

## Ratio Of EPC And CEC As Endotel Dysfunction Predictor In High Risk Group With Framingham Risk Score 10 Years Category

Wiwit Nurwidyaningtyas<sup>1</sup> Djanggan Sargowo<sup>2</sup>, Achdiat Agoes<sup>3</sup>,  
Titin Andri W.<sup>4</sup>, Satuman<sup>4</sup>

**Research background.** Circulating Endothelial Cells (CEC) is a reflection of endothelial damage or endothelial stress, increasing of CEC amount depend on endothelial mechanism, endothelial adhesivity damage and cellular apoptosis as a result of decreasing sitoskeleton function. If higher exposure affects the increasing of CEC amount, VEGF other *growth factor* mediators will be reflected as endothelial stress manifestation which roles in the increasing of re-population and *Endothelial Progenitor Cells* (EPC) differentiation. Endothelial Progenitor Cells is a mononuclear cell (a part of stem cell) that could change to be mature endothel and roles in re-endothelialisation and neovascularisation. This research aimed to investigate the ratio of EPC : CEC in risk group through Framingham Risk Score (FRS) 10 years approach as endothelial dysfunction predictor.

**Research method and result.** There were 55 research subjects whom taken by FRS scoring and divided into some risk groups and two control groups. They were control group I (health) and control group II (sick). Base blood was taken to every each of them to analyze their EPC and CEC with Flowcytometry. EPC was analyzed by CD34 Per CP Santa Cruz SC-19621 and CD 133 FITC (fluorescein isothiocyanate) Bioss bs-0395R-FITC marker. While CEC was analyzed CD45 FITC Biolegend 202205 dan CD 146 PE Biolegend 134704 marker. Result showed, there was significant ratio differences of EPC : CEC in those six groups which was proven by p-value  $0.032 < \alpha (0.05)$ . The higher ratio was in high risk group (139.06).

**Conclusion.** Research showed that EPC amount was increase related to the increasing of high risk level according to FRS 10 years, but its increasing did not followed by its ability to homing in injury area as role part in re-endothelialisation process. It found that EPC amount was higher in high risk group than in low risk group.

<sup>1</sup> STIKES Kenedes Malang

<sup>2</sup> Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskuler FKUB / RSSA Malang

<sup>3</sup> Departemen Neurologi FKUB / RSSA Malang

<sup>4</sup> Laboratorium Biomedik FKUB

(J Kardiol Indones. 2013;34:14-19)

**Keywords :** EPC, CEC, FRS 10 years, endothelial dysfunction

## Kajian *Rasio EPC* dan *CEC* Sebagai Prediktor Disfungsi Endotel pada Pasien dengan Kelompok Risiko Tinggi Berdasarkan *Framingham Risk Score 10 Years*

Wiwit Nurwidyaningtyas<sup>1</sup>, Djangan Sargowo<sup>2</sup>, Achdiat Agoes<sup>3</sup>, Titin Andri W.<sup>4</sup>, Satuman<sup>4</sup>

**Latar belakang.** *Circulating Endothelial Cells* (CEC) merupakan refleksi dari kerusakan atau stress endotel yang biasa disebut sebagai kondisi disfungsi endotel. Peningkatan jumlah CEC tergantung dari mekanisme cedera endotel, kerusakan adhesivitas endotel serta apoptosis seluler sebagai akibat dari penurunan fungsi sitoskeleton. Semakin besar paparan faktor risiko yang menyebabkan peningkatan jumlah CEC, maka VEGF dan mediator *growth factor* lainnya akan terekspresi sebagai manifestasi stress endotel dan berperan dalam peningkatan repopulasi dan diferensiasi *Endothelial Progenitor Cells* (EPC). *Endothelial Progenitor Cells* merupakan sel mononuklear (bagian dari stem sel) yang mampu berdiferensiasi menjadi endotel matur dan mempunyai peran reendotelialisasi dan neovaskularisasi.

**Tujuan.** penelitian ini bermaksud mengkaji rasio EPC : CEC pada kelompok risiko dengan menggunakan pendekatan *Framingham Risk Score* (FRS) 10 years sebagai prediktor disfungsi endotel.

**Metode dan hasil penelitian.** Terdapat 55 subyek penelitian yang dilakukan scoring dengan menggunakan FRS dan dikelompokkan menjadi kelompok risiko dan kelompok kontrol I (sehat) dan kelompok kontrol II (sakit) yang kesemua kelompok dilakukan pengambilan darah tepi untuk dilakukan analisa CEC dan EPC dengan tehnik *flowcytometry*. EPC dikaji dengan menggunakan marker CD34 Per CP Santa Cruz SC-19621 dan CD 133 FITC (*fluorescein isothiocyanate*) Bioss bs-0395R-FITC sedangkan untuk identifikasi CEC peneliti menggunakan marker CD45 FITC Biologend 202205 dan CD 146 PE Biologend 134704. Hasil menunjukkan bahwa ada perbedaan rasio EPC : CEC yang bermakna pada keenam kelompok yang dibuktikan dengan p-value  $0.032 < \alpha (0.05)$ . Dan rasio tertinggi ada pada kelompok *high risk* (139.06).

**Kesimpulan.** Studi ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah EPC seiring dengan peningkatan derajat kelompok risiko berdasarkan FRS 10 years, namun peningkatan jumlah EPC ini tidak diikuti dengan kemampuan EPC untuk *homing* pada area injury dalam melaksanakan perannya sebagai reendotelialisasi. Sehingga pada kajian ini jumlah EPC akan semakin meningkat justru pada kelompok risiko tinggi dibandingkan dengan kelompok risiko rendah.

(J Kardiol Indones. 2013;34:14-19)

Kata kunci : EPC, CEC, FRS 10 years, disfungsi endotel

### Alamat Korespondensi:

Wiwit Nurwidyaningtyas, STIKes Kenedes Malang Program Studi S1 Keperawatan.  
E-mail: [wiwit\\_nurwidyaningtyas@yahoo.com](mailto:wiwit_nurwidyaningtyas@yahoo.com)

Beberapa jurnal penelitian telah menunjukkan bahwa angka kematian oleh karena penyakit kardiovaskuler terus meningkat dan kini penyakit ini merupakan penyebab

utama kematian untuk penduduk usia diatas 45 tahun diseluruh dunia.<sup>1</sup>

Peningkatan angka kematian akibat CVD dijumpai tidak hanya terjadi dinegara industri atau negara maju tapi juga dinegara berkembang seperti Indonesia.

Tentu saja ini merupakan suatu permasalahan serius yang memerlukan perhatian dan penanganan cepat agar angka kematian akibat *Cardio Vascular Disease* (CVD) bisa ditekan.

Selain itu besarnya biaya yang harus dikeluarkan untuk pengobatan klien dengan gangguan kardiovaskuler menjadi perhatian pada pengembangan upaya pencegahan dan deteksi dini yang lebih murah dan efektif sebagai bentuk upaya menurunkan angka kesakitan dan kematian akibat CVD. Paparan faktor resiko penyakit kardiovaskuler mengakibatkan kerusakan fungsi pengaturan endothelium yang berkembang dari *quiescent state to activation*, apoptosis dan kematian sel endotel.<sup>2</sup> Namun, belakangan ini ditemukan bahwa setengah dari pasien yangmelaporkan manifestasi klinis CVD tidak memiliki salah satu faktor resiko.<sup>1</sup> Berbagai parameter untuk mengkaji prediksi faktor resiko CVD seperti usia, gender, tekanan darah, kadar lipid darah, perokok dan diabetes melitus menjadi penting untuk penentuan derajat resiko CVD dengan menggunakan alat ukur *Framingham Risk Score* (FRS).<sup>3,4</sup> FRS banyak menjelaskan kaitan resiko kardiovaskuler dengan CVD dalam 10 tahun ke depan yang dibagi menjadi 4 kategori kelompok resiko yaitu *very low risk*, *low risk*, *moderate risk* dan *high risk* yang mempunyai ketajaman 34.2% lebih besar dibandingkan dengan *risk prediction models* yang lain.<sup>4,5</sup>

Selain penentuan derajat resiko penyakit kardiovaskuler dengan menggunakan FRS sebagai kajian terhadap hubungan faktor resiko dengan disfungsi endotel, terdapat penanda lain yang bisa digunakan untuk menilai fungsi endotel yang biasa disebut dengan biomarker fungsi endotel.<sup>6</sup> Sudah sejak 10 tahun terakhir ini diidentifikasi sel endotel yang tersirkulasi (CECs) dan *Endothelial-derived Micro Particel* (EMP) sangat diminati sebagai penanda non-infasif marker dari keadaan disfungsi endotel. CECs dan EMP juga bisa bertindak sebagai patogenik faktor yang potensial untuk meningkatkan disfungsi endotel.<sup>1,6</sup>

Respon endotel terhadap injuri secara luas akan diikuti oleh mekanisme kompensasi berupa proses perbaikan yang fisiologis yang didasarkan

pengiriman *Circulating Endothelial Progenitor Cells* (EPCs) dari sumsum tulang belakang. Studi terakhir mengindikasikan bahwa penurunan jumlah dan fungsi EPCs oleh paparan faktor resiko kardiovaskuler berperan dalam perjalanan penyakit kardiovaskuler. Pada masa yang akan datang diharapkan kajian mengenai multi marker kombinasi dari jumlah CEC, EPC dan EMP bisa digunakan sebagai indikator dari kemampuan pembuluh darah yang kemungkinan bisa menjadi dasar kajian faktor resiko atau derajat kerusakan pembuluh darah maupun pengontrolan keberhasilan terapi dan penatalaksanaan.<sup>1,2,6</sup>

## Metode

### Pasien

Responden dalam penelitian ini dikategorikan menjadi 6 kelompok yaitu 10 orang kelompok sehat atau orang normal, 4 kelompok resiko tinggi dengan distribusi 10 orang kelompok *very low risk*, 10 kelompok *low risk*, 10 orang kelompok *moderat risk* dan 5 orang kelompok *high risk* dan sebagai kelompok kontrol sakit adalah 5 pasien PJK dan 5 orang pasien Stroke sehingga total total responden adalah 55 orang yang berjenis kelamin laki-laki dengan tehnik *accidental sampling* dilanjutkan dengan *simple random sampling* untuk penentuan subyek penelitian. Penelitian ini menggunakan responden laki-laki dengan tujuan untuk menghindari pengaruh estrogen sebagai *confounding factor* terhadap mobilisasi dan diferensiasi EPC.

### Prosedur studi

Identitas dan penentuan kelompok resiko dilakukan diawal paparan peneliti dengan responden pada wawancara mengenai usia, pola kebiasaan merokok dan pemeriksaan tekanan darah, setelah memenuhi kriteria dalam kelompok subyek dilakukan pengambilan darah tepi pada kelompok resiko dan kelompok kontrol untuk analisa jumlah EPC dan CEC kemudian dengan menggunakan *flowcytometry* analisis.<sup>7</sup>

### Definisi operasional

Kriteria responden kelompok resiko dianalisis dengan menggunakan *Framingham Risk Score10 years* yang akan dikelompokkan berdasarkan berat ringannya faktor resiko yaitu<sup>4</sup> :

1. *Very Low Risk* : < 10%
2. *Low Risk* : < 15%
3. *Moderate Risk* : 15 – 20%
4. *High Risk* : > 20%

Adapun komponen yang diperhatikan dalam penentuan responden kelompok resiko meliputi hal sebagai berikut:

- a. Usia 20 - <50 tahun
- b. Total kolesterol
- c. Kolesterol HDL
- d. Hipertensi yaitu mempunyai riwayat hipertensi > 1 tahun dan mendapatkan terapi antihipertensi.
- e. Merokok yaitu riwayat merokok > 2 pack setahun atau mempunyai riwayat dan tidak merokok dalam 1 tahun terakhir.

### Analisa statistik

Data kuantitatif berupa kadar EPC dan CEC akan di analisa dengan bantuan program SPSS versi 19. Perbedaan kadar tingginya EPC dan CEC pada kedua kelompok tidak dianalisa dengan tehnik uji *statistic non-parametrik Kruskall Wallis H* mengingat distribusi data tidak normal. Signifikansi statistik ditentukan jika nilai  $p \leq 0.05$ .

### Hasil penelitian

Selama periode penelitian didapatkan Jumlah responden yang diperiksa adalah 80 orang yang masing-

Tabel 1. Hasil Analisa Pemeriksaan CEC dan EPC

Parameter	sehat	<i>Very low risk</i>	<i>Low risk</i>	<i>Moderate risk</i>	<i>High risk</i>	Sakit
Rata-rata CEC	0.009	1.846	2.313	1.540	0.040	0.029
Populasi EPC	0.034	1.113	1.303	2.048	4.316	3.765
Rasio EPC : CEC	3.792	24.608	27.678	36.871	139.055	123.988

masing dilakukan pemeriksaan dan dikategorikan menjadi 6 kelompok yaitu (1) kelompok sehat 10 orang, (2) kelompok sakit 10 orang, (3) kelompok resiko sangat rendah (*very low risk*) 10 orang, (4) kelompok resiko rendah (*low risk*) 10 orang, (5) kelompok resiko sedang (*moderat risk*) 10 orang, (6) kelompok resiko tinggi (*high risk*) 5 orang. Dan ringkasan karakteristik responden dapat disimpulkan bahwa dari faktor usia sebagian besar responden masuk dalam rentangan usia 20 sampai 34 tahun (22%) dan mendominasi pada

kelompok sehat, kebiasaan merokok hampir selalu ada pada kelompok sakit dan keempat kelompok resiko serta tidak satupun pada kelompok sehat. Lebih dari setengahnya (65%) responden tidak melakukan olah raga rutin. Masing-masing 35% responden mempunyai kadar kolesterol total dalam rentangan <160 – 199 mg/dl sedangkan hampir setengahnya (40%) responden mempunyai kadar HDL <40 mg/dl sampai dengan 49 mg/dl. Untuk pemeriksaan tekanan sistolik sebagian besar responden masuk dalam rentangan tekanan sistolik 120 mmHg sampai dengan 129 mmHg.

Dari tabel 1 di atas dapat diambil kesimpulan bahwa rata-rata nilai CEC terendah ada pada kelompok kontrol sehat yaitu 0.009% dan paling tinggi ada pada kelompok resiko rendah yaitu 2.313%, sedangkan untuk rata-rata nilai cd 133 paling tinggi ada pada kelompok high risk yaitu 4.316% dan terendah ada pada kelompok kontrol sehat (0.034%). Dan diketahui bahwa rasio tertinggi ada pada kelompok high risk sebesar 139.06 dan rasio terendah terjadi pada kelompok kontrol sehat sebesar 3.792

Dari tabel 2 di atas dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan rasio EPC : CEC yang bermakna pada keenam kelompok yang dibuktikan dengan nilai  $p 0.032 < \alpha (0.05)$ .

### Diskusi

Hasil penelitian kali ini menunjukkan bahwa ada perbedaan rasio EPC : CEC pada kelompok

Tabel 2. Hasil Analisa Uji Kruskal-Wallis Test Rasio EPC : CEC Terhadap Kelompok

Kelompok	<i>Mean rank</i>	<i>p-value</i>
1	26.75	0.032
2	22.35	
3	21.30	
4	24.95	
5	46.50	
6	35.40	

resiko berdasarkan FRS bila dibandingkan dengan kelompok kontrol yang dibuktikan dengan nilai  $p$  0.032. Dan bila dilihat dari pola rasio EPC : CEC seperti yang tampak pada tabel 1 maka dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan rasio seiring dengan peningkatan estimasi resiko CVD berdasarkan FRS 10 years. Jelas bahwa EPC yang dipengaruhi oleh bioavailabilitas NO menjadi kunci penting perbaikan susunan endotel yang mengalami injuri akibat paparan faktor resiko CVD,<sup>8</sup> namun rasio EPC : CEC masih perlu dianalisa ketajaman sebagai prediktor disfungsi endotel mengingat banyak sekali komponen yang mempengaruhi jumlah EPC dan CEC sendiri.<sup>1,9</sup> Rasio terendah ada pada kelompok kontrol sehat dengan angka 3.792 dan rasio tertinggi ada pada kelompok *high risk* dengan angka 139.06.

Peningkatan derajat resiko CVD berdasarkan FRS ternyata masih menunjukkan pengaruh terhadap peningkatan repopulasi dari EPC. Hal ini bisa disimpulkan bahwa faktor resiko CVD tidak mempengaruhi EPC dari segi kuantitatif, namun dari segi kualitatif belum bisa dijawab dari penelitian kali ini. Sehingga dari sisi klinis penting kiranya modifikasi pendekatan terapi pada pasien dengan kelompok resiko untuk meningkatkan fungsional EPC atau peningkatan kualitas EPC dalam proses reendotelialisasi.<sup>9,10,11</sup>

Ketidakmampuan EPC untuk homing dan memainkan perannya dalam proses reendotelialisasi ternyata tidak seperti hitungan matematis dimana dua dikurangi satu menjadi satu, tapi keberhasilan proses homing yang diperankan oleh EPC dalam menggantikan lapisan endotel yang mengalami *detachment* akibat paparan faktor resiko aterosklerosis banyak dipengaruhi oleh kadar *nitric oxide* dan peranan mediator inflamasi yang pada penelitian ini tidak dilakukan pengkajian terhadap pelepasan mediator inflamasi dan *nitric oxide* pada kelompok resiko.<sup>2, 9, 10</sup>

Penelitian ini merupakan kajian *circulating endothelial cells* dan *endothelial progenitor cells* yang berfokus pada segi kuantitatif saja dan belum melihat sisi kualitatif melalui pengukuran *nitric oxide* dan *flow mediated dilatation*, sehingga peningkatan EPC seiring dengan peningkatan FRS hanya bisa menjelaskan bahwa dengan peningkatan faktor resiko CVD tidak terlalu memberikan banyak perubahan terhadap jumlah EPC yang justru cenderung mengalami peningkatan, namun kemampuan diferensiasi dan

homing EPC pada area injuri masih belum bisa dipastikan karena pemilihan subyek penelitian pada manusia.

Studi pada populasi laki-laki bertujuan untuk menghomogenitaskan data hasil penelitian dengan pertimbangan bahwa kadar estrogen pada wanita sangat mempengaruhi bioavailabilitas NO dan berperan dalam diferensiasi serta repopulasi dari EPC yang berperan dalam reendotelialisasi dan remodeling vasokuler yang mengalami injuri.<sup>12,13,14</sup>

Peneliti menghitung jumlah EPC dan CEC dengan menggunakan teknik *flowcytometry* yang tidak dilakukan perhitungan sel pada awalnya sehingga kadar EPC dan CEC yang didapat hanya berupa *prosentase gate* saja. Meskipun bukan protap yang harus dikerjakan di awal penggunaan teknik *flowcytometry* namun perhitungan sel pada kelompok kontrol dengan mikroskop electron dimana sel yang akan dilihat dan dihitung harus dilakukan perwarnaan atau teknik *staining* sesuai dengan sel, lebih baik dilakukan di awal untuk penentuan jumlah sel endotel yang tersirkulasi ataupun sel progenitor sehingga bisa menghitung jumlah sel yang sebenarnya. Selain itu untuk perhitungan jumlah sel yang diambil dari darah tepi lebih baik menggunakan teknik immunosparation bead dengan melihat ikatan antigen-antibody penanda EPC dan CEC seperti yang telah banyak digunakan oleh peneliti terdahulu.

## Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini masih terfokus pada kelompok laki-laki dan hasilnya tentunya belum bisa menjawab gambaran rasio EPC : CEC pada kelompok wanita. Dan faktor –faktor yang membuktikan hambatan homing EPC masih belum bisa dijelaskan secara saintifik pada penelitian ini.

## Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa rasio EPC : CEC tertinggi ada pada kelompok *high risk*. Sehingga bisa diasumsinya bahwa peningkatan jumlah EPC pada kelompok *high risk* belum bisa menggantikan sel endotel yang mengalami *detachment* pada paparan faktor resiko yang tinggi berdasarkan FRS 10 years.

## Daftar pustaka

1. F. Sabatier : 2008, Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence,, DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00639. The Authors Journal compilation © 2009 Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell Publishing Ltd
2. Rabelink, T. J. : *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 404–414 (2010) Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease
3. John Bayliss Feb 2001., Wilson PWF, : Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47
4. Men- Women Estimate of 10-Year Risk for Men (Framingham Point Scores) and ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute NIH Publication No. 01-3305 May 2001, U.S. Department Of Health And Human Services
5. Chia Y C, Review of tools of cardiovascular disease risk stratification: interpretation, customisation and application in clinical practice, *Singapore Med J* 2011; 52(2): 116-123
6. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endotelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2003;23:168–175.
7. Caroline Schmidt-Lucke ; 2010 Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol, November 2010 | Volume 5 | Issue 11 | e13790
8. Mariuca Vasa, 2001, Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease, *Circ Res.* 2001;89:e1-e7
9. Jonathan M. Hill, 2003, Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
10. Brendan Doyle, 2006 Endothelial Progenitor Cells *Endothelium*, 13:403–410, 2006 ISSN: 1062-3329 print/1543-5261 online
11. Christopher J. Boos , 2006 Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease, *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 48, No. 8, 2006 ISSN 0735-1097/06
12. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002;23:665–686.
13. Boo YC, Hwang J, Sykes M, : Shear stress stimulates phosphorylation of ENOS at ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 2002;283:H1819–H1828.
14. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, : Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 1998;32:351–355.