

Ekspresi IFN- γ oleh Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ Setelah Stimulasi Antigen Fusi ESAT-6-CFP-10 pada Pasien Tuberkulosis Paru Aktif

EXPRESSION OF INTERFERON GAMMA FROM CD4⁺ AND CD8⁺ T-CELLS AFTER ESAT-6-CFP-10 FUSION ANTIGEN STIMULATION ON ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

Rahmad Yudha Wibowo¹, Betty Agustina Tambunan¹, Jusak Nugraha¹,
Francisca Srioetami, dan Tanoerahardjo²

¹.Departemen/Instalasi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran,
Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

².Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 29 Jakarta 10560, Indonesia
E - mail : kzha200684@gmail.com

Submitted : 5-6-2017, Revised : 2-9-2017, Revised : 2-9-2017, Accepted : 1-11-2017

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a major global health problem. T-cells mediated immunity contribute to protection from Mycobacterium tuberculosis infection. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells secreted interferon gamma (IFN- γ) to stimulate fusion of phagolysosome and produce free radicals for killing mycobacteria. Early secretory antigenic target 6 kD (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP-10) are dominant M. tuberculosis antigens in inducing IFN- γ . This study compared CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing IFN- γ with and without ESAT-6- CFP-10 fusion antigen stimulation in active tuberculosis patients. Peripheral blood mononuclear cells from active TB patients were cultured with and without ESAT-6-CFP-10 fusion antigen. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing IFN- γ were examined using flow cytometry. CD4⁺ T-cells expressing IFN- γ after antigen stimulation compare to controls (1.51% \pm 1.7 vs 1.23% \pm 0.86; p=0.08), and CD8⁺ T-cells (1.58% \pm 0.99 vs 1.92% \pm 1.13; p=0.86). CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing IFN- γ after antigen stimulation (1.51% \pm 1.7 vs 1.58% \pm 0.99; p=0.94). There were no significant differences of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing IFN- γ after ESAT-6-CFP-10 fusion antigen stimulation in active pulmonary tuberculosis patients.

Key word: CD4⁺, CD8⁺, IFN- γ , ESAT-6-CFP-10 fusion antigen

Abstrak

Tuberkulosis masih menjadi masalah kesehatan di dunia. Imunitas yang diperantarai sel T berperan penting dalam perlindungan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ mensekresi IFN- γ yang menstimulasi fusi fagolisosom dan pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan *M. tuberculosis*. ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen *M. tuberculosis* yang dominan menginduksi IFN- γ . Penelitian membandingkan sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10 pada TB aktif. Sampel PBMC pasien TB aktif dikultur dengan dan tanpa stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10. Persentase sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ diperiksa dengan flow cytometry. Sel T CD4⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen dibandingkan dengan kontrol (1,51% \pm 1,7 vs 1,23% \pm 0,86; p=0,08) dan sel T CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ (1,58% \pm 0,99 vs 1,92% \pm 1,13; p=0,86). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam ekspresi IFN- γ antara sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ setelah stimulasi antigen fusi ESAT6-CFP10 pada pasien TB paru aktif.

Kata kunci: Sel T, CD4⁺, CD8⁺, IFN- γ , antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah kesehatan di dunia. *Mycobacterium tuberculosis* diperkirakan menginfeksi sepertiga populasi dunia tetapi hanya sekitar 5-15% yang berkembang menjadi penyakit aktif dan mampu menularkan dengan alasan yang belum dapat dijelaskan.¹ Imunitas yang diperantarai sel T memegang peran penting dalam pertahanan pejamu terhadap infeksi *M. tuberculosis*, terutama sel T CD4+ tipe T-helper 1 (Th1) yang mensekresi interferon gamma (IFN- γ).^{2,3} Interferon gamma (IFN- γ) memperkuat potensi fagosit dari makrofag dengan menstimulasi fusi fagolisosom dan pembentukan *reactive oxygen intermediates/ reactive nitrogen intermediates* (ROI/RNI) yang dapat menghancurkan bakteri *M. tuberculosis*.⁴ Sel T-CD8+ juga dapat memproduksi IFN- γ untuk membantu menghancurkan bakteri *M. tuberculosis*.^{5,6} *Early secretory antigenic target* 6 kD (ESAT-6) dan *culture filtrate protein* 10 (CFP-10) merupakan protein spesifik dari strain *M. tuberculosis* yang tidak terdapat pada *M. bovis* (BCG).⁷ Fusi dari protein ESAT-6 dan CFP-10 memiliki parameter termodinamik dan stabilitas biologis yang lebih baik dibandingkan masing-masing protein terpisah.⁸ Kedua protein antigen ini merupakan faktor virulen karena dapat menghambat makrofag memproduksi ROI/RNI yang diperlukan untuk eliminasi mikobakterium, tetapi pada penelitian lain dilaporkan ESAT-6 dan CFP-10 juga merupakan antigen yang dominan menginduksi produksi IFN- γ .⁷ Pengamatan bagaimana pengaruh antigen ESAT-6 dan CFP-10 terhadap penderita TB diperlukan untuk mendapatkan informasi yang lebih baik. Stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 pada pasien TB secara *in vitro* mungkin dapat meningkatkan produksi IFN- γ karena telah terdapat sel T memori. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbandingan persentase sel T CD8+ dan CD4+ yang mengekspresikan interferon gamma (IFN- γ) setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 pada pasien tuberkulosis paru aktif baru.

BAHAN DAN METODE

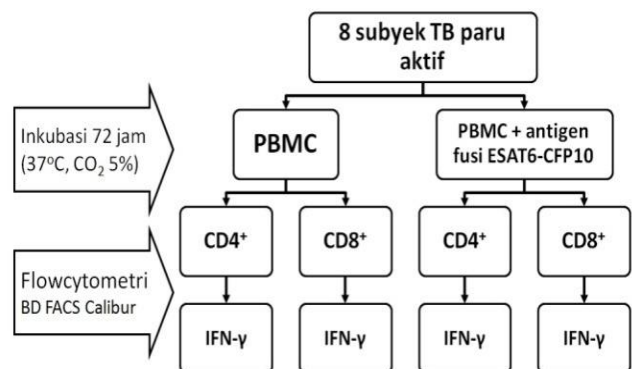
Penelitian ini menggunakan desain eksperimen semu (*quasi experimental design*) di laboratorium dengan cara *in vitro*, dan telah mendapatkan kelaikan dari komite etik penelitian kesehatan fakultas kedokteran universitas airangga.

Optimasi dilakukan sebelum penelitian untuk menentukan besar dosis antigen yang digunakan, dan dosis 5 μ g/mL antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 *M. Tuberculosis* yang dikultur dengan PBMC orang sehat memberikan indeks proliferasi limfosit tertinggi

dibandingkan 1 μ g/mL, 2 μ g/mL dan 10 μ g/mL.

Penelitian dilakukan antara bulan November 2016 – Maret 2017 di Rumah Sakit Karang Tembok dan RSUD dr. Soetomo. Subjek penelitian merupakan 8 penderita TB aktif kasus baru usia lebih dari 18 tahun dan belum mendapat pengobatan TB. Diagnosis TB aktif ditegakkan oleh dokter spesialis paru berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium bakteri tahan asam (BTA) positif dan atau pemeriksaan foto toraks sesuai gambaran TB paru aktif.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) diisolasi dari darah vena kemudian dibagi menjadi dua tabung, tabung pertama sebagai kontrol dan tabung kedua sebagai perlakuan yang diberikan 5 μ g/mL antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 *M. tuberculosis*. Kedua tabung PBMC dari masing-masing sampel subjek penelitian dikultur dengan media RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*) dan diinkubasi selama 72 jam dengan incubator pada suhu 37°C dan CO₂ 5%.⁹ Persentase limfosit T CD8+ dan limfosit T-CD4+ yang mengekspresikan IFN- γ diperiksa dengan metode *flowcytometry* BD FACSCalibur.

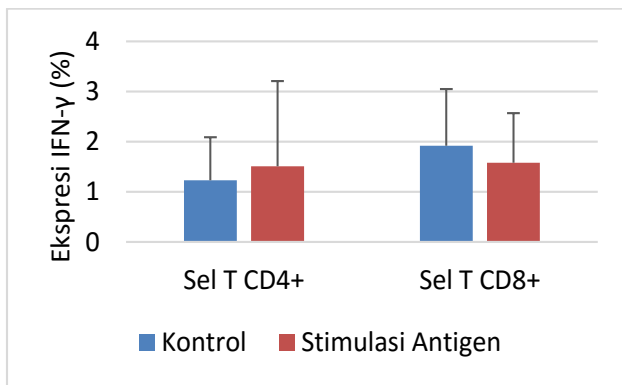


Gambar 1. Alur penelitian

Perbandingan hasil IFN- γ yang diekspresikan sel T CD4+ dan sel T CD8+ dengan dan tanpa stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10 dianalisis dengan *paired-t* test. Semua analisis statistik diolah menggunakan perangkat lunak (*software*) SPSS v.23, bermakna jika nilai $p < 0,05$

HASIL

Sebanyak delapan sampel PBMC penderita TB paru aktif baru masing-masing dikultur dengan dan tanpa stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10. Jumlah subjek penelitian yang berjenis kelamin laki-laki 6 orang dan perempuan 2 orang, proposi laki-laki penderita TB paru aktif pada penelitian ini lebih besar dibandingkan perempuan, hal ini sesuai dengan data WHO 2014 bahwa secara global rasio penderita TB aktif laki-laki 1,7 dibanding perempuan.



Gambar 2. Grafik hasil sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ

Hasil pemeriksaan persentase sel T CD4⁺ yang mengekspresikan IFN- γ dengan stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, tetapi secara statistik tidak bermakna ($p=0,08$). Berbeda dengan sel T CD4⁺, untuk sel T CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, tetapi tidak berbeda secara statistik ($p=0,86$).

Penelitian ini juga mencoba membandingkan persentase sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10, dan didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna ($p=0,94$).

PEMBAHASAN

Imunitas yang diperantarai sel T berperan penting dalam pertahanan pejamu terhadap infeksi TB, terutama sel T CD4⁺ tipe T-helper 1 (Th1) yang mensekresi interferon gamma (IFN- γ).³ Sel T CD8⁺ juga dapat memproduksi IFN- γ untuk membantu menghancurkan kuman *M. tuberculosis*.⁵ Sel T CD4⁺ saja tidak cukup untuk mengendalikan pertumbuhan kuman *M. tuberculosis* tetapi juga diperlukan sel T-CD8⁺ yang akan meningkatkan produksi IFN- γ .⁶ Interferon gamma merupakan sitokin yang paling berperan dalam pertahanan pejamu melawan infeksi *M. tuberculosis* intraselular. Peningkatan produksi IFN- γ oleh sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ diharapkan dapat memberikan perlindungan pada saat pejamu terinfeksi oleh basil *M. tuberculosis*.¹⁰

Hasil dari penelitian ini menunjukkan persentase sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 dengan dosis 5 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Marei et al, dimana tidak terdapat perbedaan sel T CD4⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 dengan menggunakan

dosis 10 $\mu\text{g/mL}$, baik yang diinkubasi selama 6 jam ataupun 18 jam.¹¹ Wang et al dalam penelitiannya juga melaporkan tidak terdapat perbedaan bermakna persentase sel T CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen dengan dosis yang sama dengan inkubasi selama 24 jam.¹² Pollock et al dalam penelitiannya melaporkan hasil yang berbeda, yaitu terdapat peningkatan bermakna sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ setelah diinkubasi dengan antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 menggunakan dosis yang sama selama 16 jam.¹³ Perbedaan hasil ini mungkin dipengaruhi oleh dosis antigen, lama inkubasi dan asal dari antigen yang berbeda. Dosis antigen diduga menentukan antigenitas yang mempengaruhi stimulasi terhadap proliferasi sel T dan produksi sitokin, bahkan suatu studi melaporkan pada dosis tertentu antigen *M. tuberculosis* dapat menghambat proliferasi dan produksi sitokin dari sel T.¹⁴

Penurunan fungsi sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ dalam memproduksi IFN- γ dapat mengganggu proses eliminasi basil *M. tuberculosis*.¹⁰ Kegagalan respon imun pejamu dalam mengeleminasi dan menghambat replikasi basil *M. tuberculosis* yang menginfeksi makrofag dan sel dendritik di alveolar akan menyebabkan pejamu menjadi penderita TB aktif yang beresiko menularkan *M. tuberculosis* (infeksius) ke orang lain melalui droplet. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan secara in vitro tidak terdapat peningkatan bermakna antara persentase sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang mengekspresi IFN- γ sampel PBMC pasien TB aktif setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10. Penelitian lain yang dilakukan oleh Shams et al juga menemukan proporsi sel CD4⁺ dan sel CD8⁺ yang memproduksi IFN- γ sebagai respon terhadap infeksi *M. tuberculosis* menurun pada penderita TB aktif yang berat.¹⁵ Studi berbeda yang dilakukan Davoudi et al menunjukkan hubungan tingkat keparahan penyakit TB dengan jumlah CD4⁺ dan CD8⁺ yang rendah.¹⁶

Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase ekspresi IFN- γ dari sel T CD4⁺ dibandingkan sel T CD8⁺ yang mendapat stimulasi antigen fusi ESAT-6-CFP-10 pada penelitian ini sesuai dengan studi yang dilakukan Shams et al yang menemukan bahwa proporsi IFN- γ yang dihasilkan antara sel T CD4⁺ dan CD8⁺ adalah sama. Hal ini menunjukkan bahwa sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ memiliki kapasitas yang sama dalam memproduksi IFN- γ pada penderita TB aktif.¹⁰ Peran Sel T CD8⁺ dalam perlindungan terhadap infeksi *M. tuberculosis* tidak hanya melalui IFN- γ , tetapi juga dengan aktivitas sitotoksik yaitu: apoptosis sel yang terinfeksi melalui *Fas-FasL pathway* dan dengan sekresi perforin dan granulysin.¹⁷

Penyebab rendahnya sel T CD4⁺ dan sel T

CD8⁺ yang mengekspresikan IFN- γ pada penderita TB aktif sehingga menimbulkan respon imun yang tidak protektif terhadap infeksi *M. tuberculosis* mungkin disebabkan karena *exhausted lymphocyte*. *Exhausted lymphocyte* merupakan gangguan fungsi dari sel limfosit yang umumnya terjadi pada infeksi kronis termasuk tuberkulosis. Gangguan fungsi ini dapat berupa penurunan kapasitas proliferasi, produksi sitokin, kemampuan sitotoksitas dan *metabolically deficient* dari limfosit yang distimulasi.¹⁸ Faktor genetik kelainan polimorfisme gen IFN gamma⁸⁷⁴ T/A dan status gizi mungkin juga berperan dalam rendahnya produksi IFN- γ , namun pada penelitian ini tidak diteliti.⁴

KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan persentase sel T-CD4⁺ dan sel T-CD8⁺ sebelum dan setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10. Sel T-CD4⁺ dan sel T-CD8⁺ yang tidak adekuat dalam memproduksi IFN- γ sebagai pertahanan terhadap infeksi *M. tuberculosis* dapat menyebabkan pejamu menjadi TB aktif.

DAFTAR RUJUKAN

1. WHO. WHO *Global Tuberculosis Reports* 2014. Geneva: WHO ;2014.
2. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Spectrum*. 2014;2(5):MGM2-0005-2013. 1–24.
3. Arram EO, Hassan R, Saleh M. Increased frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ circulating regulatory T cells (Treg) in tuberculous patients. *Egypt J Chest Dis Tuberc* [Internet]. 2014;63(1):167–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0422763813002501>.
4. Widjaja JT, Jasaputra DK, Roostati RL. Analisis Kadar Interferon Gamma pada Penderita Tuberkulosis Paru dan Orang Sehat. *J Respir Indo*. 2010;30(2):119–24.
5. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Immunologic Tolerance and Autoimmunity. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 7th edition, Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
6. Handojo I. Imunoasai terapan pada beberapa penyakit infeksi. Surabaya: Airlangga University Press; 2004.
7. Jackson-Sillah D, Cliff JM, Mensah GI, Dickson E, Sowah S, Tetteh JKA, et al. Recombinant ESAT-6-CFP-10 Fusion Protein Induction of Th1/Th2 Cytokines and FoxP3 Expressing Treg Cells in Pulmonary TB. *PLoS One*. 2013;8(6).
8. Zhang L, Zhang H, Zhao Y, Mao F, Wu J, Bai B, et al. Effects of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein on the Autophagy Function of Mouse Macrophages. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2012;31(2):171–9. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dna.2011.1290>.
9. Maat, S *Imunologi Laboratorium*. Cetakan Pertama. Surabaya : Global Persada Press;2013.
10. Afzal N, Javed K, uz-Zaman S, Mumtaz A, Hussain S, Tahir R, Ullah I, Akram M, . Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in blood of tuberculosis patients. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2010;22(4):182-186.
11. Marei A, Ghaemmaghmi A, Renshaw P, Wiselka M, Barer M, Carr M, et al. Superior T cell activation by ESAT-6 as compared with the ESAT-6-CFP-10 complex. *Int Immunol*. 2005;17(11):1439–46.
12. Wang F, Mao L, Hou H, Wu S, Huang M, Yin B, et al. The source of Mycobacterium tuberculosis-specific IFN- γ production in peripheral blood mononuclear cells of TB patients. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2016;32:39–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.012>.
13. Pollock KM, Whitworth HS, Montamat-Sicotte DJ, Grass L, Cooke GS, Kapembwa MS, et al. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. *J Infect Dis*. 2013;208(6):952–68.
14. Wang X, Barnes PF, Dobos-Elder KM, Townsend JC, Chung Y -t., Shams H, et al. ESAT-6 Inhibits Production of IFN- γ by Mycobacterium tuberculosis-Responsive Human T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2009;182(6):3668–77. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0803579>
15. Shams H, Wizek B, Weis SE, Samten B. Contribution of CD8⁺ T Cells to Gamma Interferon Production in Human Tuberculosis. *Infect Immun*. 2001;69(5):3497–501.
16. Davoudi S, Rasoolinegad M, Younesian M, Hajiabdolbaghi M, Soudbakhsh A, Jafari S, et al. CD4⁺ cell counts in patients with different clinical manifestations of tuberculosis. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2008;12(6):483–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287835> %5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000600008&lng=en&nrm=iso&tlng=en
17. Sud D, Bigbee C, Flynn JL, Kirschner DE. Contribution of CD8⁺ T Cells to Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol* [Internet]. 2006;176(7):4296–314. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.7.4296>.
18. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *J Biomed Biotechnol*. 2011.