

**EFEK PROTROMBOTIK ANTIBODI ANTI BETA-2
GLIKOPROTEIN-1 PADA SEL ENDOTEL:
KAJIAN *TISSUE FACTOR*, TROMBOMODULIN, DAN
*PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1***

RIKARNI

RINGKASAN

1. PENDAHULUAN

Sindrom antifosfolipid (*antiphospholipid syndrome* = APS) merupakan penyakit autoimun dengan gejala trombosis vena atau arteri, kematian janin berulang, dan peningkatan kadar antibodi antifosfolipid yang persisten.^{1, 2} Trombosis vena yang paling sering ditemukan adalah trombosis vena dalam dan emboli paru. Trombosis arteri sering terjadi pada pembuluh darah otak yang menimbulkan *transient ischaemic attack* dan *stroke*.^{3, 4} Trombosis merupakan salah satu penyebab kematian dan kecacatan. Berdasarkan hasil riset kesehatan dasar, penyebab kematian terbanyak di Indonesia tahun 2007 adalah *stroke* (15,4 %).⁵ Sekitar 80 % penyebab *stroke* adalah iskemia serebral karena trombosis arteri.⁶ Antibodi antifosfolipid merupakan faktor risiko terjadinya *stroke* terutama pada usia muda (< 40 tahun) dan ditemukan sekitar 18 %.⁷

Trombosis dipengaruhi oleh beberapa faktor risiko. Faktor risiko trombosis terdiri dari kelainan bawaan dan didapat. Faktor risiko bawaan berupa defisiensi antitrombin, defisiensi protein C, defisiensi protein S, dan faktor V Leiden. Faktor risiko didapat meliputi APS, keganasan, kerusakan jaringan, dan tirah baring yang lama. Faktor risiko didapat yang paling sering dihubungkan dengan trombosis adalah APS.⁸

Sindrom antifosfolipid terdiri dari APS primer dan APS sekunder. Sindrom antifosfolipid primer merupakan APS yang tidak disertai penyakit autoimun lain, sedangkan APS sekunder ditemukan pada pasien dengan penyakit autoimun terutama lupus eritematosus sistemik.^{3, 9} Berdasarkan konsensus internasional di Sydney tahun 2006 (kriteria Miyakis)¹⁰ untuk membuat diagnosis APS adalah apabila ditemukan paling sedikit satu kriteria klinis dan satu kriteria laboratorium. Kriteria klinis berupa trombosis vaskular atau morbiditas kehamilan. Kriteria laboratorium adalah ditemukannya antikoagulan lupus, peningkatan kadar imunoglobulin (Ig)G dan atau IgM antibodi antikardiolipin (*anticardiolipin antibody* = ACA) dengan titer > 40 *IgG phospholipid unit* (GPL) atau *IgM*

phospholipid unit (MPL) atau > 99 *percentile*, peningkatan kadar IgG dan atau IgM antibodi anti beta-2 glikoprotein-1 (β_2 GP₁) dengan titer > 99 *percentile*, minimal 2 kali pemeriksaan dengan jarak waktu 12 minggu.

Mekanisme patogenesis APS masih belum jelas, tetapi sejumlah hipotesis telah diusulkan untuk menerangkan mekanisme bagaimana antibodi antifosfolipid menimbulkan trombosis. Keadaan yang memudahkan terjadinya trombosis disebut keadaan protrombotik atau disebut juga keadaan hiperkoagulabilitas atau trombofilia. Keadaan hiperkoagulabilitas terjadi karena gangguan keseimbangan dalam sistem hemostasis.^{11, 12} Sel endotel berperan penting dalam hemostasis dan trombosis.¹³

Antibodi antifosfolipid dianggap berperan penting dalam mekanisme trombosis karena peningkatan antibodi antifosfolipid dalam serum berkorelasi dengan trombosis.^{2, 14} Penelitian Arad dkk.¹⁵ dengan memakai mencit yang diinjeksi dengan IgG anti- β_2 GP₁ dari pasien APS memperlihatkan terbentuknya trombus pada pembuluh darah mencit. Danowski dkk.¹⁶ memperlihatkan hubungan IgG anti- β_2 GP₁ dengan trombosis vena dan IgM anti- β_2 GP₁ dengan trombosis arteri.^{15, 16} Penelitian Vega-Ostertag dkk.¹⁷ meneliti efek IgG APS pada sel endotel menyimpulkan antibodi antifosfolipid meningkatkan transkripsi dan fungsi *tissue factor* (TF), meningkatkan interleukin (IL)-6, IL-8 dan melibatkan p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

Antibodi antifosfolipid terutama berikatan secara langsung dengan *phospholipid binding proteins*. Antigen berupa *phospholipid binding protein* yang terutama adalah β_2 GP₁ dan protrombin. *Beta-2glycoprotein-1* merupakan glikoprotein plasma, 50-kDa. Peran fisiologis β_2 GP₁ masih belum jelas, diduga berperan dalam klirens sel apoptosis, berikatan dengan *oxidized low density lipoprotein*, dan berinteraksi dengan F XI.¹⁸

Efek antibodi anti- β_2 GP₁ pada sistem koagulasi, antikoagulan alamiah dan sistem fibrinolisis baru sebagian diketahui. Berdasarkan penelusuran kepustakaan, belum pernah diteliti efek IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS yang telah dipurifikasi pada sel endotel untuk membuktikan peningkatan *messenger ribonucleic acid* (mRNA)

plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) dan penurunan mRNA trombomodulin dan belum pernah diteliti efek IgM anti- β_2 GP₁ yang telah dipurifikasi pada sel endotel untuk membuktikan peningkatan mRNA TF, mRNA PAI-1 dan penurunan mRNA trombomodulin.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas, masalah pada penelitian ini adalah :

1. Apakah efek IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel akan meningkatkan mRNA TF dan mRNA PAI-1 ?
2. Apakah efek IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel akan menurunkan mRNA trombomodulin ?
3. Apakah efek IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel akan meningkatkan mRNA TF dan mRNA PAI-1 ?
4. Apakah efek IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel akan menurunkan mRNA trombomodulin ?

1.3. HIPOTESIS

1. IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS yang dipajankan pada sel endotel akan meningkatkan mRNA TF dan mRNA PAI-1.
2. IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS yang dipajankan pada sel endotel akan menurunkan mRNA trombomodulin.
3. IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS yang dipajankan pada sel endotel akan meningkatkan mRNA TF dan mRNA PAI-1.
4. IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS yang dipajankan pada sel endotel akan menurunkan mRNA trombomodulin.

1.4. TUJUAN PENELITIAN

1.4.1. Tujuan umum

Menganalisis efek protrombotik antibodi anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel

1.4.2. Tujuan khusus

1. Menganalisis efek IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel dengan kajian mRNA TF, mRNA trombomodulin dan mRNA PAI-1.
2. Menganalisis efek IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel dengan kajian mRNA TF, mRNA trombomodulin dan mRNA PAI-1.

1.5. Manfaat penelitian

Penelitian ini memberi manfaat sebagai berikut :

1.5.1. Manfaat dalam bidang akademik/ilmiah

Hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangan pengetahuan dan pemahaman tentang efek protrombotik antibodi anti- β_2 GP₁ pasien APS pada sel endotel.

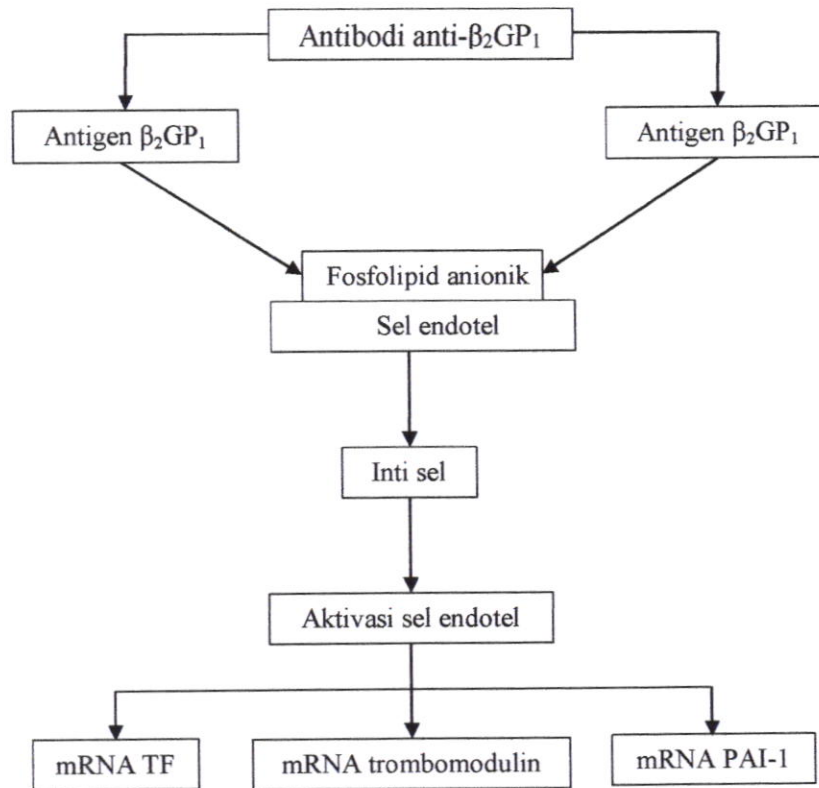
1.5.2. Manfaat dalam pengembangan penelitian

Penelitian ini dapat mendorong pengembangan penelitian eksperimental tentang mekanisme trombosis pada APS.

1.5.3. Manfaat klinis

Hasil penelitian ini dapat mendorong atau pengembangan obat yang dapat menghambat efek protrombotik antibodi anti- β_2 GP₁.

2. KERANGKA KONSEP



3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah studi eksperimental yang dilakukan di Departemen Patologi Klinik, Departemen Mikrobiologi dan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/Rumah Sakit Ciptomangunkusumo pada bulan Mei 2012 – Juni 2013. Sampel adalah IgG anti- β 2GP1 dan IgM anti- β 2GP1 dipurifikasi dari dari serum pasien APS yang memenuhi kriteria Miyakis 2006. Jumlah sampel IgG anti β 2GP1 sejumlah 6 dan IgM anti β 2GP1 sejumlah 6. Kontrol adalah IgG dan IgM yang dipurifikasi dari orang sehat. Masing-masing subjek menandatangani *informed consent*. Pemeriksaan IgG anti- β 2GP1 dan IgM anti- β 2GP1 serum dilakukan secara kuantitatif dengan metode ELISA.

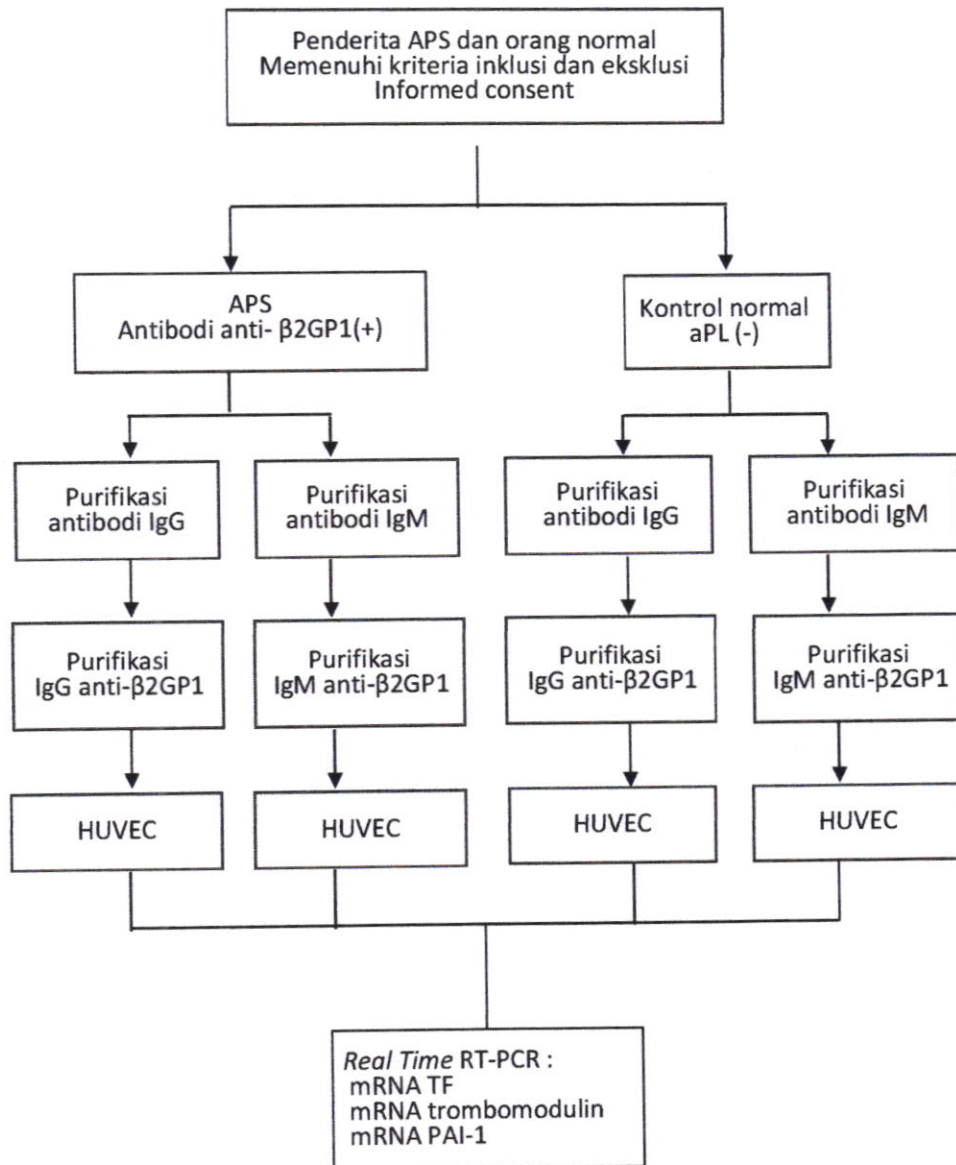
Purifikasi IgG dengan metode kromatografi afinitas memakai MAb Trap Kit. Prinsip kerja purifikasi IgG adalah memisahkan IgG dari komponen lain yang ada di dalam serum, dengan metode kromatografi afinitas menggunakan kolom berisi protein G *sepharose* yang dilekatkan dengan *agarose bead*. Alat dan reagen yang digunakan adalah MAb Trap Kit (GE Healthcare, GEE 17112801).¹⁹

Purifikasi IgM metode kromatografi afinitas memakai *HiTrap IgM Purification*. Prinsip kerja purifikasi IgM adalah memisahkan IgM dari komponen lain yang ada dalam serum, dengan metode kromatografi afinitas menggunakan kolom berisi protein M *sepharose* yang dilekatkan dengan *agarose bead*. Alat dan reagen adalah *HiTrap IgM Purification* (GE Healthcare, HP GEE-17511001).²⁰

Purifikasi IgG anti β 2GP1 dan IgM anti β 2GP1 dengan *HiTrap NHS-activated HP column*. Prinsip kerja purifikasi IgG anti β 2GP1 dan IgM anti β 2GP1 adalah kromatografi afinitas. Protein β 2GP1 *purified* (SCIPAC P195-5) dimasukkan ke kolom *HiTrap NHS-activated HP* dan larutan bufer. Biomolekul yang terhenti pada kolom akan dipakai untuk menangkap protein target yang berinteraksi. Kemudian dilakukan pencucian untuk membuang protein yang tidak ditangkap dan selanjutnya protein target dielusi. Alat dan reagen adalah kolom *HiTrap NHS-activated HP* (GE Healthcare, GEE17071601).²¹

penelitian bebas untuk menyetujui atau menolak berpartisipasi dalam penelitian setelah mendapat penjelasan.

ALUR PENELITIAN



Keterangan gambar : APS = *antiphospholipid syndrome*, aPL = *antiphospholipid antibody*, anti-β₂GP₁ = *anti beta 2 glycoprotein 1*, HUVEC = *human umbilical vein endothelial cell*, TF = *tissue factor*, PAI-1 = *plasminogen activator inhibitor-1*.

4. HASIL

Sampel penelitian berasal dari serum pasien APS dan orang sehat. Jumlah pasien APS 10 terdiri 8 pasien APS primer dan 2 pasien APS sekunder. Antibodi anti- β 2GP1 baik IgG maupun IgM berasal dari serum pasien APS yang memenuhi kriteria Miyakis tahun 2006 masing-masing berjumlah 6 sampel. Sebagai kontrol dipakai IgG dan IgM dari serum orang sehat. Kadar IgG anti- β 2GP1 pasien APS berkisar paling tinggi 165,20 SGU/mL dan paling rendah 49,70 SGU/mL, kadar IgM anti- β 2GP1 paling tinggi 229,9 SMU/mL dan paling rendah 47,10 SMU/mL.

4.1. Hasil pemeriksaan mRNA *tissue factor* pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β 2GP1 dan IgM anti- β 2GP1

Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC yang dipajan dengan IgG anti- β 2GP1 pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (3,03), (3,83), (4,19), (3,72), (2,01), (2,08) kali dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan IgG kontrol sehat. Pada HUVEC tanpa pemajanan didapatkan ekspresi relatif mRNA TF ($1,09 \pm 0,76$) kali dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan IgG kontrol sehat (gambar 4.1).

Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC yang dipajankan dengan antibodi IgM anti- β 2GP1 pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (2,22), (2,50), (4,35), (7,67), (4,11), (5,13) kali dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat. Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC tanpa pemajanan ($0,91 \pm 0,10$) kali dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat (gambar 4.2).

Rerata ekspresi relatif mRNA TF dengan medium (sebelum dipajan) adalah ($1,09 \pm 0,76$), setelah dipajan dengan IgG anti- β 2GP1 adalah ($3,14 \pm 0,93$), dengan nilai $p = 0,003$ (tabel 4.1). Rerata ekspresi relatif mRNA TF dengan medium (sebelum dipajan) adalah ($1,03 \pm 0,11$), setelah dipajan dengan IgM anti- β 2GP1 adalah ($4,33 \pm 1,98$), dengan nilai $p = 0,008$ (tabel 4.2).

4.2. Hasil pemeriksaan mRNA trombomodulin pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β_2 GP1 dan IgM anti- β_2 GP1

Ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan dengan IgG anti- β_2 GP1 pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (0,41), (0,18), (0,41), (0,45), (0,24), (0,14) kali dibandingkan mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan IgG orang sehat. Pada HUVEC tanpa pemajanan didapatkan ekspresi relatif mRNA trombomodulin ($0,91 \pm 0,10$) kali dibandingkan mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan IgG orang sehat seperti diperlihatkan pada gambar 4.3.

Ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan dengan IgM anti- β_2 GP1 pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (0,33), (0,51), (0,10), (0,17), (0,67), (0,18) kali dibanding mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat. Pada HUVEC tanpa pemajanan didapatkan ekspresi relatif mRNA trombomodulin ($0,93 \pm 0,3$) kali dibandingkan mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat seperti diperlihatkan pada gambar 4.4.

Rerata ekspresi relatif mRNA trombomodulin dengan medium (sebelum dipajan) adalah ($0,91 \pm 0,11$), setelah dipajan dengan IgG anti- β_2 GP1 adalah ($0,31 \pm 0,13$), dengan nilai $p = 0,001$ (tabel 4.1). Rerata ekspresi relatif mRNA trombomodulin dengan medium (sebelum dipajan) adalah ($0,93 \pm 0,08$) dan setelah dipajan dengan IgM anti- β_2 GP1 adalah ($0,33 \pm 0,22$), dengan $p = 0,003$ (tabel 4.2).

4.3. Hasil pemeriksaan mRNA *plasminogen activator inhibitor-1* pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β_2 GP1 dan IgM anti- β_2 GP1

Ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgG anti- β_2 GP1 pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (8,2), (8,9), (3,55), (2,75), (5,82), (2,75) kali dibandingkan mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgG orang sehat. Pada HUVEC tanpa pemajanan didapatkan ekspresi relatif mRNA PAI-1 ($0,93 \pm 0,3$) kali dibanding mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgG orang sehat (gambar 4.5).

Ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajankan dengan IgM anti- β_2 GP pasien APS (n=6) berturut-turut adalah (7,62), (3,53), (4,63), (9,51), (2,41), (5,17) kali dibandingkan mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat. Pada media tanpa pemajanan didapatkan ekspresi relatif mRNA PAI-1 (1,02 \pm 0,10) kali dibandingkan mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgM orang sehat (gambar 4.6).

Rerata ekspresi relatif mRNA PAI-1 dengan medium (sebelum dipajan) adalah (0,93 \pm 0,13), setelah dipajan dengan IgG anti- β_2 GP₁ adalah (5,33 \pm 2,75), dengan nilai p = 0,013 (tabel 4.1). Rerata ekspresi relatif mRNA PAI-1 dengan medium (sebelum dipajan) adalah (1,02 \pm 0,10) dan setelah dipajan dengan IgM anti- β_2 GP₁ adalah (5,47 \pm 2,64), dengan p = 0,001 (tabel 4.2).

5. PEMBAHASAN

5.1. Hasil pemeriksaan mRNA *tissue factor* pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁

Penelitian ini memperlihatkan bahwa ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC yang dipajankan dengan IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS lebih tinggi dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan dengan IgG kontrol sehat (gambar 4.1). Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC yang dipajankan dengan IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS lebih tinggi dibandingkan mRNA TF pada HUVEC yang dipajan dengan IgM kontrol sehat.(gambar 4.2).

Penelitian ini melaporkan terdapat perbedaan bermakna rerata ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan dengan IgG anti- β_2 GP₁ (1,09 \pm 0,76 berbanding 3,14 \pm 0,93, p = 0,003) (tabel 4.1). Terdapat perbedaan bermakna rerata ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan dengan IgM anti- β_2 GP₁ (1,03 \pm 0,11 berbanding 4,33 \pm 1,98, p = 0,008) (tabel 4.2).

Penelitian Vega-Ostertag dkk.²⁷ memperlihatkan pada tikus yang diinjeksi IgG APS terjadi aktivasi sel endotel, meningkatnya aktivitas TF dan menginduksi trombosis *in vivo*. Secara *in vitro*, Vega-Ostergad dkk.¹⁷ meneliti efek IgG APS pada sel endotel menyimpulkan antibodi antifosfolipid akan meningkatkan

transkripsi dan fungsi TF, meningkatkan interleukin (IL)-6, IL-8, pada sel endotel dan melibatkan p38 *mitogen- activated protein kinase* (MAPK). Pada penelitian ini didapatkan hasil yang sama dengan Vega yaitu peningkatan TF. Penelitian Vega-Ostergad meneliti aktivitas koagulasi, sedangkan penelitian ini di samping meneliti aktivitas koagulasi dengan pemeriksaan TF juga meneliti jalur protein C, antikoagulan dengan pemeriksaan trombomodulin dan aktivitas fibrinolisis dengan pemeriksaan PAI-1. Penelitian Vega-Ostergad dkk. meneliti IgG pasien APS yang dipurifikasi dan tidak melakukan purifikasi IgG anti- β_2 GP₁, sedangkan pada penelitian ini dilakukan purifikasi IgG dan purifikasi IgM dilanjutkan dengan purifikasi IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM-anti β_2 GP₁ untuk mendapatkan IgG anti- β_2 GP₁ yang murni dan IgM anti- β_2 GP₁ yang murni, sehingga efek yang timbul disebabkan oleh IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁ tanpa dipengaruhi oleh imunoglobulin lain.

Penelitian sebelumnya oleh Hamid dkk.²⁸ meneliti ekspresi gen yang diinduksi IgG anti- β_2 GP₁ dari 5 pasien APS primer memperlihatkan bahwa IgG anti- β_2 GP₁ dapat menginduksi ekspresi gen pada sel endotel meliputi gen apoptosis/antiapoptosis, gen molekul adhesi, sitokin, kemokin, faktor transkripsi, dan gen *tissue factor*. Penelitian tersebut mendapatkan hasil peningkatan ekspresi gen TF 3,3 kali. Penelitian ini meneliti 8 pasien APS primer dan 2 pasien APS sekunder dan mendapatkan hasil peningkatan mRNA TF yang hampir sama dengan penelitian Hamid dkk. Berbeda dengan penelitian Hamid yang tidak meneliti Ig M anti- β_2 GP₁, penelitian ini memperlihatkan bahwa IgM anti- β_2 GP₁ sama seperti IgG anti- β_2 GP₁ meningkatkan mRNA TF pada endotel.

Tissue factor tidak diekspresikan oleh sel endotel pada keadaan normal tetapi berada di tunika adventitia.^{29, 30} Bila endotelium diinduksi oleh stimulasi beberapa agen seperti lipopolisakarida, endotoksin, IL-1, *tumor necrosis factor* (TNF)- α dan trombin maka endotelium vaskular dapat mengekspresikan TF.³¹ Di samping berperan dalam kaskade koagulasi, kompleks TF-FVIIa juga mengaktifkan *Protease-Activated receptor 2* (PAR2) yang menimbulkan inflamasi, meningkatnya sitokin proinflamasi, meningkatnya molekul adhesi dan aktivasi faktor transkripsi.³² *Protease-Activated receptor 2* akan memulai sinyal memicu

respons seperti masuknya kalsium ke dalam sel, ekspresi molekul adhesi untuk leukosit dan melepaskan *growth factor* serta meningkatkan ekspresi TF.³³

Pada penelitian ini terbukti bahwa IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁ dari pasien APS dapat meningkatkan ekspresi relatif mRNA TF pada endotel. *Tissue Factor* yang meningkat akan memicu proses koagulasi sehingga menimbulkan keadaan protrombotik yang memudahkan terjadinya trombosis. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa mekanisme trombosis pada APS dapat terjadi melalui jalur aktivasi koagulasi.

5.2. Hasil pemeriksaan mRNA trombomodulin pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁

Penelitian ini memperlihatkan ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajankan dengan IgG anti- β_2 GP₁ pasien APS lebih rendah dibandingkan mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajankan dengan IgG kontrol sehat (gambar 4.3). Ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan dengan IgM anti- β_2 GP₁ pasien APS lebih rendah dibandingkan mRNA trombomodulin pada HUVEC yang dipajan dengan IgM kontrol sehat (gambar 4.4).

Penelitian ini melaporkan terdapat perbedaan bermakna ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan dengan IgG anti- β_2 GP₁ ($0,91 \pm 0,11$ berbanding $0,31 \pm 0,13$, $p = 0,001$). Terdapat perbedaan bermakna ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan dengan IgM anti- β_2 GP₁ ($0,93 \pm 0,08$ versus $0,33 \pm 0,22$, $p = 0,003$) seperti diperlihatkan pada tabel 4.1.

Penelitian Liestol dkk.³⁴ memperlihatkan hubungan meningkatnya activated protein C (APC) resisten pada APS yang berhubungan dengan trombosis. Antibodi antifosfolipid dapat menginduksi APC resisten, mengganggu jalur protein C. Penelitian Simoncini dkk.³⁵ memperlihatkan IgG APS menginduksi *oxidative stress*, meningkatkan produksi ROS, dan meningkatkan ekspresi VCAM.

Pengaruh antibodi antifosfolipid terhadap jalur protein C masih belum jelas sampai saat ini.³⁶ Jalur protein C merupakan salah satu sistem yang berperan dalam menghambat koagulasi.³⁷ Komponen esensial jalur protein C adalah trombin, trombomodulin, *endothelial protein C receptor* (EPCR), protein C dan protein S.³⁸ Trombomodulin merupakan protein transmembran yang diekspresikan pada permukaan sel endotel. Trombomodulin berikatan dengan afinitas tinggi dengan trombin dan menghambat aktivitas protrombotik trombin.³⁹ Trombomodulin mencegah trombin mengubah fibrinogen menjadi fibrin karena tempat ikatan trombomodulin dan fibrinogen pada trombin yang berkompentisi.^{33,40} Trombomodulin membentuk kompleks trombomodulin-trombin yang mengaktifkan protein C menjadi protein C aktif.²⁹ Protein C aktif dengan bantuan protein S akan menginaktivasi faktor Va dan VIIIa sehingga mencegah pembentukan trombin selanjutnya. Protein C aktif juga mempunyai aktivitas profibrinolitik dengan kemampuan menetralkan aktivitas PAI-1.^{33, 40}

Pada penelitian ini terbukti bahwa IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁ dari pasien APS dapat menurunkan ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada endotel. Trombomodulin yang rendah mengakibatkan aktivasi protein C terhambat sehingga F Va dan F VIIIa tidak dapat diinaktivasi dan hal itu menimbulkan keadaan hiperkoagulabilitas yang memudahkan terjadinya trombosis. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa mekanisme trombosis pada APS dapat terjadi melalui hambatan jalur protein C yang merupakan antikoagulan

5.3. Hasil pemeriksaan mRNA *plasminogen activator inhibitor-1* pada HUVEC setelah dipajan IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁

Penelitian ini memperlihatkan ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajankan dengan IgG anti- β_2 GP₁ dari pasien APS lebih tinggi dibandingkan mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajankan dengan IgG kontrol sehat (gambar 4.5). Ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajankan dengan IgM anti- β_2 GP₁ dari pasien APS lebih tinggi dibandingkan mRNA PAI-1 pada HUVEC yang dipajan IgG kontrol sehat (gambar 4.6).

Penelitian ini melaporkan terdapat perbedaan bermakna rerata ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan IgG anti- β_2 GP₁ ($0,93 \pm$

0,13 berbanding $5,33 \pm 2,75$, $p = 0,013$). Terdapat perbedaan bermakna ekspresi relatif mRNA PAI pada HUVEC sebelum dan sesudah dipajan IgM anti- β_2 GP₁ ($1,02 \pm 0,10$ berbanding $5,47 \pm 2,64$, $p = 0,01$) seperti diperlihatkan pada tabel 4.1.

Protein yang berperan dalam fibrinolisis adalah plasminogen, tPA, PAI-1 dan α_2 antiplasmin. Plasminogen activator inhibitor-1 merupakan inhibitor utama t-PA. Proses fibrinolisis dimulai dengan dilepaskannya t-PA dari sel endotel, selanjutnya t-PA akan mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin akan memecah deposit fibrin menjadi *fibrin degradation product (FDP)*. Di sirkulasi PAI-1 akan berikatan dengan tPA membentuk kompleks sehingga t-PA tidak dapat mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin sehingga fibrinolisis terhambat.²⁹ Hambatan berlebihan dari fibrinolisis dapat mengganggu keseimbangan hemostasis dan berperan untuk terjadi trombosis.⁴¹

Pada penelitian ini terbukti bahwa IgG anti- β_2 GP₁ dan IgM anti- β_2 GP₁ dari pasien APS dapat meningkatkan mRNA PAI-1 pada endotel. Kadar PAI-1 yang tinggi akan menyebabkan aktivitas fibrinolisis menurun karena PAI-1 menghambat t-PA sehingga plasminogen tidak dapat diubah menjadi plasmin. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa salah satu mekanisme trombosis pada APS dapat melalui penghambatan fibrinolisis.

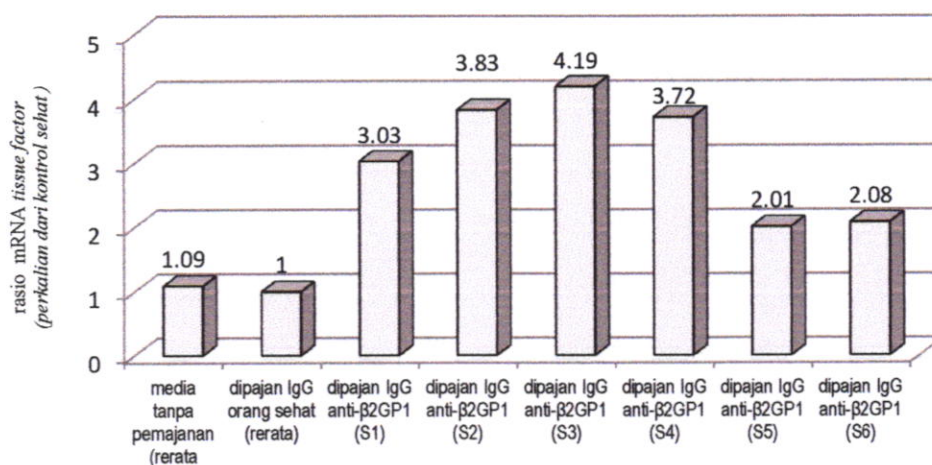
6. SIMPULAN

Pada penelitian ini terbukti bahwa IgG anti β_2 GP₁ dan IgM anti β_2 GP₁ dari pasien APS mempunyai efek protrombotik pada sel endotel dengan meningkatkan mRNA TF dan mRNA PAI-1, serta menurunkan mRNA trombomodulin. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa mekanisme trombosis pada APS dapat terjadi melalui peningkatan aktivasi koagulasi, penurunan aktivitas fibrinolisis dan penurunan aktivitas antikoagulan.

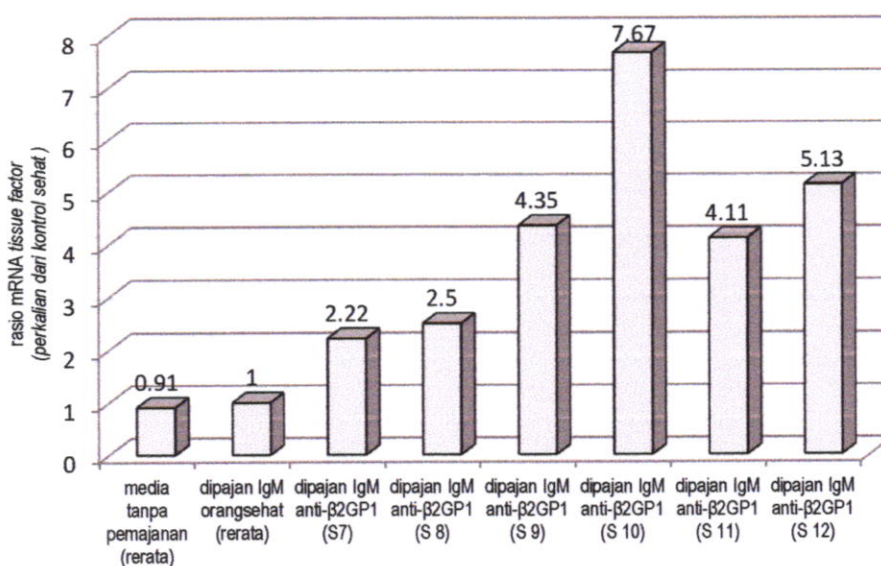
7. SARAN

Melakukan penelitian eksperimental dengan memajankan HUVEC dengan antibodi antifosfolipid selain anti β_2 GP₁ dan pengembangan penelitian obat yang dapat menghambat efek protrombotik antibodi anti β_2 GP₁ pada endotel.'

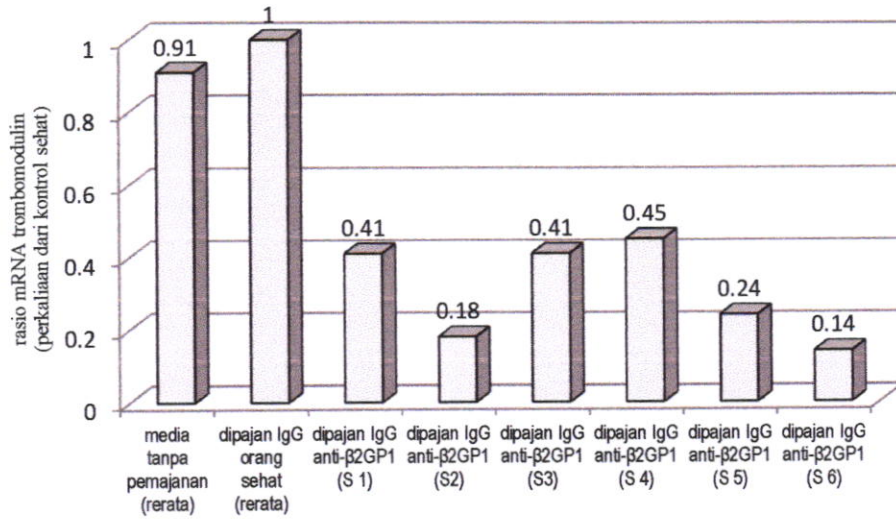
DAFTAR GAMBAR



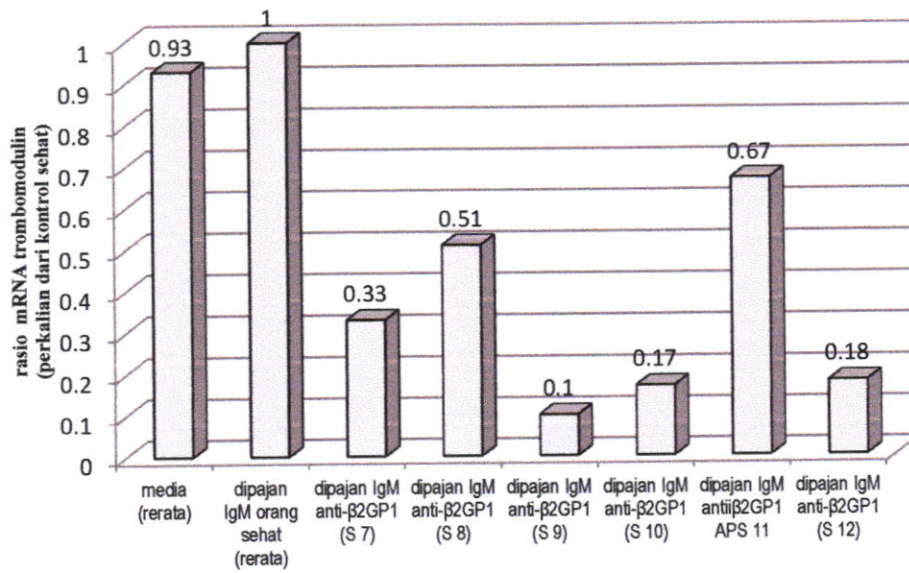
Gambar 4.1. Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC tanpa pemajanan, dipajan IgG kontrol sehat, dipajan IgG anti-β₂GP₁ pasien APS.



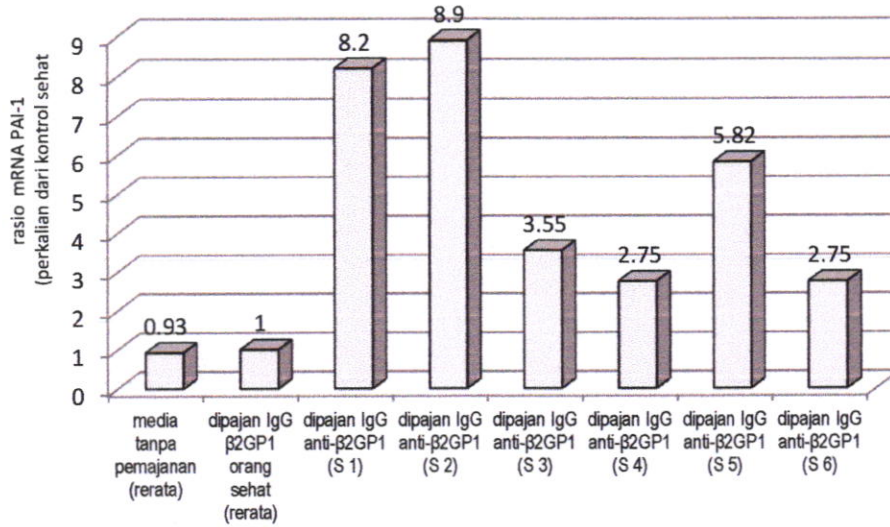
Gambar 4.2. Ekspresi relatif mRNA TF pada HUVEC (tanpa pemajanan, dipajan IgM orang sehat, dipajan IgM anti-β₂GP₁ pasien APS).



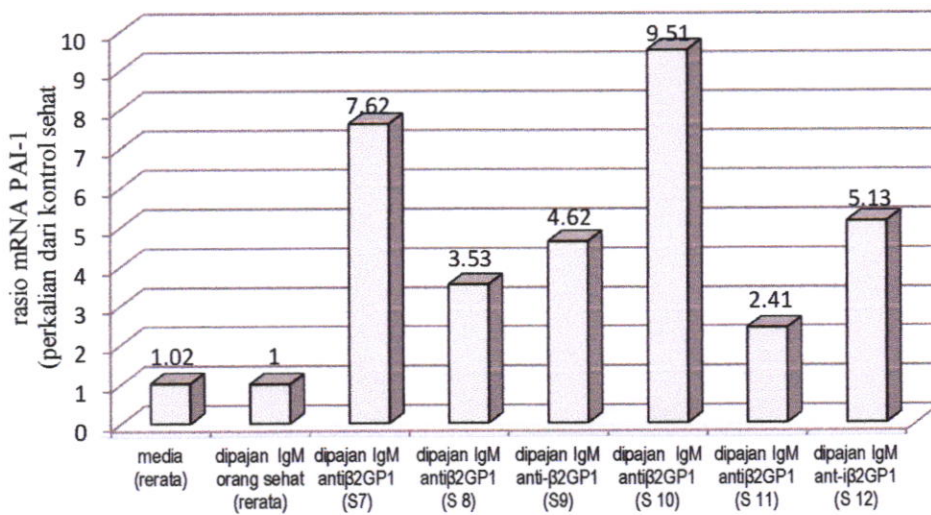
Gambar 4.3. Ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC (tanpa pemajanan, dipajan IgG orang sehat, dipajan IgG anti-β₂GP₁ pasien APS).



Gambar 4.4. Ekspresi relatif mRNA trombomodulin pada HUVEC (tanpa pemajanan, dipajan IgM orang sehat, dipajan IgM anti-β₂GP₁ pasien APS)



Gambar 4.5. Ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC (tanpa pemajanan, dipajan IgG orang sehat, dipajan IgG anti- β 2GP1 pasien APS).



Gambar 4.6. Ekspresi relatif mRNA PAI-1 pada HUVEC (tanpa pemajanan, dipajan IgM orang sehat, dipajan IgM anti- β 2GP1 pasien APS).

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Rerata ekspresi relatif mRNA TF, mRNA trombomodulin, mRNA PAI-1 dengan medium (sebelum dipajan), setelah dipajan dengan IgG Anti- β_2 GP₁

parameter	HUVEC dengan medium	HUVEC setelah dipajan	P
	sebelum pemajanan, n = 6) rerata \pm SB	IgG anti- β_2 GP ₁ , n = 6) rerata \pm SB	
mRNA TF	1,09 \pm 0,76	3,14 \pm 0,93	0,003
mRNA TM	0,91 \pm 0,11	0,31 \pm 0,13	0,001
mRNA PAI-1	0,93 \pm 0,13	5,33 \pm 2,75	0,013

Tabel 4.2. Rerata ekspresi relatif mRNA TF, mRNA trombomodulin, mRNA PAI-1 dengan medium (sebelum dipajan), setelah dipajan dengan IgM anti- β_2 GP₁

parameter	HUVEC dengan medium	HUVEC setelah dipajan	P
	(sebelum pemajanan, n = 6) rerata \pm SB	IgM anti- β_2 GP ₁ (n = 6) Rerata \pm SB	
mRNA TF	1,03 \pm 0,11	4,33 \pm 1,98	0,008
mRNA TM	0,93 \pm 0,08	0,33 \pm 0,22	0,003
mRNA PAI-1	1,02 \pm 0,10	5,47 \pm 2,64	0,010

DAFTAR PUSTAKA

1. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2007;109:422-30.
2. Hanly JG. Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ*. 2003;168(13):1675-82.
3. Asherson RA, Bucciarelli S, Puerta JAG, Cervera R. History Classification and subset of antiphospholipid syndrome. In: Cervera R, Reverter JC, Kamashta M, editors. *Antiphospholipid Syndrome in Systemic Autoimmune Disease*. Amsterdam-Tokyo: Elsevier; 2009. p. 1-9.
4. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br.J.Haematol*. 2012;157:47-58.
5. Riset Kesehatan Dasar. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan, Republik Indonesia. 2008:275-85.
6. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood*. 2008;112:3555-62.
7. Bertolacinni MR, Barrutia OA, Kamashta MA. *Antiphospholipid Syndrome Handbook*. London: Springer-Verlag; 2010. p. 5-13.
8. Previtali E, Bucciarelli P, M S, Passamonti IM. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus*. 2011;9:120-38.
9. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. In: Yehuda Shoenfeld, Cervera R, editors. *Diagnostic Criteria in autoimmune disease*. Totowa: Humana Press; 2008. p. 9-14.
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4:295-306.
11. Morrissey JH, Mutch NJ. Tissue Factor Structure and Function. In: Colman RW, Cloves AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ, Ames NG, editors. *Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006 p. 92-107.

12. Deitcher SR, Rodgers GM. Thrombosis and Antithrombotic Therapy. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology* 12th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2009. p. 1465-508.
13. Kemball CG TE, Mc Vey JH. Normal haemostasis. In: Hoffbrand AV CD, Tuddenham EGD, editor. *Postgraduate haematology*. 5 ed. Malden Massachusetts: Blackwell publishing 2005. p. 783-807.
14. Levine JS, Branch W, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346(10):752-63.
15. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. Beta 2-glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood*. 2011;117:3453-9.
16. Danowski A, Kickler T, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein 1 : prevalence, clinical correlation, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2006;33(9):1775-9.
17. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the Up-Regulation of Tissue Factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis & rheumatism*. 2007;52:1545-54.
18. Farmer-Boatwright MK, Roubey RAS. Venous Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:321-5.
19. HealthCare G. MAb TrapKit. Instructions 71-5003-43 AI. Purification of antibodies. Freiburg, Germany: GE Healthcare. 2009.
20. Heathcare G. HiTrap IgM Purification HP. Instructions 71-5004-37 AL. HiTrap affinity columns. Freiburg, Germany: GE Healthcare. 2010.
21. Healthcare G. HiTrap NHS-activated HP. Instructions 71-7006-00 AW. HiTrap affinity columns Freiburg, Germany: GE Healthcare. 2011.
22. Lonza. Clonetic Endothelial Cell Systems. Instructions for use. Walkersville, USA: Lonza Walkersville, Inc; 2012.

23. Lonza. Reagent Pack. Subculture reagents. Walkersville USA: Lonza Walkersville, Inc; 2010.
24. Ambion. Trizol Reagent by life technologies. 2010:1-4.
25. Invitrogen. Superscript III Platinum One Step Quantitative RT-PCR systems. 2010:1-4.
26. lifetechnologies. Real-Time PCR handbook. http://findlifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLRpdf.
27. Vega-Ostertag M, Ferrara M, Romay-Penabad Z. Role of p38 mutagen-activated protein kinas in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. . *J Thromb Haemost*. 2007;5:1828-34.
28. Hamid C, Norgate K, Cruz D, Kashamanta M, Arno M, Pearson J, et al. Anti B2GP1 antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals inductions of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1000-7.
29. Ziedins KB, Orfeo T, Jenny NS, Everse SJ, Mann KG. Blood Coagulation and Fibrinolysis. . In: Greer JP, Foester J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12 ed. Philadelphia.: Lippincot Williams & Wilkins; 2009. p. 529-617.
30. Kinev A, Roubey R. Tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008;17:952-8.
31. Greenberg DL, Davie EW. The Blood Coagulation Factors: their Complementary Dnas, Genes, and Expression. In: Colman RW CA, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ, Ames NG, editor. *Basic Principles and Clinical Practice 5th Edition* ed ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 22-58.
32. Chu AJ. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. *Int J of Inflam*. 2011; 2011.
33. Shami PJ, Rodges GM. Endothelium, angiogenesis and the regulation of hemostasis. In: Greer JP, Foester J, Rodgers GM, Parakevas F, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 620-30.

34. Liestol S, Sandset P, Mowinckel M, Wisloff F. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 2204–2210. 2007;5:2204-10.
35. Simoncini S, Sapet1 Cd, Camoin-Jau1 L, Bardin N, Harle J-R, Sampol J, et al. Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immun.* 2005;4:489-500.
36. Urbanus R, Laat Bd. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *Lupus.* 2010;19:394-9.
37. Kojima T, Saito H. Hypercoagulable States. In: Tanaka K, Davie E, editors. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.* 1 ed. Tokyo: Springer; 2008. p. 507-20.
38. Esmon CT. The Protein C pathway. *Chest J.* 2003;124:S 26-32.
39. Huntington JA. Structural Insights into the Life History of Thrombin. In: Tanaka K, Davie E, editors. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.* 1 ed. Tokyo: Springer; 2008. p. 80-106.
40. Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:393-401.
40. Fukudume K. Structure and Function of the Endothelial Protein C Receptor In: Tanaka K, Davie E, editors. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.* Tokyo Spinger 2008. p. 211-17.
41. Yepes M, Loskutoff DJ, Lawrence DA. Plasminogen Activator Inhibitor-1. In: Colman, W R, Clowes, W A, Goldhaber, Z S, et al., editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 5 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 366-81.