

## TLR4 macrophage expression of the wistar rats were inoculated by *Candida albicans*

I Dewa Ayu Ratna Dewanti

Staf of Biomedic Faculty of Dentistry Jember University

### Abstract

Multidimensional crisis in Indonesia caused to multi effects. In health aspect caused increase infection diseases, otherwise mouth become some gate for entrance pathogen flora into human body. One of the most infection diseases was found in the mouth is candidiasis caused by *C. albicans*. TLR4 were play a pivotal role in recognition of *Candida albicans*. **The purposed experimental** : This experimental purposed to know comparison of TLR4 expression macrophage of the wistar rats were inoculated *C. albicans*. **Method** : The subjects of this research are 20 male-wistar rats divided into five groups : Control Group (KO) were 10 rats that were not given treatment. Experimental Groups (KP), 10 rats that were inoculated by *C. albicans*. After 21 days, will be kill and cut on tongue for analized by imunohistochemic. The data obtained will be analyzed using t test. **The result** : The result this research showed that there was not a significant different ( $p < 0,05$ ) to comparison of TLR4 macrophage expression of Experimental Groups 1 (KP). A significant different was found at decreasing of TLR4 between KO with KP. **Discused** : These decreasing are assumed that *C. albicans* infection could inhibit TLR4 activities, so the decreasing of macrophage activity caused TLR4 decreased. All of those activity causes the decreasing immune response and killed activity to *C. albicans*. **The conclusion** : The fact of this research is dereasing TLR4 macrophage of wistar rat was inoculated by *C. albicans*.

**Key words** : *Candida albicans* ; TLR4 ; macrophage ; infection diseases ; immune respons

**Korespondensi (Correspondence)** : I Dewa Ayu Ratna Dewanti, Bagian Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia, Telp.(0331)333536

Makrofag berperan penting dalam melawan *C. albicans* yang merupakan penyebab utama kandidiasis mulut<sup>1,2</sup>. Kandidiasis mulut salah satu penyakit infeksi yang paling banyak dijumpai di rongga mulut (80%)<sup>2</sup>. Penelitian sebelumnya oleh penulis membuktikan bahwa *C. albicans* dapat menurunkan jumlah makrofag<sup>3</sup>. Dimana peneliti juga telah membuktikan bahwa penurunan respons imun karena *C. albicans* dapat diperbaiki dengan pemberian bahan imunomodulator<sup>4,5</sup>. *Candida albicans* disebut oportunistik, karena dapat menjadi patogen pada keadaan sistem pertahanan tubuh kita terganggu. Kandungan dinding sel seperti mannan, zymosan berperan memodulasi imunitas pejamu<sup>6,7,8</sup>. Makrofag sebagai fagosit profesional mengenali dan menghancurkan patogen melalui beberapa reseptor merangsang produksi substansi mikrobial melalui CD14 yang diekspresikan ke permukaan sel, akan mengaktifkan *Toll-like receptors* (TLRs) serta NF- $\kappa$ B<sup>9,10</sup>. Stimulasi sitokin proinflamatori dan aktivasi *innate immunity* tergantung keakuratan pengenalan dari invasi patogen. Diduga TLR4 berperan pada perlekatan *C. albicans* pada fagosit, sehingga dikatakan TLR4 merupakan kunci mediator pada Imunitas alami terhadap jamur, namun belum diketahui apakah memang TLR ini berperan dan yang mana dari keduanya yang lebih berperan<sup>12,13,17</sup>. Penurunan NF- $\kappa$ B, TLR4 oleh *C. albicans* akan menghambat aktivitas fagositosis, sehingga dikatakan TLRs merupakan mediator kunci

imunitas alami antifungal<sup>14,15,17</sup>. Pada imunitas alami, patogen dikenali TLR, menimbulkan signaling dalam sel dan mempengaruhi ekspresi sitokin. Reseptor sitokin dan TLR akan mengaktifasi faktor transkripsi gen dan sintesis protein yang memperantarai fungsi efektor makrofag seperti pembunuhan mikroba, trombosis, *tissue remodelling*, inflamasi dan peningkatan presentasi antigen.

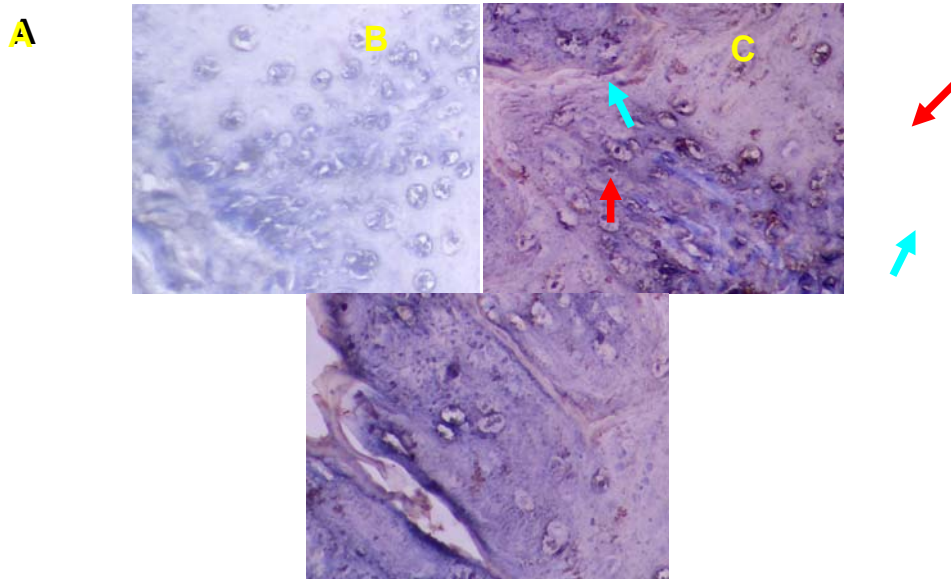
### TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi TLR4 makrofag pada tikus wistar yang diinokulasi dengan *C. albicans*

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan jumlah sampel 20 ekor tikus Wistar jantan, berat 100-200 gr, usia 2-3 bulan yang dilakukan adaptasi 1 minggu, terdapat 2 kelompok yang terbagi menjadi Kelompok Kontrol (KO) yang tidak diberi tidak diinokulasi *C. albicans* dan kelompok perlakuan yang terdiri dari 10 ekor tikus yang diinokulasi *C. albicans* (KP1), mulai hari ke 8 sampai hari ke 21. Masing-masing kelompok dilakukan pengamatan pada hari ke 22 tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan jaringan lidah tikus dan dibuat sediaan dengan pengecatan imunohistokimia. Data yang diperoleh dianalisis dengan t test.

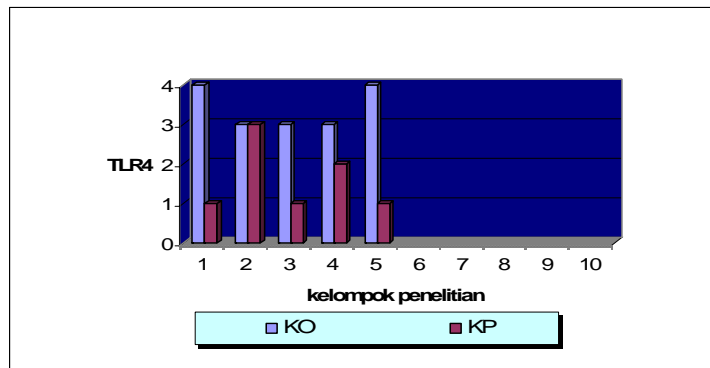
HASIL PENELITIAN



Gambar 2. Ekspresi TLR4 pada Makrofag dengan teknik imunohistokimia (pembesaran 400 x)

**Keterangan :**

- Warna coklat pada membran sel terdapat ekspresi TLR4 (↗)  
 Warna biru pada membran sel menunjukkan tidak ada ekspresi TLR4 (↖)
- A. Kontrol pengecatan
  - B. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Kontrol (KO)
  - C. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Perlakuan (KP)

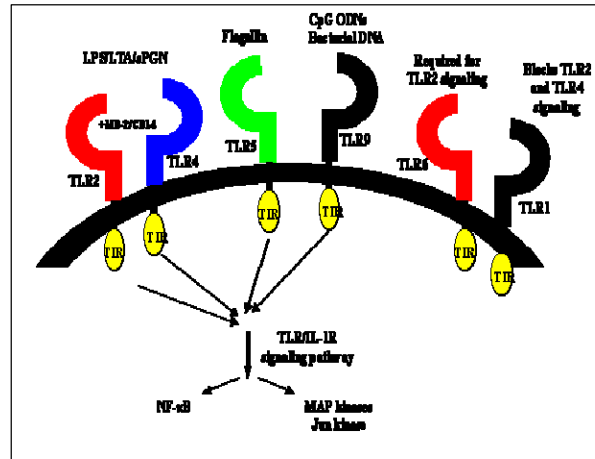


Gambar 4. Perbandingan ekspresi TLR4 antara kontrol dengan KP (infeksi *C. Albicans*)

Gambar 3, 4, 5 setelah dilakukan analisa statistik dengan Anova yang dilanjutkan Uji HSD menunjukkan terjadi penurunan TLR4 yang signifikan, sedangkan perbandingan TLR4 terdapat perbedaan yang tidak signifikan.

#### PEMBAHASAN

*TLRs* merupakan protein homologous pada membrane sel APC yang berfungsi sebagai reseptor fungsional yang mengaktifkan leukosit untuk menimbulkan mentrigger respons imun *innate* atau respons inflamatori dalam melawan patogen. Protein ini ditemukan pertama kali pada *Drosophila* sebagai protein Toll. Reseptor ini terdiri dari daerah yang kaya dengan *leucine* pada ekstrasel dan pada region ekor sitoplasma yang merupakan reseptor dari IL-1 dan IL-8 dan disebut Toll/IL-1 reseptor (TIR) domain Reseptor untuk pengenalan terhadap patogen dan produk mikroba akan menimbulkan imunitas *innate*. Fungsi tersebut dihubungkan dengan reseptor kinase yang kemudian menstimulasi produksi sitokin dan substansi mikrobisidal.

Gambar 6. Pengenalan patogen oleh TLR<sup>17</sup>

Keterangan :

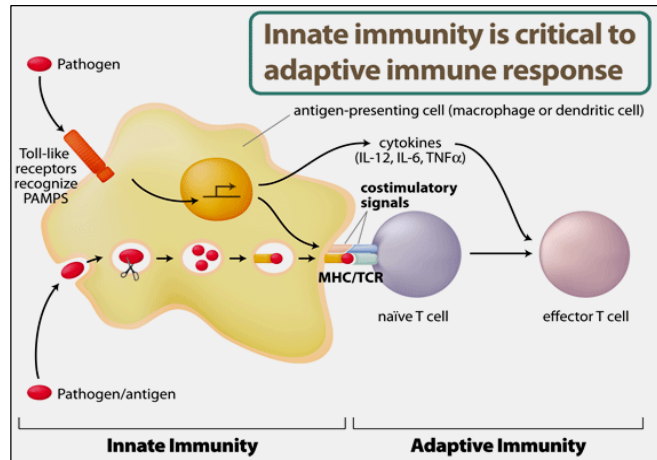
Komponen mikroba yang telah dikenali dan terikat pada CD14, TLR melalui MD-2, TIR/IL-1R akan mengaktifkan NF-κB MAP kinases melalui Jun kinases. TLR2 mengenali mikroba melalui lipopeptida, TLR1, TLR6 bekerjasama dengan TLR2 untuk membedakan *triacyl* dan *diacyl* lipopeptida. TLR4 merupakan reseptor terhadap LPS, mannan. TLR9 spesifik pada pengenalan CpG DNA. TLR3 untuk pengenalan dsRNA virus, sedangkan TLR7 dan TLR8 dikhususkan pada pengenalan flagela.

Aktivitas TLR4 mempengaruhi fosfatidilinositol pada membran sel makrofag dan akan mengaktifkan protein Rac, selanjutnya akan mengaktifkan NF-κB dan AP-1 melalui jun kinase melalui jalur MAPK (*The mitogen-activated protein kinase*). Termasuk jalur ini ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) dan p38. ERK mempengaruhi aktivitas jun, sedangkan p38 mempengaruhi produksi IL-6, IL-8 dan IL-12. Aktivitas p38 dan ERK dapat mengaktifkan AP-1. Ketiga jalur MAPK dapat diaktifkan dalam waktu yang sama. NF-κB merupakan regulator dari respons awal terhadap patogen dan sebagai aktivator respons imun. NF-κB adalah p50-p65 dari keluarga protein heterodimer yang menranskripsi bermacam-macam gen. Aktivasi NF-κB memerlukan fosforilasi protein I-κB, kemudian terjadi degradasi yang menyebabkan p50-p65 berada dalam nukleus dan mengaktifkan bermacam-

macam gen. Setelah terjadi pelepasan I-κB, maka terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF-κB yang menstimulasi ekspresi gen yang mempengaruhi produksi TNF-α dan aktivitas fagositosis. Stimulasi ekspresi gen antara lain mempengaruhi produksi TNF-α. Dalam respons imun terhadap *C. albicans*, TNF-α berperan sebagai imun primer dalam regulasi sistem imun. Khusus pada makrofag sitokin ini meningkatkan aktivitas dalam membunuh patogen, di mana aksi ini menjadi mediator penting pada inflamasi. TNF-α, IL-6 menginduksi proliferasi netrofil selama inflamasi, apoptosis, diferensiasi, diferensiasi, tumorigenesis, replikasi virus. TNF-α, IL-6 ini diproduksi secara kontinyu oleh sel untuk homeostasis dan akan meningkat dengan tujuan *remodeling* atau *replacement* dari injuri, yang berkaitan dengan penyakit inflamatori atau. Selanjutnya efek aktivitas ini akan menstimulasi juga respons adaptif (gambar 7

Aktivitas TLR4 mempengaruhi fosfatidilinositol pada membran sel makrofag dan akan mengaktifkan protein Rac, selanjutnya akan mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan AP-1 melalui jun kinase melalui jalur MAPK (*The mitogen-activated protein kinase*). Termasuk jalur ini ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) dan p38. ERK mempengaruhi aktivitas jun, sedangkan p38 mempengaruhi produksi IL-6, IL-8 dan IL-12. Aktivitas p38 dan ERK dapat mengaktifkan AP-1. Ketiga jalur MAPK dapat diaktivasi dalam waktu yang sama. NF- $\kappa$ B merupakan regulator dari respons awal terhadap patogen dan sebagai aktivator respons imun. NF- $\kappa$ B adalah p50-p65 dari keluarga protein heterodimer yang menranskripsi bermacam-macam gen. Aktivasi NF- $\kappa$ B memerlukan fosforilasi protein I $\kappa$ B, kemudian terjadi degradasi yang menyebabkan p50-p65 berada dalam nukleus dan mengaktifkan bermacam-

macam gen. Setelah terjadi pelepasan I- $\kappa$ B, maka terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang menstimulasi ekspresi gen yang mempengaruhi produksi TNF- $\alpha$  dan aktivitas fagositosis. Stimulasi ekspresi gen antara lain mempengaruhi produksi TNF- $\alpha$ . Dalam respons imun terhadap *C albicans*, TNF- $\alpha$  berperan sebagai imun primer dalam regulasi sistem imun. Khusus pada makrofag sitokin ini meningkatkan aktivitas dalam membunuh patogen, di mana aksi ini menjadi mediator penting pada inflamasi. TNF- $\alpha$ , IL-6 menginduksi proliferasi netrofil selama inflamasi, apoptosis, diferensiasi, diferensiasi, tumorigenesis, replikasi virus. TNF- $\alpha$ , IL-6 ini diproduksi secara kontinyu oleh sel untuk homeostasis dan akan meningkat dengan tujuan *remodeling* atau *replacement* dari injuri, yang berkaitan dengan penyakit inflamatori atau. Selanjutnya efek aktivitas ini akan menstimulasi juga respons adaptif (gambar 7).



Gambar 7. Imunitas *innate* dan adaptif <sup>18</sup>

## DAFTAR PUSTAKA

1. Lehner, T, 1995. Immunologi of Oral Disease. 1992. Imunologi pada Penyakit Mulut. Ed. 3. Terjemahan: Ratna Farida dan NG Suryadhana. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm: 112-115.
2. Roeder Alexander, Carsen J. KirChing, Rudolf A. Rupec, Martin Schaller, Gunther Weindl. Hans Christian Korting, December 2004. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. Issue. No. 107; p. 485-498.
3. Dewanti Ratna, 2003. Daya hambat pertumbuhan *C albicans* oleh Perasan Daun Mimba (*Azadirachta Indica juss*), Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal), Edisi khusus Temu Ilmiah Nasional III 6-9 Agustus. Hlm: 342-344.
4. Dewanti Ratna, 2005. Perasan daun mimba meningkatkan jumlah sel radang pada tikus yang diinokulasi *C albicans*.
5. Dewanti, 2008. Peningkatan TLR2 pada tikus wistar yang diinokulasi *C albicans* dan diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba.
6. Jeganathan S. and Yow Cheong Char, 1992. Immunodiagnosis in Oral Candidiasis. *Reviews. Oral Surgery Med Pathol Oral Radiol Endoct* ; vol.14; 451-5.
7. Chattopadhyay A, et all, 2005, Risk Indicators for Oral Candidiasis and Oral Hairy Leukoplakia in HIV- Infected Adults, <http://www. Ingenta connect.com/content/ mksj/ com/ 2005/ 00000033/ 00000001/ art 00005. diakses 3 Februari 2007. jam 09.00 wib>
8. Winarto Hariyono dan Noroyono Wibowo. Review Artikel. Peran Imunitas Seluler Lokal pada Kandidosis Vulvovagina Rekuren. [File:///E:\imun\\_c\\_albican.htm](File:///E:\imun_c_albican.htm). Diakses tanggal 5-12-2005. Jam 09.00 wib [www.tempo.co.id/medika/online/tmponline\\_co.id/pus-2.htm-18k-supplemental-Result.retrieved.13 Juli 05](http://www.tempo.co.id/medika/online/tmponline_co.id/pus-2.htm-18k-supplemental-Result.retrieved.13 Juli 05).
9. Diamond Richard D, Caron A. Lyman and Deborah R. Wysong, 1991. Disparate Effects of Interferon  $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  on Early Neutrophil Respiratory Burst and Fungicidal Responses to *Candida albicans* Hyphae in vitro. *J. Clin. Invest.*; vol.87: 711-720.
10. Newman Simon L and Angela Holly. 2001. *Candida albicans* Is Phagocytosed, Killed, and Processed for Antigen Presentation by human Dendritic Cells. *Infection and Immunity* .; Vol. 69: No. 11: 6813-6822.
11. Ulmann Breanna D, Hadley Myers, Wiriya Chiranand, Anna L. Lazzell, Qiang Zhao, Luis A. Vega, Jose L. Lopez-Ribot, Paul R. Gardner and Michael C. Gustin, 2004, June. Inducible Defense Mechanism against Nitric Oxide in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*: Vol. 3: No. 3: 715-723.
12. Baltch A.L, R.P Smith, M.A Franke, W.J Ritz, P.B Michelsen, and L.H Bopp, 2001. Effects of Cytokine and Fluconazole on the Activity Human Monocytes against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45;no. 1;96-104.
13. Netea G. Mihai, Chantal van der Graaf, Alieke Verschueren, Jos W.M Van der Meer and Bart Jan Kullberg, 2002. The Role of Toll-Like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in The Host Defense against Disseminated Candidiasis. *The Journal of Infectious Disease*:vol.185: 1483-1489
14. Kadowaki Norimitsu, Stephen Ho, Svetlana Antonenko, Rene de Waal Malefyt, Robert A. Kastelein, Fernando Bazan and Yong-Jun Liu, 2001 Subset of Human Dendritic Cell precursor Express Different Toll-Like receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, vol.194:6:863-870.
15. Sato Morihito, Hitomi Sano, Daisuke Iwaki, Kazumi Kudo, Masanori Konishi, Hiroki Takahashi, Toru Takahashi, Hitoshi Imazumi, Yasufumi Asai and Yoshiro Kuroki. Direct binding of Toll-Like Receptors 2 to Zymosan and TNF  $\alpha$  Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A. *The Journal of Immunology*, 2003,vol.171:417-425.
16. Blasi, E. Mucci, A. Neglia, R.Pezzini, F. Colombari, B. Radzioch, D. Cossa-rizza, 2005. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol.44;no.1;69-79.
17. Netea G. Mihai, Neil A.R. Gow, Carol A. Monro, Stevens Bates, Claire Collins, Gerben Ferweda, Richard P. Hudson, Gwyneth Bertram, H. Bledy Hughes, Trees Jansen, Listbeth Jacobs, Ed T. Buurman, Karlijn Gizjen, David L. Williams, Ruurd Torensma, Odds, Jos W.M. Van der Meer, Alistair J.P. Brown and Bart Jan Kullberg, 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannan and glucans by lectin and Toll-Like receptors. *J. Clin. Invest.*;vol. 116: 1642-1650.
18. Kobayasi, Harvard medical school departement of Pathology. Diakses 3 Januari 2008. Jam 09.00 wib.