

Analisis Kadar Biomarker Urine *Monocyte Chemoattractant Protein-1* Terhadap Klasifikasi Histopatologi Nefritis Lupus

Analysis Biomarker Levels of Urine MCP-1 Against Lupus Nephritis Classification Histopathology Lupus Nephritis

Yuliana Salman*

STIKES Husada Borneo Banjarbaru, Jl. A. Yani Km 30,5 No.4 Banjarbaru

*korespondensi : ulee_s1@yahoo.com

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by chronic and acute inflammation. The common of serious complications in SLE is lupus nephritis.. Biomarker that showed high specificity for SLE especially in lupus nephritis is Monocyte Chemoattractant Protein urine-1 (uMCP-1). In Indonesia, correlation between uMCP-1 with lupus nephritis still unknown. This approach is expected to replace renal biopsy in histopathological classification of lupus nephritis. This study is an observational that was conducted in cross-sectional study. The research will be conducted over a 11-month with urine sampling to determine levels of MCP-1 in patients with SLE, and renal biopsy was performed to determine the class of lupus nephritis according to WHO (1982) classification. The results showed no significant difference ($p = 0,247 > \alpha$) between mean rank levels of urinary uMCP-1 of control and cases group. In the Kruskal-Wallis test demonstrated the comparison of mean rank urine MCP-1 levels among 3 groups are no significant difference ($p = 0,197 > \alpha$). It can be concluded that the levels of urinary MCP1 was not associated with incidence and histopathological classification of lupus nephritis.

Keyword: *Lupus nephritis, uMCP-1, Histopathology class*

Pendahuluan

Lupus eritematosus sistemik (LES) adalah penyakit autoimun yang ditandai oleh peradangan kronis dan akut pada berbagai jaringan tubuh seperti ginjal, hati, sendi, sel darah merah, leukosit dan trombosit. Berdasarkan Sudoyo (1), data dari Yayasan Lupus Indonesia, penderita LES diperkirakan mencapai 5 juta orang di seluruh dunia. Komplikasi yang sering terjadi pada LES dan sering menimbulkan akibat yang serius adalah nefritis lupus. Perkiraan prevalensi keterlibatan ginjal secara klinis pada pasien LES berkisar antara 30-90%. Nefritis lupus lebih sering dijumpai pada wanita, (rasio prevalensi LES wanita:pria=9:1) (2,3). Adanya pembentukan imun kompleks antara autoantibodi dan target antigen (*self-antigen*) pada LES akan memicu pelepasan mediator proinflamasi seperti MCP-1 akan merekrut monosit atau makrofag dan sel efektor imun lainnya yang akan menyebabkan kerusakan jaringan (4,5).

Kemampuan untuk mengetahui komplikasi nefritis lupus pada pasien LES sebelum nampak adanya gangguan organ sangat diperlukan. Oleh karena itu diperlukan suatu biomarker yang dapat menggambarkan aktivitas penyakit.

Salah satu biomarker yang dapat menggambarkan aktivitas penyakit LES

khususnya nefritis lupus adalah *urine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (uMCP-1)*. *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)* adalah polipeptida monomerik yang memegang peranan penting dalam infiltrasi leukosit ke dalam ginjal meningkatkan perlekatan leukosit ke endotel serta meningkatkan permeabilitas endotel. MCP-1 juga dapat memediasi respon fibrogenik dan peningkatan kadarnya berhubungan dengan temuan histologis berupa jaringan parut pada biopsi ginjal (6,7,8,9). Peningkatan uMCP-1 berperan dalam terjadinya hiperseluler pada endokapiler glomerulus yang disebabkan karena infiltrasi leukosit, termasuk neutrofil, monosit dan limfosit serta adanya proliferasi endotelial glomerulus dan sel mesangial (10, 11).

Meskipun beberapa penelitian menunjukkan bahwa uMCP-1 sebagai biomarker yang menjanjikan pada nefritis lupus, namun masih terdapat kontroversi dengan penelitian yang lain. Di Indonesia belum ada penelitian yang dilakukan untuk melihat perbedaan kadar biomarker tersebut yang dihubungkan dengan klasifikasi histopatologis nefritis lupus.

Pendekatan ini diharapkan dapat mengganti biopsi ginjal dalam penentuan kelas histopatologi nefritis lupus karena hal tersebut sangat diperlukan dalam

penanganan yang tepat dari pasien nefritis lupus, meningkatkan efisiensi terapi sehingga mengurangi efek toksisitas terapi.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan studi observasional yang dilakukan secara *cross-sectional study*. Penelitian ini akan dilakukan selama 11 bulan berupa studi observasional dengan pengambilan sampel urin pada 31 responden untuk mengetahui kadar uMCP-1 pada pasien lupus, serta dilakukan biopsi ginjal untuk menentukan kelas nefritis lupus berdasarkan klasifikasi WHO. Variabel bebas penelitian ini yaitu kadar uMCP-1, sedangkan variabel terikat yaitu gambaran klasifikasi histopatologis nefritis lupus.

Prosedur Kerja

Pemeriksaan kemokin urine MCP-1

Pemeriksaan urine MCP-1 dilakukan dengan metode ELISA menggunakan RayBio ELISA Kit. Sampel urin yang diperoleh, disimpan dalam -80°C sampai cukup jumlahnya untuk diperiksa. Pada sumur mikrotiter yang telah dilapisi antibodi *anti-human* MCP-1 ditambahkan sampel urin 100 μl . Inkubasi selama 3 jam pada suhu ruang, tambahkan antibodi biotin dan inkubasi kembali selama 1 jam. Tambahkan *Streptavidin solution* (inkubasi selama 45 menit). Tambahkan *Tetramethyl benzidine (TMB) solution* dan inkubasi selama 1 jam, Reaksi dihentikan dengan penambahan *stop solution*, kemudian dibaca dengan spektrofotometer pada 450 nm.

Biopsi ginjal

Biopsi ginjal dilakukan oleh dokter Ahli Penyakit Dalam konsultan Ginjal Hipertensi di seksi Ginjal-Hipertensi Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam RSSA dengan tuntunan Ultrasonografi (*USG-Guided*). Pengambilan jaringan dilakukan sebanyak 2 kali. Jaringan pertama diawetkan dalam formalin 10%, sedangkan yang kedua dengan *OCT compound*. Jaringan ginjal yang diperoleh segera dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Analisis data kuantitatif berupa kadar antibodi anti-dsDNA dan urine MCP-1 akan di analisa

dengan bantuan program SPSS versi 19. Uji statistik yang digunakan adalah statistik non parametrik, yaitu uji Mann-Whitney, uji Kruskal-Wallis dan uji korelasi *Spearman rho* dengan taraf signifikansi $p \leq 0,05$ serta uji diagnostik. Data kualitatif berupa gambaran histopatologis dari nefritis lupus untuk menetapkan kelas nefritis lupus berdasarkan klasifikasi WHO tahun 1982 (12).

Hasil Penelitian

1. Karakteristik subyek penelitian

Penelitian ini menggunakan 31 sampel pasien biopsi, yang terdiri atas 6 pasien LES tanpa nefritis lupus (kontrol) dan 25 pasien LES dengan nefritis lupus. Karakteristik dari subyek penelitian yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada tabel 1 di bawah ini :

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

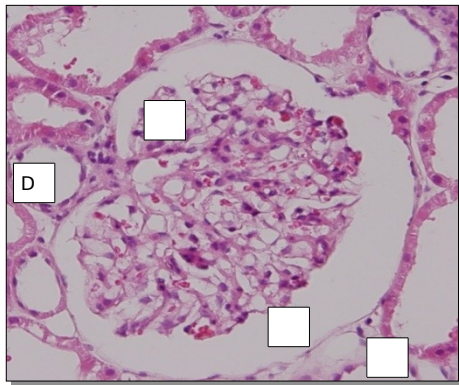
Kategori	Subyek penelitian
Jenis Kelamin	
Laki-laki	6,45%
Perempuan	93,55%
Usia (tahun)	
10-20	29,03%
21-30	48,38%
31-40	38,71%
Suku	
Jawa	100%
Lama Sakit	
<1 tahun	16,13%
1-2 tahun	32,26%
>2 tahun	51,61%
Gejala Klinis	
Nefritis	80,64%
Odema	29,03%
Nyeri sendi	54,83%
Rash	41,93%
Seroritis	9,68%
<i>Silent lupus nephritis</i>	25,80%

Berdasarkan Tabel 1 di atas, terlihat bahwa sebagian besar subyek penelitian dari jenis kelamin perempuan dengan persentase sebesar 93,55%. Rentang usia yang memiliki persentase terbesar antara 21-30 tahun sebesar 48,38%. Suku dari subyek penelitian 100% suku Jawa. Lama sakit subyek penelitian yang paling banyak sudah berjalan >2 tahun, yaitu sebesar 51,61% dan gejala klinis yang paling banyak muncul

adalah nefritis lupus, yaitu 80,64%. Adanya *silent lupus nephritis* sebesar 25,80%.

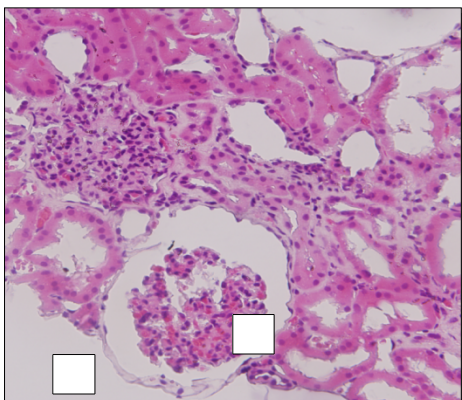
2. Gambaran klasifikasi histopatologi menurut WHO

Pada penelitian ini, telah diamati gambaran histopatologi ginjal yang diambil dari 31 pasien LES yang telah dibiopsi untuk menentukan kelas nefritis lupus. Berikut hasil gambaran klasifikasi histopatologi ginjal dari pasien LES menurut WHO tahun 1982.



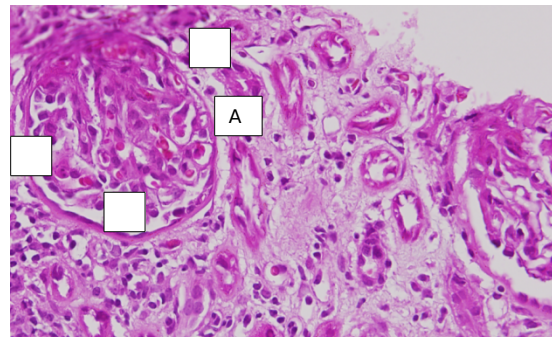
Gambar 1. Gambaran histopatologi kelas I & II (kontrol)

Keterangan: Tampak jaringan biopsi ginjal yang pada umumnya normoseluler. (A) Lumen pembuluh kapiler paten, dinding pembuluh kapiler tidak menebal. (B) Ruang bowman tidak menyempit. (C) Kapsula Bowman tidak menebal. (D) Tubulus tidak atrofik, interstitium tidak fibrotik, tidak terdapat infiltrasi sel radang. Pembuluh darah tidak menunjukkan kelainan. (AG4) (Perbesaran 400x).



Gambar 2. Gambaran histopatologi kelas III & IV
Keterangan: (A) Tampak jaringan ginjal hiperseluler dengan proliferasi endokapiler ringan dengan penambahan sel-sel mesangial. Tidak didapatkan

infiltrasi sel-sel neutrofil pada glomerulus. (B) Lumen kapiler paten, dinding kapiler menebal (AG 27) (Perbesaran 400x).



Gambar 3. Gambaran histopatologi kelas V

Keterangan: (A) Tampak jaringan biopsi ginjal hiperseluler dengan proliferasi endokapiler ringan disertai dengan penambahan matriks dan sel mesangial. (B) Didapatkan beberapa sel neutrofil pada 1-2 glomerulus. (C) Lumen kapiler paten, sebagian menyempit serta didapatkan penebalan dinding kapiler tanpa terlihat gambaran wire loop. Tidak didapatkan nekrosis fibrinoid maupun karyorrheksis. (D) Simpai bowman tidak menebal, ruang bowman sebagian menyempit, didapatkan kresent fibroseluler pada 2 buah glomeruli. (AG 1) (Perbesaran 400x).

3. Uji perbandingan kadar uMCP-1 antara kelompok kontrol dan kasus

Untuk melihat perbedaan kadar uMCP-1 antara kelompok kontrol dan kelompok kasus, maka digunakan uji *Mann-Whitney* yang secara ringkas ditampilkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 2. Perbandingan kadar uMCP-1 antara kelompok kontrol dan kelompok kasus

Variabel	Kontrol (n=6)	Kasus (n=25)
	Rerata Rank	Rerata Rank
uMCP-1	12,00	16,96

Keterangan: $\alpha < 0,05$

Hasil perbandingan rerata rank kadar urine MCP-1 kelompok kontrol sebesar 12 dan kelompok kasus sebesar 19,96 menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0,247 > \alpha$). Hal ini dapat diartikan bahwa tingginya kadar urine MCP-1 belum tentu menunjukkan kejadian nefritis lupus.

4. Uji perbandingan kadar uMCP-1 antara ketiga kelompok sampel

Analisis data hasil uji *Kruskal-Wallis* secara ringkas ditampilkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 3. Perbandingan keempat kelompok sampel

Kelompok	n	Rerata rank urine MCP-1 (ng/ml)
kontrol	6	12,00
Klas III & IV	16	15,13
Klas V	9	20,22
<i>p-value</i>		0,197

Keterangan: *p-value* < 0,05 ada perbedaan yang bermakna

Pada Tabel 3 hasil uji perbandingan ketiga mean rank kadar urine MCP-1 menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0,197 > \alpha$), dengan nilai rerata rank masing-masing kelompok sebesar 12, 15,13 dan 20,22. Hal ini berarti bahwa kadar anti-dsDNA dan urine MCP-1 antar klasifikasi histopatologi pasien nefritis lupus tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pembahasan

LES merupakan prototype dari kelainan autoimun yang mempunyai karakteristik keterlibatan berbagai multisistem dan adanya autoantibodi (antara lain anti- dsDNA) yang secara langsung menyerang komponen sel. Pada penelitian ini, menggunakan 31 sampel pasien SLE yang terdiri atas 25 pasien dengan nefritis lupus dan 6 pasien SLE non nefritis lupus. Karakteristik pasien pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan jenis kelamin pasien 93,55% perempuan, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Rus (3) yang menyatakan bahwa rasio prevalensi LES antara wanita dan pria sebesar 9:1. Pada Tabel 1 juga menunjukkan rentang usia yang paling banyak berkisar antara 21-30 tahun sebesar 48,38%, hal ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa Sebagian besar pasien berkembang menjadi lupus nefritis pada awal penyakitnya (11,13).

Berdasarkan hasil biopsi diperoleh gambaran Kelas I dan II (**Gambar 1**), yaitu jaringan ginjal yang pada umumnya normoseluler, Lumen pembuluh kapiler paten, dinding pembuluh kapiler tidak menebal, ruang Bowman tidak menyempit dan tubulus tidak atrofik. Pada kelas II terdapat penambahan

ringan matriks dan atau sel mesangial. Hal ini sesuai dengan gambaran klasifikasi WHO tahun 1982 (14). Selain itu juga diperoleh gambaran histopatologi kelas III dan IV (**Gambar 2**). Dari gambaran tersebut, diperoleh karakteristik jaringan ginjal yang hiperseluler dengan proliferasi endokapiler ringan dengan penambahan sel-sel mesangial, Kelas III digambarkan memiliki kerusakan atau glomerulus lesions <50% dari total glomerulus, sedangkan kelas IV digambarkan memiliki kerusakan atau glomerulus lesions >50% dari total glomerulus. Hal ini sesuai dengan gambaran klasifikasi WHO tahun 1982 yang menyatakan bahwa sebagian besar kasus dari kelas III dan kelas IV nefritis lupus *endocapillary* mengalami hiperseluleritas. Kelas III nefritis didefinisikan sebagai *focal segmental* atau *global endocapillary* dan *extracapillary* glomerulonephritis kurang dari 50% dari total glomerulus. Sedangkan kelas IV didefinisikan sebagai *diffuse segmental* atau *global endocapillary* dan *extracapillary* glomerulonephritis lebih dari 50% dari total glomerulus. Pada penelitian ini juga diperoleh gambaran klasifikasi kelas V (**Gambar 3**) yang sesuai dengan klasifikasi WHO tahun 1982 yaitu pada kelas V terdapat penebalan dinding kapiler karena adanya deposit kompleks imun disepanjang kapiler glomerular (10).

Pada penelitian ini diukur kadar urine MCP-1. Berdasarkan hasil analisis kadar urine MCP-1, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok nefritis lupus (**Tabel 2**). Begitu pula perbandingan antar kelas pada nefritis lupus, tidak ada perbedaan yang signifikan (**Tabel 3**). Adapun alasan yang dapat menjelaskan hasil di atas, yang pertama adanya penelitian yang menyatakan bahwa polimorfisme gen uMCP-1 dapat mempengaruhi kadar MCP-1 dan dapat menjadi faktor pemicu terjadinya nefritis lupus (4,14). Alasan yang kedua, yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Tian *et.al* (15) menyatakan bahwa uMCP-1 tidak berhubungan dengan histopatologis indeks aktivitas penyakit dan peningkatan uMCP-1 bukan merupakan prediktor independen dari kerusakan ginjal. Pada penelitian tersebut, yang menjadi prediktor independen adalah urine RANTES dan M-CSF.

Kedua kemokin tersebut juga merupakan suatu kemoatraktan yang berperan dalam inflamasi. RANTES merupakan kemoatraktan yang kuat bagi sel T dan sel monosit, sedangkan M-CSF merupakan kemoatraktan dan proliferasi yang baik bagi makrofag intrarenal. Sedangkan MCP-1 merupakan kemokin yang diproduksi pada ginjal yang dapat merekrut sel-sel inflamasi. Penelitian Dai (16) menunjukkan bahwa ekspresi MCP-1 berhubungan dengan jumlah infiltrasi makrofag pada interstitium. Sehingga untuk menentukan klasifikasi kelas nefritis lupus diperlukan penambahan parameter atau biomarker lain seperti RANTES dan M-CSF (15).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian ini, antara lain kondisi lingkungan, latar belakang pasien (adanya faktor genetik) dan riwayat penyakit sebelumnya serta lamanya waktu penggunaan obat-obatan yang bersifat immunosupresan yang berbeda-beda pada subyek penelitian. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa LES merupakan penyakit yang melibatkan banyak gen. Pada individu yang memiliki predisposisi genetik, alel normal dari beberapa gen normal masing-masing berkontribusi terhadap respon imun abnormal yang kecil, jika beberapa variasi jumlah berakumulasi maka penyakit akan terjadi. Rangsangan lingkungan juga dapat mempengaruhi kemunculan LES dengan peningkatan apoptosis pada sel kulit atau dengan mengubah DNA dan protein intraseluler dan membuatnya menjadi antigenik. Semua faktor tersebut tidak dapat dikendalikan oleh peneliti mengingat keterbatasan sampel dan waktu penelitian. Hal ini merupakan keterbatasan dalam penelitian.

Kesimpulan

Dapat disimpulkan bahwa kadar biomarker antibodi anti-dsDNA dan uMCP-1 tidak berhubungan dengan kejadian dan klasifikasi histopatologi dari nefritis lupus

Daftar Pustaka

1. Sudoyo A. W et al. 2007. Nefritis lupus. In : Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid 3. Edisi IV. Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam UI, Jakarta.
2. Dooley M. A. 2007. Clinical and laboratory features of lupus nephritis. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins: 1112-30.
3. Rus V, Maury EE, Hochberg MC. 2007. Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins:34-44.
4. Tucci M., Barnes E. V., Sobel E. S., et al. 2004. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50(6); 1842–1849.
5. Li Yi, et.al. 2009. Increased expression of FcyRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Research & Therapy*; Vol 11 (1).
6. Marks, S.D., Williams, S.J., Tullus, K and Sebire, N.J. 2008. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in paediatric lupus nephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*: 23: 3521–3526.
7. Rovin B. 2009. Urinary MCP-1 is a sensitive and specific biomarker of renal systemic lupus erythematosus.
8. Marks S. D, Shah V, Hasson N, Pilkington C, Tullus K. 2010. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 correlates with disease activity in lupus nephritis. *P265 Abstract Book*; Nov 25(11): 2283-2288.
9. Mok, C. C. 2010. Biomarker for Lupus Nephritis : A Critical Appraisal, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
10. Lahita, R. G. 2003. *Systemic lupus erythematosus*, fourth edition. University of Toronto.
11. Wallace D. J, Hahn B H, eds. 2007. *Dubois' Lupus Erythematosus*, fourth ed. Philadelphia William & Wilkins: 93-104.
12. Sastroasmoro S & Ismael S. 2002. *Dasardasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi

- kedua. CV. Sagung Seto, Jakarta. Hal 137-141.
13. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. 2002. Demographic differences in the outcome of SLE nephritis: a retrospective analysis. *American Journal of Medicine*. 112:726-729.
 14. Kim HL, Lee DS, Yang SH *et al*. 2002. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *American Journal of Kidney Disease*. 40: 1146-1152.
 15. Tian S, *et.al*. 2007. Urinary levels of RANTES and M-CSF are predictor of lupus nephritis flare. *Inflammation research*. 56: 304-310.
 16. Dai C, Liu Z, Zhou H, Li L. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tissue is associated with monocyte recruitment and tubule-interstitial lesions in patient with lupus nephritis. *Chin med J (Engl)*. 114;864-8.