

PENGARUH PENAMBAHAN CLOFAZIMINE TERHADAP AKTIVASI INH PADA MENCIT YANG DIINFEKSI *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN INH MUTAN *katG*

REVIONO

Promotor : Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., SpP(K)

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS; CLOFAZIMINE

KKA KK Dis K 14/12 Rev p

Copyright© 2011 by Airlangga University Library Surabaya

RINGKASAN

Pengaruh penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* mutan *katG*

Tuberkulosis (TB) masih merupakan penyebab kematian utama di dunia terutama di Asia dan Afrika. Setiap tahun tercatat 9.400.000 kasus baru di dunia dan saat ini prevalensi kasus TB di dunia adalah 11.100.000 (WHO, 2009). Kendala program penanggulangan TB yang serius saat ini adalah peningkatan resistensi obat anti TB terutama *multidrug resistant* TB (MDR-TB), yaitu resisten INH dan Rifampisin. Kasus MDR – TB dapat menimbulkan kesulitan dalam tata laksana, selain itu biayanya cukup mahal, baik dalam dan menegakkan diagnosis maupun mahalnnya harga obat anti TB lini kedua yang digunakan untuk MDR – TB. Obat lini kedua selain mahal, efektivitas rendah dan mempunyai efek samping lebih banyak. INH merupakan obat anti TB pilihan utama karena efektivitas yang tinggi ditoleransi dengan baik oleh tubuh dan harga ekonomis (WHO, 2006). Perlu pengembangan penanganan kasus resistensi INH dengan penambahan preparat yang dapat meningkatkan efektivitas INH dengan aktivasi lewat jalur penambahan superoksida (O_2^-). Clofazimine sebagai penghasil O_2^- diduga mampu mengaktivasi INH pada kasus TB dengan resistensi INH (Wang JY, *et al.*, 1998).

Clofazimine masuk ke dalam tubuh dapat meningkatkan FMLP, PMA, asam arakidonat dan Ca ionosphere untuk merangsang neutrofil dan makrofag memproduksi O_2^- . Anion superoksida ini akan mengaktifkan INH melalui jalur *katG independent* sehingga membentuk metabolit aktif. Metabolit aktif INH adalah ROS, ROR dan *isonicotinoyl radical*. *Reactive oxygen species* terdiri dari OH^* , H_2O_2 , O_2^- yang akan menyebabkan kerusakan DNA dan lipid peroksidasi. *Reactive organic radical* yang terdiri dari *isonicotinic acylradical*, *acyl*, *acyl peoxo* dan *pyridil radical* akan menghambat sintesis asam mikolat sebagai pembentuk dinding *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang Y, *et al.*, 2005).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengonfirmasi bahwa penambahan Clofazimine secara *in vivo* pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH mutan *katG* dapat menimbulkan peningkatan aktivasi INH memproduksi metabolit aktif. Clofazimine dapat meningkatkan daya bunuh INH terhadap *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH.

Metode penelitian ini menggunakan rancangan eksperimental murni dengan *randomized post test only control group design*. Isolat *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH disiapkan dengan uji identifikasi dan uji resistensi pada media Lowenstein Jensen. Mutasi

gen *katG* ditentukan dengan PCR dan *sequencing* gen *katG*. Hewan coba menggunakan mencit yang dibagi menjadi empat kelompok masing-masing 10 ekor. Mencit diinfeksi secara instilasi transtrakeal dengan *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH mutan *katG* sebanyak 0,1 mL, dengan konsentrasi 10^5 per mL. Akhir perlakuan dilakukan pemeriksaan CFU dan kerusakan histopatologi pada paru mencit.

Hasil penelitian ini menunjukkan CFU kelompok I (INH dan Clofazimine) = $3,9 \times 10^4$ lebih rendah dibandingkan dengan kelompok II (INH saja) = $5,6 \times 10^4$ ($p=0,257$), lebih rendah dibandingkan dengan kelompok III (tanpa obat awal sakit/perlakuan) = $7,3 \times 10^4$ ($p=0,041$) dan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IV : $7,5 \times 10^4$ ($p=0,004$). Perbandingan CFU pada kelompok kontrol (II) : $5,6 \times 10^4$ lebih rendah dibandingkan dengan kelompok III = $7,3 \times 10^4$ ($p=0,406$) dan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IV (akhir sakit/perlakuan) = $7,5 \times 10^4$ ($p=0,056$). Kerusakan histopatologis dengan skor Dormans, kelompok I = 11,10 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok II = 12,20 ($p=0,469$), lebih rendah dibandingkan dengan kelompok III = 12,70 ($p=0,299$) dan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IV = 13,20 ($p=0,223$). Perbandingan kerusakan histopatologi antara kelompok I dengan kelompok lain pada hanya pada tipe pembentukan granuloma yang berbeda bermakna. Kerusakan tipe granuloma kelompok I = 1,90 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok II = 3,20 ($p=0,023$), lebih rendah dibandingkan kelompok III = 3,20 ($p=0,029$) dan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IV ($p=0,034$).

Temuan ini berbeda dengan penelitian serupa secara *in vitro* yang menunjukkan bahwa penambahan O_2^- baik lewat Clofazimine maupun plumbagin akan meningkatkan aktivasi INH pada *Mycobacteria* resisten INH mutan *katG*. (Bulatovic VM, *et al.*, 2002). Kemungkinan pertama penyebabnya adalah peningkatan sekresi enzim superoksida dismutase (SOD) pada kondisi *in vivo* dibandingkan dengan kondisi *in vitro* sehingga mendismutasi O_2^- menjadi H_2O_2 akibatnya INH tidak cukup teraktivasi. Kemungkinan kedua terdapat gen lain yang terkait dengan resistensi INH yang belum dikendalikan yaitu gen *inhA*, *ahpC*, *kasA* dan *ndh* (Zhang Y *et al.*, 2005). Kemungkinan ketiga waktu penambahan Clofazimine kurang lama sehingga efektivitasnya belum tampak.

Temuan penting pada penelitian ini adalah pembentukan granuloma gradasi berat-sangat berat pada kelompok I berdasarkan skor Dormans lebih rendah dibandingkan dengan kelompok II, $p = 0,023$. Pembentukan granuloma diawali dengan keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler. Penambahan Clofazimine terhadap INH tampaknya lebih efektif pada kondisi intraseluler (di dalam makrofag). Hal ini kemungkinan karena SOD yang dihasilkan hanya dari *Mycobacterium tuberculosis* saja tanpa SOD dari jaringan paru mencit.

Kesimpulan penelitian ini (i) CFU pada penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH mutan *katG* tidak berbeda dibandingkan dengan mencit yang diberi INH saja (ii) Kerusakan jaringan paru pada penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH mutan *katG* tidak berbeda dibandingkan dengan mencit yang diberi INH saja (iii) Pembentukan granuloma gradasi berat - sangat berat pada penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium resisten* INH mutan *katG* lebih sedikit dibandingkan dengan mencit yang diberi INH saja.

Saran: perlu penelitian lanjutan yang mengeksplorasi lama penambahan Clofazimine dan pemberian Clofazimine yang diberikan 8 jam terlebih dahulu setelah INH untuk menilai hambatan pembentukan CFU dan kerusakan histopatologik. Beberapa faktor perlu dipertimbangkan diantaranya faktor biologis sel inflamasi terutama makrofag, pengaruh SOD, pengaruh gen pengendali resisten INH lainnya (*inhA*, *ndh*, *kasA* dan *ahpC*) dan marker inflamasi antara lain $IFN\gamma$.

SUMMARY

The Effect of Clofazimine Additional on the INH activation in INH-resistant *katG*-mutant *Mycobacterium tuberculosis*-infected Mice

Tuberculosis (TB) remains the leading cause of mortality worldwide, particularly in Asia and Africa. Around the world, approximately 9.400.000 new cases were recorded annually. While current prevalence is 11.100.000 (WHO, 2009). Serious constrain of TB control programme is attributed to the increasing resistance to current anti-TB drug, especially multidrug resistant TB (MDR-TB) type. Cases of MDR-TB will lead to the difficulties in management of tuberculosis. Also, it might end up with higher cost both in establishing the definite diagnosis and the price of second-line anti-TB drugs administered for MDR-TB. In addition to being expensive, second-line drugs are less effective and attributed to more possible side effects. Isoniazid (INH) becomes a choice of anti-TB drugs due to its high effectiveness, well tolerated properties and very economical price (WHO, 2006). Moreover, it is suggested to develop the management of INH resistance cases by combination with substance(s) to increase INH effectiveness by activation through superoxide (O_2^-) additional. An O_2^- producing substance, Clofazimine, is suggested to activate INH on INH-resistant TB cases (Wang JY, et al., 1998).

Clofazimine induces FMLP, PMA, arachidonic acid and Ca ionosphere to stimulate neutrophil and macrophage production of O_2^- . Through a *katG* independent pathway, this anion superoxide activates INH to form the active metabolites which are ROS, ROR and isonicotinoyl radical. Reactive oxygen species comprises of OH^* , H_2O_2 , O_2 of which induce DNA damage and lipid peroxydase. Reactive organic radical consists of isonicotinic acyl radical, acyl, acyl peoxo and pyridil radical which inhibit the synthesis of mycolic acid as wall-former of *Mycobacterium tuberculosis* (Zang Y et al., 2005).

The objective of the present study was to confirm if Clofazimine in vivo additional on the INH-resistant *KatG*-mutant *Mycobacterium tuberculosis* might induce the INH activation in active metabolites produce. Clofazimine is suggested to induce the killing capacity of INH towards INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. The effect was determined by counting the bacteria colony forming unit (CFU) and assesing the degree of histopathologic damage using Dormans's score.

Methods, the present study was a true experimental study with randomized controlled group post-test only design. INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates were cultured on Lowenstein Jensen medium for identification and susceptibility test. *KatG* gene mutation was determined by PCR and *katG* gene sequencing. Mice were infected via transtracheal instillation with 0.1 mL solution (10^5 bacteria per mL) of INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Mice were randomly divided into four groups. The group with its administered agents were group I with INH and Clofazimine, group II with INH only, group III with no drug (initial treatment), group IV with no drugs (end of

treatment). Drug effectiveness were assessed by histopathological abnormality using Dormans score and CFU counts of the mice's lungs.

These result shows the CFU count of subset Group I = 3.9×10^4 was lower than in group II = 5.6×10^4 ($p = 0.257$), lower compared to group III = 7.3×10^4 ($p = 0.041$) and lower than group IV = 7.5×10^4 ($p = 0.004$). CFU count comparison of control group (II) = 5.6×10^4 lower than in group III = 7.3×10^4 ($p = 0.406$) and lower than group IV = 7.5×10^4 ($p = 0.056$). We found that histopathologic abnormality using Dormans score in Group I = 11.10 was lower than in Group II = 12.20 ($p = 0.469$), lower compared to group III = 12.70 ($p = 0.299$) and lower than group IV = 13.20 ($p = 0.223$). The significantly difference between group I and other groups was only on the histopathologic abnormality type of granuloma formation. The scoring of granuloma formation in group I = 1.90 lower than group II = 3.20 ($p = 0.023$), lower than group III = 3.20 ($p = 0.029$) and lower than group IV = 3.30 ($p = 0.034$). These results were different from previous in vitro studies which showed that the addition of either anion superoxide by Clofazimine and plumbagin increased the activation of INH in INH-resistant *katG*-mutant *Mycobacteria* (Bulatovic VM, et al., 2002).

One plausible explanation of this finding is the increase secretion of superoxide dismutase (SOD) enzyme in vivo compared to that of in vitro conditions. This increase induced dismutation of O_2^- to H_2O_2 , and resulted in lower activation of INH. The second possibility is attributed to the existence of other genes associated with INH resistance that were uncontrolled in the present study, among others were *inhA*, *ahpC*, *kasA* and *ndh* genes (Zhang Y, et al., 2005). The third one is attributed to the lack of duration of Clofazimine administration to allow the effect to be induced.

Other important findings is lower formation of the severe-to-very severe grade of granuloma formation group I compared to group II ($p=0.023$). Granuloma formation was initiated by intracellular *Mycobacterium tuberculosis* infiltration. Presumably, these finding suggested that the addition of Clofazimine to INH might be more effective under intracellular conditions (in macrophages). This might be rendered to the possibility that SOD was produced only by *Mycobacterium tuberculosis* without addition of SOD production from mice's lung tissue.

Conclusion, the present study showed that (i) colony forming unit (CFU) count and histopathologic abnormality (Dormans score) assessment under condition of Clofazimine addition to INH was not significantly different than that of INH alone. The severe-to-very severe grade of granuloma formation in treatment group mice under condition of Clofazimine addition to INH was less than that of INH only group.

Further studies were suggested for the exploration of optimal duration of Clofazimine additional to INH and of the Clofazimine administration 8 hours before INH administration to assess the bacteria colony forming unit and the degree of histopathologic abnormality. Several factors should be considere among others cell inflammation biologic properties especially macrophage, SOD role, other genes related to INH resistance (*inhA*, *ndh*, *kasA*, *ahpC*) and inflammation markers i.e IFN γ .

ABSTRAK

Pengaruh penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* mutan *katG*

Masalah resistensi obat antiTB terutama INH menjadi kendala yang serius dalam program penanggulangan TB. Anion superoksida (O_2^-) dapat mengaktivasi INH untuk menjadi metabolit aktif terutama melalui jalur *katG* independent.

Penelitian ini bertujuan mengonfirmasi bahwa Clofazimine dapat merangsang pembentukan O_2^- sehingga dapat mengaktivasi INH pada *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH mutan *katG*

Metode penelitian, rancangan eksperimental murni dengan *randomized post test only control group design*, pada hewan coba mencit. Mencit diinfeksi secara transtrakeal dengan *Mycobacterium tuberculosis* resisten INH sebanyak 0,1 mL larutan kuman dengan konsentrasi 10^5 per mL. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok terdiri dari kelompok I : INH dan Clofazimine, Kelompok II : INH saja, Kelompok III : tanpa obat (awal perlakuan), Kelompok IV : tanpa obat (akhir perlakuan). Penilaian keefektifan obat ditentukan dengan pemeriksaan CFU kerusakan histopatologik (skor Dormans) ada paru mencit.

Hasil penelitian ini memperlihatkan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna $p=0,257$ antara CFU (mL/g) *M tuberculosis* resisten INH pada kelompok penambahan Clofazimine dan INH (kelompok I) dengan kelompok INH saja (kelompok II). Demikian juga Skor Dormans antara kelompok I dan kelompok II $p=0,469$. Pada kerusakan histopatologik tipe granuloma menunjukkan perbedaan bermakna kelompok I=1,90 lebih rendah dibandingkan kelompok II=3,20 ($p=0,023$), lebih rendah dibandingkan kelompok III=3,20 ($p=0,029$) dan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok IV= 3,30 ($p=0,034$). Kesimpulan penelitian yaitu pembentukan koloni (CFU) dan kerusakan histopatologik (skor Dormans) pada pemberian Clofazimine dan INH tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan pemberian INH saja. Pembentukan granuloma gradasi berat - sangat berat pada penambahan Clofazimine terhadap aktivasi INH pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium resisten* INH mutan *katG* lebih sedikit dibandingkan dengan mencit yang diberi INH saja.

Kata kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, resisten INH, mutan *katG*, Clofazimine

ABSTRACT**Effect of Clofazimine Additional on the INH activation in INH-resistant *katG*-mutant *Mycobacterium tuberculosis*-infected Mice**

The emergence of anti tuberculosis drugs resistance particularly to isoniazid (INH) is becoming a serious constrain in TB control program. Anion superoxide (O_2^-) activates INH to produce active metabolites especially through independent *katG* pathway.

This study was aimed to confirm if Clofazimine stimulates O_2^- formation, hence activates INH in INH-resistant *katG*- mutant *Mycobacterium tuberculosis*.

The present study was a true experimental study with randomized controlled group post test only design in mice animal model. Mice were infected via transtracheal instillation with 0.1 mL (10^5 /mL bacilli) INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* solution. Mice were randomly divided into four groups with its respective administered agents, which were Group I with INH and Clofazimine, Group II with INH only, group III with no drug (initial treatment), group IV with no drug (end of treatment). Drug(s) effectiveness were assessed by CFU counts and histopathologic abnormality (Dorman's score) of the mice lungs.

The result showed no significant difference in CFU between group I (addition of Clofazimine to INH) and INH only (group II) ($p=0.257$). Dormans's score in group I and group II showed no significant difference ($p=0.469$). Significant difference was only shown on the histopatologic degree of granuloma formation of which group I was lower than that of other groups. The scoring of granuloma formation in group I = 1.90 lower than group II = 3.20 ($p = 0.023$), group III = 3.20 ($p = 0.029$) and group IV= 3.30 ($p = 0.034$).

The study concluded that colony forming unit (CFU) count and histopathologic abnormality (Dorman's score) under condition of Clofazimine addition to INH was not significantly different than that of INH alone. The severe-to-very severe grade of granuloma formation under condition of Clofazimine addition to INH was less than that of INH only.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, INH resistant, *katG* mutant, Clofazimine