

## Peningkatan kadar *soluble* Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) sebagai petanda aktivasi endotel pada serum penderita sindrom antifosfolipid yang dipajankan pada kultur endotel tali pusat manusia

G. PRATAMA  
N. WIBOWO  
E.J. SURJANA  
S.B. SUBAKIR\*  
R.D. SETIABUDY\*\*

Departemen Obstetri dan Ginekologi  
Departemen Ilmu Faal\*  
Departemen Patologi Klinik\*\*  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/  
RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo  
Jakarta

**Tujuan:** Mendapatkan kadar *soluble* VCAM-1 (sVCAM-1) pada serum penderita APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia untuk membuktikan adanya peran aktivasi endotel pada mekanisme terjadinya trombotosis pada penderita APS (*antiphospholipid syndrome*).

**Bahan dan cara kerja:** Penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro* di Makmal Terpadu Imuno-Endokrinologi/FKUI pada tahun 2003. Sebanyak masing-masing 14 sampel serum yang berasal dari pasien APS dan non APS yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi berdasarkan batasan operasional (kriteria Sapporo). Kemudian kultur sel endotel dipajankan selama 24 jam dengan medium perlakuan yang ditambahkan 20 % serum dari masing-masing penderita APS atau non APS. Kemudian diukur kadar sVCAM-1 pada masing-masing sampel dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

**Hasil:** Secara statistik didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kadar sVCAM-1 pada serum APS dibandingkan dengan serum non APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia. Secara statistik juga didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) pada kadar sVCAM-1 pada serum APS dibandingkan dengan serum non APS setelah dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia selama 24 jam per 10.000 sel endotel.

**Kesimpulan:** Produksi sVCAM-1 oleh sel endotel vena umbilikalis manusia yang dipajankan dengan serum APS lebih tinggi daripada yang dipajankan dengan serum non APS. Kadar sVCAM-1 pada serum APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia didapatkan lebih tinggi daripada serum non APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalis manusia.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2009; 33-1: 35-40]

**Kata kunci:** *soluble* VCAM-1 (sVCAM-1); APS (*Antiphospholipid syndrome*); Kriteria Sapporo; ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

**Objective:** To obtain *soluble* VCAM-1 (sVCAM-1) concentration from APS subjects' sera exposed to the culture of human umbilical cord endothels to demonstrate whether there is a role of endothelial activation in the thrombotic events in APS (*antiphospholipid*) patient.

**Material and methods:** An *in-vitro* experimental research carried out in Makmal Terpadu Imunoendokrinologi/FKUI in 2003. Fourteen serum samples of each group, APS and non APS subjects, fulfilling the inclusion and exclusion criteria, based on operational definition. (*Sapporo criteria*). Then the endothel cell cultures were exposed to treatment media, which has been added with 20 % serum from each subjects of APS and non APS. The concentration of sVCAM-1 from each subject was measured using *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) method.

**Results:** Statistically there was a significant difference ( $p < 0,05$ ) between APS patient serum sVCAM-1 concentration and non APS' sera that were not exposed to human umbilical vein endothel cell cultures. Statistics also demonstrate that there was significant difference ( $p < 0,05$ ) of the concentration of sVCAM-1 from APS patients' sera compared with non APS' sera after exposed to human umbilical vein endothel cultures for 24 hours per 10.000 endothelial cells

**Conclusion:** sVCAM-1 is produced in greater amount by human umbilical vein endothelial cells exposed to APS patients' sera compared with those exposed to non APS' sera. The concentration of sVCAM-1 from APS patients' sera not exposed to human umbilical vein endothelial cells culture was higher than those of non APS' sera.

[Indones J Obstet Gynecol 2009; 33-1: 35-40]

**Keywords:** *soluble* VCAM-1 (sVCAM-1); APS (*Antiphospholipid syndrome*); Sapporo Criteria; ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

### PENDAHULUAN

Sindrom antifosfolipid (*antiphospholipid syndrome*/APS) merupakan suatu sindrom penyakit yang disebabkan oleh mekanisme autoimun dengan karakteristik adanya trombotosis arteri/vena yang berulang, berbagai komplikasi obstetri, trombositopenia, serta peningkatan titer antibodi antifosfolipid

(*antiphospholipid antibody*/aPL) berupa antibodi antikardiolipin (*anticardiolipin antibodies*/ACA) dan lupus antikoagulan (LA).<sup>1</sup>

Tergantung dari *vascular bed* yang terlibat, manifestasi klinis APS akibat trombotosis sangat bervariasi antara lain emboli paru, hipertensi pulmonal, stroke, infark usus dan hipertensi renal. Sedangkan pada bidang obstetri vaskulopati desidual,

infark plasenta, pertumbuhan janin terhambat, pre-eklampsia onset dini, abortus berulang dan kematian janin. Dibandingkan dengan wanita yang tidak ditemukan aPL, angka kejadian abortus akan meningkat sebanyak 2,6 kali dan angka kejadian pre-eklampsia serta pertumbuhan janin terhambat akan meningkat sebanyak 6 kali.<sup>1</sup> Sedangkan pengamatan yang dilakukan Surjana dan kawan-kawan menemukan bahwa pada penderita abortus 1 kali atau lebih dari 18 pasien, 30 % di antaranya mengandung ACA.<sup>2</sup> Gharavi dan kawan-kawan menyatakan bahwa aPL menyebabkan terjadinya insufisiensi uteroplasenta akibat terjadinya trombosis multipel dan infark plasenta serta vaskulopati arteri spiralis.<sup>3</sup>

Sel endotel merupakan regulator utama pada proses hemostasis. Hal ini membuat para ahli berspekulasi bahwa kondisi *hypercoagulable* pada yang terjadi pada APS berhubungan dengan terganggunya fungsi sel endotel. Beberapa penelitian menemukan bahwa adanya aPL dapat menyebabkan aktivasi sel-sel endotel yang ditandai dengan peningkatan ekspresi molekul-molekul adhesi seperti, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1), dan *E-selectin*.<sup>4-7</sup> Molekul VCAM-1 dan *E-selectin* terutama dihasilkan oleh sel endotel, sedangkan

ICAM-1 selain dihasilkan oleh sel endotel juga dihasilkan oleh monosit, neutrofil serta limfosit.<sup>7</sup>

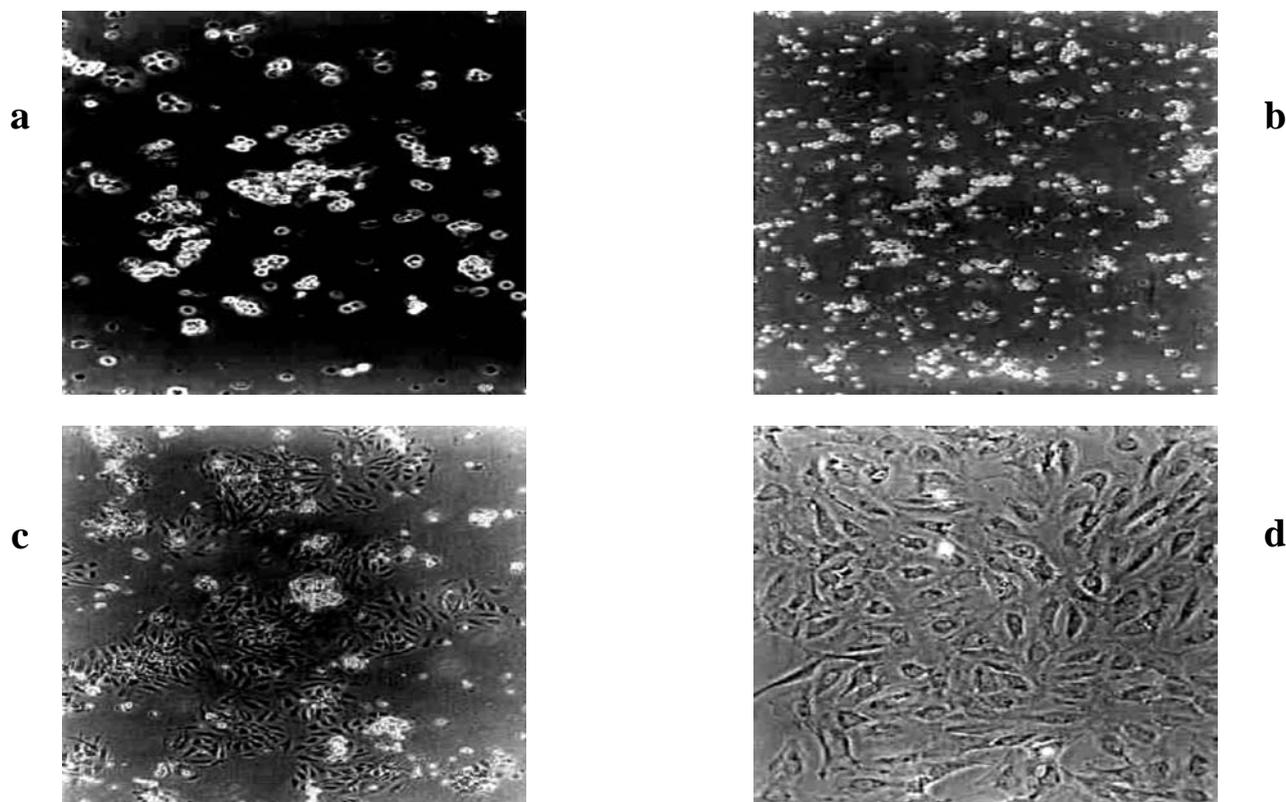
Efek yang diperantarai oleh molekul  $\beta_2$ GPI ini akan menyebabkan peningkatan adhesi leukosit pada dinding vaskuler sehingga mencetuskan proses inflamasi dan trombosis yang dapat menyebabkan timbulnya manifestasi klinis pada APS.<sup>4-7</sup>

Penatalaksanaan bagi penderita APS yang saat ini terutama ditujukan untuk mengatasi keadaan trombosis yang terjadi, bukan mengacu pada mekanisme patogenesis APS yang sebenarnya terjadi.

Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya peran aktivasi endotel pada mekanisme patofisiologi terjadinya trombosis pada penderita APS dan mendapatkan kadar *soluble* VCAM-1 (sVCAM-1) pada serum penderita APS dan non APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia.

#### CARA KERJA

Dilakukan penelitian di Makmal Terpadu Imuno-endokrinologi/Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia terhadap pasien APS dan non APS selama periode Mei sampai Agustus 2003. Selama kurun waktu tersebut didapatkan masing-masing 14 sam-



**Gambar 1.** Hasil kultur sel endotel vena umbilikal manusia setelah (a) 1 jam, (b) 4 jam, (c) 1 hari, (d) 3 hari

pel serum yang berasal dari pasien APS dan non APS yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi berdasarkan batasan operasional (kriteria Sapporo), tidak sedang dalam pengobatan atau terapi APS/SLE, tidak menderita penyakit SLE, diabetes melitus, preeklampsia, artritis reumatoid, skleroderma dan infeksi. Kemudian kultur sel endotel dipajankan selama 24 jam dengan medium perlakuan yang ditambahkan 20 % serum dari masing-masing penderita APS atau non APS. Sebagai kontrol, kultur sel endotel juga dipajankan pada medium perlakuan yang bebas serum (Gambar 1).

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah mengetahui besar perbedaan kadar VCAM-1 pada serum APS terhadap serum non APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia. Oleh karena itu, parameter yang diukur adalah kadar VCAM-1 pada serum APS dan non APS yang dipajankan pada medium kultur sel endotel vena umbilikal manusia, dan tidak dipajankan sebagai pembandingan.

Data-data yang didapatkan dari hasil-hasil penelitian ini telah dilakukan analisis secara statistik. Telah dilakukan uji normalitas secara Kolmogorov Smirnov. Untuk mengetahui apakah kadar VCAM-1 lebih tinggi secara bermakna pada medium kultur setelah pajanan kultur sel endotel tali pusat terhadap serum APS dibandingkan serum non APS, dilakukan uji *independent T*.

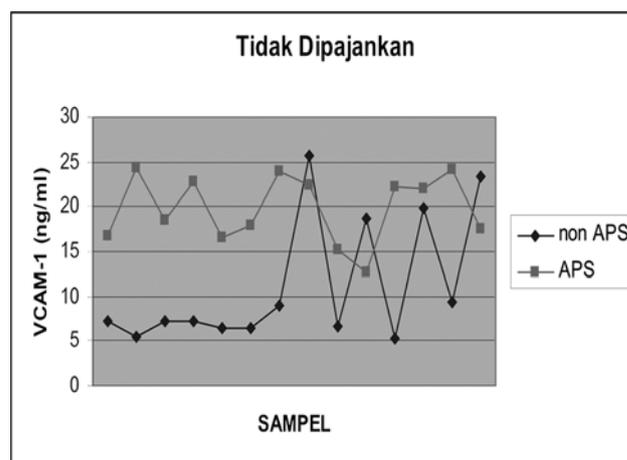
### HASIL

Pada serum pasien APS, terdapat 3 pasien dengan kadar ACA tinggi (> 80 GPL/MPL unit), sedangkan sisanya memiliki kadar ACA sedang (20 - 80 GPL/MPL unit). Sedangkan berdasarkan jenis imunoglobulinnya, 13 sampel mempunyai kadar IgM > 20 MPL unit, 1 sampel mempunyai IgG yang juga > 20 GPL unit dan 3 sampel keduanya. Dari uji statistik, tidak didapatkan adanya perbedaan bermakna antara tingginya kadar ACA dengan tingginya kadar VCAM-1 pada serum yang tidak dipajankan pada kultur endotel vena umbilikal manusia ( $p > 0,05$ ;  $p = 0,18$ ), maupun terhadap kadar VCAM-1 setelah dipajankan ( $p > 0,05$ ;  $p = 0,21$ ).

Sebaran data kadar VCAM-1 pada serum non APS dan APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia disajikan dalam Gambar 1. Sedangkan sebaran data kadar VCAM-1 pada serum non APS dan APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia disajikan pada Gambar 2.

**Tabel 1.** Perbandingan kadar VCAM-1 (ng/ml) serum pasien APS dengan serum non APS yang tidak dipajankan pada kultur endotel vena umbilikal tali pusat manusia

	kadar VCAM-1 (ng/ml)
Non APS	11,262 ± 7,225
APS	20,108 ± 4,231
<i>p</i>	0,001

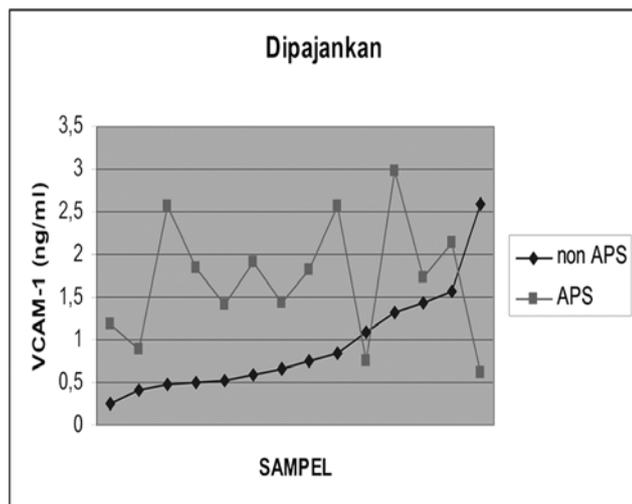


**Gambar 1.** Sebaran kadar VCAM-1 (ng/ml) pada serum non APS dan APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia,  $p < 0,05$

Secara statistik didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,001$ ) antara kadar VCAM-1 pada serum APS dibandingkan dengan serum non APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia (Tabel 1). Serum yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia ini merupakan pembandingan adanya peningkatan kadar VCAM-1 pada masing-masing serum setelah dipajankan selama 24 jam.

**Tabel 2.** Perbandingan kadar VCAM-1 (ng/ml) serum pasien APS dengan serum non APS yang dipajankan pada kultur endotel vena umbilikal tali pusat manusia

	kadar VCAM-1 (ng/ml)
Non APS	0,928 ± 0,632
APS	1,703 ± 0,713
<i>p</i>	0,005



**Gambar 2.** Sebaran kadar VCAM-1 (ng/ml) pada serum non APS dan APS setelah dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalisis manusia selama 24 jam per 10.000 sel endotel,  $p < 0,05$

Secara statistik juga didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,005$ ) pada kadar VCAM-1 pada serum APS dibandingkan dengan serum non APS setelah dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalisis manusia selama 24 jam per 10.000 sel endotel (Tabel 2).

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dicoba untuk membuktikan adanya peningkatan kadar VCAM-1 pada serum pasien APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikalisis manusia. Diasumsikan bahwa serum pasien APS tersebut mempunyai salah satu aPL, yaitu antibodi antikardiolipin/ACA yang berhubungan dengan terjadinya aktivasi endotel pada kultur sel endotel vena umbilikalisis manusia. Dari berbagai kepustakaan didapatkan bahwa petanda terjadinya aktivasi endotel yang juga merupakan salah satu petanda awal terjadinya trombosis adalah peningkatan kadar TF, PAI dan molekul-molekul adhesi, termasuk VCAM-1.<sup>4-7</sup> Pada penelitian ini, kami memeriksakan kadar VCAM-1 sebagai salah satu dari molekul-molekul adhesi karena selain keterbatasan dana yang tersedia, VCAM-1 terutama dihasilkan oleh sel endotel, sedangkan PECAM dan ICAM-1 dihasilkan terutama oleh trombosit, megakariosit dan sel hematopoietik lainnya.<sup>7,8</sup>

Gejala klinis APS berhubungan dengan terjadinya trombosis pada arteri dan vena berbagai organ.

Sel endotel merupakan regulator utama hemostasis. Oleh karena itu, salah satu mekanisme patofisiologi pada APS adalah adanya kondisi protrombotik dari sel endotel yang akan merubah keseimbangan hemostasis yang disebabkan oleh adanya aPL. Oleh karena itu pada penelitian ini, kami menggunakan kultur primer sel endotel vena umbilikalisis manusia sebagai model bagi sel endotel pada berbagai organ manusia. Sebenarnya dapat juga digunakan *cell lines* yang lebih mudah pemeliharaannya, terus bertumbuh dan tersedia dalam jumlah sel yang banyak. Namun, dengan pertimbangan karakteristik fungsi sel endotel pada *cell lines* kemungkinan telah mengalami yang degradasi fungsi dibandingkan dengan kultur primer, maka peneliti memilih menggunakan kultur primer yang berasal dari sel endotel vena umbilikalisis manusia yang dari berbagai penelitian mempunyai karakteristik fungsi dan aktivitas yang dapat mewakili fungsi sel endotel pada berbagai organ tubuh manusia.<sup>7,9-11</sup>

Saat ini telah diketahui bahwa terdapat heterogenitas karakteristik fungsional pada sel endotel arteri, vena dan kapiler. Misalnya pada sebuah penelitian kultur terhadap endotel arteri *bovine* menunjukkan ekspresi aktivitas faktor V lebih besar daripada endotel vena. Sedangkan penelitian lainnya menunjukkan bahwa ekspresi aktivitas vWF hanya ditemukan pada sel endotel yang berasal dari vena. Dari berbagai penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas prokoagulan terutama didapatkan pada sel endotel yang berasal dari arteri sedangkan aktivitas antikoagulan terutama pada sel endotel vena dan kapiler. Hal ini sesuai dengan kebutuhan arteri untuk dengan cepat melakukan pembentukan trombin dan fibrin sehingga dapat membentuk klot bila terjadi kerusakan pada sel endotel arteri. Sedangkan mekanisme antikoagulan terutama dibutuhkan oleh vena dan kapiler untuk mencegah terjadinya trombosis.<sup>12</sup>

Dari data hasil penelitian ini, setelah dilakukan uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna kadar VCAM-1 pada serum APS dibandingkan dengan serum non APS. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kaplanski dan kawan-kawan, yang memeriksakan kadar VCAM-1 pada serum pasien APS yang dibandingkan dengan serum non APS. Penelitian itu mendapatkan serum pasien APS, kadar VCAM-1 mencapai  $894 \pm 79$  ng/ml, sedangkan pada serum non APS  $543 \pm 30$  ng/ml.<sup>10</sup> Namun, penelitian tersebut dilakukan dengan membandingkan kadar VCAM-1 serum APS dan non APS secara langsung (*soluble VCAM-1*), sehingga terlalu banyak faktor yang sukar dikontrol. Pada penelitian ini, dilakukan model penelitian

secara in vitro dengan menggunakan kultur endotel, sehingga dapat dihitung peningkatan kadar VCAM-1 yang hanya diproduksi oleh sel endotel saja, bukan yang berasal dari sel-sel hematopoietik, dan lainnya.

Dari hasil penelitian ini, didapatkan produksi VCAM-1 yang hanya dihasilkan oleh sel endotel (per 10.000 sel endotel), ternyata juga berbeda bermakna antara yang kultur endotel yang dipajankan serum non APS dan APS.

Oleh karena itu, hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis awal penelitian yaitu kadar VCAM-1 pada serum pasien APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia lebih tinggi daripada kadar VCAM-1 serum pasien non APS yang juga dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia. Sehingga, penelitian ini membuktikan adanya peran aktivasi endotel sebagai salah satu mekanisme patofisiologi terjadinya trombosis pada APS.

Dari data kadar VCAM-1 yang didapatkan, terdapat 4 sampel pasien non APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia mempunyai kadar VCAM-1 yang tinggi (> 15 ng/ml). Hal ini dapat terjadi karena serum yang dipakai pada penelitian ini tidak dapat menyingkirkan seluruh kemungkinan adanya peningkatan VCAM-1 yang disebabkan oleh berbagai faktor rangsang seperti inflamasi, peningkatan histamin, stres oksidan, sitokin, hipoksia dan *shear stress*.<sup>13</sup> Pada penelitian ini, peneliti mencoba menyingkirkan faktor-faktor tersebut dengan anamnesis, pemeriksaan fisik dan laboratorium standar. Namun, tingginya kadar VCAM-1 pada serum pasien non APS tersebut ternyata tidak diikuti dengan peningkatan kadar VCAM-1nya setelah dipajankan. Hal ini menunjukkan di dalam serum non APS tersebut tidak terdapat faktor yang dapat menyebabkan terjadinya aktivasi endotel lebih lanjut.

Walaupun kadar VCAM pada serum pasien APS lebih tinggi pada non APS menunjukkan adanya proses aktivasi endotel, namun ternyata jumlah hitung sel endotel yang dipajankan pada serum APS dan non APS tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ;  $p = 0,048$ ). Hal ini menunjukkan bahwa sel endotel hanya mengalami aktivasi namun tidak mengalami kerusakan (*injury*).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa aPL tidak dapat terikat secara langsung dengan sel endotel namun membutuhkan suatu protein plasma sebagai target antigen yang terpenting dari aPL, yaitu  $\beta 2$ GPI.<sup>3,14</sup> Meroni dan kawan-kawan, menyatakan bahwa pada medium kultur jaringan yang menggunakan *fetal calf serum* (FCS) yang berasal dari *bo-*

*vine*, sudah terdapat molekul  $\beta 2$ GPI.<sup>15</sup> Pada penelitian ini, peneliti menggunakan FBS yang diasumsikan juga telah mengandung molekul  $\beta 2$ GPI, sehingga aPL dapat terikat pada permukaan sel endotel. Berdasarkan alasan di atas, dan juga keterbatasan dana yang tersedia maka peneliti tidak memeriksakan kadar anti- $\beta 2$ GPI pada serum sampel.

## KESIMPULAN

- Kadar VCAM-1 pada serum pasien APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia lebih tinggi daripada kadar VCAM-1 serum pasien non APS yang dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia.
- Kadar VCAM-1 pada serum pasien APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia juga didapatkan lebih tinggi daripada kadar VCAM-1 serum pasien non APS yang tidak dipajankan pada kultur sel endotel vena umbilikal manusia

## SARAN

- Perlu dilakukan penelitian in vitro lainnya untuk memeriksa parameter-parameter aktivasi endotel lainnya kadar TF, PAI dan molekul-molekul adhesi selain VCAM-1
- Penelitian selanjutnya sebaiknya menggunakan juga sel endotel yang berasal dari pasien APS.

## RUJUKAN

1. Connective tissue disorder. In: Cunningham GF, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, et al eds. Williams Obstetrics 20<sup>th</sup> ed. Appleton and Lange 1997: 1244-6
2. Gharavi AE, Levy RA, Pierangeli SS. Mechanism of pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. Clin Obstet Gynecol 2001; 44: 11-9
3. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. Arthritis Rheum 1996; 39: 1444-54
4. Rand JH. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. Circulation Research 2002; 90: 29-45
5. Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A.  $\beta 2$  glycoprotein 1 mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. Clin Exp Rheumatol 1995; 13: 179-86

6. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96: 2211-9
7. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Gregoire R, Gatel A. Increased soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus related antiphospholipid syndrome. Correlation with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 55-64
8. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J* 1988; 2: 116-23
9. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1200-4
10. Mitchell R, Kumar V. Acute Inflammation. In *Conran: Robbins pathologic basis of Disease*, 6<sup>th</sup> ed. WB Saunders company. 1999: 53-62
11. Frenete PS, Wagner DD. Molecular medicine, adhesion molecules-part I. *New Engl J Med* 1996; 334: 1526-9
12. Frenete PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part II, Blood vessels and blood cells. *New Engl J Med* 1996; 335: 43-5
13. Shireman PK, Pearce WH. Endothelial cell function in: Biologic and physiologic function in health and disease. *AJR* 1996; 166: 7-13
14. Pierangeli SS, Liu X, Anderson GH. Thrombogenic properties of murine anticardiolipin antibodies induced by 2 glycoprotein I and human immunoglobulin G antiphospholipid antibodies. *Circulation* 1996; 94: 1746-51
15. Meroni PL, Raschi E, Testoni C. Antiphospholipid antibodies and the endothelium. *Rheum Dis Clin North Am* 2001: 27