

# EKSPRESI GEN SUPEROXIDE DISMUTASE 1 SERTA HUBUNGANNYA DENGAN FUNGSI TIMUS PENDERITA SINDROMA DOWN

Siti Nurhajjah<sup>1</sup>, Rinang Mariko<sup>2</sup>, Raysa Ramayumi<sup>3</sup>

## ABSTRAK

Infeksi merupakan masalah kesehatan pada penderita sindroma Down (SD), sehingga tinggi angka kesakitan dan kematian. Peningkatan ekspresi SOD1 1,5 kali pada penderita SD yang berefek terhadap peningkatan peroksidasi ( $H_2O_2$ ), sehingga diperkirakan sebagai faktor penyebab apoptosis timus. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi gen SOD1 dan hubungannya dengan sel timus pada penderita SD. Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional comparative study* dengan jumlah sampel sebanyak 50 orang (25 orang penderita SD dan 25 orang kontrol). Darah vena diambil sebanyak 5 cc setiap sampel untuk isolasi RNA dan DNA, ekspresi gen SOD1 dengan teknik Real Time PCR, sedangkan fungsi timus dilihat dari presentasi TREC. Analisis statistik untuk ekspresi gen dan hubungan antar variabel dengan menggunakan uji t. Penelitian ini ditemukan log copy number SOD 1 pada kelompok penderita SD adalah  $11,107 \pm 0,44/\text{ng cDNA}$ , sedangkan pada kontrol  $10,501 \pm 0,48/\text{ng cDNA}$ , secara statistik terdapat perbedaan bermakna ( $P=0,000$ ). Presentase TREC adalah  $44,7 \pm 7,4\%$  pada kelompok penderita SD dan  $57,9 \pm 5,4\%$  pada kelompok kontrol. secara statistik terdapat perbedaan bermakna  $p < 0,05$ . Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi gen SOD 1 pada penderita SD dibandingkan kontrol dan rendahnya presentasi TREC pada penderita SD dibandingkan kontrol, hal ini mungkin disebabkan terjadi penurunan fungsi timus akibat peningkatan ekspresi gen SOD1.

**Kata Kunci:** sindrom Down, ekspresi gen SOD 1, presentasi TREC

**Afiliasi Penulis:** 1. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, 2. Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Andalas/RSUP Dr.M.Djamil Padang, 3. Mahasiswa S1 Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. **Korespondensi:** Siti Nurhajjah, Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Jl. Perintis Kemerdekaan No. 94 Padang 25127. Email: sitinurhajjah@yahoo.co.id. Telp/Hp: +6281363394123

## PENDAHULUAN

Sindrom Down (SD) merupakan suatu kelainan kromosom yang ditandai dengan kelebihan satu kromosom 21.<sup>1</sup> Insiden penderita SD dilaporkan di beberapa negara masih tinggi yaitu 1/600 kelahiran, dimana kasus terbanyak ditemukan di Finlandia yaitu 1/364 kelahiran.<sup>2,3</sup> Jumlah penderita SD di Indonesia belum didapatkan data secara pasti, namun data rekam medik di laboratorium molekuler FK.Undip didapatkan sebanyak 123 penderita SD yang diperiksa kromosom dari tahun 2005 sampai 2010.<sup>4</sup> Data dari Bagian Anak RSUP M.Djamil Padang didapatkan rata-rata sekitar 25 kasus penderita SD pertahun.

Kelebihan satu kromosom 21, mengakibatkan peningkatan ekspresi dan ketidakseimbangan gen-gen yang berada pada kromosom ini maupun kromosom lain. Hal ini yang menyebabkan gangguan sistem imun, intellectual disability (ID) dan kelainan organ pada penderita ini.<sup>1,5-7</sup>

Gangguan sistem imun pada penderita SD karena disfungsi dan defisiensi imunitas spesifik dan nonspesifik, sehingga meningkatkan kerentanan terhadap infeksi serta tingginya angka kesakitan dan kematian.<sup>8-10</sup> Infeksi saluran nafas merupakan kasus paling sering ditemukan dan sebagai penyebab kematian pada penderita SD.<sup>8,11</sup>

Infeksi saluran nafas yang menyebabkan peningkatan penderita SD dirawat rumah sakit sebanyak 16 kali lipat selama wabah virus H1N1. Prevalensi kematian pada penderita SD 23.3% lebih tinggi dibandingkan dengan pasien yang bukan menderita SD yaitu sekitar 0,1%.<sup>12</sup> Resiko infeksi yang tinggi pada penderita SD juga menjadi masalah bagi keluarga dan pemerintah, dimana akan dibutuhkan biaya yang besar serta waktu untuk perawatan lama.

Gen SOD1 merupakan gen yang berlokasi pada kromosom 21q22.1. SOD1 adalah enzim yang berperan dalam merubah reaksi oksigen reaktif menjadi oksigen peroksidasi ( $H_2O_2$ ).<sup>13</sup> Kelebihan satu kromosom 21 menyebabkan peningkatan ekspresi gen SOD1 sekitar 50%, hal ini menyebabkan kelainan neurologi, imunitas dan penuaan yang cepat.<sup>14</sup> Peningkatan ekspresi gen ini masih terus diteliti terutama efek toksik yang mengakibatkan gangguan proses apoptosis. Gen SOD1 bertanggung

jawab terhadap kerentanan infeksi yang terjadi pada penderita SD.<sup>8</sup>

Penelitian tentang fungsi sel timus pada penderita SD sudah dilakukan oleh beberapa peneliti. Mereka mendapatkan tingginya persentasi  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  dan rasio Th1/Th2.<sup>15,16</sup> Kelainan sistem imun pada penderita SD dilaporkan berkaitan dengan rendahnya jumlah sel limfosit T dan sel B penderita ini, serta berkurangnya kemotaksis dari sel neutrofil.<sup>8</sup> Kadar limfosit T dan ekspresi T cell receptor rearrangement excision circles (TREC) rendah pada penderita SD, hal ini menunjukkan terjadinya abnormal timus.<sup>17</sup> Indek mitotik sel limfosit rendah ditemukan pada penderita SD, hasil ini dapat dijadikan indikator bahwa keadaan status imun penderita SD rendah, sehingga dapat meningkatkan risiko kerentanan terhadap infeksi.<sup>8,9,18,19</sup>

Berdasarkan latar belakang, diasumsikan bahwa kelebihan kromosom 21 akan mengakibatkan peningkatan ekspresi gen SOD1 berakibat terjadinya apoptosis sel timus. Peneliti tertarik untuk mengetahui ekspresi gen SOD1 serta kaitannya dengan kemungkinan terjadinya abnormalitas timus.

## METODE

Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional comparative study*. Sampel penelitian adalah penderita SD di SLB Kota Padang (25 orang) dan bukan SD (25 orang). Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Isolasi RNA dengan menggunakan kit isolasi RNA Roche, RNA yang didapatkan dirubah ke cDNA. Isolasi DNA menggunakan kit isolasi Roche. Isolasi RNA dan DNA serta cDNA sesuai dengan prosedur yang terdapat pada kit. Pemeriksaan RT-PCR gen SOD1 dengan membuat campuran PCR untuk satu reaksi, terdiri dari master mix PCR,  $H_2O$ , Primer SOD1 : F 5' GTG GTA GTC TCC TGC AGG TGT 3', R 5' GCC TTC GTC GCC ATA ACT 3', Probe 5' (FAM) TTC CGT TGC AGT CCT CGG ACC (TAMRA) 3', enzim Amplitaq dan cDNA. Kemudian campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin RT-PCR (Roche), sebanyak 35 siklus. Pemeriksaan RT-PCR gen TREC dengan membuat campuran PCR untuk satu reaksi, terdiri dari master mix PCR,  $H_2O$ , Primer sjTREC :F 5'-CAC ATCCCT

TTC AAC CAT GCT-3'; R 5'-GCC AGC TGC AGG GTT TAG G-3'; dan Probe FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT -BLACK HOLE-3' enzim Amplitaq dan DNA. Kemudian campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin RT-PCR (Roche), sebanyak 35 siklus. Analisis statistik untuk ekspresi gen dan melihat hubungan antar variabel menggunakan uji t.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah sebanyak 50 orang yang terdiri dari 25 orang penderita SD dan 25 orang bukan penderita SD (kontrol). Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Subyek Penelitian

| Karakteristik | Kelompok    |                  |
|---------------|-------------|------------------|
|               | SD<br>n (%) | Kontrol<br>n (%) |
| Jenis Kelamin |             |                  |
| Laki-laki     | 13 (52)     | 11 (44)          |
| perempuan     | 12 (48)     | 14 (56)          |
| Usia          |             |                  |
| < 10 tahun    | 9 (36)      | 11 (44)          |
| ≥ 10 tahun    | 16 (64)     | 14 (56)          |

Karakteristik subyek pada penelitian ini didapatkan jenis kelamin laki-laki lebih besar didapatkan pada kelompok penderita SD (52%) dibanding-kan dengan kontrol (44%), sedangkan usia subyek penelitian ≥ 10 tahun pada penderita SD adalah 16 orang (64%) dan Kontrol 14 orang (56%).

Presentase T-cel receptor excision circles (TRECs) dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengandung komponen TREC dibandingkan dengan jumlah sel T yang mengandung FasL. Jumlah sel dihitung berdasarkan kurva standar yang disusun dari pengenceran serial limfosit. TREC. Data penelitian memperlihatkan presentase TREC adalah  $44,7 \pm 7,4\%$  pada kelompok penderita SD dan  $57,9 \pm 5,4\%$  pada kelompok kontrol. Analisis statistik dengan t test memperlihatkan perbedaan yang bermakna dimana  $p=0,000$  berarti  $p<0,05$ .

Ekspresi Gen SOD1 didapatkan dari log copy number SOD1 pada kelompok penderita SD adalah  $11,107 \pm 0,44/\text{ng cDNA}$ , sedangkan pada kelompok kontrol  $10,501 \pm 0,48/\text{ng cDNA}$ . Hasil analisis statistik memperlihatkan terdapat perbedaan copy number kedua kelompok, dimana nilai  $p=0,000$  berarti nilai  $p<0,005$ .

Penelitian ini didapatkan perbedaan copy number gen SOD1 antara kelompok penderita SD dengan kelompok yang bukan penderita SD, ini membuktikan bahwa terjadi peningkatan ekspresi gen SOD1. Penelitian yang dilakukan oleh Epstein et al menemukan bahwa terjadi peningkatan ekspresi gen SOD1 sekitar 50% yang berkaitan dengan kelainan neurologi, dan proses penuaan pada penderita SD.<sup>14</sup> Gen SOD1 juga bertanggung jawab terhadap kerentanan infeksi pada penderita SD. Peningkatan ekspresi gen ini secara teori disebabkan karena kelebihan satu kromosom 21 pada penderita SD, dimana gen ini terdapat di kromosom ini.

SOD1 adalah enzim yang berperan merubah reaksi oksigen reaktif menjadi oksigen peroksidasi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Peningkatan ekspresi gen SOD1 berefek toksik yang mengakibatkan proses apoptosis. Beberapa peneliti melaporkan bahwa ekspresi gen ini berkaitan dengan terjadinya proses apoptosis pada mencit SD pada sel neuron. Gen SOD1 juga bertanggung jawab terhadap kerentanan infeksi pada penderita SD.<sup>8</sup> Kemungkinan proses apoptosis ini juga terjadi pada beberapa organ lain seperti timus.

Penelitian ini didapatkan presentase TREC adalah  $44,7 \pm 7,4\%$  pada kelompok penderita SD dan  $57,9 \pm 5,4\%$  pada kelompok kontrol. Analisis statistik dengan t test memperlihatkan perbedaan yang bermakna dimana  $p=0,000$  berarti  $p<0,05$ . Hal ini menggambarkan bahwa terjadi penurunan TREC pada penderita SD dibandingkan kontrol

Penelitian tentang fungsi sel timus pada penderita SD sudah dilakukan oleh beberapa peneliti, dimana dilaporkan kadar limfosit T dan ekspresi T cell receptor rearrangement excision circles (TREC) rendah pada penderita SD, hal ini menunjukkan terjadinya abnormal timus.<sup>17</sup> Indek mitotik sel limfosit rendah ditemukan pada penderita SD, hasil ini dapat dijadikan indikator bahwa keadaan status imun penderita SD rendah, sehingga dapat meningkatkan risiko kerentanan terhadap infeksi.<sup>8,9,18</sup>

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa peningkatan ekspresi gen SOD1 mungkin berkaitan dengan penurunan presentasi TREC yang dapat mengakibatkan penurunan

fungsi timus serta dapat menyebabkan peningkatan kerentanan infeksi pada penderita SD.

#### DAFTAR RUJUKAN

1. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC. Down syndrome-recent progress and future prospects. *Hum Molecular Genet* 2009;18:75-83.
2. Marttala J, Yliniem O, Glissler M, Nieminen P, Ryyanen M. Prevalence of Down syndrome in a pregnant population in Finland. *Acta Obstet Gynecol* 2010;89:715-717.
3. Weijerman ME, van Furth AM, Vonk Noordegraaf A, van Wouwe JP, Broers CJ, Gemke RJ. *Prevalence, neonatal characteristics and first-year mortality of Down syndrome*. *J Pediatr* 2008;152:15-9.
4. Nurhajjah S, Revilla G, Afdal. Polimorfisme gen TLR4 Asp299Gly pada penderita sindrom Down di Semarang. (Lap DIPA 2011). Padang Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
5. Weijerman ME, van Furth AM, van der Mooren MD, et al. Prevalence of congenital heart defects and persistent pulmonary hypertension of the neonate with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2010;169:1195-9.
6. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13(3):221-227.
7. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, et al. The national Down syndrome project: design and implementation. *Public Health Reports* 2007;122:62-72.
8. Ram G and Chinen J. Infection and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011;164(1):9-16.
9. Megged O. Down syndrome and streptococcus group A disease in hospitalized children. *Acta Pediatr* 2010;99:796-8.
10. Garrison MM, Jeffries H, Chistakis DA. Risk of Death for Children with Down Syndrome and Sepsis. *J Pediatric* 2005;147(6):723-5.
11. Bloemers BL, Broers CJ, Bont L, Weijerman ME, Gemke RJ, van Furth AM. Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome: the consequence of an altered immune system. *Microbes Infect* 2010;12:799-808.
12. Pérez-Padilla R, Fernández R, García-Sancho C. Pandemic (H1N1) 2009 Virus and Down Syndrome Patients. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16;1312-14
13. Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y, et al. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J* 1998;4: 77-84, 1985.
14. Epstein CJ, Avaranham KB, Lovett M, et al. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 8044-48.
15. Franciotta D, Verri A, Zardini E, et al. Interferon-gamma and interleukin-4-proceeding T cell in Down syndrome. *Neurosci Lett* 2006;395: 67-70.
16. Trotta MB, Setto Azul JB, Wajngarten M, Fonseca SG, Goldberg AC, Kalil JE. Inflammatory and immunological parameters in adults with Down syndrome. *Immun Ageing* 2011;8(1):1-7.
17. Prada N, Nasi M, Troiano L, et al. Direct analysis of thymic function in children with Down's syndrome. *Immun Ageing* 2005;2(4):1-8.
18. Ranganath P, Suresh G, Subramaniam A, Rajangam S. Mitotic Index in Down Syndrome is it an indicator of Immunological Status. *Indian J Hum Genet* 2004;10(2):73-5.
19. Gocchi G, Matrocola M, Capelli M, Bastelli A. Immunological pattern in young children with Down syndrome: Is there a temporal trend?. *Acta paediatrica* 2007;96:1479-82.