

Ekspresi Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)-1 di Trofoblas Mencit yang Diinfeksi *Toxoplasma gondii*

The Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)-1 in the Trophoblast of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*

Lucia Tri Suwanti

Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015,
e-mail: tsuwan@yahoo.com

Abstract

Toxoplasma gondii infection causes the increase of TNF- α on decidua placenta. TNF- α have two receptors to act to the target cell. One the other is TNFR-1. This study measured TNFR-1 expression on the trophoblast of infected-pregnant mice. Forty-eight pregnant Swiss mice were divided into 2 main groups. Group I (control) was uninfected mice and group II (treatment) was infected mice. Each group was divided into 3 subgroups: the first, second and third week gestation. Mice were infected with 1×10^5 tachyzoites *T. gondii* doses by intraperitoneal. Four days post infection, mice were sacrificed, placenta was removed for observation TNFR-1 expression by immunohistochemistry staining. The data were analysed by ANOVA and LSD post hoc test. The result showed that TNFR-1 expression were significantly difference ($p < 0.00$) between infected mice and uninfected mice trophoblast. TNFR-1 expression were increasing on trophoblast of infected mice. TNFR-1 expression in first week gestation infected mice increased 3.4 times (from 10.40% to become 35.01%); in second week increased 2.5 times (from 13.94% to become 35.28%) and in the third week increased 2.4 times (from 13.97% to become 33.52%). We concluded that *Toxoplasma gondii* infection effected to the increase of TNFR-1 expression on pregnant mice trophoblast.

Key words: *Toxoplasma gondii*, TNFR-1, decidua plasenta, trophoblast

Pendahuluan

Fetus kontak secara langsung dengan darah maternal selama kebuntingan. Fetus mempunyai antigen asing yang berasal dari paternal, tetapi fetus tidak ditolak oleh respons imun maternal. Hubungan antara maternal dan fetus memerlukan kerja imunomodulator yang khusus, karena fetus harus dilindungi dari penolakan respons imun maternal. Sementara, pada saat yang bersamaan, sistem imun maternal harus melindungi dari serangan agen infeksi baik untuk melindungi maternal maupun fetus. Fenomena ini sering disebut dengan *immunological paradox of pregnancy* (Arvola, 2001). Para peneliti terus mencari penjelasan imunologis kenapa kebuntingan dapat dipertahankan. Hasil penelitian para peneliti menunjukkan bahwa plasenta merupakan organ yang berperan terhadap daya tahan fetus dari penolakan maternal, tetapi mekanisme fetus dapat menghindari dari pengenalan dan penolakan maternal sampai saat ini masih belum pasti.

Keberhasilan kebuntingan tergantung pada toleransi sistem imun maternal terhadap fetus. Toleransi tersebut dapat tercapai melalui tiga meka-

nisme. Pertama, trofoblast mengekspresikan molekul tertentu. Kedua, karena pengaruh sitokin tertentu pada *maternal-fetal interface* dan ketiga, plasenta memproduksi agen immunosupresif. (Abbas *et al.*, 2000; Coulam, 2000; dan Vigano and Ranieri, 2000).

Trofoblas tidak mengekspresikan MHC klasik, tetapi MHC Kelas I nonklasik yang disebut HLA-G. Fungsi molekul HLA-G untuk melindungi sel trofoblas dari lisis yang diperantarai sel NK maternal. Trofoblas juga mengekspresikan Fas Ligan (FasL). FasL ini merupakan mekanisme pertahanan melawan leukosit maternal. Untuk menghindari sel T melisiskan trofoblas, melalui metabolisme triptofan, trofoblas mengekspresikan enzim indolamine 2,3-deoxygenase, yaitu enzim katabolisme triptofan. Plasenta juga memproduksi prostaglandin (PGE₂) dan progesteron yang berpengaruh pada perubahan respons ke arah ke Th2 (Abbas *et al.*, 2000; Coulam, 2000; Kauma *et al.*, 1999; dan Miyaura and lwata, 2002).

Keseimbangan sitokin Th1 dan Th2 sangat menentukan keberhasilan kebuntingan. Pola dominasi sitokin Th2 di plasenta melindungi fetoplacental dari

penolakan oleh imunitas adaptif yang diperantarai sel, inflamasi alami non spesifik dan respons fagosit. IFN- γ dan TNF- α bersifat embriotoksik. TNF- α dapat menyebabkan nekrosis embrio implantan sedangkan IFN- γ menghambat sekresi CSF-1. CSF-1 berfungsi mendorong pertumbuhan dan diferensiasi blastosit. Jadi, respons inflamasi yang ditandai dengan produksi sitokin pro-inflamatori (Th1) diperlukan pada awal implantasi, yaitu diperlukan untuk invasi trofoblas dan angiogenesis. Segera setelah terjadi implantasi, respons harus segera berganti dari Th1 ke Th2. (Coulam, 2000)

Perubahan keseimbangan antara sitokin Th1 ke Th2 diperantarai hormon kebuntingan dan sitokin TGF- β (Coulam, 2000). Pada kebuntingan normal, ratio sitokin Th1/Th2 tertinggi pada kebuntingan trimester pertama dan menurun pada trimester kedua dan trimester ketiga (Shimaoka *et al.*, 2000). Kemungkinan tersebut dapat terjadi karena populasi limfosit desidua pada kebuntingan awal didominasi oleh subset sel Th1 dan dominasi subset Th2 baru terjadi pada umur kebuntingan lanjut (Arck *et al.*, 1999).

Kajian tersebut di atas ditujukan pada masalah toleransi imunologis fetus. Yang menjadi pertanyaan bagaimana efektivitas respons imun di plasenta saat terjadi infeksi, khususnya infeksi agen intraseluler. Salah satu agen intraseluler adalah *Toxoplasma gondii*. Organisme tersebut menyerang semua sel di berbagai organ dan jaringan dalam tubuh induk semang, termasuk plasenta. *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler yang dicirikan dengan respon ke arah sitokin Th1 lebih dominan (Denkers and Gazzinelli, 1998; Johnson, 1990).

Hasil penelitian penulis (data tidak ditunjukkan) terjadi peningkatan IFN- γ dan TNF- α di desidua plasenta mencit yang diinfeksi dengan *T. gondii*. Setiap sitokin, agar dapat bekerja pada sel target, harus dikenali dan ditangkap oleh reseptor yang dimiliki oleh sel target. Salah satu reseptor TNF- α adalah TNFR-1. Yang menjadi pertanyaan adalah apakah di plasenta (trofoblas) mencit bunting yang terinfeksi *T. gondii* terjadi peningkatan TNFR-1. Secara *in vitro* infeksi *T. gondii* meningkatkan ekspresi TNFR-1 (Derouich-Guergour *et al.*, 2002; Molestina *et al.*, 2003), tetapi belum ada penelitian yang melaporkan pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap peningkatan ekspresi TNFR-1 di trofoblas secara *in vivo*.

Metode Penelitian

Perbanyakan isolat *T. gondii*

Isolat *T. gondii* yang dipergunakan adalah stadium takizoit dari strain RH yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Isolat diperbanyak dengan cara dipasase-

kan ke mencit. Mencit diinjeksi secara intraperitoneal. Dosis injeksi 1×10^5 takizoit tiap mencit. Takizoit dipanen setelah mencit menunjukkan gejala : lemah, bulu berdiri dan nafas tersengal-sengal. Mencit dikorbankan, dibuka kulit di bagian perut. Ke dalam cavum peritoneum mencit ditambahkan 5 ml NaCl fisiologis dan cairan diambil kembali. Parasit dalam cairan peritoneal dihitung dengan hemositometer. Takizoit hasil panen dipergunakan untuk perlakuan.

Hewan coba dan perlakuan infeksi *T. gondii*

Hewan coba digunakan mencit betina umur 2 bulan strain Swiss. Mencit diperoleh dari laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

Untuk mendapatkan umur kebuntingan yang sama, 48 ekor mencit betina umur 2 bulan digertak birahi dengan kombinasi 5 IU PMSG dan 5 IU HCG. Setelah pengertakan, satu ekor mencit betina dikandangkan bersama dengan satu ekor mencit jantan. Mencit dinyatakan bunting 0,5 hari apabila terlihat *vaginal plug* pada keesokan harinya. Mencit bunting dibagi secara acak menjadi 2 kelompok utama. Kelompok I (K/kontrol) merupakan kelompok mencit yang tidak diinfeksi dan kelompok II (P/perlakuan) terdiri dari mencit yang diinfeksi. Masing-masing kelompok dibagi 3 subkelompok berdasarkan umur kebuntingan, minggu pertama, kedua dan ketiga. Secara rinci pembagian kelompok adalah sebagai berikut: K1: mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama) tidak diinfeksi; K2: mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua) tidak diinfeksi; K3: mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga) tidak diinfeksi; P1: mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama) diinfeksi; P2: mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua) diinfeksi; P3: mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga) diinfeksi.

Dosis infeksi 1×10^5 takizoit setiap mencit. Empat hari setelah infeksi, mencit dikorbankan dan plasenta mencit diambil untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Plasenta difiksasi dalam buffer formalin 10 % selama minimal 24 jam. selanjutnya jaringan plasenta diblok dalam parafin seperti pada pembuatan preparat histologis.

Pembuatan preparat histologis dengan pengecatan imunohistokimia

Jaringan plasenta dalam blok parafin dipotong setebal 4-5 μ m, untuk dilakukan pengecatan imunohistokimia. Pengecatan menggunakan streptavidin dan biotin (Instruction Dako LSAB + Kit, Peroxidase). Potong diletakkan di atas obyek glass, sebagai perekat digunakan polilis. Jaringan dideparafinisasi dalam xylol 2 kali masing-masing 5 menit, selanjutnya secara berturut-turut dimasukkan dalam ethanol absolut 2 kali 3 menit, ethanol 95% 2 kali masing-

masing 3 menit dan etanol 70% 3 menit. Terakhir dicuci dengan aquabides. Jaringan ditetesi dengan proteinase K selama 5 menit. Cuci dengan PBS 2 kali, selanjutnya ditetesi *hydrogen peroxidase* (H_2O_2) 3 % selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali. Setiap sayatan jaringan diinkubasi dalam antibodi poliklonal kelinci terhadap TNFR-1 *mouse* selama 30 menit. Selanjutnya jaringan diinkubasi dalam antibodi sekunder yang dilabel dengan biotin (Link) selama 30 menit, dicuci dengan PBS 2 kali. Kemudian preparat ditetesi streptavidin *peroxidase* selama 15-30 menit, cuci dengan PBS 2 kali dan terakhir dimasukkan dalam larutan substrat DAB selama 5-10 menit. Untuk *counterstain*, digunakan meyer hematoxylin, diinkubasi 30 detik pada suhu kamar kemudian dicuci 3 kali dengan dH_2O . Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*.

Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pola faktorial 2×3 . *Randomized posttest only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dipilih, karena pengukuran awal tidak mungkin dilakukan. Data persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 dianalisis dengan Anova dilanjutkan dengan uji beda LSD.

Hasil dan Pembahasan

Hasil perhitungan statistik dengan Anova terdapat perbedaan ekspresi TNFR-1 pada trofoblas mencit yang sangat bermakna ($p < 0,01$) antara kelompok

mencit bunting terinfeksi dengan kelompok mencit bunting tidak terinfeksi (Tabel 1). Pada kelompok mencit terinfeksi menunjukkan peningkatan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1. Peningkatan mencapai 2,71 kali, dari 12,77% pada kelompok tidak terinfeksi menjadi 34,60% pada kelompok mencit terinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi TNFR-1 pada trofoblas.

Faktor umur kebuntingan tidak memberikan perbedaan antar kelompok. Presentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 pada subkelompok umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Artinya, umur kebuntingan tidak berpengaruh terhadap perubahan ekspresi TNFR-1 pada trofoblas. Tidak ada interaksi antara faktor infeksi dan faktor umur kebuntingan. Hasil uji LSD menunjukkan ada perbedaan antara kelompok infeksi dan tidak infeksi pada tiap umur kebuntingan (lihat Tabel 2 dan Gambar 1). Secara rinci peningkatan tersebut adalah: pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama meningkat 3,4 kali (10,40% pada mencit tidak terinfeksi dan 35,01% pada mencit terinfeksi), pada minggu kedua meningkat 2,5 kali (13,94% pada mencit tidak terinfeksi dan 35,28% pada mencit terinfeksi) dan pada minggu ketiga meningkat 2,4 kali (13,97% pada mencit tidak terinfeksi dan 33,52% pada mencit terinfeksi). Gambar 2 di bawah adalah trofoblas mencit yang terinfeksi *T. gondii*.

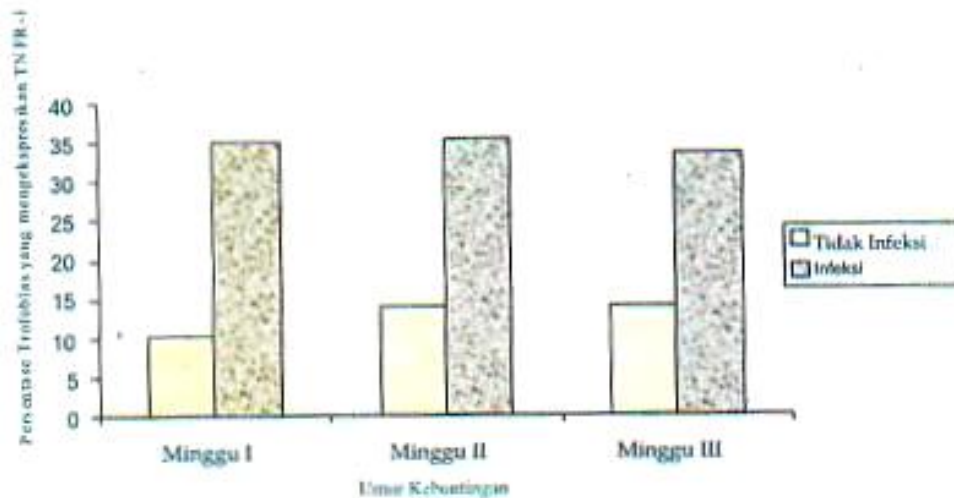
Tabel 1. Rata-Rata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Persentase Jumlah Trofoblas yang Mengekspresikan TNFR-1 pada Mencit yang Terinfeksi dan Tidak Terinfeksi

Kelompok		F	P
Tidak Infeksi	Infeksi		
12,77 ± 8,54	34,60 ± 8,80	71,17	0,003

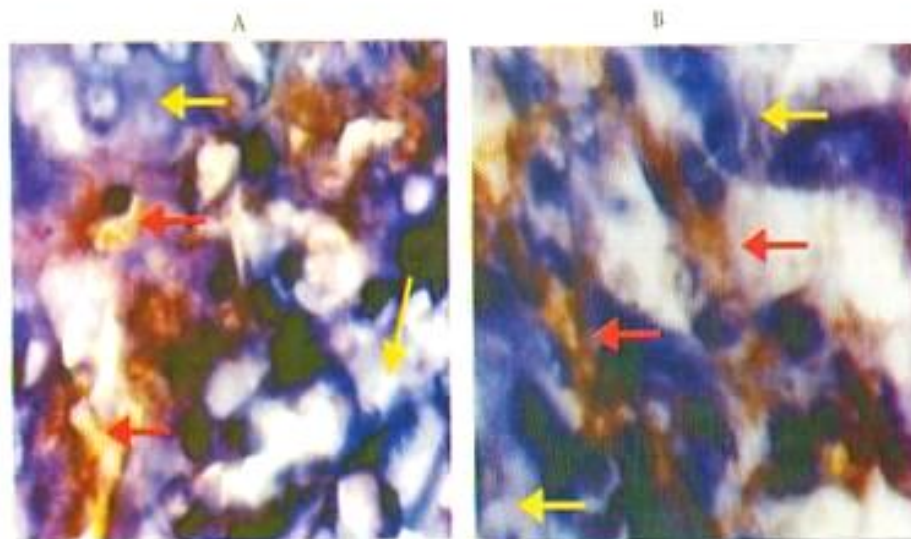
Tabel 2. Rata-Rata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Persentase Jumlah Trofoblas yang Mengekspresikan TNFR-1 pada Mencit Tidak Terinfeksi dan Terinfeksi pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama, Kedua, dan Ketiga

Perlakuan	Umur Kebuntingan		
	Minggu I	Minggu II	Minggu III
Tidak Infeksi	10,40 ^a ± 3,50	13,94 ^a ± 10,59	13,97 ^a ± 10,27
Infeksi	35,01 ^b ± 7,96	35,28 ^b ± 9,66	33,52 ^b ± 9,79

Keterangan: Huruf yang berbeda pada nilai rata-rata tiap variabel menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,01$).



Gambar 1. Grafik peningkatan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 pada mencit yang terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga.



Gambar 2. Sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1. Pengobatan imunohistokimia streptavidin dan avidin. Pembesaran 400x. A. Spongiotrofoblas B. Labyrinth, tanda panah merah (→) sel yang positif, tanda panah kuning (→) sel yang negatif.

Peningkatan ekspresi TNFR-1 di trofoblas pada infeksi *T. gondii* kemungkinan merupakan konsekuensi dari peningkatan ekspresi TNF- α di desidua (data tidak ditunjukkan). Sitokin TNF- α sebagai ligan

mempunyai reseptor TNFR-1 (p55) dan TNFR-2 (p75). Sitokin TNF- α menjalankan aktivitas biologisnya melalui ikatan dengan reseptor TNFR-1 dan TNFR-2. TNFR-1 mempunyai Death Domain (DD)

sedangkan TNFR-2 tidak mempunyai DD. TNFR-1 mempunyai dua aktivitas biologis yang saling berbeda, pertama merupakan sinyal apoptotik dan kedua merupakan *survival signal transduction*. Ikatan antara TNF- α dengan reseptor TNFR-1 menyebabkan penarikan protein intraseluler yang terlibat baik dalam transduksi sinyal apoptotik dan *survival signal transduction*. Interaksi TNF- α dengan TNFR-1 menyebabkan trimerisasi DD dari TNFR-1. DD TNFR-1 yang tertrimerisasi menarik protein adaptor, TNFR-associated death domain (TRADD). Selanjutnya TRADD akan menarik *signal transduction* yang lain pada proses apoptosis maupun *survival cell*, dimana kedua proses tersebut memerlukan protein adaptor yang berbeda. (Abbas *et al.*, 2000; Dumur *et al.*, 2001; dan Gupta, 2003).

Peningkatan ekspresi TNFR-1 di trofoblas akibat infeksi *T. gondii* perlu diwaspadai. Hal ini karena sehubungan dengan pendapat Gorivodsky *et al.*, (1998) yang mengatakan bahwa peningkatan TNFR-1 pada plasenta berhubungan dengan kegagalan kebuntingan mencit. Untuk mengetahui apakah peningkatan ekspresi TNFR-1 di trofoblas akibat infeksi *T. gondii* juga berakibat pada kegagalan kebuntingan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Peningkatan TNFR-1 juga terjadi pada infeksi *T. gondii* pada penelitian tingkat *in vitro*. Infeksi *T. gondii* pada sel kultur fibroblas memicu peningkatan ekspresi TNFR-1, tetapi peningkatan reseptor ini berhubungan dengan resistensi sel terinfeksi terhadap apoptosis. (Derouich-Guergour *et al.*, 2002; dan Molestina *et al.*, 2003). Menurut Ho *et al.* (1995) TNFR-1 memainkan peran penting pada pertahanan tubuh induk semang melawan mikroorganisme dan faktor-faktor patogenik yang ditimbulkan. Pernyataan tersebut didasarkan pada hasil penelitian mencit yang kekurangan TNFR-1 apabila diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes* lebih parah dan lebih cepat mati dibanding dengan mencit yang normal.

Berdasarkan uraian tersebut timbul pertanyaan apakah peningkatan TNFR-1 di trofoblas pada kasus ini merupakan mekanisme pertahanan tubuh mencit melawan infeksi *T. gondii* yang sehingga berdampak pada kegagalan kebuntingan ataukah merupakan mekanisme pertahanan organisme *T. gondii* untuk menghindari agar sel yang ditempati (terinfeksi) tidak mengalami apoptosis. Hal ini perlu pembuktian lebih lanjut.

Kesimpulan

Ekspresi TNFR-1 di trofoblas mencit dipengaruhi oleh infeksi *Toxoplasma gondii* tidak tergantung pada umur kebuntingan.

Daftar Pustaka

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Egan PJ, Croitoru K, Carding SR, Dietl J, and Clark DA. 1999. Murine T cell determination of pregnancy outcome. *Cell Immunol*, 196 (2): 71-9.
- Arvola M. 2001. Immunological Aspects of Maternal-Foetal Interaction in Mice. Dissertations, Faculty of Science and Technology. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala.
- Coulam CB. 2000. Understanding the immunobiology of pregnancy and applying it to treatment of recurrent pregnancy loss. *Biology and Medicine* 4 (1): 19-29.
- Denkers EY, and Gazzinelli RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11: 569-588.
- Derouich-Guergour D, Aldebert D, Vigan I, Jouvin-Marche E, Marche PN, Aubert D, Ambroise-Thomas P, and Felloux H. 2002. *Toxoplasma gondii* infection can regulate the expression of tumour necrosis factor- α receptors on human cells in vitro. *Parasite Immunol*, 24: 271-279.
- Dumur CI, Almenara JA, Durandi S, Flury A, Koritschoner NP, and Patrio LC. 2001. A new death domain associated with gestational trophoblastic diseases induces apoptosis in distinct cell types. *International J. Oncol*, 19: 1161-1167.
- Gorivodsky M, Zenlyak I, Orenstein H, Savion S, Fein A, Torchinsky A, and Toder V. 1998. TNF- α messenger RNA and protein expression in the uteroplacental unit of mice with pregnancy loss. *J. Immunol*, 160: 4280-4288.
- Gupta S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Intern. J. Oncol*, 22: 15-20.
- Ho YS, Dunbar JD, Yuan XZ, Guo D, and Donner DB. 1995. Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc* 270 (8): 3574-3581. JBC on line <http://www.jbc.org/cgi/content/full/270/8/3574>. 13 juli 2006. 15:00.
- Johnson AM. 1990. *Toxoplasma: Biology, Pathology, Immunology, and Treatment*. In Long, PL. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. United States: CRC Press, Inc.

- Kauma SW, Huff TF, Hayes N, and Nilkaro A. 1999. Placental fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J. Clin. Endocrinol. & Metabol.* 84: 2188-2194.
- Miyaura H, and Iwata M. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol*, 168: 1087-1094.
- Molestina RE, Payne TM, Coppens L, and Sinai AP. 2003. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Science*, 116: 4359-4371.
- Shimaoka Y, Hidaka Y, Tada H, Nakamura T, Mitsuda N, Morimoto Y, Murata Y, and Amino N. 2000. Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44: 143-147.
- Viganò P, and Ranieri S. 2000. The implantation of the embryo: T helper 2-type cytokines and natural immunity as favouring factors at the maternal-fetal interface. Document online Ferti_Net. <http://www.ferti.net/fertimagazine/hottopic/2000-06-02-files/image33.jpg>, 05 Oktober 2002. 21: 56.

