

RINGKASAN

Malaria yang disebabkan infeksi *Plasmodium sp* masih merupakan masalah kesehatan Indonesia dan dunia hingga kini. Anemia berat akibat malaria pada umumnya mengakibatkan kematian. Patogenesis anemia akibat malaria adalah kompleks dan multifaktorial yang sampai saat ini belum sepenuhnya diketahui. Anemia pada malaria disebabkan oleh peningkatan destruksi eritrosit, penurunan produksi eritrosit, diseritropoesis dan eritrofagositosis.

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) diduga berperan dalam patogenesis anemia. MIF adalah molekul efektor penting pada sistem imun *innate* yang bekerja dengan cara berikatan dengan salah satu reseptor MIF, yaitu CD74 yang merupakan bentuk permukaan sel *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *class II*. Namun hingga kini masih terdapat kontroversi tentang peran MIF dalam patogenesis anemia pada malaria. Selain itu hubungan antara MIF, reseptor CD74 dan anemia pada malaria belum diketahui, maka perlu dilakukan studi tentang MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia pada malaria.

Penelitian pada sitokin menyediakan informasi berharga tentang sifat alamiah terhadap respons imun host. Regulasi ekspresi sitokin terpenting berada level transkripsi, *message turnover* dan degradasi protein, karena itu untuk mempelajari aspek molekular dengan baik perlu dilakukan studi terhadap ekspresi *messenger RNA* (mRNA) sitokin. MIF adalah sitokin yang disimpan dalam bentuk setengah jadi (*preformed*) dalam vakuola makrofag, sedangkan CD74 merupakan suatu protein transmembran, sehingga penelitian yang mempelajari tentang aspek molekular MIF dan CD74 paling tepat dilakukan dengan mengamati ekspresi mRNA MIF dan CD74 karena dapat mengetahui produksi sitokin langsung dari sumbernya. *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) digunakan untuk mempelajari mekanisme yang mendasari ekspresi gen karena sensitif dan kuat untuk kuantifikasi mRNA, dan memerlukan sedikit sampel dibanding teknik sebelumnya, seperti *Northern blot*, *dot blot* dan *hybridization protection assays* dan *in situ hybridization*.

Model mencit pada studi malaria diperlukan karena penelitian *in vitro* dan *in vivo* pada manusia tidak dapat secara lengkap menginterpretasi dan menjelaskan

dasar biologis sel imun pada host. Mencit adalah model yang tepat untuk meneliti faktor-faktor yang berkontribusi pada patologi anemia selama infeksi falsiparum akut. *Plasmodium yoelii* 17XL adalah model infeksi malaria falsiparum akut pada mencit yang digunakan untuk mengamati respon imun pada infeksi malaria, untuk mempelajari aspek molekuler pada malaria.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi mRNA MIF dan CD74 dalam kaitannya dengan patogenesis anemia malaria pada mencit BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii* 17XL .

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan *post test only design* dengan menggunakan 24 ekor mencit BALB/c yang dibagi dalam 4 kelompok. Mencit diinfeksi dengan 1×10^5 *P. yoelii* 17XL secara intraperitoneal. Selanjutnya dilakukan pengukuran berat badan, kadar Hb dan parasitemia setiap hari. Pada hari ke-3 dan ke-6 dilakukan pengambilan limpa untuk pengukuran limpa, pengecatan jaringan limpa dengan Hematoksilin Eosin (HE) dan isolasi RNA untuk menganalisis ekspresi mRNA MIF, CD74, GM-CSF, IL-10, IL-12, TNF α dan IFN γ dengan cara RT-PCR dan menggunakan beta (β) actin sebagai kontrol internal.

Infeksi 1×10^5 *P. yoelii* 17XL menyebabkan kematian mencit pada hari ke-6 pasca infeksi. Terjadi penurunan berat badan mencit yang signifikan pada hari ke-6 pasca infeksi ($p < 0,05$). Pada awal infeksi, parasit menginfeksi retikulosit, dan pada hari ke-3 pasca infeksi, parasit mulai paten dengan sel hospes. Analisis statistik menunjukkan bahwa parasitemia meningkat signifikan sejak hari ke-3 pasca infeksi ($p < 0,05$), dan meningkat pesat pada hari ke-4 pasca infeksi hingga mencapai 66,16% pada hari ke-6 pasca infeksi. Terjadi anemia berat pada mencit yang diinfeksi *P. yoelii* 17XL. Pengukuran kadar Hb yang dilakukan setiap hari menunjukkan telah terjadi penurunan kadar Hb yang signifikan sejak hari ke-2 pasca infeksi ($p < 0,05$). Kadar Hb menurun dengan cepat pada hari ke-4 dan ke-5 pasca infeksi ($p < 0,005$) dan mencapai 4,92 g/dl pada hari ke-6 pasca infeksi. Meskipun terjadi penurunan kadar Hb yang signifikan sejak hari ke-2 pasca infeksi dan peningkatan parasitemia yang signifikan sejak hari ke-3 pasca infeksi, namun analisis statistik menunjukkan bahwa penurunan kadar Hb tidak berkorelasi dengan parasitemia.

Terjadi perubahan pada limpa yang meliputi pembesaran dan perubahan warna limpa yang sejalan dengan peningkatan parasitemia dan lamanya infeksi. Pada pengukuran limpa terlihat bahwa seiring lama infeksi, ukuran limpa semakin meningkat. Ukuran limpa (panjang x lebar) pada kelompok kontrol, kelompok H3 dan H6 berturut-turut adalah 2,12x0,54 cm; 2,42x0,63 cm; 2,87x0,72cm. Limpa kelompok H6 lebih gelap dibanding limpa kelompok H3 dan kelompok kontrol. Pemeriksaan histopatologi jaringan limpa menunjukkan perubahan arsitektur limpa yang tampak lebih nyata pada kelompok H6 dibanding H3 dan kontrol, yaitu perluasan zona marginalis, hiperplasi dan kongesti pulpa merah dan pulpa putih, edema, vasodilatasi dan hipervaskularisasi. Pada limpa juga ditemukan peningkatan jumlah makrofag dan makrofag yang memfagositosis pigmen hemozoin. Pigmen hemozoin ini terlihat makin banyak pada hari ke-6 pasca infeksi.

Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa ekspresi mRNA MIF menurun pada hari ke-3 dan hari ke-6 pasca infeksi dibanding kontrol, sedangkan ekspresi mRNA CD74 meningkat pada hari ke-3 pasca infeksi dan menurun pada hari ke-6 pasca infeksi dibanding kontrol. Ekspresi mRNA sitokin lain, yaitu TNF α , IFN γ dan IL-10 meningkat pada hari ke-3 dibanding kontrol dan tidak terekspresi pada hari ke-6 pasca infeksi.

Penurunan ekspresi mRNA MIF dan CD74 yang sejalan penurunan kadar Hb pada mencit yang diinfeksi strain letal *Plasmodium* pada hari ke-6 pasca infeksi menunjukkan bahwa MIF mungkin tidak berperan dalam anemia. Penurunan ekspresi mRNA MIF, CD74, GM-CSF dan tidak adanya ekspresi mRNA TNF α , IFN γ , IL-10 pada hari ke-6 pasca infeksi menunjukkan adanya immunosupresi pada mencit BALB/c diinfeksi *P. yoelii* 17XL. Hal ini mungkin disebabkan oleh fungsi sel fagosit yang terganggu (paralisa), akibat sel fagosit yang menelan dan mencerna hemozoin. Hal ini terlihat dari semakin banyaknya tumpukan di dalam limpa. Immunosupresi yang terjadi secara tidak langsung berperan terhadap proses anemia, yaitu penurunan ekspresi mRNA GM-CSF, yang merupakan faktor pertumbuhan hematopoiesis, akan menyebabkan penurunan proliferasi dan diferensiasi sel progenitor hemopoetik. Peningkatan parasitemia yang tidak berkorelasi dengan penurunan kadar Hb menunjukkan

bahwa anemia mungkin tidak hanya disebabkan pecahnya eritrosit akibat multiplikasi parasit yang cepat namun juga karena supresi eritropoesis/diseritropoesis yang ditandai oleh penurunan mRNA GM-CSF. Selain itu ekspresi mRNA MIF pada limpa yang menurun mungkin disebabkan karena MIF berada di organ lain tempat eritrosit terinfeksi tersekustrasi.

Penelitian ini mempelajari ekspresi mRNA dan mungkin akan memberikan gambaran yang berbeda pada tingkat protein. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui secara keseluruhan aspek molekular peran MIF dan CD74 dalam patogenesis anemia malaria yaitu dengan menggunakan metode ELISA dan imunohistokimia untuk mengetahui profil protein atau *real time* RT-PCR untuk mengkuantifikasi ekspresi mRNA.

Summary

Malaria caused by *Plasmodium* sp is a health problem until now. Severe malarial anemia is a common cause of malaria mortality. Pathogenesis of malarial anemia is complex and multifactorial, therefore it is still not completely known. Malarial anemia is characterized by increasing erythrocyte destruction, both infected erythrocyte and normal erythrocyte, and decreasing erythrocyte production, diserythropoiesis and erythrophagocytosis.

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) may play role on the pathogenesis of malarial anemia. MIF is an important effector molecule in innate immune system. MIF acts by binding with one of its receptors, CD74, which is a surface molekul form of Major Histocompatibility Complex (MHC) class II. But, controversies on MIF role on the pathogenesis of malaria still persist until now. Martiney then hypothesized that MIF is a factor contributing to severe anemia. But study by Awandare then suggest that MIF may not responsible on increasing severity of anemia in children with acute falciparum. Besides, association between MIF and CD74 on the pathogenesis of anemia is still unknown, therefore a study investigating MIF and CD74 on the pathogenesis of anemia malaria is needed.

Study of cytokines will provide valuable information about the nature of host immune response. The most cytokine expression regulation is on the level of transcription, message turnover and protein degradation, therefore to studying mollecular aspect completely study of mRNA expressions are needed. MIF is stored in preformed inside vacuola of macrophages and CD74 is a transmembrane protein, therefore to studying mollecular aspect of MIF and CD74 is best conducting mRNA expressions of MIF and CD74 because we can study directly from the source. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is used to studying mechanisms underlying gene expressions because sensitive and strong to quantify mRNA and need fewer samples compare other previous techniques such as Northern blot, dot blot dan hybridization protection assays dan in situ hybridization.

Animal model in malaria studies is necessary, because both in vitro and in vivo study in human can not explain and interpret the basic biological immune

mechanism in host completely. Mice is the right model to analyse factors, which contribute in the pathology of anemia during acute falciparum infection. BALB/c mice infected with *Plasmodium yoelii* 17XL is being used to investigate immune response in malaria infection and mollecular aspects in malaria. Therefore, it still needs to study the role of MIF and its receptors in anemia pathogenesis in animal model. The aim of this study is to analyze mRNA expression of MIF and CD 74 on the pathogenesis of malarial anemia in BALB/c mice infected with *Plasmodium yoelii* 17XL.

Laboratory experimental with post test only design was conducted using 24 BALB/c mice, which were divided in 4 groups. Mice were infected intraperitoneally with 1×10^5 *P. yoelii* 17XL. Body weight, hemoglobin [Hb] level and parasitemia were measured daily. Spleen was collected on day 3 and 6 post infection for histopathological analysis and RNA isolation. mRNA of MIF, CD74, GM-CSF, IL-10, TNF α and IFN γ expressions were analysed by RT-PCR.

The results showed that infection with 1×10^5 *P. yoelii* 17XL caused fatality infection in BALB/c mice on day 6 post infection. Body weights significantly decreased on day 6 post infection.. Parasite prefered to infect reticulocyte on first day until day-3 post infection, then invaded all erithrocytes stages. Parasitemia was paten on day-3 post infection and significantly increase up to 66,16% on day-6 post infection ($p < 0,05$). Hemoglobin level started to decrease significantly on day-4 post infection and to be 4,92 g/dl on day-6 post infection ($p < 0,05$). Although Hb level started to decrease ignificantly on day 2 and parasitemia started to increase significantly on day 3 post infection, statistical correlation showed no correlation between Hb level and parasitemia.

Enlarged spleen with dark color and architectural changes of spleen tissue were increasing consistently with the duration of infection.. Spleen size in control, day 3 and day 6 were 2,12x0,54 cm; 2,42x0,63 cm and 2,87x0,72cm respectively. Spleen was to be darkened consistently with duration of infection. Histopathological examination of spleen by Hematoxillin-eosin (HE) staining showed architectural changes which were more obvious on day 6 post infection compare to day 3 and control. They consisted of enlargement of marginal zone, hyperplasia and congestion of red pulp and white pulp, edema, vasodilatation and

hypervascularization. Macrophage, macrophage phagocytosed hemozoin pigment, hemozoin pigment were prominently appeared on day 6 post infection.

RT-PCR results showed that the mRNA expression of MIF was decreased on day-3 and day-6 post infection compared to control, while expression of mRNA CD74 was increased on day-3 post infection and decreased on day-6 post infection compared to control. The expression of mRNA TNF α , IFN γ and IL-10 were increased on day-3 post infection compared to control and no expression on day-6 post infection.

Decreased mRNA expressions of MIF and CD74 consisten with decreasing hemoglobin levels in mice infected with lethal strain of Plasmodium on day 6 post infection, suggest that MIF might not play role on the pathogenesis of anemia. Decreased mRNA expressions of MIF, CD74, GM-CSF and no mRNA expressions of TNF α , IFN γ , IL-10 on day 6 p.i suggested that immunosuppression occured. Suppression of the immune system in lethal infection of Plasmodium yoelii 17XL maybe because of impairment of macrophage function due to ingested hemozoin or infected red blood cell, confirmed with increasing hemozoin deposition in spleen. Immunosuppression indirectly play role on the anemia process, by decreased mRNA expression of GM-CSF, which is a growth factor of hematopoesis, will lead to decreased proliferation and differentiation of hemopoetic progenitor. Increased parasitemia did not correlate with decrease hemoglobin level suggest that anemia caused by multiple factor, not only by erythrocyte lysis due to rapid multiplication of parasite but also by supression of erithropoesis/ diserythropoesis..

This study investigated mRNA expressions which may show different result on the protein level. Therefore further analysis for these cytokines production and protein expressions of MIF and CD74 in order to study completely the molecular aspects of pathogenesis of malaria anemia is needed, by using ELISA and immunohistochemistry to analyze proteins profile or real time RT-PCR to quantify mRNA expressions will be needed.

ABSTRACT

Background

Pathogenesis of anemia in malaria is still not completely known. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) may play role in pathogenesis of anemia in malaria. MIF would bind with its receptors, such as CD74, a surface form of Major Histocompatibility Complex (MHC) class II. The role of MIF and CD74 on the pathogenesis of malaria anemia is still unknown. The aim of this study is to analyze mRNA expression of MIF and CD74 on the pathogenesis of malaria anemia in BALB/c mice infected with *Plasmodium yoelii* 17XL.

Methods

Laboratory experimental with post test only design was conducted using 24 BALB/c mice, which were divided in 4 groups. Mice were infected intraperitoneally with 1×10^5 *P. yoelii* 17XL. Body weight, hemoglobin and parasitemia level were measured daily. Spleen was collected on day 0, 3 and 6 post infection (p.i) for histopathological analysis and RNA isolation. Expressions of mRNA MIF, CD74, GM-CSF, IL-10, TNF α and IFN γ were analysed by RT-PCR.

Results

Infection with 1×10^5 *P. yoelii* 17XL caused lethal infection in BALB/c mice. Body weight significantly decreased on day 6 p.i ($p < 0,05$). Hemoglobin levels started to decrease significantly on day-2 p.i and to be 4,92 g/dl on day-6 p.i. Parasitemia started to increase significantly on day-3 p.i ($p < 0,05$) and to be 66,16% on day-6 p.i. But no correlation between Hb levels and parasitemia. Enlarged spleen with dark color and architectural changes of spleen tissue were increasing consistently with the duration of infection. RT-PCR showed decreased expressions of mRNA MIF on day-3 and day-6 p.i. increased expressions of mRNA CD74, GM-CSF, TNF α , IFN γ and IL-10 on day-3 p.i and decreased expressions of mRNA CD74 and GM-CSF on day 6, while mRNA of TNF α , IFN γ , and IL-10 were not expressed on day 6 p.i.

Conclusion

Decreased mRNA expressions of MIF, CD74, GM-CSF, no expressions of mRNA of TNF α , IFN γ , and IL-10 and the low level of Hb on day-6 p.i suggested that the immunosuppression occurred and MIF might not be responsible to malaria anemia in BALB/c mice infected with *P. yoelii* 17XL. The high parasitemia might cause severe anemia in lethal infection of malaria. However, further analysis for these cytokines production and protein expressions of MIF and CD74, the role of MIF and CD74 on increasing erythrophagocytosis during malaria infection and erythropoiesis on bone marrow are also needed in order to study completely the molecular aspects of pathogenesis of malaria anemia.

Keywords: MIF, CD74, anemia, *Plasmodium yoelii* 17XL, BALB/c mice

ABSTRAK

Latar Belakang

Patogenesis anemia akibat malaria belum sepenuhnya diketahui. *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) diduga berperan dalam patogenesis anemia malaria. MIF berikatan dengan salah satu reseptornya, yaitu CD74, yang merupakan suatu bentuk permukaan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *class II*. Peran MIF dan CD74 dalam patogenesis anemia malaria belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi mRNA MIF dan CD74 dalam patogenesis anemia malaria pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii* 17XL.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *post test only design* menggunakan 24 ekor mencit BALB/c yang dibagi dalam 4 kelompok. Mencit diinfeksi 1×10^5 *P. yoelii* 17XL secara intraperitoneal. Berat badan, kadar hemoglobin (Hb) dan derajat parasitemia diukur setiap hari. Limpa diambil pada hari ke-0, ke-3 dan ke-6 pasca infeksi (p.i) guna analisis histopatologi dan isolasi RNA. Ekspresi mRNA MIF, CD74, GM-CSF, IL-10, TNF α dan IFN γ dianalisis menggunakan RT-PCR.

Hasil

Infeksi 1×10^5 *P. yoelii* 17XL berakibat fatal pada mencit BALB/c. Berat badan menurun signifikan pada hari ke-6 p.i ($p < 0,05$). Kadar Hb menurun signifikan sejak hari ke-2 pasca infeksi ($p < 0,05$), hingga mencapai 4,92 g/dl pada hari ke-6 p.i. Parasitemia meningkat signifikan ($p < 0,05$) sejak hari ke-3 p.i hingga mencapai 66,16% pada hari ke-6 p.i. Namun tidak didapatkan korelasi antara kadar Hb dan parasitemia. Limpa membesar, menjadi lebih gelap dan mengalami perubahan arsitektur yang meningkat seiring lama infeksi. Hasil RT-PCR menunjukkan penurunan ekspresi mRNA MIF pada hari ke-3 dan ke-6 p.i, peningkatan ekspresi mRNA CD74, GM-CSF, TNF α , IFN γ dan IL-10 pada hari ke-3 dan penurunan ekspresi mRNA CD74 dan GM-CSF pada hari ke-6, sedangkan mRNA TNF α , IFN γ dan IL-10 tidak terekspresi pada hari ke-6 p.i.

Kesimpulan

Penurunan ekspresi mRNA MIF, CD74, GM-CSF, mRNA TNF α , IFN γ dan IL-10 yang tidak terekspresi dan kadar Hb yang rendah pada hari ke-6 p.i kemungkinan menunjukkan terjadinya imunosupresi dan MIF mungkin tidak bertanggung jawab terhadap anemia malaria pada mencit BALB/c yang diinfeksi 1×10^5 *P. yoelii* 17XL. Parasitemia tinggi mungkin menyebabkan anemia berat pada infeksi letal malaria. Namun studi lebih lanjut tentang produksi sitokin dan ekspresi protein MIF dan CD74, peran MIF dan CD74 dalam peningkatan eritrofagositosis selama infeksi malaria dan studi tentang eritropoesis dalam sungsum tulang perlu dipelajari untuk mempelajari secara lengkap aspek molekular dalam patogenesis anemia malaria.

Kata kunci: MIF, CD74, anemia, *Plasmodium yoelii* 17XL, mencit BALB/c