

Injeksi Serum Mengandung TNF- α Tinggi Menurunkan Konsentrasi VEGF dan Ekspresi Nephtrin Glomerulus Mencit Bunting

Injection of Serum Containing High TNF- α Lowers VEGF Concentration and Glomerulus Nephtrin Expression of Pregnant Mice

Syahroni Yudistian A¹, Siti Candra WB², Loeki E Fitri³

¹Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

²Laboratorium Obstetri dan Ginekologi RSUD Dr. Saiful Anwar/Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Preeklampsia ditandai dengan adanya hipertensi dan proteinuria pada usia kehamilan lebih dari 20 minggu. Preeklampsia diderita oleh 3%-8% wanita hamil dan menjadi penyebab utama kematian pada kehamilan. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) diduga memiliki peranan penting dalam menimbulkan terjadinya preeklampsia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek injeksi serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi terhadap konsentrasi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan ekspresi protein nephtrin glomerulus pada mencit bunting. Serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi diambil dari ibu hamil dan diinjeksikan intraperitoneal pada mencit bunting dengan usia kebuntingan 13 dan 14 hari. Pada usia kebuntingan 18 hari konsentrasi VEGF serum diperiksa menggunakan ELISA dan ekspresi protein nephtrin glomerulus dengan imunohistokimia. Penelitian ini menunjukkan injeksi serum TNF- α dapat menurunkan konsentrasi VEGF serum mencit bunting ($p=0,021$) dan ekspresi protein nephtrin glomerulus ($p=0,000$). Penurunan konsentrasi VEGF dan protein nephtrin terjadi pada pasien preeklampsia dan dapat menimbulkan gejala preeklampsia. Dapat disimpulkan bahwa injeksi intraperitoneal serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi dapat memberikan gambaran preeklampsia pada mencit bunting.

Kata Kunci: Nephtrin glomerulus, preeklampsia, TNF- α , VEGF

ABSTRACT

Preeclampsia is characterized by hypertension and proteinuria in gestational age more than 20 weeks. Preeclampsia affects 3%-8% of pregnant women and the leading cause of death in pregnancy. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) is thought to have an important role in causing the occurrence of preeclampsia. The aim of this study was to determine the effect of high levels serum TNF- α injection to VEGF concentration and glomerular nephtrin expression in pregnant mice. High level of serum TNF- α were taken from pregnant women, then injected intraperitoneally to pregnant mice on gestation days 13th and 14th. At day 18th of gestation, the levels of VEGF were examined using ELISA and the expression of glomerular nephtrin were examined using immunohistochemistry. This study showed that the injection of serum TNF- α could decrease VEGF concentration ($p=0,021$) as well as the glomerular nephtrin expression ($p=0,000$), in pregnant mice. Decreased concentration of VEGF and nephtrin protein occurs in preeclampsia patients and can cause symptoms of preeclampsia. Based on data, it can be concluded that intraperitoneal injection of serum TNF- α can give symptoms of preeclampsia in pregnant mice.

Keywords: Glomerular nephtrin, preeclampsia, TNF- α , VEGF,

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Syahroni Yudistian A. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang 61455 Tel. (0341) 551611 Email: roniyudis@gmail.com

PENDAHULUAN

Preeklampsia merupakan sindrom yang ditandai dengan hipertensi dan proteinuria setelah usia kehamilan 20 minggu dan terjadi pada wanita yang sebelumnya memiliki tekanan darah normal dan tidak ada proteinuria (1). Preeklampsia diderita oleh 3%-8% wanita hamil di dunia barat dan menjadi penyebab utama kematian dan kecacatan di dunia. Secara keseluruhan 10%-15% kematian maternal secara langsung berkaitan dengan preeklampsia dan eklampsia (2).

Gejala preeklampsia yang secara relatif terjadi pada fase akhir kehamilan dan tidak adanya model *in vitro* atau *in vivo* yang baik menjadi salah satu faktor yang menghambat penelitian dalam menangani terjadinya preeklampsia. Beberapa penelitian melaporkan hewan coba model preeklampsia hanya mencerminkan sebagian gejala preeklampsia pada manusia dan memerlukan biaya yang mahal (3). Oleh karena itu hewan coba model preeklampsia yang mencerminkan kondisi preeklampsia pada manusia sangat dibutuhkan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut dalam mengatasi preeklampsia.

Penelitian oleh Zhou menunjukkan bahwa serum pasien preeklampsia mengandung (AT1-AA). Timbulnya gejala preeklampsia pada mencit bunting dapat diinduksi oleh AT1-AA. Peingkatan konsentrasi *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) dan penurunan konsentrasi *Vascular Endothelial Growth Factor*(VEGF) dapat disebabkan oleh AT1-AA sehingga menimbulkan gejala preeklampsia (4). Penurunan konsentrasi VEGF juga dapat menyebabkan penurunan konsentrasi protein nephrin glomerulus sehingga menimbulkan adanya proteinuria (5).

Penelitian sebelumnya meunjukkan bahwa efek pemberian immunoglobulin G (IgG) AT1-AA dari serum pasien preeklampsia dalam menimbulkan gejala preeklampsia pada mencit bunting dimediasi oleh TNF- α (6). Pemberian TNF- α dosis rendah pada babon secara terus menerus selama 2 minggu juga diketahui dapat menimbulkan proteinuria dan peningkatan tekanan darah (7). Oleh karena itu pada penelitian ini ingin diketahui efek injeksi intraperitoneal serum yang mengandung konsentrasi TNF- α tinggi terhadap konsentrasi VEGF dan ekspresi nephrin glomerulus, pada mencit bunting sebagai kandidat hewan model untuk preeklampsia.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan *post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk mengetahui efek injeksi intraperitoneal serum tinggi TNF- α terhadap konsentrasi serum VEGF, dan *fraction area* dari protein nephrin glomerulus pada mencit bunting.

Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek manusia yaitu pasien hamil serta hewan mencit Balb/cbunting. Pasien hamil merupakan pasien yang kontrol ke poli Obstetri Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar Malang dengan usia rata-rata 30 tahun yang menyetujui untuk berpartisipasi dalam penelitian ini. Didapatkan 6 pasien hamil dengan konsentrasi TNF- α yang tinggi pada serumnya (>20ng/ml). Pasien dengan penyakit infeksi dan penyakit kronis yang lain dieksklusi dari penelitian ini. Mencit

bunting yang digunakan sebanyak 18 ekor dan dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok perlakuan itu kelompok yang diinjeksi dengan serum wanita hamil dengan konsentrasi TNF- α yang tinggi (>20ng/ml) dan kelompok control yaitu kelompok yang tidak diinjeksi. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pengukuran Konsentrasi TNF- α

Serum darah diambil dari pasien hamil secara intravena dengan menggunakan spuit 5cc. Konsentrasi TNF- α pada serum diukur menggunakan ELISA kit (Biolegend, USA, nomor katalog 430207). Serum yang memiliki konsentrasi TNF- α tinggi (>20ng/ml) kemudian dikelompokkan menjadi satu kelompok dan dihomogenisasi dengan cara dicampur.

Injeksi Serum yang mengandung TNF- α Tinggi

Serum wanita hamil dengan konsentrasi TNF- α yang tinggi (27,59 \pm 5,39) menjadi bahan yang diinjeksikan pada mencit bunting. Serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi diinjeksikan pada mencit bunting secara intraperitoneal sebanyak 0,1cc dengan 2 kali injeksi pada usia kehamilan 13 dan 14 hari (4). Injeksi intraperitoneal dilakukan dengan cara memposisikan mencit supinasi kemudian menarik perut mencit dan diinjeksi dengan spuit 1cc jarum 27G pada bagian lateral perut.

Pengukuran Konsentrasi VEGF Serum

Mencit dikorbankan pada usia kebuntingan 18 hari dengan menggunakan kloroform. Serum darah mencit diambil dari jantung kanan mencit menggunakan spuit 1cc. Konsentrasi VEGF pada serum diukur menggunakan ELISA *indirect* (Santa Cruz Biotechnology, USA, dengan no. katalog jh121 sc-57496).

Ekspresi Nephrin Glomerulus

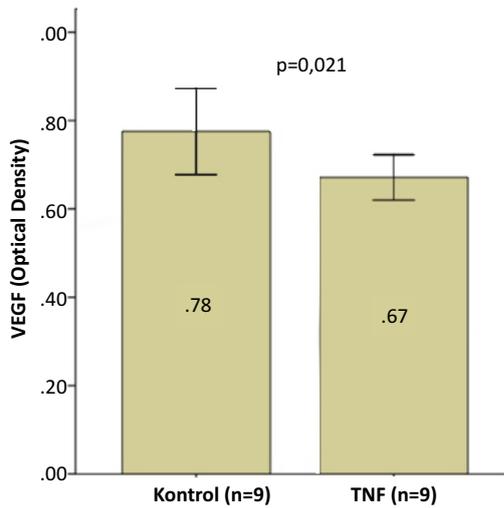
Ginjal mencit kanan dan kiri diambil dengan menggunakan *minor surgery set* dan dibersihkan dari lemak yang menempel. Ginjal ditempatkan pada pot sampel dengan formalin 10%. Ginjal difiksasi pada blok parafin dan dibuat slide immunohistokimia. Pengecatan immunohistokimia menggunakan antibodi primer (Abcam, USA, dengan no. katalog Ab58968). Ekspresi Nephrin Glomerulus diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Setiap sampel diamati lima glomerulus (8). Glomerulus yang telah diamati, difoto dengan menggunakan camera (canon DSLR) dan ditransfer ke dalam komputer untuk diukur persentase fractional area (FA) nephrin glomerulus dengan menggunakan perangkat lunak Image J (9). *Fractal area* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$FA = \frac{\text{Luas Area Protein Nephrin}}{\text{Luas Area Tool Glomerulus}} \times 100\%$$

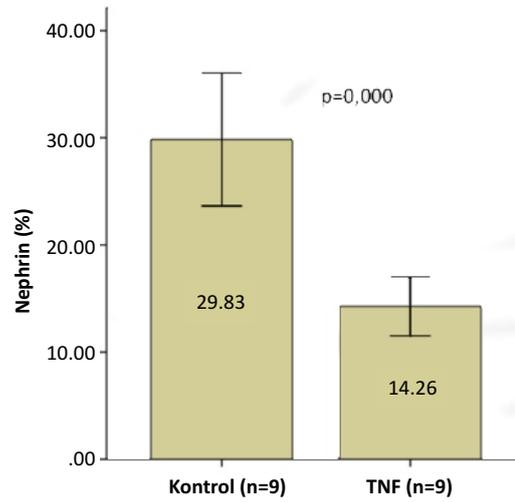
HASIL

Konsentrasi VEGF Serum

Konsentrasi VEGF serum mencit bunting yang diinjeksi serum yang mengandung TNF- α dengan konsentrasi tinggi dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan uji analisis *independent t-test* didapatkan nilai $p=0,021$. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara konsentrasi VEGF serum mencit yang diinjeksi serum tinggi TNF- α dan serum mencit kontrol ($p<0,05$). Nilai rata-rata *optical density* dari masing-masing konsentrasi VEGF serum didapatkan (0,775 \pm 0,98 vs 0,671 \pm 0,51).



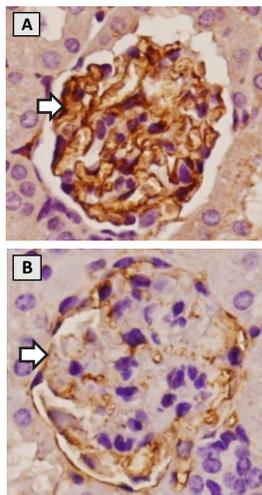
Gambar 1. Konsentrasi VEGF serum mencit bunting pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan TNF- α



Gambar 3. Ekspresi Nephryn Glomerulus pada kelompok control dan perlakuan dengan TNF- α

Persentase Fractional Area Nephryn Glomerulus

Terjadi penurunan konsentrasi protein nephryn pada glomerulus mencit bunting yang diinjeksi dengan serum tinggi TNF- α . Gambaran ekspresi protein nephryn glomerulus dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Immunohistokimia nephryn glomerulus

Keterangan: Glomerulus yang telah diamati, difoto dengan menggunakan camera (canon DSLR) dan ditransfer ke dalam komputer untuk diukur persentase fractional area. Area protein nephryn ditunjukkan dengan gambar berwarna coklat pada glomerulus (tanda panah). Gambar A. menunjukkan glomerulus mencit kontrol dan gambar B. menunjukkan glomerulus mencit yang diinjeksi serum tinggi TNF- α .

Ekspresi protein nephryn yang dihitung dengan menggunakan *fractional area* pada setiap glomerulus ditunjukkan pada gambar 3. Pada uji analisis dengan menggunakan analisis *independent t-test* didapatkan nilai $p=0,000$. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara *fractional area* nephryn glomerulus mencit yang diinjeksi serum tinggi TNF- α dan serum mencit kontrol ($p<0,05$). Nilai rata-rata *fractional area* dari masing-masing ekspresi glomerulus didapatkan ($29,83\pm 6,20$ vs $14,25\pm 2,73$).

DISKUSI

Penelitian ini menunjukkan bahwa injeksi intraperitoneal serum tinggi TNF- α dapat menurunkan konsentrasi VEGF serum mencit bunting. Hal ini didukung hasil penelitian lain yang menyatakan bahwa penurunan konsentrasi VEGF pada penderita *acute kidney injury* (AKI) dimediasi oleh aktivasi reseptor TNF- α (10). Penelitian lain yang pernah dilakukan mendemonstrasikan bahwa kemampuan serum pasien preeklampsia dalam meningkatkan produksi sFlt-1 dan *soluble endoglin* (sEng) pada kultur sel endothel dihambat dengan pemberian obat anti-TNF- α . Dapat diambil kesimpulan bahwa TNF- α dapat secara langsung meningkatkan produksi sFlt-1 dan sEng (6). Telah diketahui bahwa pada pasien preeklampsia, peningkatan sFlt-1 dapat menyebabkan penurunan konsentrasi VEGF dan *Placental Growth Factor* (PlGF).

Soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) merupakan reseptor solubel dari VEGF. Peningkatan konsentrasi sFlt-1 dapat menjadi reseptor antagonis bagi VEGF sehingga VEGF tidak dapat menempel pada reseptor di permukaan sel. *Soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1) tidak memiliki domain transmembran dan intraseluler sehingga ikatan antara VEGF dengan sFlt-1 tidak dapat memberikan signal pada *second messenger* untuk menimbulkan respon seluler (11). Proses remodeling dan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dapat berlangsung dengan adanya VEGF (12). Penurunan aktivasi VEGF akan menyebabkan kegagalan angiogenesis pada plasenta yang dapat memperparah peningkatan sekresi sFlt-1. Selain itu penurunan aktivasi reseptor VEGF juga dapat menyebabkan disfungsi endothel yang mengawali terjadinya gejala preeklampsia pada maternal (13).

Pada penelitian ini juga dibuktikan bahwa injeksi intraperitoneal serum tinggi TNF- α dapat menurunkan persentase *fractional area* nephryn glomerulus. Sesuai dengan penelitian lain bahwa TNF- α juga dapat menurunkan ekspresi nephryn pada glomerulus. Hambatan ekspresi nephryn oleh TNF- α tidak dimediasi oleh downstream target dari TNF- α seperti *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Akt, dan *cAMP-protein kinase A* (PKA), namun dimediasi oleh hambatan TNF- α pada *retinoic acid receptor* (RAR) (14). Promotor gen

nephrin diaktivasi melalui mediasi RAR dan vitamin D reseptor (VDR) (15).

Penurunan persentase *fractional area* nephrin glomerulus juga dapat disebabkan karena penurunan konsentrasi VEGF oleh TNF- α . *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan faktor yang dapat memblokir sekresi ET-1 dari endothel (16). Apabila konsentrasi VEGF turun maka akan terjadi peningkatan konsentrasi ET-1 yang dapat menyebabkan degradasi dari protein nephrin di podosit glomerulus. Hilangnya nephrin dari membran podosit yang diinduksi oleh peningkatan ET-1 bukan karena berkurangnya produksi namun berhubungan

dengan aktivasi sitoskeleton dan aktivasi protease yang menyebabkan pemecahan nephrin dari membran sel dan bergeser ke supernatan (16).

Data dari penelitian ini menunjukkan bahwa injeksi serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi dapat menurunkan konsentrasi VEGF dan ekspresi nephrin glomerulus (persentase *fractional area* glomerulus). Penurunan konsentrasi VEGF dan ekspresi protein nephrin terjadi pada pasien dengan preeklampsia dan dapat menimbulkan adanya gejala preeklampsia. Sehingga dapat disimpulkan bahwa injeksi serum dengan konsentrasi TNF- α tinggi dapat memberikan gambaran preeklampsia pada mencit bunting.

DAFTAR PUSTAKA

1. Program National High Blood Pressure Education. *Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure*. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 2000; 183(1): S1 - S22.
2. Duley L. *The Global Impact of Pre-Eclampsia and Eclampsia*. Seminars in Perinatology. 2009; 33(3): 130 - 137.
3. Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, and Fukamizu. *Hypertension Induced in Pregnant Mice by Placental Renin*. Science. 1996; 274(5289): 995 - 998.
4. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, et al. *Autoantibody from Women with Preeclampsia Induces Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Production via Angiotensin Type 1 Receptor and Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-Cells Signaling*. Hypertension. 2008; 51(4): 1010 - 1019.
5. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. *Excess Placental Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 (Sflt1) May Contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia*. The Journal of Clinical Investigation. 2003; 111(5): 649-658.
6. Zhou CC, Irani RA, Zhang Y, et al. *Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody-Mediated Tumor Necrosis Factor- α Induction Contributes to Increased Soluble Endoglin Production in Preeclampsia*. Circulation. 2010; 121(3): 436-444.
7. Sunderland NS, Thomson SE, Heffernan SJ, et al. *Tumor Necrosis Factor A Induces A Model Of Preeclampsia In Pregnant Baboons (Papio hamadryas)*. Cytokine. 2011; 56(2): 192 - 199.
8. Hyvönen ME, Dumont V, Tienari J, et al. *Early-Onset Diabetic E1-DN Mice Develop Albuminuria and Glomerular Injury Typical of Diabetic Nephropathy*. BioMed Research International. 2014; 2015: 11.
9. Rangan GK and Tesch GH. *Methods In Renal Research: Quantification Of Renal Pathology By Image Analysis*. Nephrology. 2007; 12(6): 553 - 558.
10. Xu C, Chang A, Hack BK, Eadon MT, Alper SL, and Cunningham PN. *TNF-Mediated Damage to Glomerular Endothelium is an Important Determinant of Acute Kidney Injury in Sepsis*. Kidney International. 2014; 85(1): 72- 81.
11. Shibuya M. *Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): A Dual Regulator for Angiogenesis*. Angiogenesis. 2006; 9(4): 225-230.
12. Maharaj A and D'Amore P. *Roles for VEGF in Adult*. Microvascular Research. 2007; 74(2-3): 100-113.
13. Karumanchi SA and Lindheimer MD. *Preeclampsia Pathogenesis: "Triple A Rating"-Autoantibodies and Antiangiogenic Factors*. Hypertension. 2008; 51(4): 991-992.
14. Saito Y, Okamura M, Nakajima S, et al. *Suppression of Nephrin Expression by TNF-A Via Interfering with the Camp-Retinoic Acid Receptor Pathway*. American Journal of Physiology. 2010; 298(6): F1436-F1444.
15. Okamura M, Takano Y, Saito Y, Yao J, and Kitamura M. *Induction of Nephrin Gene Expression by Selective Cooperation of the Retinoic Acid Receptor and the Vitamin D Receptor*. Nephrology Dialysis Transplantation. 2009; 24(10): 3006-3012.
16. Collino F, Bussolati B, Gerbaudo E, et al. *Preeclamptic Sera Induce Nephrin Shedding from Podocytes through Endothelin-1 Release by Endothelial Glomerular Cells*. American Journal of Physiology. 2008; 294(5): 1185-1194.