar 2).



Gambar 1. Konsentrasi kalsium intraseluler pada kelompok perlakuan

Keterangan: P1: HUVEC+LPS; P2: HUVEC model sepsis; P3: HUVEC+LPS+ Ketamin; P4: HUVEC model sepsis+Ketamin

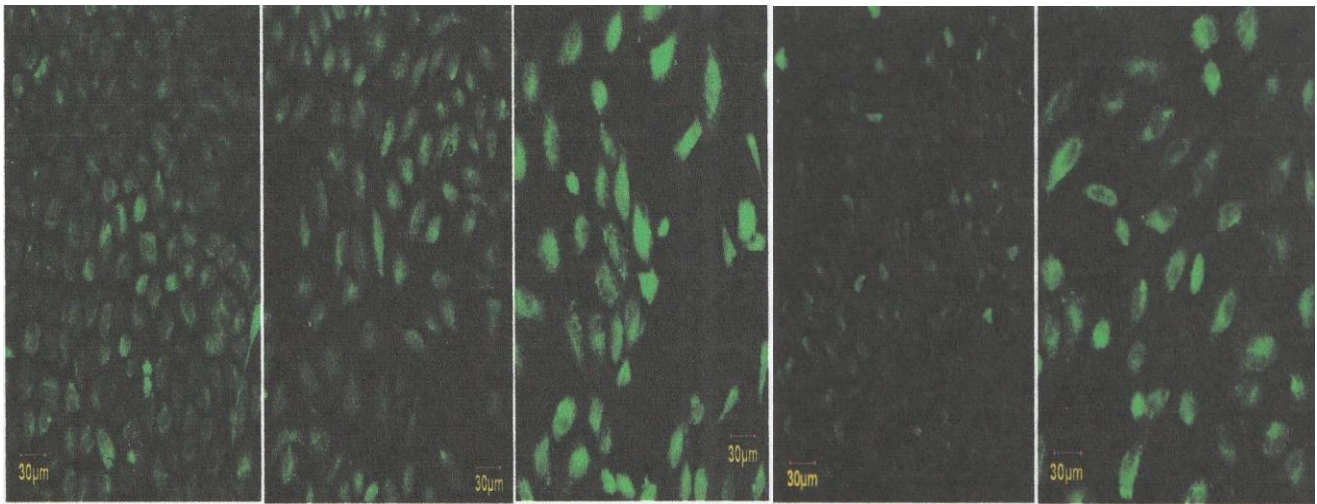
Kontrol

P1

P2

P3

P4



Gambar 2. Konsentrasi kalsium intraseluler pada kelompok perlakuan dilihat menggunakan imunofluoresens. Keterangan: P1: HUVEC+LPS; P2: HUVEC model sepsis; P3: HUVEC+LPS+ Ketamine; P4: HUVEC model sepsis+ketamin.

PEMBAHASAN

Pemberian LPS pada HUVEC (Kelompok P1) dapat meningkatkan ekspresi kalsium intraseluler dari $536,2 \pm 146,8$ intensity/ μm menjadi $725,2 \pm 135,9$ intensity/ μm . Endotoksin glikoprotein atau LPS merupakan komponen utama membrane terluar bakteri gram negative yang merangsang peradangan jaringan, demam dan syok. LPS merupakan faktor utama pemicu sepsis.² Pada penelitian sebelumnya, LPS diduga menstimulasi peningkatan ion kalsium intraseluler melalui protein kinase-C dan protein kinase-A.¹⁵ Peningkatan kadar kalsium intraseluler dapat terjadi karena masuknya kalsium intraseluler melalui *coltage-dependent calcium channel* atau NMDA reseptor pada membran plasma dan melalui pelepasan kalsium Retikulum Endoplasma lewat InsP3R atau reseptor ryanodine (RYR).¹⁶

Pada HUVEC model sepsis (kelompok P2), konsentrasi kalsium intraseluler mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan HUVEC kontrol. HUVEC model sepsis dibuat dengan memberikan LPS dan monosit pada kultur HUVEC. Monosit merupakan komponen imunologis yang berperan dalam inisiasi respon imun terhadap infeksi. Pemberian LPS dapat mengaktifkan reseptor *toll-like receptor* pada monosit, makrofag, dan sel endothelial sehingga terjadi pelepasan mediator inflamasi dan mengaktifkan koagulasi. Setelah itu, akan terjadi aktivasi *cascade* komplemen dan mediator inflamasi secara autokrin dan parakrin

sehingga mengaktifkan monosit dan endotel. Peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler pada kelompok sepsis memicu peningkatan respon inflamasi, kematian sel, dan disfungsi organ.^{5,17}

Pemberian ketamin pada HUVEC yang diberi LPS (kelompok 3) dan pada kelompok HUVEC model sepsis menyebabkan penurunan konsentrasi kalsium intraseluler jika dibandingkan dengan kelompok HUVEC model sepsis. Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui jika ketamin dapat menghambat atau menurunkan konsentrasi kalsium intraseluler. Penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Kudoh dkk.¹⁸ yang menyatakan bahwa ketamin menyebabkan efek inotropik negatif pada miokard dengan adanya hambatan masuknya Ca^{2+} melalui kanal kalsium dan hambatan pelepasan Ca^{2+} dari sarkoplasmik endoplasma. Norepinephrine (NE) pada kardiomyosit menyebabkan pelepasan inositol 1,4,5-*triphosphatase* (IP3) yang berperan penting dalam kontraksi jantung dengan melepaskan Ca^{2+} . Pada kardiomyosit, ketamin menghambat produksi IP3. Penghambatan IP3 menyebabkan menurunnya pelepasan Ca^{2+} .

Konsentrasi kalsium intraseluler pada kelompok P3 dan P4 yang diberi ketamin memiliki beda yang signifikan. Konsentrasi kalsium intraseluler pada kultur HUVEC-LPS yang diberi ketamin jauh lebih rendah dibandingkan dengan HUVEC model sepsis yang diberi ketamin. Hal ini terjadi karena perbedaan komposisi kultur sel pada kedua kelompok. Kelompok sepsis terdiri dari HUVEC yang ditambah LPS dan monosit. Monosit

merupakan komponen imun yang berperan dalam respon imun *innate*. LPS akan memicu diferensiasi monosit menjadi makrofag yang berfungsi untuk memfagosit mikroba. Peningkatan konsentrasi kalsium merupakan salah satu tanda awal adanya proses fagositosis dari makrofag. Selain fagositosis, kalsium juga berperan dalam proses *binding* molekul-molekul terkait respon imun.¹⁹ LPS yang diberikan pada kelompok sepsis memicu aktivasi monosit yang diiringi dengan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler. Oleh karena itu, pemberian Ketamin pada kelompok sepsis masih memiliki kadar kalsium intraseluler yang lebih tinggi

dibandingkan kelompok HUVER-LPS yang ditambah Ketamin. Akan tetapi, secara umum Ketamin yang diberikan sudah dapat menurunkan konsentrasi kalsium intraseluler dibandingkan kelompok sepsis.

KESIMPULAN

Pemberian Ketamin 50 $\mu\text{mol/L}$ dapat menurunkan ekspresi kalsium intraseluler pada HUVEC yang dipapar LPS dan HUVEC model sepsis. Ketamin dapat digunakan sebagai imunoterapi sepsis dengan memodulasi konsentrasi kalsium intraseluler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Loix S, De Kock M, Henin P. The anti-inflammatory effects of ketamine: state of the art. *Acta Anaesthesiol Belg*. 2011;62:47-58.
2. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):49-57. doi:10.1016/S0008-6363(03)00397-3
3. Sodik DC, Pradipta IS, Lestari K. Manajemen Terapi Sepsis. *Students e-Journal*. 2012;1(1):38.
4. Gurfinkel R, Czeiger D, Douvdevani A, et al. Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats. *Anesth Analg*. 2006;103(2):396-402. doi:10.1213/01.ane.0000226140.84281.3e
5. Collage RD, Howell GM, Zhang X, et al. Calcium supplementation during sepsis exacerbates organ failure and mortality via calcium/calmodulin-dependent protein kinase signaling. *Crit Care Med*. 2013;41(11):1-18. doi:10.1097/CCM.0b013e31828cf436
6. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, coagulation in sepsis. *J L*. 2009;83:536-545. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.09.020
7. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: Can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*. 2011;16(SUPPL. 1). doi:10.3109/1354750X.2011.587893
8. Morris C, Perris A, Klein J, Mahoney P. Anaesthesia in haemodynamically compromised emergency patients: Does ketamine represent the best choice of induction agent? *Anaesthesia*. 2009;64(5):532-539. doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05835.x
9. White M, de Graaff P, Renshof B, van Kan E, Dzoljic M. Pharmacokinetics of S(+) ketamine derived from target controlled infusion. *Br J Anaesth*. 2006;96(3):330-334. doi:10.1093/bja/aei316
10. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: new uses for an old drug? *Br J Anaesth*. 2011;107(2):123-126. doi:10.1093/bja/aer221
11. Jung I, Jung SH. Vasorelaxant mechanisms of ketamine in rabbit renal artery. *Korean J Anesthesiol*. 2012;63(6):533-539. doi:10.4097/kjae.2012.63.6.533
12. Dale O, Somogyi AA, Li Y, Sullivan T, Shavit Y. Does intraoperative ketamine attenuate inflammatory reactivity following surgery? A systematic review and meta-analysis. *Anesth Analg*. 2012;115(4):934-943. doi:10.1213/ANE.0b013e3182662e30
13. Wu GJ, Chen TL, Ueng YF, Chen RM. Ketamine inhibits tumor necrosis factor- α and interleukin-6 gene expressions in lipopolysaccharide-stimulated macrophages through suppression of toll-like receptor 4-mediated c-Jun N-terminal kinase phosphorylation and activator protein-1 activation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;228(1):105-113. doi:10.1016/j.taap.2007.11.027
14. Abbas A, Litchman A. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
15. Zhang Z, Liu Y, Song T, et al. An antiapoptotic Bcl-2 family protein index predicts the response of leukaemic cells to the pan-Bcl-2 inhibitor S1. *Br J Cancer*. 2013;108(9):1870-1878. doi:10.1038/bjc.2013.152
16. Wei H. The role of calcium dysregulation in anesthetic-mediated neurotoxicity. *Anesth Analg*. 2011;113(5):972-974. doi:10.1213/ANE.0b013e3182323261
17. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-3777. doi:10.1182/blood-2002-06-1887
18. Kudoh A, Kudoh E, Katagai H, Takazawa T. Ketamine suppresses norepinephrine-induced inositol 1,4,5-trisphosphate formation via pathways involving protein kinase C. *Anesth Analg*. 2002;94(3):552-557.

doi:10.1097/00000539-200203000-00013

19. Nunes P, Demaurex N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2010;88(1):57-68. doi:10.1189/jlb.0110028

Untuk menyitir artikel ini: Vitraludyono, R, AA Asmoro, E Widjanto. Ketamin Sebagai Inhibitor Kalsium Intraseluler pada *Human Umbilical Vein Endotel Cell* (HUVEC) Model Sepsis. *Journal of Anaesthesia and Pain.* 2020;1(1): 7-12.