

Increasing Airway Smooth Muscle Apoptosis has a Relationship with Increasing CD8⁺ T Cell in Asthmatic Models Mice

Peningkatan Jumlah Apoptosis *Airway Smooth Muscle* Berhubungan dengan Peningkatan Jumlah Sel T CD8⁺ pada Model Mencit Asma

Dessy Setiawati*, HMS Chandra Kusuma**, Kusworini***

* Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

** Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

*** Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Airway remodeling is an important thing in asthma. The increase of airway smooth muscle mass is a prominent feature of asthmatic airway remodeling. The importance role of airway smooth muscle cell (ASM) apoptosis in airway remodeling is unknown. T cell also had important role in asthma, whereas CD4⁺ T cell role in airway remodeling has already known, but how CD8⁺ T cell role in airway remodeling is still unclear. A randomized control group experimental study used Balb/c mice, that categorized into 2 groups: asthma and control. 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 expression of CD8⁺ T cell lymphocyte was examined through immunohistochemistry method, whereas ASM apoptosis by TUNEL method. Independent sample t-test and spearman test was used in statistical analysis with confident interval 95%. The bronchioli and lungs specimens were obtained from 18 mice (9 in each group). Case group had significant increase in the amount of ASM apoptosis and expression of CD8⁺ T cell lymphocyte ($p=0.000$; $p=0.001$). There was also positif correlation between ASM apoptosis and expression of CD8⁺ T cell ($r=0.37$, $p=0.065$). We conclude that increasing ASM apoptosis has a relationship with increasing CD8⁺ T cell

Keywords: asthma, mice, ovalbumin, ASM apoptosis and CD8⁺ T cell

PENDAHULUAN

Asma masih menjadi penyakit kronis yang serius dan menjadi masalah di seluruh dunia. Prevalensi asma di dunia diperkirakan 7,2% atau diperkirakan mencapai 300 juta orang (6% pada dewasa, dan 10% pada anak), dengan mortalitas mencapai 250.000 orang per tahun. Inflamasi kronis atau persisten telah dibuktikan merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi keparahan dan frekuensi eksaserbasi asma, serta berperan dalam *remodeling* jalan nafas (1).

Pada proses *remodeling* jalan nafas penyakit asma terdapat beberapa sel yang berperan antara lain : sel mukus (hipersekreksi mukus), sel endotel (angiogenesis), sel fibroblas (fibrosis) dan sel otot polos jalan nafas. Pada peningkatan proliferasi jaringan otot polos jalan nafas (*airway smooth muscle/ASM*) menunjukkan pengaruh yang besar terhadap penyempitan jalan nafas (2). Teori yang sudah ada menyebutkan bahwa pada proses asma terjadi hipertrofi dan hiperplasi otot polos sebagai akibat dari peningkatan migrasi dan proliferasi sel, atau penurunan kematian sel melalui apoptosis atau nekrosis (3,4). Namun telah dilaporkan bahwa pada kuda yang mengalami *remodelling* jalan nafas didapatkan peningkatan jumlah ASM yang mengalami apoptosis, dan berbeda dari penelitian penelitian sebelumnya. Peranan apoptosis ASM sendiri pada pergantian otot polos secara fisiologis belum pernah ditegaskan sampai sekarang (5).

Penelitian lain yang sedang berkembang mengenai *airway remodeling* adalah peran sel T yang penting pada asma kronis di mana sel T adalah kunci dalam patogenesis asma melalui pelepasan beberapa sitokin. Hubungan stimulasi dua arah antara sel T yang teraktivasi dengan *airway smooth muscle cell* juga telah dilaporkan (6, 7, 8).

Peran sel T CD4⁺ pada timbulnya responsifitas jalan nafas dan *airway remodeling* pada asma telah diketahui dengan baik, tetapi bagaimana peran sel T CD8⁺ pada hiperresponsifitas jalan nafas dan *airway remodeling* kasus asma belum terlalu jelas (9, 10). Beberapa penelitian melaporkan sel T CD8⁺ sebagai supresor pada hiperresponsifitas dan reaksi inflamasi jalan nafas pada asma. Di sisi lain beberapa penelitian melaporkan terjadi peningkatan sitokin yang diproduksi sel T CD8⁺ pada asma yang berat dan fatal (11, 12).

Hadirnya limfosit T CD8⁺ setelah paparan alergen pada pasien asma alergi berhubungan dengan supresi respon inflamasi fase lambat. Pada hewan model asma (*rodent*), penurunan sampai kadar minimal dari limfosit T Cd8⁺ akan meningkatkan respon imun fase awal dan fase lambat (13,14). Penelitian oleh Tsuchiya (2008) pada hewan model asma menunjukkan bahwa sel T CD8⁺ mempunyai efek inhibisi atau menghambat terjadinya *remodeling* jalan nafas pada asma. Pada kondisi penurunan kadar sel T Cd8⁺, terjadi peningkatan *remodeling* jalan nafas. Sebaliknya Cho *et al* ,2005 menunjukkan adanya peningkatan produksi sitokin tipe 2 oleh sel T Cd8⁺. Disamping itu hubungan antara produksi sitokin tipe 2 oleh sel T CD8⁺ dengan keparahan penyakit, lebih kuat dibandingkan dengan produksi sitokin tipe 2 oleh sel T Cd4⁺ (15).

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 3, Desember 2009; Korespondensi: Dessy Setiawati Program Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jln. Veteran, Malang. Tel. +62812528140

Berdasarkan fakta tersebut penting untuk dikaji hubungan apoptosis ASM dan sel T CD8⁺ pada proses *remodeling* jalan nafas pada asma. Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur *Mus musculus (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 *remodeling* jalan nafas, yang ketiganya merupakan patofisiologi terjadinya asma pada manusia (16).

METODE

Hewan coba yang digunakan

Hewan coba yang digunakan adalah mencit galur *Mus musculus (Balb/c mice)*, yang berasal dari kandang hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma. Jenis kelamin mencit yang dipilih adalah betina karena memiliki respon terhadap alergen yang lebih baik dibandingkan dengan mencit berjenis kelamin jantan. 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 dieksklusi 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.

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. Pengambilan subyek penelitian dilakukan dengan teknik *consecutive sampling*, yaitu subyek yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan dalam penelitian sebanyak yang diperlukan sesuai besar subyek yang dibutuhkan, yaitu 9 subyek per kelompok sehingga total subyek penelitian sebanyak 18 subyek penelitian.

Subyek yang memenuhi kriteria inklusi akan 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 setiap 3 hari, 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.

Pembuatan dan Pengamatan Slide

Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 µm. Terdapat 18 slide, yang terdiri dari 9 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 dilakukan secara terpisah. Pemeriksaan dan perhitungan jumlah apoptosis ASM dan jumlah ekspresi sel T CD8⁺ dilakukan pada masing-masing slide pada bidang pandang dengan pembesaran 1000x, dihitung per mm² pada 20 lapang pandang dan diambil nilai rerata

Pengecatan Struktur Sel

Slide atau sediaan histopatologi dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit. Selanjutnya, slide direndam dalam *tap water* selama 10 menit, kemudian dibilas dengan dH₂O. Tahap berikutnya adalah dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan larutan eosin selama 3 menit. Setelah itu, slide dibilas dengan alkohol 30%, dicuci dengan dH₂O selama 5 menit, serta dikering-anginkan. Tahap akhir adalah *mounting* dengan entelan.

Pengamatan Apoptosis ASM

Slide atau sediaan histopatologi dicuci dengan menggunakan PBS pH 7,4; kemudian diinkubasi menggunakan proteinase-K 20 µg/ml selama 15 menit pada suhu 37°C. Tahap berikutnya adalah inkubasi pada H₂O₂ 3% selama 15 menit, untuk kemudian diinkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labeling* 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 dH₂O. Jumlah apoptosis ASM adalah jumlah sel ASM per mm² pada pemeriksaan

bronkiolus mencit, dengan karakteristik berinti tunggal, perbandingan inti dan sitoplasma 3:4, dengan sitoplasma berwarna merah, dimana inti sel berwarna coklat gelap setelah pengecatan dengan TUNEL⁵, melalui pemeriksaan mikroskop dengan pembesaran 1000x.

Pengamatan Ekspresi sel T CD8⁺

Sediaan histopatologi dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan 2 tahap *blocking*, yaitu: *blocking* endogenous peroksida menggunakan H₂O₂ 3% selama 20 menit dan *blocking* protein non-spesifik menggunakan FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100. Selanjutnya slide diinkubasi menggunakan mouse monoklonal anti-CD8 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 dH₂O, 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 dH₂O, dan *mounting* menggunakan entelan. Jumlah sel T yang mengekspresikan CD8⁺ adalah jumlah sel limfosit per mm² pada pemeriksaan bronkiolus dan paru mencit yang tampak berpendar warna coklat pada sitoplasma, pada pemeriksaan mikroskop cahaya pembesaran 1000x.

Pemeriksaan IgE Ovalbumin

Tahap pertama adalah *coating* mikroplate dengan ovalbumin selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian dicuci dengan *washing buffer* 3 kali. Selanjutnya, 100 µL 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.

Analisis Statistik

Beda rerata (*mean*) jumlah apoptosis ASM dan jumlah sel T CD8⁺ antara kedua kelompok (perlakuan dan kontrol) masing-masing dianalisis dengan menggunakan *independent-sample T-test*; sedangkan hubungan antara jumlah apoptosis ASM dan jumlah sel T CD8⁺ dengan *Spearman test* karena distribusi tidak normal, dengan menggunakan nilai interval kepercayaan 95%. Semua data diolah dengan menggunakan *SPSS 16.0 for windows*.

Persetujuan Penelitian

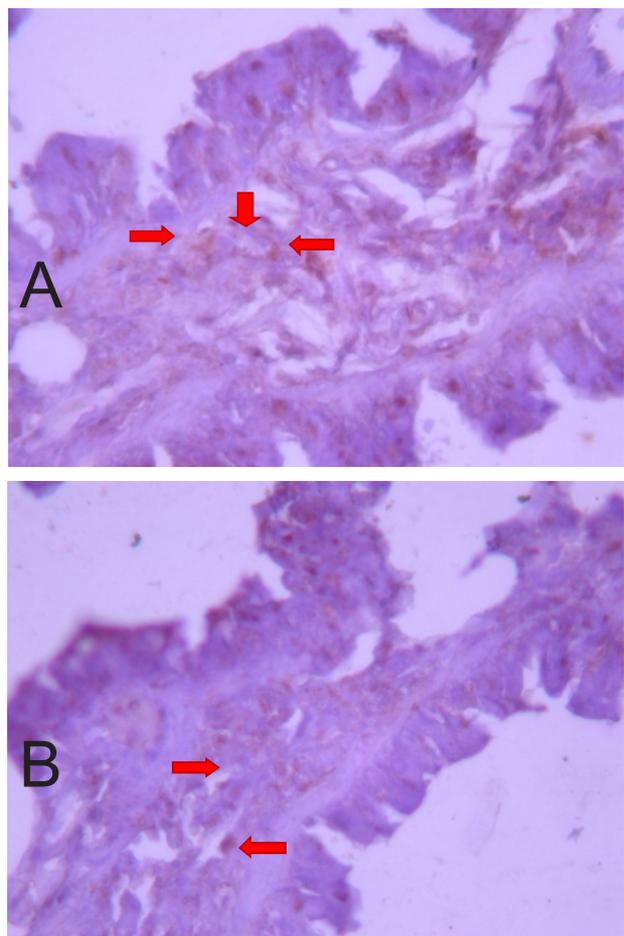
Penelitian ini dilakukan setelah disetujui oleh Panitia Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, RSUD dr. Saiful Anwar, Malang.

HASIL

Dari sampel yang sudah dikelompokkan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada jumlah, usia, jenis kelamin, dan berat badan hewan coba (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Hewan Coba

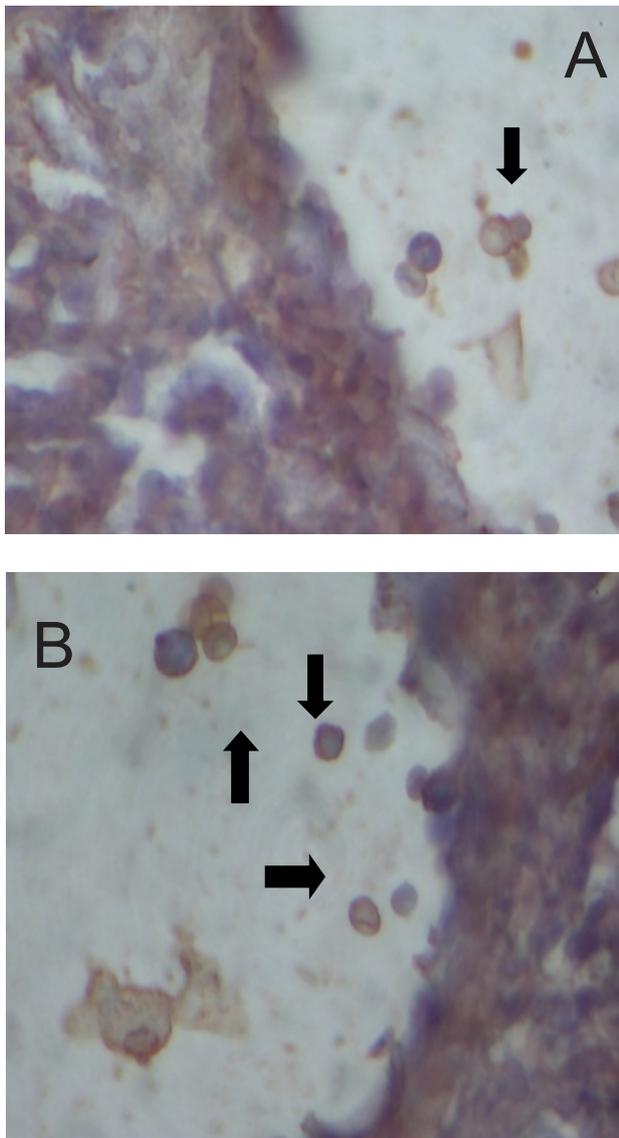
Karakteristik	Perlakuan	Kontrol	
Jenis	<i>Mus musculus (balb/c Mice)</i>	<i>Mus musculus (balb/c mice)</i>	
Jumlah (ekor)	9	9	<i>p</i> = 0,751
Usia (minggu)	6-12	6-12	
Jenis kelamin	Betina	Betina	
Berat (g)	26,82 ± 2,19	26,36 ± 3,36	



Gambar 1. Gambaran Apoptosis ASM pada Bronkiolus dan Paru Mencit.

Keterangan : A. Kelompok Perlakuan B. Kelompok Kontrol.

Apoptosis ASM tampak sebagai sel-sel berinti tunggal, perbandingan inti-sitoplasma 3:4, sitoplasma berwarna merah, inti sel warna coklat gelap (Gambar 1). Pada pengamatan apoptosis ASM didapatkan perbedaan bermakna yaitu apoptosis ASM lebih tinggi pada kelompok perlakuan (asma). Pada pengamatan jumlah ekspresi sel T CD8⁺, didapatkan pula perbedaan bermakna yaitu jumlah ekspresi sel T CD8⁺ lebih tinggi pada kelompok perlakuan. Pada Tabel 2 didapatkan hubungan positif



Gambar 2. Gambar Ekspresi Sel T CD8 pada Bronkiolus dan Paru Mencit.

Keterangan: A. Kelompok Perlakuan B. Kelompok kontrol. Ekspresi sel T CD8⁺ Tampak sebagai sel-sel berwarna coklat pada sitoplasmanya (*panah hitam*)

Tabel 2 Perbandingan IgE OVA pada Kedua Kelompok

Variabel	Perlakuan (Mean ± SD)	Kontrol (Mean ± SD)	
IgE OVA	11,22 ± 2,30	7,60 ± 1,13	<i>p</i> = 0,001
Sel TCD8 ⁺	17,33 ± 2,09	11,11 ± 0,99	<i>p</i> = 0.001
Apoptosis	20,00 ± 4,06	3,27 ± 1,82	<i>p</i> = 0,000

kuat antara ekspresi CD8 dengan apoptosis ASM, dengan nilai *r* = 0.774 dan *P* < 0.001.

DISKUSI

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya hubungan dari apoptosis ASM dan jumlah sel T CD8⁺ dalam proses remodeling jalan nafas mencit asma. Proses terjadinya remodeling pada asma sendiri berhubungan dengan perjalanan penyakit asma yang

kronis dan berat. Hal ini telah didukung oleh penelitian sebelumnya. Kaminska (2009) melaporkan pada subyek asma berat dan kronik hasil biopsi endobronkialnya menunjukkan adanya fibrosis submukosa, penebalan area ASM. Aysola (2008) melaporkan pada pasien asma berat terdapat penebalan dinding jalan nafas dibandingkan pasien asma ringan atau asma sedang.

Gambaran utama dari asma adalah *remodeling* jalan nafas, dan salah satu bagian dari remodeling tersebut adalah peningkatan jumlah ASM pada dinding jalan nafas. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pada asma terjadi penurunan apoptosis ASM. Di sisi lain peningkatan proliferasi ASM baik secara hipertrofi maupun hiperplasi berakibat pada peningkatan penyempitan dan resistensi jalan nafas. Penelitian oleh Herszberg (2006) melaporkan bahwa pada hewan coba (kuda) yang mengalami *remodeling* jalan nafas menyerupai remodeling asma pada manusia didapatkan peningkatan jumlah ASM yang mengalami apoptosis, berbeda dari penelitian penelitian sebelumnya (5).

Pada penelitian ini digunakan hewan model dari golongan *BALB/c mice* jenis kelamin betina dengan dasar bahwa jenis atau golongan ini adalah yang paling sering digunakan pada banyak penelitian mengenai asma, dan selama ini telah terbukti bahwa pada golongan *BALB/c mice* ditemukan perubahan jaringan dalam hal *remodeling* jalan nafas yang sama dengan yang ditemukan pada manusia (17).

Paparan alergen pada penelitian ini adalah dengan ovalbumin secara injeksi peritoneal pada awal penelitan dan inhalasi selama total 60 hari (hampir 9 minggu) dengan frekuensi paparan antara 2 - 3 kali perminggu. Tujuan dari metode ini adalah memberikan paparan kronis yang akhirnya memberikan gambaran peradangan kronis seperti pada kasus asma, yang salah satunya adalah terjadinya *remodeling* jalan nafas. Sehingga dapat diketahui kondisi apoptosis ASM yang merupakan salah satu faktor dalam remodeling jalan nafas. Hal ini didukung oleh penelitian penelitian sebelumnya. Temelkovski (1998) melaporkan paparan ovalbumin terhadap *BALB/c mice* betina selama 8 minggu dengan durasi 3 hari per minggu memberikan gambaran *remodeling*, induksi sitokin Th2, dan hiperresponsifitas. Henderson (2002) melaporkan paparan ovalbumin pada *BALB/c mice* betina selama 8 minggu memberikan gambaran remodeling jalan nafas antara lain : *hiperplasia* sel goblet, deposisi kolagen subepitel. MacMillan (2005) juga melaporkan pemberian paparan ovalbumin selama hampir 8 minggu pada *BALB/c mice* betina memberikan hasil gambaran inflamasi, *remodeling*, induksi sitokin Th2, hiperresponsifitas jalan nafas, dan induksi sitokin TGF-β (17).

Indikator asma yang dipakai pada penelitian ini adalah adanya peningkatan immunoglobulin E ovalbumin (IgE ova). Ig E telah dianggap sebagai komponen molekul utama dari penyakit atopi, termasuk asma. Beberapa studi klinis telah menemukan hubungan yang erat antara asma dan kadar IgE serum; IgE selalu ditemukan pada sekresi jalan nafas pasien-pasien asma (18).

Penggunaan ovalbumin sebagai alergen yang dapat menginduksi reaksi alergi asma juga telah diakui dan digunakan secara luas pada banyak penelitian mengenai asma pada hewan model. Fernandez, 2008 juga melaporkan terjadinya inflamasi eosinofilik, hiperresponsifitas jalan nafas, dan respon imun asma fase awal dan lambat (19).

Pada penelitian didapatkan hasil perbedaan yang signifikan pada kadar IgE spesifik OVA antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan ditemukan nilai IgE yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini mendukung terjadinya asma, seperti penelitian - penelitian yang telah banyak dilakukan sebelumnya (18).

Dari hasil penelitian didapatkan perbedaan yang signifikan jumlah ASM yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan (asma) dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan jumlah apoptosis ASM lebih banyak dibanding kontrol. Hal ini berbeda dari beberapa laporan atau teori yang cukup banyak yang pernah ada sebelumnya, bahwa pada asma terjadi penurunan jumlah ASM yang mengalami apoptosis. Namun hasil lain dari penelitian ini yaitu pada perwarnaan struktur sel dengan Hematoxilen-Eosin (data tidak ditampilkan) didapatkan kesan terjadi penebalan daerah ASM pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Hal tersebut bisa dijelaskan dari beberapa sudut pandang antara lain perlu dipertimbangkan adanya proses homeostasis sistem tubuh kita.

Dalam proses *remodelling* jalan nafas kondisi asma, saat terjadi peningkatan proliferasi ASM, proses apoptosis ASM juga bisa meningkat untuk mencegah perubahan struktural yang ekstrim dari jalan nafas. Jadi dalam hal ini apoptosis ASM juga mempunyai peranan dalam proses remodeling yaitu mencegah terjadinya penebalan ASM yang berlebihan. Proses apoptosis sendiri merupakan kejadian yang dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain faktor faktor pro apoptotik dan faktor - faktor anti apoptotik. Jika faktor pro apoptotik lebih dominan maka kejadian apoptosis akan meningkat. Sebaliknya jika faktor anti apoptotik yang lebih dominan maka kejadian apoptosis akan menurun. Selain itu ada beberapa jalur yang bisa dipakai untuk menginduksi terjadinya apoptosis yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik.

Banyak penelitian sebelumnya yang melaporkan peran IFN- γ atau TNF- α sebagai beberapa faktor pro apoptotik, yang mampu menginduksi terjadinya apoptosis sel baik secara langsung maupun tidak langsung. Shi (2002) melaporkan IFN- γ menginduksi apoptosis beberapa tipe sel termasuk sel adenocarcinoma colon, selain juga dilaporkan bahwa kemampuan menginduksi apoptosis dari IFN γ lebih besar dibandingkan Fas (21). Madejek (2009) melaporkan bahwa apoptosis *bronchial smooth muscle cell* meningkat pada kondisi di mana terjadi peningkatan IFN- γ dan TNF- α yang merupakan molekul efektor dari apoptosis *bronchial smooth muscle cell* (8, 20).

Bronchial smooth muscle cell atau ASM adalah target penting dari sel T dan eosinofil dalam proses *remodeling* asma. Beberapa penelitian melaporkan peran beberapa faktor proapoptotik dan jalur yang

berperan pada kejadian apoptosis ASM. Hamman *et. al*, (2000) melaporkan pada *Human Airway Smooth Muscle* (HASM) yang dikultur terdapat ekpresi Fas, dan ikatan Fas dengan HASM in vivo dapat menginduksi terjadinya apoptosis dari HASM. Kondisi ini didukung dengan didapatkannya peningkatan IFN- γ dan TNF- α yang merupakan molekul efektor dari apoptosis *bronchial smooth muscle cell* dan mempotensiasi terjadinya apoptosis tersebut.

Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Medejek *et. al*, (2008) juga melaporkan pentingnya peranan sel T pada proses apoptosis dari *bronchial smooth muscle cell* (BSMC). Ditemukan bahwa supernatan dari sel Th1 yang mengandung IFN- γ dan TNF- α mempunyai kemampuan menginduksi kejadian apoptosis dari BSMC yang lebih kuat (poten) dibandingkan dengan cairan *supernatant* dari Th2. Penemuan sebelumnya mendukung penelitian ini, di mana dalam penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah ekspresi sel T CD8⁺, dan sel T CD8⁺ telah diketahui predominan dalam mensekresi IL-2 dan IFN- γ . Hasil ini bertolak belakang dengan hipotesa yaitu bukan penurunan tetapi sebagai faktor pro apoptotik (17).

Perlu pembuktian lebih lanjut apakah ekspresi sel T CD8 dalam penelitian ini memang mewakili ekspresi Th1, bukan ekspresi Th2 seperti yang pernah dilaporkan penelitian sebelumnya, selain melalui sitokin sitokin yang diproduksi. Stanciu *et al* (1997) yang menyimpulkan bahwa sel T CD8⁺ pasien asma merupakan sumber penting sitokin tipe 2, yaitu IL-4 dan IL-5. Sel T CD8⁺ pasien asma menunjukkan ekspresi IL-4 yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan subyek sehat non atopi, sementara ekspresi IFN- γ tidak didapatkan perbedaan. Penelitian oleh Coyle (1995) dan Stock (2004) pada hewan coba yang disensitisasi ovalbumin dilaporkan sel T CD8⁺ paru memproduksi sitokin tipe Th2 yaitu IL-4, IL-5 yang tinggi tetapi sedikit produksi IFN- γ nya (14, 22).

Hasil lain dari penelitian ini yang juga kebalikan dari hipotesis adalah peningkatan jumlah ekspresi sel T CD8⁺ dari kelompok perlakuan (asma) yang lebih tinggi dan signifikan dibandingkan kelompok kontrol dengan nilai $p = 0.001$ dan selain itu kedua variabel tersebut juga mempunyai korelasi yang positif dengan nilai $r = +0.774$.

Astma merupakan penyakit inflamasi kronik mukosa bronkial dan sel T adalah kunci dalam patogenesis asma melalui pelepasan beberapa macam sitokin - sitokinnya. Pada penelitian oleh Medejek, *et. al*, 2009 dilaporkan bahwa sel T mempunyai peran penting dalam terjadinya kematian otot polos bronkiolus baik melalui proses apoptosis maupun nekrosis pada asma yang berat (22, 12).

Berat terjadi pergeseran produksi sitokin Th1 yang lebih dominan daripada sitokin Th2 yaitu antara lain : peningkatan infiltrasi sel T CD8⁺ pada biopsi jaringan

Rensen (2004) melaporkan pada pasien asma dengan penurunan fungsi paru didapatkan bronkialnya, dan Cho (2005) yang melaporkan bahwa produksi IL-4, IL-5, dan IFN- γ meningkat produksinya baik oleh sel T CD4⁺ maupun sel T CD8⁺ pada kondisi asma yang berat (12, 23).

Sel T CD8⁺ telah diketahui sebagai salah satu produsen dari IFN- γ , saat berfungsi sebagai *T cytotoxic 1*. IFN- γ sendiri juga dilaporkan meningkat produksinya pada kondisi asma berat akut pada penelitian Cho, 2002 baik oleh sel T CD8⁺ maupun oleh sel T CD4⁺, dan bahkan sel T CD4⁺ selain memproduksi IL-4 juga dapat juga berfungsi memproduksi IFN- γ .

Meskipun asma diketahui sebagai penyakit dengan predominan kelainan eosinofilik yang melibatkan sitokin Th2, namun pada kondisi berat dan kronik, penyakit ini mempunyai karakteristik Th1, dengan keterlibatan neutrophil, TNF- α , IFN- γ . Selain itu pada asma berat terjadi peningkatan kerusakan jaringan atau apoptosis yang berlebihan dan merupakan bagian penting untuk terjadinya *remodeling* (13). Mekanisme lain yang dapat menerangkan kondisi asma berat dengan apoptosis sel yang meningkat adalah data penelitian lain yang menyebutkan bahwa neutrophil ditemukan meningkat pada sekresi bronkial pasien dengan kondisi asma berat, hal ini didukung juga oleh Madejek, 2008 yang melaporkan terjadinya peningkatan apoptosis dari *bronchial smooth muscle cell* pada kondisi asma berat serta peningkatan ekspresi caspase 3 yang signifikan pada *smooth muscle cell* dan sel epitel, sebagai faktor pro apoptotik.

Berdasarkan fakta-fakta tersebut di atas ada kemungkinan yang mengarahkan hewan coba dengan perlakuan di sini kemungkinan mengalami kondisi asma berat sehingga terjadi peningkatan apoptosis ASM dan juga sel T CD8⁺ yang bersifat Tc1 yang juga telah dilaporkan berhubungan dengan derajat keparahan asma. Namun memang masih perlu data-data lain untuk mendukung kondisi asma berat pada penelitian ini antara lain pemeriksaan target organ secara keseluruhan kondisi struktur sel yang lain misalnya kondisi kerusakan epitel, fibrosis submukosa, penebalan ASM, maupun secara fungsi misalnya nilai FEV1. Dapat disimpulkan bahwa pada model mencit asma didapatkan peningkatan apoptosis ASM dan peningkatan sel T CD8⁺ secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, serta terdapat hubungan yang signifikan peningkatan apoptosis ASM dengan peningkatan sel T CD8⁺ pada model mencit asma.

KESIMPULAN

Peningkatan jumlah *Airway Smooth Muscle* yang mengalami apoptosis terbukti berperan pada proses *remodelling* jalan nafas pada mencit asma. Peningkatan apoptosis ASM tersebut berhubungan dengan peningkatan sel T CD8⁺.

DAFTAR PUSTAKA

1. UKK Pulmonologi. *Pedoman nasional asma anak*. Jakarta: PP Ikatan Dokter Anak Indonesia. 2004
2. Stewart AG. *Airway wall remodelling and hyperresponsiveness : modelling remodelling in vitro and in vivo*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics . 2001;14:255-265.
3. Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, et al. *Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium*. J Clin Invest . 1997; 99:439-446.
4. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, et al. *Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia*. J Immunol . 1997;158:3902-3908.
5. Herszberg B, Ramos D, Tamaoka M, Martin J, Lavole JP. *Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling*. J Allergy Clin Immunol . 2006; 118:382-8.
6. Beier KC, Kallinich T, Hamelmann E. *Master switches of T-cell activation and differentiation*. Eur Respir J. 2007; 29:804-12.
7. Hakornason H, Maskeri N, Carter C, Grunstein M. *Regulation of TH1 and TH2 type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle*. J Clin Invest. 1999; 103:1077-87.
8. Madejek KS, Basinski TM, Cramer R, et al. *T cell and eosinophils in bronchial smooth muscle cell death in asthma*. Clinical and Experimental Allergy . 2009;39:845-55.
9. Oltman U, Sukkar MB, Xie S. *Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase*. Am J Respir Cell Mol Biol . 2005; 32:334-341.
10. Ramos-Barbon D, Presley JF, Hamid QA, et al. *Antigen-specific CD4⁺ T cells drive airway smooth muscle cell remodeling in experimental asthma*. J Clin Invest . 2004;115: 1580-1589.
11. Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, et al. *Requirement for CD8⁺ T Cells in the Development of Airway Hyperresponsiveness in a Murine Model of Airway Sensitization*; J. Exp. Med. 1996;183:1719-29.
12. Rensen EL, Sont JK, Evertse CE, et al. *Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine . 2004; 172:837-41.
13. Biller H, Bade B, Matthys H, Luttmann W, Virchow JC. *Interferon- γ secretion of peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes in patients with bronchial asthma: In vitro stimulus determines cytokine production*. Clin Exp Immunol. 2001 ;126:199-205.
14. Stanciu LA, Shute J, Promwong C, Holgate ST, and Djukanovic R. *Increased levels of IL-4 in CD8⁺ T cells in atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol. 1997;100:373-77.
15. Tsuchiya K, Isogai S, Tamaoka M. *Depletion of CD8⁺ T cells enhances airway remodelling in a rodent model of asthma*. Immunology . 2008;126:45-54.
16. Zosky GR, Larcombe AN, White OJ. *Ovalbumin-*

sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. Clin Exp Allergy. 2000;38:829838.

17. Nials AT, Uddin S. *Mouse model of allergic Asthma : acute and chronic allergen challenge.* Disease Models & Mechanisms .2008;1:213-20.
18. Zuberi RI, Apgar JR, Chen S, Liu F. *Role of IgE in airways secretions : IgE immune complexes are more potent inducer than antigen alone of airway inflammation in a murine model.* The Journal of Immunology.2000;164:2667-73.
19. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. *The classical ovalbumin challenge model of asthma in mice.* Curr Drug Target . 2008; 9:485-94.
20. Fernandez RS, Ford WR, Broadley KJ, Kidd EJ. *Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma.* Int Immunopharmacol. 2008; 8:756-763.
21. Shi ZQ, Fischer MJ, Sanctis GT, Schulyer MR., *IFN- δ , but not Fas, mediates reduction of allergen-induced mucous cell metaplasia by inducing apoptosis.* The Journal of Immunology . 2002;168:4764-71.
22. Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D. *CD8⁺ T cells regulate immune responses in murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation.* Eur J Immunol. 2004; 7:1817-27.
23. Cho SH, Stanciu LA, Begishvili T, Bates PJ, Holgate ST, and Johnston SL. *Peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cell type 1 and type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects.* Clin Exp All.2002; 32:427-33.