Increases Interleukin (IL)-4 Expression is Related with Decreases of Bax and Lymphocyte Apoptosis in Bronchiolus and Lung of Asthmatic Mice

Peningkatan Ekspresi Interleukin (IL)-4 Berhubungan dengan Penurunan Bax dan Apoptosis Limfosit pada Bronkiolus dan Paru Mencit Asma

Saptadi Yulianto*, HMS Chandra Kusuma*, Edi Widjajanto**

*Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSSA Brawijaya

**Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSSA Brawijaya

ABSTRACT

Decrease of lymphocyte apoptosis is one factor that leads to chronic airway inflammation in allergic asthma. Previous studies revealed the role of interleukin (IL)-4 in preventing lymphocyte apoptosis; however there are few studies about the role of lymphocyte-Bax and its relationship with IL-4 in asthma. The aim of the study is to demonstrate IL-4 role in preventing lymphocyte apoptosis via lymphocyte-Bax inactivation in bronchioli and lungs of asthmatic mice. It is a randomized control group experimental study. The subject was Balb/c mice that categorized into 2 groups: asthma and non-asthma. Asthma group was sensitized by ovalbumin intraperitoneally in day 0 and 14, followed by inhalation every 2-3 days for 6 weeks. In week 8, all of mice were terminated. The IL-4 and lymphocyte-Bax expression was examined through immunohistochemistry method, whereas lymphocyte apoptosis by TUNEL method. Independent sample t-test, Mann Whitney U test, regression analysis, and path analysis was used in statistical analysis with confident interval 95%. The bronchioli and lungs specimens were obtained from 18 mice (9 in each group). Lymphocyte apoptosis was similar between 2 groups ($p=0.116$), additionally lymphocyte-Bax decreased in asthmatic group ($p=0.003$). This indicated low activity of lymphocyte apoptosis in asthmatic group. Conversely, IL-4 expression increased in asthmatic group ($p=0.00$). There was moderate negative correlation ($r^2=0.29$, $p=0.011$) between IL-4 and lymphocyte apoptosis. There was also strong negative correlation ($r^2=0.39$, $p=0.002$) between IL-4 and lymphocyte-Bax expression. However, we did not find any correlation between lymphocyte-Bax and lymphocyte apoptosis ($r=0.37$, $p=0.065$). Path analysis revealed the stronger direct relationship between IL-4 and lymphocyte apoptosis rather than indirect relationship via lymphocyte-Bax inactivation. We conclude that increases of IL-4 expressions inhibit lymphocyte apoptosis; however, it is not due to the Bax-lymphocyte inactivation.

Keywords: asthma, mice, ovalbumin, lymphocyte apoptosis, IL-4, lymphocyte-Bax

PENDAHULUAN

Asthma menjadi masalah di seluruh dunia dengan prevalensi diperkirakan mencapai 300 juta orang (1-18% dari populasi). Insiden asma ditemukan sebanyak 6% pada dewasa, dan 10% pada anak. Mortalitas asma mencapai 250.000 orang per tahun(1). Asma adalah gangguan inflamasi kronik pada saluran respirasi dengan banyak sel yang berperan, terutama sel mast, basofil, dan limfosit-T, serta elemen seluler. Inflamasi kronik berkaitan dengan hiperresponsif saluran nafas yang menyebabkan episode berulang dari *wheezing*, sesak nafas, rasa tertekan pada dada (*chest tightness*), dan batuk, terutama pada malam atau dini hari. Episode ini berkaitan dengan obstruksi saluran respiratorik yang luas, dengan derajat bervariasi, yang kadang reversibel secara spontan atau dengan pengobatan (1,2).

Kegagalan meredanya proses inflamasi setelah terjadinya eksaserbasi merupakan masalah utama pada asma. Inflamasi kronis atau persisten ini telah

dibuktikan merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi keparahan dan frekuensi eksaserbasi, serta berperan dalam *remodelling* jalan nafas, hipertrofi otot polos, dan hiperreaktivitas jalan nafas (3,4). Salah satu mekanisme yang diduga berperan dalam kronisitas asma adalah kegagalan apoptosis sel-sel radang, antara lain: eosinofil, netrofil, limfosit-T, dan makrofag (5-7). Secara fisiologis, apoptosis merupakan kematian sel terprogram, yang merupakan suatu bentuk kematian sel untuk menjaga keseimbangan perkembangan sel-sel tubuh, dimana terjadi resorpsi sel tanpa kerusakan berat pada metabolisme seluler. Pada keadaan fisiologis, apoptosis hanya terjadi pada beberapa sel dalam jumlah kecil, dan selektif (8). Pada proses inflamasi, apoptosis berfungsi mengendalikan kelebihan sel inflamasi, membatasi kerusakan jaringan, dan meredakan proses inflamasi (7). Penelitian pada beberapa penyakit, yaitu polip nasi dan arthritis rheumatoid, menunjukkan bahwa kronisitas penyakit tersebut berhubungan dengan kegagalan atau keterlambatan apoptosis pada sel-sel radang sehingga sel-sel tersebut bertahan pada tempat inflamasi (9,10). Limfosit-T, terutama sel T_H2 , yang berperan sentral dalam regulasi sistem imun dan patogenesis asma, juga telah dibuktikan mengalami kegagalan proses apoptosis (5).

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 3, Desember 2009; Korespondensi: Saptadi Yulianto, Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jln. Veteran, Malang. Tel. +628179619040, Email : dr.saptadiyulianto@yahoo.com

Salah satu faktor penghambat apoptosis limfosit-T adalah sitokin pro-inflamasi, terutama interleukin (IL)-4. Secara *in vitro* dan *in vivo*, dibuktikan bahwa IL-4 mampu menghambat apoptosis pada limfosit-T (11,12). Di sisi lain, pada reaksi alergi dibuktikan terjadi peningkatan produksi IL-4 oleh *antigen presenting cell* (APC) dan sel T_H2 (13), serta oleh basofil (14). Penelitian oleh Vella (1998) merupakan penelitian *in vivo* pada mencit transgenik menggunakan induksi *staphylococcal enterotoxin A* (SEA) dan pemberian DNA yang mengkode IL-4 sehingga penelitian ini analog dengan kondisi infeksi dan bukan kondisi alergi (asma). Selain itu, produksi IL-4 bukan merupakan produksi alami tubuh mencit, melainkan melalui proses transgenik (11). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian *in vivo* pada subyek asma untuk mengetahui apakah IL-4 pada asma berperan dalam hambatan apoptosis limfosit.

Bax merupakan protein proapoptotik yang berperan sebagai protein eksekutor pada apoptosis jalur mitokondrial (jalur intrinsik) sehingga ekspresinya dapat digunakan sebagai petanda apoptosis (15,16). Pada penderita asma didapatkan penurunan ekspresi Bax-limfosit dan peningkatan rasio Bcl-2/Bax pada darah tepi yang menunjukkan adanya penghambatan apoptosis limfosit (17). Adanya bukti bahwa peningkatan IL-4 menyebabkan peningkatan Bcl-2 (11,12), serta bukti lain yang menyatakan Bcl-2 mampu menginaktivasi Bax (16), menimbulkan suatu dugaan bahwa peningkatan IL-4 pada asma mampu menghambat apoptosis melalui penurunan ekspresi Bax pada jalur mitokondrial. Oleh karena itu, diperlukan suatu penelitian *in vivo* untuk membuktikan pengaruh IL-4 pada apoptosis limfosit melalui inaktivasi Bax-limfosit.

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit *Balb/c mice* yang merupakan hewan model yang baik untuk menggambarkan kondisi asma pada manusia. Telah dibuktikan bahwa paparan antigen ovalbumin (OVA) menunjukkan adanya fenomena hiperresponsif saluran nafas (*airway hyperresponsiveness* / AHR), peningkatan sel-sel radang pada mukosa saluran nafas mencit, serta adanya peningkatan resistensi saluran nafas, yang ketiganya merupakan patofisiologi terjadinya asma pada manusia (18,19). Tujuan penelitian ini adalah membuktikan apakah pada bronkiolus dan paru mencit asma peningkatan IL-4 mampu menghambat apoptosis limfosit melalui penurunan Bax-limfosit.

METODE

Hewan coba

Hewan coba adalah mencit *Balb/c mice*, yang berasal dari kandang hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma Jl. Ahmad Yani Surabaya. Jenis kelamin mencit yang dipilih adalah betina karena memiliki respon terhadap alergen yang lebih baik dibandingkan dengan mencit berjenis kelamin jantan (20). Usia mencit adalah 6-12 minggu, berat badan 20-30 g, dengan kondisi mencit sehat dan bebas penyakit (makan banyak, aktivitas baik, bulu tidak rontok). Hewan coba akan dieksklusikan jika sakit dalam pengamatan, yang tampak dari perubahan perilaku hewan (perubahan pola makan/minum dan aktivitas)

dan tanda-tanda klinis penting lainnya (penurunan berat badan, pola nafas, diare, muntah, dan sebagainya), atau mati dalam pengamatan.

Ovalbumin (OVA)

OVA yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovalbumin dengan merek *SERVA* yang merupakan *albumin egg lyophil* yang bebas garam dan bebas *lysozyme* yang diproduksi oleh *SERVA Electrophoresis GmbH. Aluminum hydroxide* (alum) digunakan sebagai *adjuvant* yang membuat efek alergen ovalbumin bertambah kuat dan sensitisasi berlangsung lebih lama (19).

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental (*true experimental*) dengan desain studi *randomized control group*, yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang selama 7 bulan, yaitu bulan Februari 2009 sampai dengan September 2009. Pengambilan subyek penelitian dilakukan dengan teknik *consecutive sampling*, yaitu subyek yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan dalam penelitian.

Subyek yang memenuhi kriteria inklusi dibagi ke dalam 2 kelompok, yaitu: kelompok perlakuan (asma) dan kelompok kontrol (non-asma) dengan teknik *simple random sampling*. Aklimatisasi hewan coba dilakukan dalam kandang berukuran 40 x 50 x 15 cm, masing-masing kandang berisi 2-3 ekor mencit, selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan pemberian makanan dan minuman standar laboratorium serta bebas ovalbumin. Air minum diberikan secara *ad libitum* dengan metode tetes untuk menghindari kontaminasi dengan kotoran.

Sensitisasi awal dilakukan secara intraperitoneal dengan menyuntikkan campuran 10 µg ovalbumin (OVA) + 1 mg $Al(OH)_3$ yang dilarutkan dalam 0,5 ml normal saline (NaCl 0,9%) pada hari ke-0 dan hari ke-14. Sensitisasi ulangan dilakukan secara inhalasi dengan memberikan ovalbumin (OVA) 1% dalam normal saline (NaCl 0,9%) sebanyak 8 ml per perlakuan dengan menggunakan *nebulizer OMRON* tipe NU-017 selama 20 menit dengan *air flow volume* dan *nebulization volume* pada skala 1. Sensitisasi secara inhalasi tersebut diulang selama 6 minggu sesuai jadwal, yaitu pada hari ke-21, 23, 25, 28, 30, 32, 35, 37, 39, 42, 44, 46, 49, 51, 53, 56, 58, dan 60, pada waktu yang kurang lebih sama pada tiap perlakuan, yaitu antara pukul 09.00 - 11.00 WIB.

Setelah 8 minggu, seluruh hewan coba pada kedua kelompok diterminasi dengan cara diambil darah melalui jantungnya, setelah sebelumnya diberikan obat anestesi ketamin dan midazolam. Organ paru mencit diletakkan di dalam tempat organ dan difiksasi dengan formalin 10%, selanjutnya dibuat sediaan histopatologi.

Pemeriksaan IgE

Tahap pertama adalah *coating* mikroplate dengan ovalbumin selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan *washing buffer* 3 kali.

Selanjutnya, 100 μ L sample dan Standar (*IgE- IBL- Bioscience Hamburg Cat#GIE119*) dimasukkan pada mikroplate. Dilakukan inkubasi dengan anti IgE biotin konjugate (*santa cruz cat# sc-66169*) selama 60 menit, kemudian dengan SA-HRP selama 40 menit. Selanjutnya diberikan TMB dan diinkubasi selama 20 menit. Setiap pergantian tahap pemrosesan dilakukan pencucian dengan *washing buffer* sebanyak 3 kali. Tahap akhir adalah penghentian reaksi dengan NaOH dan diinkubasi 10 menit. Hasil dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Pembuatan dan Pengamatan Slide

Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μ m. Terdapat 16 slide, yang terdiri dari 8 slide dari masing-masing kelompok pemeriksaan. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomor kodenya dan diberi nomor baru secara acak sehingga pemeriksa tidak mengetahui kelompok slide yang diperiksa (metode *blinding*). Pemeriksa terdiri dari 2 orang analis biomedik, dimana pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa. Pemeriksaan dan perhitungan jumlah apoptosis limfosit, ekspresi IL-4, dan ekspresi Bax dilakukan pada masing-masing slide pada bidang pandang dengan pembesaran 1000x, dihitung per mm^2 dan diambil nilai rerata.

Apoptosis Limfosit

Slide atau sediaan histopatologi dicuci dengan menggunakan PBS pH 7,4; kemudian diinkubasi menggunakan proteinase-K 20 μ g/ml selama 15 menit pada suhu 37°C. Tahap berikutnya adalah inkubasi pada H_2O_2 3% selama 15 menit, untuk kemudian diinkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labeling* (*Apo-BrdU-IWC CatK403-50:Lot P10013*) selama 60 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya sediaan diinkubasi dengan *peroxidase solution* selama 40 menit pada suhu 37°C dan ditetesi dengan substrat untuk peroksidase (DAB/diamino benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang. Setiap pergantian tahap pemrosesan, slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Tahap akhir adalah *counterstain* sediaan dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit; selanjutnya dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH_2O . Jumlah apoptosis limosit adalah jumlah sel per mm^2 pada pemeriksaan bronkiolus dan paru mencit, dengan karakteristik berinti tunggal, perbandingan inti dan sitoplasma 3:4, dengan sitoplasma berwarna merah, dimana inti sel berwarna coklat gelap setelah pengecatan dengan *TUNEL* (5), melalui pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 1000x.

Ekspresi IL-4

Sediaan histopatologi dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan 2 tahap *blocking*, yaitu: *blocking* endogenous peroksida menggunakan H_2O_2 3% selama 20 menit dan *blocking* protein non-spesifik menggunakan FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100. Selanjutnya slide diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti IL4 (*Cat. # 500706 Bio-Legend-Antibody primer*),

selama 60 menit, kemudian diinkubasi kembali dengan menggunakan *anti rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Tahap selanjutnya adalah pemberian DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit, serta pencucian menggunakan dH_2O , selama 5 menit. Setiap pergantian tahap pemrosesan, slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Tahap terakhir adalah *counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit, pencucian menggunakan tap water, pembilasan menggunakan dH_2O , dan *mounting* menggunakan entelan. Jumlah sel yang mengekspresikan IL-4 adalah jumlah sel per mm^2 pada pemeriksaan bronkiolus dan paru mencit yang menunjukkan warna coklat pada sitoplasma, pada pemeriksaan mikroskop cahaya pembesaran 1000x.

Ekspresi Bax-Limfosit

Sediaan histopatologi dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan 2 tahap *blocking*, yaitu: *blocking* endogenous peroksida menggunakan H_2O_2 3% selama 20 menit dan *blocking* protein non-spesifik menggunakan FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100. Selanjutnya slide diinkubasi menggunakan rabbit poliklonal anti-Bax (*Cat. #MS-711 - P1ABX LabVision*) selama 60 menit, kemudian diinkubasi kembali dengan menggunakan *anti rabbit HRP conjugated* selama 40 menit. Tahap selanjutnya adalah pemberian DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit, serta pencucian menggunakan dH_2O , selama 5 menit. Setiap pergantian tahap pemrosesan, slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Tahap terakhir adalah *counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit, pencucian menggunakan tap water, pembilasan menggunakan dH_2O , dan *mounting* menggunakan entelan. Jumlah limfosit yang mengekspresikan Bax, yaitu jumlah limfosit (sel dengan karakteristik berinti tunggal, perbandingan inti dan sitoplasma 3:4, dengan sitoplasma berwarna merah pada pewarnaan) per mm^2 pada pemeriksaan bronkiolus dan paru mencit yang menunjukkan warna coklat pada sitoplasma, pada pemeriksaan mikroskop cahaya pembesaran 1000x.

Analisis Statistik

Beda rerata ekspresi IL-4, dan Bax limfosit antara kedua kelompok (perlakuan dan kontrol) masing-masing dianalisis dengan *independent-sample t-test*; sedangkan jumlah apoptosis limfosit dianalisis dengan *Mann Whitney U test* karena distribusi tidak normal pada kelompok kontrol. Hubungan antara ekspresi Bax limfosit dengan jumlah apoptosis limfosit dan hubungan antara ekspresi IL-4 dengan ekspresi Bax limfosit dianalisis dengan menggunakan uji regresi linear, dengan menggunakan nilai interval kepercayaan (*confident interval*) 95%. Hubungan antara ekspresi IL-4, Bax limfosit, dan apoptosis limfosit dianalisis menggunakan *path analysis*. Semua data diolah dengan menggunakan *SPSS 16.0 for windows*.

Persetujuan Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Panitia Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, RSUD dr. Saiful Anwar, Malang.

HASIL

Karakteristik Subyek

Pada penelitian ini digunakan mencit jenis *Balb/c* betina dengan usia antara 6-12 minggu karena memiliki respon baik terhadap alergen^{20, 21}. Berdasarkan perhitungan jumlah sampel dibutuhkan sampel masing-masing kelompok >8 sehingga digunakan 9 mencit pada tiap kelompok (total 18 mencit). Rerata berat badan mencit adalah 26,82 g pada kelompok perlakuan (asma), dan 26,36 g pada kelompok kontrol (non-asma) (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Hewan Coba

Karakteristik	Asma	Non-asma
Jenis	Mencit <i>balb/c</i>	Mencit <i>balb/c</i>
Jumlah (ekor)	9	9
Usia (minggu)	6-12	6-12
Jenis kelamin	Betina	Betina
Berat (g)	26,82 ± 2,19	26,36 ± 3,36
		<i>p</i> =0,7 51

Gambaran Ekspresi IL-4 dengan Teknik Immunohistokimia

Gambar 1. Gambaran Ekspresi IL-4 pada Bronkiolus dan Paru Mencit.

Keterangan : Pada pembesaran 1000x, sel-sel dengan sitoplasma berwarna coklat (panah merah), pada bronkiolus dan paru mencit asma (kiri) tampak lebih banyak daripada non-asma (kanan).

Pemeriksaan ekspresi IL-4 pada penelitian ini menggunakan teknik imunohistokimia dengan anti IL-4. Sel yang mengekspresikan IL-4 ditandai oleh warna coklat pada sitoplasmanya. Gambar 1 menunjukkan gambaran ekspresi IL-4 pada bronkiolus mencit asma yang lebih banyak daripada non-asma, pada pembesaran 1000x.

Gambaran Apoptosis Limfosit dengan Pemulasan TUNEL

Pemeriksaan apoptosis limfosit pada penelitian ini

Gambar 2. Gambaran Apoptosis pada Bronkiolus Mencit.

Keterangan : Pada pembesaran 1000x, limfosit dengan inti sel berwarna coklat gelap (panah merah) pada bronkiolus mencit asma (kiri) tampak lebih sedikit daripada non-asma (kanan).

menggunakan teknik pemulasan TUNEL, Fragmentasi DNA pada sel apoptotik akan dikenali oleh terminal *deoxynucleotidyltransferase*, suatu enzim yang akan mengkatalisis UDP yang telah dilabel dengan FITC (fluorescein isothiocyanate). FITC akan berpendar, dan pada mikroskop fluoresens akan terlihat sebagai pendar warna coklat gelap; sehingga inti sel apoptotik akan tampak berwarna coklat gelap. Melalui *counterstaining* dengan HE, sel dengan karakteristik sel berinti tunggal, perbandingan inti dan sitoplasma 3:4, dan sitoplasma berwarna merah dianggap sebagai limfosit. Gambar 2 menunjukkan gambaran apoptosis limfosit pada bronkiolus mencit asma yang lebih sedikit daripada non-asma, pada pembesaran 1000x.

Gambaran Ekspresi Bax Limfosit dengan Teknik Immunohistokimia

Pemeriksaan ekspresi Bax limfosit pada penelitian ini menggunakan teknik imunohistokimia dengan menggunakan anti Bax.

Gambar 3. Gambaran Ekspresi Bax pada Bronkiolus dan Paru Mencit.

Keterangan : Pada pembesaran 1000x, sel-sel dengan sitoplasma berwarna coklat (panah merah), pada bronkiolus dan paru mencit asma (kiri) tampak lebih banyak daripada non-asma (kanan).

Sel yang mengekspresikan Bax ditandai oleh sitoplasma berwarna coklat. Sel dengan karakteristik sel berinti tunggal, perbandingan inti dan sitoplasma 3:4, dan sitoplasma berwarna merah dianggap sebagai limfosit. Gambar 3 menunjukkan gambaran ekspresi Bax limfosit pada bronkiolus mencit asma yang lebih sedikit daripada non-asma, pada pembesaran 1000x.

1. Perbandingan IgE OVA antara Kelompok Asma dan Non-Asma

Gambar 4. Perbandingan IgE ovalbumin antara mencit asma dan non-asma.

Salah satu parameter adanya alergi (asma) pada kelompok perlakuan adalah peningkatan IgE OVA pada kelompok perlakuan. Pada pengukuran kadar IgE ovalbumin, didapatkan kadar yang lebih tinggi bermakna pada kelompok asma (Gambar 4).

2. Perbandingan Ekspresi IL-4 antara Kelompok Asma dan Non-Asma

Gambar 5. Perbandingan ekspresi IL-4 antara mencit asma dan non-asma.

Parameter lain adanya asma pada kelompok perlakuan adalah adanya respon imun yang diperantarai oleh sel T_H2 , yang ditunjukkan dengan peningkatan sitokin T_H2 , antara lain IL-4. Pada penelitian ini, didapatkan ekspresi IL-4 lebih tinggi bermakna pada kelompok asma dibandingkan non-asma (Gambar 5).

Gambar 6. Perbandingan ekspresi Bax limfosit antara mencit asma dan non-asma.

3. Perbandingan Ekspresi Bax Limfosit antara Kelompok Asma dan Non-Asma

Bax limfosit merupakan protein eksekutor jalur intrinsik sehingga merupakan petanda adanya apoptosis. Pada penelitian ini, didapatkan ekspresi Bax limfosit lebih rendah bermakna pada kelompok asma dibandingkan non-asma (Gambar 6).

Perbandingan Apoptosis Limfosit antara Kelompok Asma dan Non-Asma

Gambar 7. Perbandingan apoptosis limfosit antara mencit asma dan non-asma.

Apoptosis limfosit berperan dalam peradangan kronis asma, dimana penurunan apoptosis limfosit berhubungan dengan persistensi limfosit pada saluran nafas. Pada pengamatan apoptosis limfosit, tidak didapatkan perbedaan bermakna antara kedua kelompok (Gambar 7).

Hubungan antara Ekspresi IL-4 dengan Apoptosis Limfosit

Gambar 8. Hubungan antara ekspresi IL-4 dengan apoptosis limfosit.

Peningkatan IL-4 diduga berperan dalam penghambatan apoptosis limfosit. Didapatkan hubungan negatif bermakna antara ekspresi IL-4 dengan apoptosis limfosit (Gambar 8), apoptosis limfosit akan dipengaruhi oleh ekspresi IL-4 sebesar 29%. Apoptosis limfosit dapat diprediksi dengan rumus: Apoptosis Limfosit = $4,85 - 0,68 \times$ (ekspresi IL-4).

Hubungan antara Ekspresi IL-4 dengan Bax Limfosit

Peningkatan IL-4 diduga berperan dalam penurunan ekspresi Bax limfosit. Didapatkan hubungan

Gambar 9. Hubungan antara ekspresi IL-4 dengan Bax.

negatif bermakna antara ekspresi IL-4 dengan ekspresi Bax limfosit (gambar 9). Ekspresi Bax limfosit akan dipengaruhi oleh ekspresi IL-4 sebesar 39%. Dan dapat diprediksi dengan rumus: Ekspresi Bax Limfosit = 11,44 - 1,29 (ekspresi IL-4).

Hubungan antara Ekspresi Bax Limfosit dengan Apoptosis Limfosit

Gambar 10. Hubungan antara ekspresi Bax limfosit dengan apoptosis limfosit.

Bax merupakan salah satu protein eksekutor apoptosis sehingga penurunan ekspresi Bax limfosit diduga berperan dalam penghambatan apoptosis limfosit. Pada analisis korelasi, tidak didapatkan hubungan bermakna antara ekspresi Bax limfosit dengan apoptosis limfosit sehingga tidak dapat dilakukan analisis regresi (Gambar 10).

Analisis Jalur Hubungan antara Ekspresi IL-4, Bax Limfosit, dan Apoptosis Limfosit

Untuk mengetahui hubungan antara ketiga variabel, yaitu: ekspresi IL-4, Bax limfosit, dan apoptosis limfosit, serta untuk mengetahui variabel atau jalur yang lebih berperan pada apoptosis limfosit, digunakan suatu analisis jalur (*path analysis*). Pada penelitian ini, (Gambar 11), peningkatan ekspresi IL-4 berpengaruh lemah terhadap penurunan ekspresi Bax limfosit ($r = -0,21$); serta penurunan Bax limfosit berpengaruh sangat lemah

Gambar 11. Analisis jalur antara ekspresi IL-4, Bax limfosit, dan apoptosis limfosit.

terhadap penurunan apoptosis limfosit ($r = 0,03$). Kekuatan hubungan tidak langsung antara IL-4 dengan apoptosis limfosit melalui Bax limfosit adalah lemah ($r = -0,21 \times 0,03 = -0,006$). Kekuatan hubungan ini lebih lemah dibandingkan dengan hubungan langsung antara IL-4 dengan apoptosis limfosit ($r = -0,11$).

DISKUSI

Pada respon imun saluran nafas normal, sensitisasi antigen akan menyebabkan proliferasi atau ekspansi klonal limfosit yang akan diikuti oleh apoptosis limfosit segera setelah fase puncak ekspansi klonal; suatu mekanisme yang disebut *activation induced cell death* (AICD) (7, 22). Pada subyek asma, terjadi hambatan apoptosis limfosit setelah sensitisasi antigen sehingga terjadi peningkatan jumlah limfosit disertai penurunan jumlah limfosit apoptotik pada saluran nafasnya (7).

Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan jumlah limfosit yang mengalami apoptosis pada kelompok asma (alergi) dan normal ($p = 0,116$) (gambar 7). Terdapat beberapa kemungkinan yang menjadi penyebab tidak adanya perbedaan apoptosis limfosit tersebut, yaitu: (1) kurangnya jumlah sampel, (2) tercapainya keadaan homeostasis pada saat pemeriksaan, dan (3) adanya penurunan aktivitas apoptosis limfosit pada kelompok asma mencapai aktivitas yang sama rendahnya dengan kelompok non-asthma.

Untuk kemungkinan penyebab pertama, pada penelitian ini, sesuai dengan perhitungan jumlah sampel, digunakan mencit sebanyak 18 ekor, masing-masing kelompok terdiri atas 9 ekor mencit. Karena data apoptosis limfosit tidak berdistribusi normal, digunakan studi non-parametrik dengan *Mann Whitney U Test*. Untuk mencapai kemaknaan statistik dengan studi non-parametrik, berdasarkan rumus²³:

$$Z = \frac{W1 - We}{\sqrt{\frac{n1n2(n1 + n2 + 1)}{12}}}$$

dimana: Z= skor Z, W1= *Sum of rank* sampel 1, We= *Sum of rank* yang diharapkan, n1= jumlah sampel 1, n2= jumlah sampel 2, diperlukan jumlah sampel ≥ 10 sampel tiap kelompok. Oleh karena itu, pada penelitian selanjutnya, diperlukan total sampel ≥ 20

mencit, masing-masing kelompok ≥ 10 mencit.

Kemungkinan penyebab kedua, setelah terjadi penghambatan apoptosis yang besar pada awal paparan ovalbumin, terjadi homeostasis pada saat pengamatan, karena pada penelitian ini, apoptosis limfosit mencit diamati setelah dilakukan paparan kronik. Untuk membuktikan hal ini, pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan pemeriksaan apoptosis limfosit secara serial sehingga dapat diketahui jumlah apoptosis limfosit pada berbagai jangka waktu paparan.

Kemungkinan penyebab ketiga adalah terjadi penurunan aktivitas apoptosis limfosit pada kelompok asma mencapai aktivitas yang sama rendahnya dengan kelompok non-asma. Hal ini dapat diterangkan sebagai berikut: pada kelompok non-asma (yang diasumsikan dalam keadaan normal), apoptosis limfosit terjadi dalam jumlah kecil karena tidak terjadi suatu peningkatan proliferasi limfosit (8,24). Sedangkan pada kelompok asma, setelah dilakukan sensitisasi alergen, akan terjadi peningkatan proliferasi limfosit. Dalam reaksi alergi atau peradangan normal, setelah fase puncak proliferasi limfosit, segera terjadi aktivitas apoptosis limfosit yang besar untuk mengembalikan jumlah limfosit seperti jumlah pre-sensitisasi (mekanisme homeostasis) (7,22). Namun, pada penelitian ini didapatkan jumlah apoptosis limfosit pada kelompok asma sama dengan non-asma sehingga diasumsikan terjadi penurunan aktivitas apoptosis limfosit pada kelompok asma; dengan kata lain aktivitas apoptosis limfosit kelompok asma sama rendahnya dengan keadaan normal (kelompok non-asma). Untuk membuktikan hal ini, pada penelitian selanjutnya perlu dibandingkan rasio apoptosis limfosit terhadap total limfosit pada kelompok asma dan non-asma.

Dari ketiga kemungkinan tersebut, kemungkinan ketiga merupakan kemungkinan terbesar karena didukung oleh bukti adanya kadar Bax limfosit yang lebih rendah pada kelompok asma ($p=0,003$) (Gambar 6), karena Bax merupakan protein eksekutor apoptosis yang dapat digunakan sebagai petanda apoptosis (16). Hal ini menunjukkan bahwa secara biomolekuler tetap terjadi hambatan apoptosis pada asma dengan bukti diduplikannya ekspresi Bax yang lebih rendah, walaupun apoptosis limfosit sama antara kedua kelompok penelitian.

Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Vignola dkk. (1999) dengan subyek manusia, yang menunjukkan tidak didapatkan perbedaan jumlah limfosit apoptotik pada hasil biopsi bronkial antara subyek asma dan subyek normal. Rasio apoptotik/total limfosit-T adalah 1% pada asma dan 0,5% pada subyek normal. Didapatkan jumlah limfosit apoptotik yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan subyek dengan bronkitis kronis (rasio apoptotik/total limfosit-T = 16%) (25). Penelitian lain oleh Muller dkk (2006) pada 12 subyek atopi dengan mengukur secara *in vitro* derajat apoptosis limfosit dari *bronchoalveolar lavage* (BAL) setelah stimulasi dengan tributyltin (TBT) pada saat sebelum dan sesudah provokasi alergen, menunjukkan adanya penurunan jumlah limfosit apoptotik setelah

provokasi alergen (42,2% pre-provokasi; 23,5% post-provokasi) (6). Begitu pula penelitian oleh Lamb dkk (2005) dengan pemeriksaan post mortem pada penderita asma fatal dan non-fatal menunjukkan apoptosis limfosit-T CD45RO+ (sel memori) yang jauh lebih sedikit pada penderita asthma (5).

Interleukin (IL)-4 merupakan sitokin kunci pada asma dan reaksi alergi lainnya, yaitu dalam menstimulasi diferensiasi sel T CD4⁺ *naïve* menjadi sel T_H2, proliferasi atau ekspansi klonal sel T_H2, menstimulasi *switching* limfosit-B dalam memproduksi IgE, meningkatkan ekspresi reseptor IgE (FcεRI) pada limfosit-B dan sel fagosit mononuklear, serta FcεRII pada sel mast dan basofil, setelah paparan antigen (26,27). Selain itu, pada asma, IL-4 mampu menstimulasi fibroblas untuk memproduksi eotaksin dan sitokin-sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan terjadinya remodelling saluran nafas serta meningkatkan ekspresi VCAM-1 pada endotel vaskuler yang menyebabkan migrasi limfosit-T, monosit, eosinofil, dan basofil ke tempat inflamasi (26). Sebagai tambahan peran IL-4 dalam menstimulasi diferensiasi sel T_H2, IL-4 juga mampu menghambat apoptosis limfosit-T. Persistensi dan aktivasi limfosit-T (sel T_H2) ini menimbulkan umpan balik positif (*positive feed back*) dengan semakin meningkatnya produksi IL-4 diikuti peningkatan diferensiasi dan ekspansi klonal sel T_H2 (11). Pada penelitian kami, didapatkan ekspresi IL-4 yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan (asma) ($p=0,000$) (gambar 5). Hal ini menunjukkan adanya peningkatan produksi IL-4 pada subyek asma setelah provokasi alergen akibat adanya peningkatan proliferasi dan penghambatan apoptosis limfosit (gambar 7), terutama sel T_H2 sebagai produsen utama IL-4. Peningkatan IL-4 ini diikuti oleh peningkatan kadar IgE ovalbumin (OVA) dimana didapatkan kadar yang lebih tinggi pada kelompok asma ($p=0,001$) (gambar 4). Peningkatan ekspresi IL-4 dan IgE OVA ini membuktikan bahwa benar terjadi asma pada kelompok perlakuan. Peningkatan kadar IL-4 pada subyek asma didukung oleh penelitian Daher dkk (1995) dengan pemeriksaan pada serum dan BAL menunjukkan peningkatan kadar IL-4 pada subyek alergi (28). Penelitian oleh Leonard dkk (1997) pada subyek asma alergik juga menunjukkan adanya peningkatan produksi IL-4 oleh sel mononuklear perifer setelah provokasi dengan alergen debu rumah (29).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa IL-4 dapat menghambat apoptosis limfosit. Melalui penelitian *in vitro* dengan kultur pada limfosit-T mencit, Vella dkk (1997) membuktikan bahwa pemberian IL-4 pada kultur akan memperpanjang usia limfosit-T melalui penghambatan apoptosis (12). Temuan ini didukung dengan penelitian selanjutnya oleh Vella dkk (1998). Secara *in vivo*, pada mencit yang diberi *staphylococcal enterotoxin A* (SEA) untuk mengaktivasi limfosit-T dan diberi plasmid yang mengkode IL-4, didapatkan adanya peningkatan usia limfosit-T akibat penghambatan apoptosis (11). Penghambatan apoptosis limfosit oleh IL-4 adalah melalui peningkatan ekspresi protein anti-apoptotik Bcl-2 (11,12), serta penurunan ekspresi Fas (30). Namun, masih belum jelas pada tingkat mana IL-4

mempengaruhi ekspresi kedua protein tersebut, kemungkinan melalui pengaruh pada sintesis mRNA, proses transkripsi, atau regulasi gen.

Pada penelitian ini didapatkan adanya peningkatan ekspresi IL-4 (rerata: asma $17,1 \pm 7,7$ vs kontrol $3,4 \pm 3,2$; $p=0,000$) disertai adanya penurunan apoptosis limfosit (rerata: asma $2,2 \pm 1,3$ vs kontrol $3,4 \pm 1,4$; $p=0,069$), disertai pula adanya penurunan ekspresi Bax limfosit (rerata: asma $6,1 \pm 1,1$ vs kontrol $8,9 \pm 2,2$; $p=0,003$) pada kelompok asma bila dibandingkan dengan kelompok normal. Terdapat korelasi negatif sedang ($r = -0,54$) antara ekspresi IL-4 dengan apoptosis limfosit, dimana apoptosis limfosit dapat diprediksi dengan rumus: Apoptosis Limfosit = $4,85 - 0,68$ [ekspresi IL-4]. Selain itu, penurunan apoptosis limfosit ini ternyata sebesar 29% dipengaruhi oleh peningkatan ekspresi IL-4. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini, peningkatan ekspresi IL-4 dapat menurunkan jumlah apoptosis limfosit. Namun, tampaknya apoptosis limfosit ini diperankan oleh banyak faktor selain IL-4 karena peningkatan ekspresi IL-4 hanya berperan sebesar 29%. Salah satu faktor yang diduga ikut berperan adalah Interferon (IFN)- γ . Penelitian oleh Cormican (2001) menunjukkan adanya korelasi negatif antara IL-4 dan IFN- γ , dimana apoptosis limfosit lebih dipengaruhi oleh penurunan ekspresi IFN- γ (31).

Walaupun terdapat penurunan Bax limfosit dan apoptosis limfosit pada kelompok asma, namun pada penelitian kami tidak didapatkan hubungan antara ekspresi Bax limfosit dengan apoptosis limfosit ($r=0,37$; $r^2=0,08$; $p=0,065$). Terdapat beberapa kemungkinan penyebab tidak adanya hubungan yang bermakna ini, yaitu: (1) kurangnya jumlah sampel penelitian, dan (2) adanya berbagai faktor yang berperan pada apoptosis limfosit selain Bax limfosit.

Pada penelitian ini, dengan nilai kepercayaan 95%, $r=0,37$, dan jumlah sampel 18 mencit, berdasarkan tabel *confidence belt* (23) didapatkan interval koefisien korelasi pada populasi (ρ) -0,1 sampai 0,7 yang menunjukkan tidak adanya hubungan bermakna antara Bax limfosit dan apoptosis limfosit. Namun, koefisien korelasi populasi (ρ) ini dapat dipersempit di atas nol (0,1 sampai 0,6) bila jumlah sampel ditingkatkan >25 mencit. Selain itu, berdasarkan rumus kemaknaan untuk analisis korelasi (23):

$$t = \frac{r}{\sqrt{(1-r^2)/(n-2)}}$$

dimana: t = skor t , r = koefisien korelasi, dan n = jumlah sampel, didapatkan bahwa untuk mencapai nilai kemaknaan $<0,05$ dengan $r=0,37$ diperlukan sampel sejumlah >26. Oleh karena itu, untuk penelitian selanjutnya diperlukan sampel sejumlah >26 mencit.

Untuk kemungkinan penyebab kedua, tidak adanya hubungan bermakna antara Bax limfosit dan apoptosis limfosit pada penelitian ini, menunjukkan bahwa penghambatan apoptosis limfosit pada asma tidak hanya diperankan oleh Bax, namun kemungkinan diperankan oleh interaksi banyak

faktor secara kompleks, yang tidak diteliti pada penelitian kami, antara lain: penurunan ekspresi Fas/Fas-L, Bak, dan protein-protein pro-apoptotik subklas III (*BH3 only protein*) atau peningkatan ekspresi protein-protein anti-apoptotik, terutama Bcl-2.

Peran Fas/Fas-L dalam mengatur apoptosis limfosit telah dibuktikan oleh Tong dkk (2006) melalui penelitian *in vivo* pada *Fas deficient mice*, dimana ternyata didapatkan jumlah limfosit yang lebih tinggi dibandingkan pada mencit normal sampai dengan hari ke-14 setelah paparan alergen, dengan dominasi sitokin-sitokin T_H2 (3). Penelitian lain oleh Spinozzi dkk (1998) dari hasil *bronchoalveolar lavage* (BAL) penderita asma didapatkan adanya ekspresi Fas yang sangat rendah dibandingkan dengan subyek normal (30). Begitu pula penelitian oleh Hamzaoui dkk (1999) dari biopsi bronkus penderita asma ternyata didapatkan peningkatan jumlah limfosit-T disertai dengan penurunan ekspresi Fas dibandingkan dengan subyek normal (32). Dibuktikan pula secara *in vitro* bahwa pemberian IL-4 pada kultur sel limfosit-T menurunkan ekspresi Fas (30). Hal ini menunjukkan bahwa pengaturan apoptosis limfosit tidak hanya melalui jalur mitokondrial atau intrinsik, namun juga jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*) dimana defisiensi Fas/Fas-L kemungkinan lebih berperan dalam penghambatan apoptosis.

Selain Bax, Bak juga memiliki peran besar dalam penghambatan apoptosis jalur mitokondrial seperti dibuktikan pada penelitian oleh Lindsten dkk (2000) bahwa pada mencit dengan defisiensi salah satu Bax atau Bak ternyata hanya mengalami abnormalitas ringan dalam perkembangan, sedangkan pada mencit dengan defisiensi Bax dan Bak 90% mengalami kematian perinatal, sedangkan 10% mengalami kelainan multipel (33). Hal ini menunjukkan bahwa pada mekanisme apoptosis jalur mitokondrial, kedua protein ini mempunyai peran saling melengkapi dalam homeostasis jaringan. Namun, apakah IL-4 pada asma juga mempengaruhi ekspresi Bak masih diperlukan penelitian lebih lanjut sebab belum ada penelitian yang mengkaji peran Bak dalam apoptosis limfosit pada asma.

Bax dan Bak merupakan protein pro-apoptotik subklas II (*bax-like protein*) yang berperan sebagai eksekutor apoptosis jalur mitokondrial. Dalam keadaan normal, terdapat sebagian kecil Bax pada membran mitokondria (sebagian besar terdapat dalam sitosol dalam bentuk monomer) yang berikatan dengan protein-protein anti-apoptotik pada domain BH3. Ikatan ini akan mencegah aktivitas apoptosis oleh Bax (34). Protein anti-apoptotik yang mampu berikatan dengan Bax adalah: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, dan Mcl-1, sedangkan yang mampu berikatan dengan Bak adalah: Bcl-xL dan Mcl-1 (35). Temuan ini menunjukkan bahwa peran *BH3 only protein* dalam aktivasi apoptosis adalah melalui inaktivasi protein anti-apoptotik (34,35) sehingga dengan terlepasnya Bax atau Bak akan terjadi oligomerisasi yang selanjutnya akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran mitokondria (36).

peran Bcl-2 dalam menghambat apoptosis limfosit pada asma. Penelitian oleh Vignola dkk (1999) dan Hamzaoui dkk (1999) dengan biopsi bronkus menunjukkan adanya peningkatan ekspresi Bcl-2 dan peningkatan jumlah limfosit-T yang berinfiltrasi ke submukosa saluran nafas subyek asthma (25,32). Muller dkk (2006) dengan pemeriksaan BAL juga menemukan adanya peningkatan ekspresi Bcl-2 pada pasien atopi yang diprovokasi oleh alergen (6). Peningkatan ekspresi Bcl-2 ini salah satunya disebabkan oleh peningkatan kadar IL-4 (11,12). Seperti dijelaskan di atas, penghambatan apoptosis oleh Bcl-2 tersebut adalah melalui ikatan terhadap Bax (35).

Untuk hubungan antara ekspresi IL-4 dengan Bax limfosit, pada penelitian kami didapatkan adanya korelasi negatif kuat ($r = -0,65$), dimana penurunan ekspresi Bax limfosit ternyata dipengaruhi sebesar 39% oleh ekspresi IL-4. Ekspresi Bax limfosit dapat diprediksi dengan rumus: Ekspresi Bax Limfosit = $11,44 - 1,29$ [ekspresi IL-4]. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi IL-4 menurunkan ekspresi Bax limfosit, dan peran ini merupakan peran lain IL-4 dalam penghambatan apoptosis selain melalui peningkatan ekspresi Bcl-2 (11,12) atau penurunan ekspresi Fas (30). Karena ekspresi IL-4 hanya berperan 39% dalam menurunkan ekspresi Bax limfosit, diduga penurunan Bax pada penelitian ini juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang tidak kami teliti, antara lain: adanya penurunan ekspresi IFN- γ , penurunan ekspresi *BH3 only protein*, atau peningkatan ekspresi protein-protein anti-apoptotik, terutama Bcl-2. Penelitian oleh Tesfaigzi dkk (2002) pada kultur sel saluran nafas mencit menunjukkan peningkatan ekspresi Bax setelah pemberian interferon (IFN)- γ (37). Adanya penurunan ekspresi IFN- γ ini kemungkinan juga berperan pada penurunan ekspresi Bax.

Untuk menganalisis kekuatan peran peningkatan ekspresi IL-4 dan penurunan ekspresi Bax limfosit terhadap penurunan apoptosis limfosit, serta jalur yang lebih berperan, dilakukan analisis jalur (*path analysis*) (38). Berdasarkan analisis jalur, peran langsung peningkatan ekspresi IL-4 terhadap penurunan apoptosis limfosit ($r = -0,11$) adalah lebih besar dibandingkan peran tidak langsung ekspresi IL-4 melalui jalur Bax limfosit ($r = -0,006$). Hal ini menunjukkan peningkatan ekspresi IL-4 mampu menurunkan jumlah apoptosis limfosit, namun bukan melalui penghambatan terhadap Bax limfosit.

Penelitian ini menunjukkan bahwa benar terdapat penghambatan apoptosis limfosit pada asma, dengan berbagai faktor yang diduga berinteraksi secara kompleks dalam mempengaruhi apoptosis limfosit. Adanya berbagai faktor yang ikut mempengaruhi apoptosis limfosit pada penelitian ini, disebabkan oleh desain penelitian *in vivo* sehingga memberikan gambaran patogenesis dan patofisiologi asma yang lebih mirip dengan gambaran penyakit sesungguhnya. Secara parsial, penelitian ini juga mampu menggambarkan patogenesis asma ditinjau dari sudut kegagalan apoptosis. Karena penelitian ini tidak mampu menunjukkan peran jalur intrinsik (terutama Bax

limfosit) dalam penghambatan apoptosis limfosit, penggunaan terapi melalui jalur ini masih diperlukan penelitian lebih lanjut. Namun, adanya bukti peran penghambatan apoptosis limfosit oleh IL-4 pada penelitian ini, memperkuat penelitian sebelumnya mengenai peran anti IL-4 (*soluble IL-4 receptor*) sebagai terapi asthma (26).

Pada penelitian ini digunakan mencit *Balb/c* betina karena memiliki respon terhadap alergen yang lebih baik (20) dan representatif untuk memberikan gambaran asma pada manusia karena mampu memberikan gambaran sensitisasi saluran nafas, inflamasi alergi yang diperantarai T_H2 , eosinofilia pada mukosa saluran nafas, dan AHR (21), serta didapatkan pula gambaran hiperplasia sel goblet, hipertrofi epitel, dan fibrosis sub-epitel dan peribronkial, dimana gambaran ini menetap setelah penghentian paparan alergen, serta didapatkan gambaran remodelling saluran nafas menetap (39,40). Pada penelitian ini, pada kelompok asma didapatkan gambaran yang analog dengan gambaran asma pada manusia berupa sensitisasi saluran nafas pada mencit yang ditandai oleh adanya peningkatan IgE ovalbumin, serta peningkatan sitokin T_H2 yaitu IL-4.

Terdapat keterbatasan pada penelitian ini, yaitu: (1) pemeriksaan hanya dilakukan sekali setelah dilakukan paparan kronis ovalbumin, (2) penentuan limfosit hanya dilakukan secara subyektif berdasarkan morfologi (tidak menggunakan petanda/*marker* limfosit secara) sehingga tidak diketahui subset limfosit yang diamati, (3) terdapat keterbatasan teknik imunohistokimia dalam penentuan sel yang mengekspresikan Bax, dan (4) faktor-faktor lain yang mempengaruhi apoptosis limfosit tidak diperiksa. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan: (1) pemeriksaan secara serial mulai dari paparan awal sampai dengan paparan akhir (paparan kronis), (2) pemeriksaan petanda (*marker*) limfosit untuk menentukan subset limfosit (terutama sel T CD4+), (3) pemeriksaan dengan teknik flow cytometry karena dapat diukur ekspresi IL-4 dan Bax beserta sel yang mengekspresikan, (4) pemeriksaan faktor-faktor lain yang kemungkinan mempengaruhi apoptosis limfosit, antara lain: IFN- γ , Fas/Fas-L, Bak, protein-protein pro- dan anti-apoptotik, dan (5) jumlah sampel >25 mencit untuk memperoleh kemaknaan statistik.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-4, disertai penurunan ekspresi Bax limfosit dan penurunan jumlah apoptosis limfosit pada mencit asma. Peningkatan ekspresi IL-4 berpengaruh sebesar 29% terhadap penurunan apoptosis limfosit dan berpengaruh sebesar 39% terhadap penurunan ekspresi Bax limfosit. Namun penurunan ekspresi Bax limfosit tidak berhubungan dengan penurunan apoptosis limfosit. Hal ini menunjukkan peningkatan ekspresi IL-4 dapat menghambat apoptosis limfosit, namun bukan melalui penurunan Bax limfosit.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- GINA Executive Committee. *Global Initiative for Asthma: global strategy for asthma management and prevention*. Ontario; 2007
- UKK Pulmonologi. *Pedoman nasional asma anak*. Jakarta: PP Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2004.
- Tong J, Bandulwala HS, Clay BS, et al. *Fas-positive T cells regulate the resolution of airway inflammation in a murine model of asthma*. J Exp Med. 2006;203:1173-84.
- Busse WW, Lemanske RF. *Asthma*. N Engl J Med. 2001;344:350-62.
- Lamb JP, James A, Carroll N, Siena L, Elliot J, Vignola AM. *Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma*. Eur Respir J. 2005;26:265-70.
- Muller M, Grunewald J, Hoglund CO, Dahlen B, Eklund A, Stridh H. *Altered apoptosis in bronchoalveolar lavage lymphocytes after allergen exposure of atopic asthmatic subjects*. Eur Respir J. 2006;28:51322.
- Spinozzi F, de Benedictis D, de Benedictis FM. *Apoptosis, airway inflammation and anti-asthma therapy: from immunobiology to clinical application*. Pediatr Allergy Immunol. 2008;19:28795.
- Guicciardi ME, Gores GJ. *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. Gut. 2005;54:1024-33.
- Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. *Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia*. J Immunol. 1997;158:3902-8.
- Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, et al. *Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium*. J Clin Invest. 1997;99:439-46.
- Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. *Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:38105.
- Vella AT, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. *Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: Stat6 is probably not required for the effect of IL-4*. J Exp Med. 1997;186:325-30.
- Larché M, Akdis CA, Valenta R. *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nat Rev Immunol. 2006;6:761-71.
- Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. *A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses*. Nature Immunol. 2008;9:3108.
- Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, et al. *Interleukin-2 receptor common γ -chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-x_L) but not pro-apoptotic (bax, bcl-x_S) gene expression*. Eur J Immunol. 1996;26:294-9.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H-C, et al. *Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies*. Nat Cell Biol. 2006;8:1348-58.
- Abdulmir AS, Kadhim HS, Hafidh RR, et al. *Severity of Asthma: The Role of CD25+, CD30+, NF- κ B, and Apoptotic Markers*. J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19:218-24.
- Irvin CG. *Using the mouse to model asthma: the cup is half full and then some*. Clin Exp Allergy. 2008;38:701-3.
- Zosky GR, Larcombe AN, White OJ, et al. *Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation*. Clin Exp Allergy. 2007;38:82938.
- Epstein MM. *Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?*. Int Arch Allergy Immunol. 2004;133:84-100.
- Nials AT, Uddin S. *Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge*. Dis Model Mech. 2008;1:213-20.
- Krammer PH. *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature. 2000;407:700-6.
- Kuzma JW. *Basic statistics for the health sciences*. 1 ed. California: Mayfield Publishing Company; 1984.
- Luedde T, Liedtke C, Manns MP, Trautwein C. *Losing balance: cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure*. European Cytokine Network. 2002;13:377-83.
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al. *Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis*. J Allergy Clin Immunol. 1999;103:563-73.
- Steinke JW, Borish L. *Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res. 2001;2:66-70.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cytokines*. In: Cellular and Molecular Immunology. 6 ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2007:267-302
- Daher S, Santos LM, Sole D, De Lima MG, Naspitz CK, Musatti CC. *Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children*. J Invest Allergol Clin Immunol. 1995;5:2514.
- Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW. *Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity*. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;17:36875.
- Spinozzi F, Fizzotti M, Agea E, et al. *Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma*. Ann Intern Med. 1998;128:363-9.

31. Cormican L, O'Sullivan S, Burke CM, Poulter LW. *IFN- γ but not IL-4 T-cells of the asthmatic bronchial wall show increased incidence of apoptosis*. Clin Exp Allergy. 2001;31:731-9.
32. Hamzaoui A, Hamzaoui K, Salah H, Chabbou A. *Lymphocytes apoptosis in patients with acuteExacerbation of asthma*. Mediators Inflamm. 1999;8:237-43.
33. Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. *The combined functions of proapoptotik Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell. 2000;6:1389-99.
34. Fletcher JI, Meusburgera S, Hawkins CJ, et al. *Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax*. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:180817.
35. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs,not Bax or Bak*. Science. 2007;315:856-9.
36. Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou J-C. *Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein*. Biochem J. 2002;368:915-21.
37. Tesfaigzi Y, Fischer MJ, Daheshia M, Green FHY, Sanctis GTD, Wilder JA. *Bax is Crucial for IFN- γ -Induced Resolution of Allergen-Induced Mucus Cell Metaplasia*. J Immunol. 2002;169:5919-25.
38. Advanced statistics: multivariate analysis II: manifest variables analyses. Topic 3: Path analysis. University of Exeter;1997
39. Kumar RK, Herbert C, Kasper M. *Reversibility of airway inflammation and remodelling following cessation of antigenic challenge in a model of chronic asthma*. Clin Exp Allergy. 2004;34:1796-802.
40. McMillan SJ, Lloyd CM. *Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling*. Clin Exp Allergy. 2004;34:497-507.