

RINGKASAN

EKSPRESI mRNA INTERLEUKIN-10 (IL-10) DAN RESEPTOR INTERLEUKIN-10 (IL-10R) DALAM KAITANNYA DENGAN PATOGENESIS MALARIA BERAT PADA MENCIT STRAIN BALB/C YANG DIINFEKSI *PLASMODIUM YOELII 17XL*

Malaria merupakan penyakit parasit yang penting. Pada tahun 2010, terdapat 216 juta kasus malaria dan 655 ribu kematian di dunia, terutama pada anak-anak yang tinggal di Afrika. Sampai saat ini, malaria masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Malaria disebabkan oleh spesies parasit dari genus *Plasmodium* yang menginfeksi manusia.

Fenotip klinis infeksi malaria sangat bervariasi, mulai dari demam ringan hingga penyakit yang mengancam jiwa seperti anemi berat, asidosis, dan *end-organ failure*. Keseluruhan pola penyakit dipengaruhi oleh umur, reaksi imun yang pernah dialami hospes, dan antigenisitas parasit.

Sebagian besar patologi infeksi malaria disebabkan oleh respon inflamasi yang berlebihan terhadap parasit. Sitokin regulatori interleukin-10 (IL-10) berperan penting mengontrol inflamasi selama infeksi malaria dan memberikan proteksi terhadap imunopatologi, tetapi dapat mengurangi efektivitas mekanisme imun lainnya dalam mengeliminasi parasit, sehingga perlu pemahaman mengenai peran IL-10 dalam kaitannya dengan patogenesis malaria berat. Telah ditemukan keterlibatan IL-10 dalam pencegahan keparahan penyakit, meskipun masih menjadi bahan perdebatan. Namun, kadar IL-10 dan TNF α yang tinggi juga dilaporkan pada kasus malaria berat dan dengan komplikasi serta kasus malaria pada anak dengan parasitemia yang tinggi. Kemungkinan jalur episode malaria berat dapat disebabkan oleh dua keadaan, yaitu produksi tinggi IL-10 pada fase awal dan atau kurangnya produksi IL-10 pada fase transisi menuju respon imun adaptif.

Limpa memiliki peran penting pada infeksi malaria, yaitu sebagai tempat klirens eritrosit terinfeksi, tempat utama erythropoiesis dan hematopoiesis dan tempat respon sel T dan B spesifik patogen.

Karena terdapat keterbatasan penelitian malaria pada manusia, maka penelitian dengan hewan coba bermanfaat. Model mencit dengan *Plasmodium yoelii* banyak digunakan sebagai hewan coba untuk mempelajari aspek molekular dari virulensi malaria, dan memberikan informasi penting tentang peran respon imun pada proteksi dan patogenesis. *Plasmodium yoelii 17XL* menyebabkan infeksi letal pada mencit dengan manifestasi anemia berat dan parasitemia yang meningkat cepat.

Pada infeksi malaria pada mencit, diketahui efek negatif dan efek protektif IL-10 terhadap respon inflamasi. Seluruh respon yang dimediasi IL-10 tergantung dari aktivasi STAT3 yang dimediasi oleh kompleks reseptor pada permukaan sel yang terdiri dari dua rantai berbeda, yaitu IL-10R1(IL-10R α) dan IL-10R2(IL-10R β). Efek antiinflamasi IL-10 membutuhkan sekuens tambahan pada rantai IL-10R α yaitu C terminal. IL-10R dalam kaitannya terhadap IL-10 belum banyak diketahui dalam patogenesis malaria.

Pengukuran kadar sitokin dapat dianalisis pada level molekular dengan menggunakan RT-PCR yang merupakan metode yang paling cepat dan efisien untuk mendeteksi mRNA spesifik sel, dan penggunaan luas RT-PCR kuantitatif meningkatkan kapabilitas dalam menentukan peningkatan atau penurunan mRNA sitokin yang spesifik.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk menganalisis ekspresi IL-10 dan IL-10 R dalam kaitannya dengan patogenesis *severe malaria* pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *P. yoelii 17XL*.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Sebanyak 24 ekor mencit strain BALB/c betina, sehat, berusia 7 – 8 minggu, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (kontrol negatif), kelompok perlakuan (dibagi menjadi dua kelompok, yaitu H3 dan H6), kelompok survival (kontrol positif). Kelompok perlakuan dan kelompok survival merupakan mencit Balb/c yang diinfeksi secara injeksi intraperitoneal sebanyak 1×10^5 *P. yoelii 17XL*. Pemeriksaan parasitemia dan kadar hemoglobin dilakukan setiap hari dengan menggunakan sampel darah dari ekor mencit. Mencit pada kelompok perlakuan dikorbankan dan diambil limpanya pada hari ketiga pasca infeksi (kelompok H3) dan pada hari keenam pasca infeksi (kelompok H6). Jaringan limpa yang diperoleh kemudian dianalisis dengan pemeriksaan histopatologis dan isolasi RNA. Ekspresi mRNA IL-10, IL-10R1, IL-10R2, IFN γ , TNF α , dan TGF β dianalisis dengan tehnik RT-PCR.

Hasil eksperimen pada mencit menunjukkan sampel yang relatif homogen pada masing-masing kelompok bila dilihat dari berat badan, masa hidup, tingkat parasitemia, kadar hemoglobin. Pola infeksi menunjukkan pada hari pertama infeksi hingga hari ketiga pasca infeksi parasit banyak menginfeksi retikulosit, dengan tingkat parasitemia yang masih rendah. Sedangkan pada hari keempat pasca infeksi hingga selanjutnya parasit banyak menginfeksi eritrosit tua. Peningkatan parasitemia sejalan dengan penurunan kadar hemoglobin, terlihat setelah hari ke-3 pasca infeksi, sedangkan penurunan berat badan baru terjadi setelah hari ke-4 pasca infeksi.

Jaringan limpa mencit menunjukkan peningkatan ukuran yang semakin besar seiring dengan lama infeksi, berturut-turut pada hari ke-3 pasca infeksi mencapai $2.42 \pm 0.15 \text{ cm} \times 0.63 \pm 0.08 \text{ cm}$ dan hari ke-6 pasca infeksi mencapai $2.87 \pm 0.2 \text{ cm} \times 0.72 \pm 0.075$. Warna jaringan limpa mencit menunjukkan perubahan warna yang semakin gelap sejalan dengan lama infeksi. Pewarnaan jaringan limpa dengan Haematoxylin-Eosin (HE) menunjukkan perubahan arsitektur berupa peningkatan patologi yang sesuai dengan lama infeksi. Peningkatan patologi ini ditandai dengan pepadatan zona marginal, folikel menjadi tidak jelas, disertai dengan adanya pelebaran pembuluh darah, kongesti, edema jaringan, terdapat peningkatan vaskularisasi, peningkatan jumlah makrofag, *giant cell* dan peningkatan pigmen hemozoin, baik yang bebas maupun yang difagosit makrofag.

Analisis ekspresi sitokin dari hasil RT-PCR limpa mencit *Balb/c* yang diinfeksi *P. yoelii 17 XL* menunjukkan mRNA IL-10, IL-10R1, IL-10R2, begitu pula dengan TGF- β , IFN γ dan TNF α pada H0 (sebelum diinfeksi) dan H6 (hari ke-6 pasca infeksi) tidak terekspresi, sedangkan pada H3 (hari ke-3 pasca infeksi) terlihat ekspresi ekspresi IL-10, TGF β dan IFN γ lebih besar dibandingkan ekspresi TNF α , dan ekspresi IL-10R2 lebih besar dibandingkan ekspresi IL-10 R1.

Hal ini menunjukkan pada infeksi *P. yoelii 17XL* di mencit *Balb/c*, terjadi kegagalan respon imun efektif dalam mengontrol infeksi, sehingga infeksi bersifat letal. Meskipun pada awalnya diduga terjadi produksi dini IL-10, namun selanjutnya diduga terjadi keadaan immunosupresi menyeluruh yang diperantarai hemozoin yang membuat sel fagosit paralisis dan menurunkan ekspresi molekul imun lain. Pada penelitian ini, tidak didapatkan hasil yang persis sama dengan yang terjadi pada manusia, hal ini dikarenakan pada manusia ada beberapa faktor yang mempengaruhi yaitu status nutrisi, dan paparan terhadap obat antimalaria.

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar protein dan ekspresi IL-10

dan IL-10R untuk menjelaskan aspek molekular pada respon imun terhadap infeksi *P. yoelii 17XL*. Adanya perbedaan pola ekspresi mRNA IL-10R1 dan IL-10R2 dikarenakan kemungkinan adanya perbedaan fungsi dalam fungsinya sebagai reseptor IL-10. Hal ini terjadi karena IL-10R2 lebih berperan dalam transmisi kaskade sinyal dibandingkan IL-10R1 meneruskan kaskade sinyal IL-10. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membahas peran IL-10 R dalam infeksi malaria.

SUMMARY

EXPRESSION OF mRNA INTERLEUKIN-10 (IL-10) AND INTERLEUKIN-10 RECEPTOR (IL-10R) ON THE PATHOGENESIS OF SEVERE MALARIA IN BALB/C STRAIN MICE INFECTED WITH *PLASMODIUM YOELII* 17XL

Malaria is an important parasitic disease. In 2010, there are 216 million cases of malaria and 655 thousand deaths in the world, especially affected children who live in Africa. Until now, malaria remains a health concern in Indonesia. Malaria is caused by parasites from genus *Plasmodium* that infect humans.

Clinical phenotypes of malaria infection vary greatly, ranging from mild fever to life-threatening diseases such as severe anemia, acidosis, and end-organ failure. The overall pattern of disease is influenced by the age, host immune reactions who ever experienced, and antigenicity of parasites.

Mostly, the pathology of malaria is caused by an excessive inflammatory response to the parasite. Regulatory cytokine, interleukin-10 (IL-10), plays an important role to control inflammation during malaria infection and provide protection against immunopathology. However, it can reduce the effectiveness of other immune mechanisms in elimination of parasites. Therefore, it needs to clarify the role of IL-10 on the pathogenesis of severe malaria. It has been found that the involvement of IL-10 in the prevention of disease severity, although it is still debatable. The ratio of IL10: IL12 associated with the decreasing production of IFN γ causes severe anemia in *Plasmodium falciparum* infection. However, high levels of IL-10 and TNF α were also reported on the severe malaria and malaria with complications as well as in children with high parasitemia. Possible pathways of severe malaria episodes can be caused by two circumstances, high production in the early phase of IL-10 and or lack of the production of IL-10 in the transition phase.

Spleen has an important role in malaria infection: clearance of infected erythrocytes, the main site of erythropoiesis and hematopoiesis, and as the site where the T and B cells response to specific pathogens.

While malaria studies in human is not always satisfactory because of some limitations, therefore the use of experimental animals give many advantages. Mice infected with *Plasmodium yoelii* are widely used as a model for illustrating the molecular aspects of malaria virulence, and provides important information on the role of immune responses in protection and immunopathogenesis. *Plasmodium yoelii* 17XL causes lethal infection in mice and leads to clinical manifestations such as severe anemia and rapidly increasing parasitemia.

In mice, malaria infections showed negative and protective effects of IL-10 against inflammatory response. Those effects are mediated by IL-10 dependent STAT3 activation of cell surface receptor complex that consists of two different chains, IL-10R1 (IL-10R α) and IL-10R2 (IL-10R β). The anti-inflammatory effect of IL-10 requires additional sequences in the IL-10R α chain, i.e. C terminal. IL-10R in relation to the IL-10 signal has not yet been known well in the pathogenesis of malaria.

Cytokine levels can be analyzed at the molecular level by using RT-PCR technique, which has most rapid and efficient way to detect cell-specific mRNA. In addition, the widely use of quantitative RT-PCR improve the capability to determine the increase or decrease in cytokine-specific mRNA level.

This study generally aims to analyze the expression of IL-10 and IL-10 R in the pathogenesis on severe malaria in mice strain BALB /c infected with *P. yoelii* 17XL.

The laboratory experimental research with post test only-control group design was conducted. A total of 24 BALB /c mice, female, healthy, age 7-8 weeks, were divided into 4 groups: control group (negative control), the treatment groups (for Day 3 and Day 6 post

infection), and the survival group (positive control). The treatment and survival groups were BALB/c mice infected intraperitoneally with 1×10^5 *P. yoelii* 17XL. Everyday, blood was taken from mice tail for parasite count and hemoglobin level, and the body weight measurement were done. Infected mice in treatment groups were sacrificed on Day 3 and Day 6 post infection. Spleen tissues were collected for histopathological analysis and RNA isolation. mRNA expressions of IL-10, IL-10R1, IL-10R2, IFN γ , TNF α , and TGF β were analysed by RT-PCR technique.

The result showed that samples are relatively homogeneous samples in weight loss, survival life, parasitemia level, and hemoglobin levels in their groups. Evaluation of patterns of infection showed that from the first day until the third day post-infection parasite prefer to infect reticulocytes, with a low level of parasitemia. On the fourth day post-infection forward, parasites prefer to infect many older erythrocytes. Increased parasitemia was in line with the decrease levels of hemoglobin after the day-3 post-infection, whereas the weight loss occurred after the 4th day post-infection.

Spleen tissues in mice infected with *P. yoelii* 17XL were enlarged on Day-3 and Day-6 post infection to $2.42 \pm 0.15\text{cm} \times 0.63 \pm 0.08\text{cm}$ and $2.87 \pm 0.2\text{cm} \times 0.72 \pm 0.075$, respectively, and the colour became darker that corresponds with the duration of infection. The histopathological analysis using Haematoxylin-eosin (HE) staining showed architectural changes consistent with the duration of infection, such as the congestion of the marginal zone, unobviously follicular zone, accompanied by a dilation and congestion of blood vessels, tissue edema, increased vascularity, increased number of macrophages and hemozoin phagocytizing macrophages, and increased hemozoin pigment.

RT-PCR of Balb/c mice spleen showed that mRNA of IL-10, IL-10R1 and IL-10R2, as well as TGF- β , IFN γ and TNF- α , increased in H3 than in H6 and control. The expression of mRNA of IL-10, TGF β and IFN γ were more than TNF α , and the expression of mRNA of IL-10R2 more than IL-10 R1.

This data showed that *P. yoelii* 17XL infection in Balb/c mice demonstrated the failure of effective immune response in controlling infection, and led to lethal infection. Although initially there was early production of IL-10, but later become suppressed. This immunosuppression might be mediated by hemozoin, that paralyzed dendritic cells and hampered other immune molecules expression. This results seemed not exactly occurred in human, because several factors involved in human malaria infection, for instance the nutritional status, and exposure to antimalarial drugs.

In summary, this study suggested that the absent of mRNA expression of IL-10 and IL-10R may indicate the failure in controlling *P. yoelii* 17XL infection in Balb/c mice. Therefore, it needs to further study on protein level and expression to clarify molecular aspects on immune response to *P. yoelii* 17XL infection. The different pattern of mRNA expression of IL-10R1 and IL-10R2 might be caused by its different function of both IL-10 receptors. This phenomenon may represent that IL-10R2 can not bind alone to IL-10, unlike IL-10R1. However, it is required the change of conformation of IL-10 receptor complex by binding IL-10R1 and IL-10 before binding IL-10R2, in transmitting the signaling cascade of IL-10. Further research need to study IL-10 R in malaria infection.

ABSTRAK

Patogenesis malaria berat masih belum diketahui. Kemungkinan jalur episode malaria berat dapat disebabkan oleh dua keadaan, produksi tinggi pada fase awal IL-10 dan atau kurangnya produksi IL-10 pada fase transisi. Efek negatif dan efek protektif IL-10 dimediasi oleh IL-10R1 dan IL-10R2. Masih belum diketahui peran IL-10 dan reseptornya pada malaria. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi IL-10 dan IL-10 R dalam kaitannya dengan patogenesis *severe malaria* pada mencit strain BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium yoelii 17XL*.

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *post test only control group design*. Sebanyak 24 mencit strain Balb/c, betina, usia 7-8 minggu, dibagi menjadi 4 kelompok. Mencit Balb/c diinfeksi secara intraperitoneal dengan 1×10^5 *P. yoelii 17XL*, dan dikorbankan pada hari ke-3 dan ke-6 pasca infeksi. Parasitemia, kadar hemoglobin, dan berat badan diperiksa setiap hari. Jaringan limpa diambil untuk pemeriksaan histopatologi dan isolasi RNA. Ekspresi mRNA IL-10, IL-10R1, IL-10R2, IFN γ , TNF α , dan TGF β dianalisis dengan RT-PCR.

Peningkatan parasitemia sejalan dengan penurunan kadar hemoglobin, terlihat setelah hari ke-3 pasca infeksi, sedangkan penurunan berat badan baru terjadi setelah hari ke-4 pasca infeksi. Limpa terlihat membesar, berwarna semakin gelap, dan menunjukkan perubahan arsitektur dengan peningkatan giant cell dan fagosit yang mengandung pigmen malaria yang sejalan dengan lamanya infeksi. Terdapat peningkatan ekspresi mRNA IL-10, IL-10R1 dan IL-10R2, begitu pula dengan TGF- β , IFN γ dan TNF α pada H3, dibandingkan pada H6 dan H0, dengan ekspresi IL-10, TGF- β , dan IFN γ lebih besar dari TNF α dan IL-10R2 lebih terekspresi daripada IL-10R1 pada H3.

Tidak adanya ekspresi IL-10 dan IL-10R pada H6, menunjukkan adanya kegagalan regulator mengontrol infeksi *P. yoelii 17XL* pada mencit Balb/c. Hal ini mungkin disebabkan hemozoin, yang memparalisa fagosit dan menurunkan ekspresi molekul imun lain. Diperlukan penelitian pada kadar dan ekspresi protein untuk menjelaskan aspek molekular pada respon imun terhadap *P. yoelii 17XL*. Peran IL-10R masih belum jelas, maka perlu penelitian lebih lanjut mengenai peran reseptor IL-10 dalam infeksi malaria.

Kata Kunci : mRNA IL-10 dan IL-10R, RT-PCR, patogenesis severe malaria, mencit Balb/c yang diinfeksi *P.yoelii 17XL*

ABSTRACT

The pathogenesis of severe malaria is still unsolved. The possible pathways of severe malaria episodes can be caused by the high production of IL-10 in the early phase and or the lack production of IL-10 in the transitional phase. The negative and protective effects of IL-10 mediated by IL-10R1 and IL-10R2. However, it still unknown the role of IL-10 and its receptors in the pathogenesis of malaria. Thus, this study aimed to analyze mRNA expression of IL-10 and IL-10 R on the pathogenesis of severe malaria in strain BALB / c mice infected with *P. yoelii 17XL*.

The laboratory experimental research with post test only-control group design was conducted. A total of 24 BALB /c mice, female, age 7-8 weeks, were divided into 4 groups. BALB/c mice were infected intraperitoneally with 1×10^5 *P. yoelii 17XL*, and were sacrificed on Day-3 and Day-6 post infection. Parasite count, hemoglobin level, and the body weight were observed daily. Spleen tissues were collected for histopathological analysis and RNA isolation. mRNA expressions of IL-10, IL-10R1, IL-10R2, IFN γ , TNF α , and TGF β were analysed by RT-PCR technique.

BALB/c mice infected with *P. yoelii 17XL* caused lethal infection with signs of increased parasitemia in line with the decrease levels of hemoglobin after the day-3 post-infection, and the weight loss after the 4th day post-infection. Spleen were enlarged, darken, and architectural changes corresponding with the duration of infection. Expression of mRNA of IL-10, IL-10R1, IL-10R2, IFN γ , TNF α , and TGF β were increased on the day 3 post infection, compared with day 0 and day 6 post infection. The mRNA of IL-10, TGF β , and IFN γ , was more expressed than TNF α and mRNA IL-10R2 was more expressed than mRNA of IL-10R1 on the day 3 post infection.

In summarize, this study suggested that the low mRNA expression of IL-10 and IL-10R on day 6 may indicate the failure of regulator in controlling *P. yoelii 17XL* infection in BALB/c mice. It might be caused by hemozoin, that paralyzed dendritic cells and hampered other immune molecules expression. Therefore, it needs to further study on protein level and expression to clarify molecular aspects on immune response to *P. yoelii 17XL* infection. Furthermore, the role of IL-10R(s) are still unobviously, so further research is required for study on IL-10 R in malaria infection

Keywords : mRNA of IL-10 and IL-10R, RT-PCR, pathogenesis of severe malaria, Balb/c mice infected with *P. yoelii 17XL*