

Novel Biomarker Monoclonal Antibody Fragmentation Collagen Type IV To Detect Acute Myocardial Infarction Related *Perviomonas Gingivalis* Infection

Muliartha¹, Mulyohadi Ali², Djanggan Sargowo³

Background. Index mortality of atherosclerotic very high. The research conducted by WHO in 1995 show 20% of IMA mortality caused by atherosclerotic. The new emerging risk factor infection is the *Perviomonas gingivalis*. The objective of study to detect IMA in blood sample by using biomarker monoclonal antibody collagen type IV.

Method. This research was experimental in vitro with ethic clearance and carried on the biomedic Laboratory, Brawijaya University. The subject were (n= 12) and healthy people are (n=4). To show expression of MMP-9 and fragmentation of collagen type IV use western blotting technique. The monoclonal antibody were obtain which sub cutan imunization followed by isolating lymphocytes and fusing with myeloma cell to growth of hibridoma and produce antibody.

Result. found in following MMP-9 product the band were 92 kDa and the collagen type IV fragmentation band 60-90 kDa. To test for biomarker reaction monoclonal antibody fragmentation collagen type IV in blood sample 1-12 was positive for AMI.

Conclusion. The biomarker for monoclonal antibody fragmentation collagen type IV shown AMI reaction positive.

(J Kardiol Indones. 2011;32:209-20)

Keywords: Monoclonal antibody fragmentation collagen type IV, IMA, biomarker

¹ Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

² Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³ Laboratorium Kardiologi RSU Saiful Anwar Malang

Biomarker Baru Monoclonal Antibody Fragmentasi Collagen Type IV Untuk Mendeteksi Acute Myocard Infarction Terkait Infeksi Perviromonas Gingivalis

Muliartha¹, Mulyohadi Ali², Djanggan Sargowo³

Latar belakang. Penyakit jantung infark miokard akut (IMA) masih menjadi masalah penyebab kematian yang utama. Faktor resiko yang dikaitkan dengan perkembangan IMA adalah aterosklerosis. Yang terbaru adalah faktor infeksi mikroorganisme. Salah satu infeksi adalah Perviromonas gingivalis.

Metodologi. Rancangan penelitian eksperimental murni in vitro dengan analisa deskriptif cross sectional sudah dilaksanakan uji etik. Subjek penelitian penderita IMA (n=12) dan kontrol sehat (n=4). Untuk mengetahui ekspresi MMP-9 serta fragmetnasi collagen type IV menggunakan teknik Western Blotting. Untuk memproduksi monoklonal antibody menggunakan mencit di imunisasi sub cutan menggunakan protein fragmentasi collagen type IV disertai dengan adjuvant, diikuti isolasi sel limfosit, dilanjutkan proses fusi dengan sel myeloma sehingga terbentuk sel hibridoma. Seterusnya dilakukan pembuatan antibodi dilanjutkan dengan pengujian titer dengan teknik Elisa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi penderita IMA menggunakan biomarker monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV.

Hasil. Hasil pengujian monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV terhadap 12 penderita IMA dengan 4 kontrol sehat, menunjukkan hasil semua penderita IMA positif.

Kesimpulan. Biomarker antibody fragmentasi collagen type IV menunjukkan reaksi positif terhadap penderita IMA.

(J Kardiol Indones. 2011;32:209-20)

Kata kunci: monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV, AMI, biomarker

I. Pendahuluan

Penyakit jantung infark Miokard Akut (IMA) saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang utama di dunia. Selain karena prevalensinya yang semakin

meningkat penyakit ini juga telah menjadi penyebab kematian yang utama.¹ Tercatat tahun 2000, ada sebanyak 16,7 juta penduduk atau sekitar 30,3% dari total kematian di seluruh dunia meninggal karena penyakit IMA. Lebih dari setengahnya dilaporkan dari negara berkembang.

Sampai saat ini diagnosa IMA ditegakkan atas kriteria WHO, yaitu berdasarkan atas keluhan, gambar EKG dan enzim spesifik untuk IMA. Diagnosis tidak mudah harus memenuhi kriteria dua mayor dapat mendiagnosa. Untuk mengatasi

Alamat Korespondensi:

Dr. dr. Ketut Muliartha, Sp.PA, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No. 1 Malang, Jawa Timur, Indonesia. E-mail: ketutmuliartha@gmail.com

hal tersebut kami bertujuan membuat terobosan alat diagnostik IMA tanpa tindakan invasif cukup dengan mengambil darah perifer dapat mengetahui lebih awal akan terjadi IMA dan juga dapat menentukan prognosis. Pemeriksaan dengan produksi antibody ini dapat mengetahui lebih dini terjadi IMA daripada pemeriksaan enzim seperti yang sudah sering dilakukan secara konvensional. Sehingga dapat segera dilakukan pengobatan. Juga dapat menentukan penyebab IMA secara spesifik.

Penelitian ini didasarkan adanya faktor yang telah dikaitkan dengan perkembangan IMA adalah aterosklerosis. Banyak faktor yang dapat berperan terhadap terbentuknya atherosklerotik, misalnya seperti: dislipidemia, hyperhomocystein, diabetes mellitus, hipertensi dan lain sebagainya. Tetapi, proses infeksi belum banyak diungkap.

Menurut Ross² proses atherogenesis dalam perkembangannya menyerupai respon inflamasi kronis terhadap mikroorganisme.

Mikroorganisme tersebut dapat secara langsung menginvasi endotel vaskular dan menginduksi respon inflamasi atau secara tidak langsung dapat secara systemic effect.

Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim, diantaranya Matrix Metallaprotease atau MMPs. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim aktif yang menyebabkan lisisnya collagen.³ Apabila proses ini terjadi pada permukaan plak atherosklerotik maka serabut collagen yang melindungi plak akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur.

Diketahui Collagen tipe-IV merupakan komponen utama dari membran basal vaskular yang letaknya berada di bawah lapisan sel endotel pembuluh darah. Collagen tipe IV mudah rusak oleh aktivitas collagenase dalam sirkulasi, selain karena lokasinya yang berada paling dekat dengan sirkulasi darah juga karena strukturnya yang mengandung protein globuler (non-collagenous domain, tidak fibrilar) yang rentan terhadap berbagai collagenase.⁴⁻⁶ Degradasi collagen tipe IV dapat terjadi secara langsung oleh protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau bila terdapat inflamasi yang signifikan, akan terjadi degradasi yang lebih besar oleh aktivitas MMPs.³

Beberapa penelitian mengaitkan infeksi *Perviomonas gingivalis* dengan penyakit periodontitis juga terkait dengan penyakit kardiovaskuler atherosklerotik. Pada penelitian seroepidemiologi yang dilakukan

oleh Ameriso, *et al*⁷ dan Muliartha dkk⁸ menemukan bahwa ada keterkaitan yang nyata antara pasien seropositif *Perviomonas gingivalis* dengan penderita aterosklerosis.

Akan tetapi, dalam menginfeksi whole sel *Perviomonas gingivalis* dapat sampai dalam peredaran darah sehingga tampak ada keterlibatan *Perviomonas gingivalis* pada aterosklerosis mungkin melalui mekanisme sekunder yaitu dengan cara systemic effect.

Menurut Fong *et al*⁹ produk mikroorganisme yang berupa endotoksin dalam sirkulasi, darah secara tidak langsung dapat merusak endothelium vascular dengan melakukan stimulasi respon imun sedangkan menurut O'Connor, *et al*¹⁰ bahwa endotoksin serta whole sel *P. gingivalis* yang didapat pada mikroorganisme tersebut masih bersifat virulen terhadap host.

Protein antigenic whole sel dalam peredaran darah akan menimbulkan suatu echo, dimana terjadinya aktivasi sel-sel yang berhubungan dengan atheroma oleh karena produk bakteri antigenik, akan menghasilkan sitokin. Sitokin akan melepaskan interleukin-1 (IL-1) dan tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). Selain itu sitokin akan merangsang sintesis hepatic dari phase acute reactants, seperti fibrinogen.¹⁰

Perviomonas gingivalis adalah salah satu bakteri, diketahui whole selnya berhubungan dengan patogenesis dari strain *Perviomonas gingivalis* disebabkan karena merupakan suatu antigen yang dapat dikenali oleh system imun nonspesifik dan spesifik karena melibatkan system toll-like receptor (TLR4).

Berdasarkan pernyataan diatas, peneliti ingin membuktikan teori tersebut akan melakukan penelitian secara in vitro menggunakan *Perviomonas gingivalis* yang akan dapat menginduksi respon imun sehingga menghasilkan enzim MMP sekaligus membuktikan apakah enzim tersebut dapat aktif mendegradasi collagen tipe IV. Diharapkan protein fragmentasi collagen tipe IV ini dapat dibuat monoklonal antibody untuk mendeteksi adanya fragmentasi collagen tipe IV di dalam darah penderita IMA.

Secara teoritis telah diketahui penyebab utama gangguan suplai oksigen dan nutrien ke jantung adalah adanya trombus. Terbentuknya trombus disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah akibat rupturnya plak atherosklerotik. Saat ini diketahui pula adanya faktor infeksi mikroorganisme yang dapat merusak sel endotel.

Faktor infeksi berperan dalam ruptur plak aterosklerotik juga sudah diketahui infeksi mikroorganismenya dapat menyebabkan trombus melalui proses kerusakan sel endothel. Menurut Fong⁹ beberapa kemungkinan agen infeksi dapat menginduksi terjadinya IMA yaitu, invasi mikroorganismenya secara langsung dan tidak langsung pada pembuluh darah akan menyebabkan terjadinya respon inflamasi yang menyebabkan peningkatan limfosit dan makrofag serta terjadi peningkatan produksi sitokin dan faktor pertumbuhan jaringan.

Selain itu pelepasan produk mikroorganismenya whole sel dapat meningkatkan pengikatan ester kolesterol oleh makrofag sehingga membentuk foam sel. Juga dapat memicu kontraksi dari otot polos dari pembuluh darah sehingga terjadi pendorongan endothel ke arah lumen menyebabkan terbentuknya plak sehingga terjadi penyempitan pembuluh darah yang menyumbat aliran darah. Serta turut berperan sebagai molekul mimikri heat shock protein-60 yang dihasilkan oleh mikroorganismenya yang akan dapat menginduksi reaksi imun.

Dengan demikian secara tidak langsung dapat menimbulkan systemic effect sehingga produk yang dihasilkan oleh mikroorganismenya dapat menimbulkan suatu keadaan echo, yaitu suatu kondisi dimana terjadinya aktivasi sel-sel yang akan menghasilkan sitokin sebagai respon terhadap whole sel tersebut. Echo ini dapat menyebabkan kerusakan endotel sehingga terjadi ruptur plak. Ruptur plak pada penelitian ini disebabkan oleh karena rupturnya collagen type IV yang akan dibawa aliran darah menyebabkan tersumbatnya pembuluh darah pada jantung sehingga terjadi IMA.

Dengan harapan fragmentasi collagen type IV tersebut dapat dideteksi menggunakan antibody monoclonal fragmentasi collagen type IV. Disamping itu sel-sel inflamatori yang teraktivasi akan meningkatkan ekspresi permukaan tissue factor mengakibatkan prokoagulan meningkat. Juga dapat terjadi penghambatan aktivator plasminogen sehingga dapat menurunkan trombomodulin serta endotel dan heparin sulfat juga proteoglikan. Peningkatan produksi sitokin dengan aktivasi marker inflamatori dan menstimulasi prokoagulan akan menyebabkan terjadinya trombus dan akhirnya menjadi IMA.

Sampai saat ini biomarker diagnostik konvensional masih dirasa belum memuaskan akibat tidak dapat mendeteksi secara awal proses IMA. Antara lain

enzim CPK CH dan CPK MB mioglobin, troponin A dan Tyang hanya dapat mendiagnosis setelah terjadi proses IMA. Juga tidak dapat mengetahui faktor etiologinya. Serta penggunaan sarana diagnostik yang lainnya berupa invasive ultrasonografi biayanya sangat mahal hanya dimiliki oleh beberapa pusat saja. Penelitian kami membuat antibody monoclonal fragmentasi collagen type IV sebagai biomarker yang dapat mendeteksi adanya proses infeksi serta dapat mendeteksi proses IMA lebih dini, efektif dan efisien.

II. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini juga telah melakukan penandatanganan ethical clearance.

Penelitian ini terdiri dua tahap, yang pertama ialah tahap degradasi collagen tipe-IV oleh enzim MMP yang diproduksi melalui sel neutrofil dengan induksi whole sel *Perviomonas gingivalis* dan tahap kedua adalah produksi antibody monoclonal fragmentasi collagen type IV dengan melakukan imunisasi serta mengisolasi sel limfosit serta dilanjutkan dengan mengisolasi sel myeloma, kemudian dilanjutkan dengan fusi sel limfosit dengan myeloma sehingga terbentuk hibridoma. Penelitian ini dilanjutkan dengan seleksi clone kemudian dilakukan insersi secara intraperitoneal sehingga terbentuk mencit ascites. Akhirnya dilakukan pengujian secara laboratorium dan pengujian pada penderita IMA dibandingkan dengan kontrol orang sehat tanpa menderita IMA

2.1 Degradasi Collagen Tipe-IV

Produksi dan Uji Aktifitas Enzim MMP

Stimulasi sekresi aktivasi enzim MMP-9 dilakukan dengan cara insersi whole sel *Perviomonas gingivalis* ke dalam neutrofil yang telah diinkubasi selama 1 jam pada 30°C. Kemudian disentrifus dingin 4°C pada 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang mengandung enzim MMP diambil, dipisahkan dan dicampur dengan tris-glycin SDS buffer, dibiarkan pada suhu ruang 10 menit tanpa dipanasi. Sampel dimasukkan pada sumuran yang telah berisi gel dengan

0,1% gelatin dan gel-dirunning dengan tris-glysin SDS running buffer, dan dirunning pada kondisi voltase konstan (125 V), kuat arus (awal 30 – 40 mA/gel dan akhir menggunakan 8 – 12 mA/gel) dalam 90 menit. Gel direnaturasi pada Zymogram renaturing buffer pada suhu ruang selama 30 menit sambil diagitasi. Gel dipindahkan ke Zymogram developing buffer pada suhu ruang dengan agitasi lembut selama 30 menit kemudian gel dimasukan dengan Zymogram developing buffer yang baru kemudian diinkubasi pada 37°C semalam. Gel distaining dengan comassie brilliant blue lalu destaining dengan metanol glacial. Pita yang berwarna putih pada gel yang berwarna biru menandakan aktivitas gelatinase. Hasil elektroforesis yang didapat berupa enzim MMP dilanjutkan dengan uji Western blotting yang menggunakan antibodi anti MMP-9 sebagai antibodi primer.

Enzim MMP yang diperoleh dipaparkan pada collagentipe-IV yang telah dilabel biotin dengan perbandingan 1:2, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang. Ditambahkan RSB dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel dimasukkan pada sumuran yang telah berisi gel kemudian dirunning dengan tri-glycine SDS running buffer, dan dirunning pada kondisi voltase konstan (120 V), dengan kuat arus 30 mA dalam waktu 90 menit. Pita-pita hasil fragmentasi collagentipe-IV diamati dengan pewarnaan comassie blue R-250 kemudian penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan destaining sambil digoyang dengan menggunakan shaker sampai gel menjadi jernih. Hasil elektroforesis dilanjutkan dengan pengujian Western blotting dengan menggunakan antibodi fragmentasi collagen tipe IV.

2.2. Produksi Antibodi anti Fragmen Collagen tipe IV serta Elektroelusi

Pita fragmen collagen tipe-IV yang terlihat pada membran NC dijadikan sebagai antigen yang diinjeksikan untuk imunisasi mencit. Elektroelusi dilakukan dengan cara memotong pita-pita yang tertransfer pada membran NC kemudian dimasukkan dalam selofan (membran dialisa) yang telah berisi running buffer 1 ml. Membran dialisa tersebut dimasukkan ke elektroelusi chamber dan dirunning pada 25 volt, 30 mA selama 120 menit. Hasil elektroelusi didialisa semalam pada suhu 4°C. Hasil dialisa dimasukkan dalam effendorf yang telah berisi etanol absolut (1:1) dan diinkubasi semalam

pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi, sampel tersebut disentrifugasi 4°C pada 6000 - 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan peletnya dikeringkan dengan dianginkan dengan cara ditaping dalam refrigerator (suhu 4°C). Pelet yang telah ditaping ditambahkan dengan buffer tris-HCl (pH 6,8) disimpan sebagai stok antigen fragmen collagen tipe-IV.

Isolasi Sel Limfosit Hasil Imunisasi

Antigen fragmen collagen tipe IV hasil elusi diinjeksikan pada mencit jantan berumur sekitar 4 bulan (berat badan sekitar 60 gr) dipelihara dalam kandang dengan makanan pelet. Imunisasi dilakukan dengan cara menyuntikan antigen fragmen collagen tipe-IV secara sub-kutan. Penyuntikan dilakukan sebanyak lima kali dengan interval waktu penyuntikan selama seminggu. Satu minggu pertama, antigen fragmen collagen tipe IV dicampur dengan Complete Freund's Adjuvant (CFA) dengan perbandingan 1:1 sedangkan penyuntikan booster (booster 1 sampai 4) dilakukan penyuntikan ulang dengan antigen fragmen collagen tipe IV tetapi dicampur dengan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA).

Panen berupa sel limfosit pada lien dilakukan satu minggu setelah penyuntikan minggu pertama dan tiap minggu setelah booster kemudian dilakukan isolasi sel limfosit. Selanjutnya dilakukan persiapan myeloma sel kemudian dilakukan fusi antara sel limfosit dengan myeloma sel untuk membentuk hibridoma. Dilanjutkan dengan penumbuhan sel hibridoma kemudian dilakukan seleksi klon hibridoma. Hasil klon yang mempunyai titer tertinggi dilakukan insersi secara intraperitoneal pada tubuh mencit sehingga terbentuk ascites mencit. Ascites ini merupakan prototype antibody monoclonal fragmentasi collagen type IV.

Pemurnian antibodi dilakukan dengan teknik presipitasi ammonium sulfat 50% jenuh. Serum ditambahkan Solid Ammonium Sulfat (SAS) dengan perbandingan 1:1 lalu divorteks 3 x 3 menit dengan interval 10 menit, simpan suhu rendah selama 1-2 jam. Kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit, peletnya diambil dan ditambahkan SAS 50% dengan perbandingan 1:2 lalu disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dengan 5ml buffer fosfat 0.2 M pH 7 kemudian divorteks selama 3 menit. Dilakukan dialisis dengan 0.1 M buffer fosfat pH 7 sebanyak 1000 ml pada suhu

4°C selama semalam. Konsentrasi antibodi diukur absorbansinya berdasarkan kerapatan optik (OD) setara dengan 1,4 atau setara dengan konsentrasi protein 1 mg/ml.¹¹

Uji Spesifisitas Antibodi dari Ascites dengan menggunakan Teknik Dot Blot

Evaluasi dan pengujian spesifisitas antibodi yang dihasilkan, dilaksanakan dengan teknik Dot Blot sesuai dengan prosedur Priou *et al.* dalam Suryadi dkk. Membran NC dipotong dengan ukuran 5 x 7 cm, dimasukkan dalam alat dot blot selanjutnya dibasahi dengan 50 µl Tris Buffer Saline (TBS) per sumur, lalu dilakukan degas. Kemudian membran NC diinkubasi dengan larutan penghambat (blocking) TBS-skim 5% selama 1 jam. Setelah diinkubasi, membran NC dibilas dengan TBS-T 0,05% sebanyak 3 x 3 menit dan larutan Antibodi (sebagai Antibodi primer 1:200 dalam TBS) ditambahkan ke dalam membran NC, diinkubasikan semalam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi lalu dibilas dengan TBS-T 0,05% sebanyak 3 x 3 menit, kemudian ditambahkan antibodi sekunder (Alkaline phosphatase conjugated antibody 1.200 dalam TBS) selama 60 menit pada suhu ruang sambil dishaker. Selanjutnya dibilas dengan TBS-T 0,05% sebanyak 3 x 3 menit, kemudian dilakukan pemberian substrat untuk pewarnaan (reaksi enzimatik) dengan menambahkan Western Blue substrat solution selama 10-30 menit pada ruangan gelap. Reaksi dihentikan dengan dibilas aquades apabila terjadi perubahan warna ungu muda sampai ungu tua pada bekas tetesan. Warna ungu menunjukkan reaksi positif, dan bila tidak terjadi perubahan warna pada bekas tetesan dianggap reaksinya negatif. Hasil dot blot dibaca dengan menggunakan Corel versi 12.¹¹

Pengujian Interaksi Serum Penderita IMA dan Antibodi Anti Fragmen Collagen Tipe IV

Evaluasi interaksi serum penderita IMA dan antibodi anti fragmen collagentipe IV dilakukan dengan teknik Dotblot. Untuk menunjukkan hasil interaksi antara prototype monoclonal fragmentasi collagen type IV dilakukan pengujian terhadap 1 – 12 penderita IMA dan 4 orang sehat diuji dengan teknik Dotblot. Pada penderita IMA, apabila menunjukkan hasil positif akan muncul tanda totonan dot berwarna biru.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil Penelitian

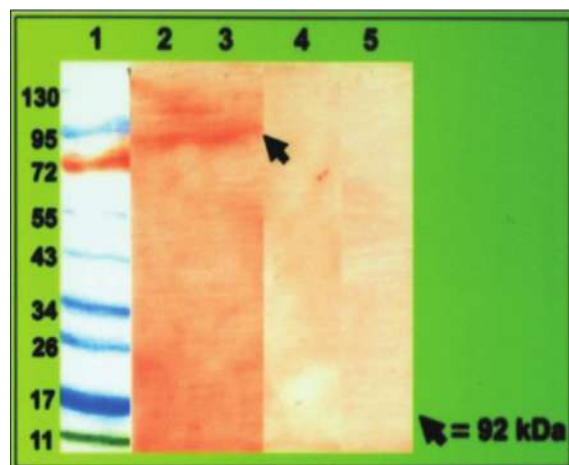
Produksi dan Uji MMP dengan SDS-PAGE Gelatin Zymography

Produksi enzim MMP diduga diperoleh dari salah satu isi neutrofil dimana neutrofil yang terinduksi aktif oleh paparan whole sel *Perviomonas gingivalis* akan memproduksi enzim MMP. Untuk mengetahui keberadaan dan aktivitas MMP maka dilakukan uji enzim MMP dengan menggunakan SDS-PAGE gel gelatin terhadap supernatan dari neutrofil yang dipapar dengan whole sel *Perviomonas gingivalis*.

Adapun Hasil uji enzim MMP yang menggunakan SDS PAGE gel gelatin terdapat pita berwarna coklat transparan dengan berat molekul 96 kDa dan 72 kDa.

Gel hasil SDS-PAGE 7,5% gelatin kemudian dilanjutkan dengan Western blotting yang menggunakan antibodi anti MMP-9 sebagai antibodi primer. Pada gambar 1 menunjukkan hasil Western blotting dimana reaktifitas antibodi anti MMP-9 dapat mengenali enzim MMP-9 dengan berat molekul 92 – 96 kDa.

Enzim MMP yang dikenali oleh antibodi anti MMP-9 diduga merupakan enzim MMP-9. Pada



Gambar 1. hasil Western Blotting pada reactivity antigen- anti MMP-9 dapat mengidentifikasi enzim MMP.

Keterangan:

M = Marker = S1,

S2 - S3 = 92-96 kDa, MMP9 kDa;

S4 - S5 = kontrol.

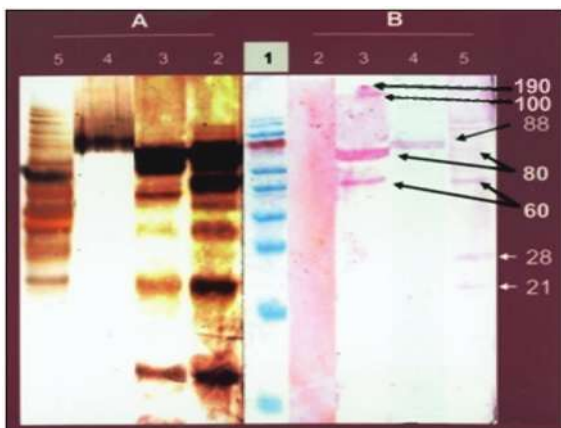
sampel S1 sampai dengan S3 adalah MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil penderita IMA yang dipapar oleh whole sel *Perviromonas gingivalis* menunjukkan antibodi anti MMP-9 yang dikenali pada berat molekul 96 kDa dan 72 kDa. Sedangkan pada sampel S3 sampai S4 adalah MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil orang sehat yang dipapar oleh whole sel *Perviromonas gingivalis* menunjukkan antibodi anti MMP-9 mengenali pita pada berat molekul 91,2 kDa, walaupun pita yang dihasilkan terlihat kabur (samar-samar).

Tahap Degradasi Collagen Tipe IV Hasil SDS-PAGE

Tahap selanjutnya dilakukan uji degradasi collagen tipe IV oleh MMP-9 dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE 10% terhadap MMP-9 yang dipaparkan ke collagen tipe IV tersebut didapatkan hasil berupa pita sebesar 66,2 kDa sampai 97,6 kDa yang dilanjutkan dengan uji Western Blotting.

Hasil Uji Western Blotting

Reaktivitas antibodi anti collagen tipe IV terhadap pita-pita diperlakukan MMP-9 yang dipapar ke collagen tipe IV dapat dilihat seperti gambar 2.



Gambar 2. Hasil western blotting pada kolagen tipe IV yang diinduksi untuk MMP-9. Keterangan: detektor penanda protein tinggi merek Sigma dengan commesie pewarna Brilliant Blue R-258,

Keterangan:

- S1 = marker;
- S2 = murni kolagen tipe IV 100–195 kDa
- S3 – S4 = fragmentasi kolagen tipe IV 60 – 80 kDa

Pada gambar 2 menunjukkan reaktivitas dengan menggunakan antibodi anti collagen tipe IV terhadap hasil pita-pita sampel collagen tipe IV yang dipapar oleh MMP-9 dari neutrofil penderita IMA sehingga didapat pita-pita yang mempunyai berat molekul 60 kDa – 80 kDa. Pada hasil Western blot di atas terdapat 2 pita yang dikenali oleh antibodi monoklonal anti collagen tipe IV (gambar 2).

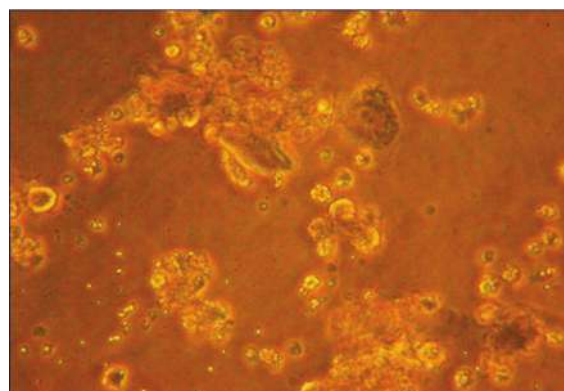
Sedangkan reaktivitas antibodi anti collagen tipe IV terhadap sampel collagen tipe IV murni sebagai kontrol (sumur 2) menunjukkan semua pita-pita terespon bahkan beberapa pita yang tidak terdeteksi pada SDS-PAGE 10% yang diberi pewarnaan *comisie brilliant blue* dapat terdeteksi dan dikenali oleh antibodi anti collagen tipe IV.

Uji interaksi antibodi anti fragmen collagen tipe IV dengan menggunakan dot blot bertujuan untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara antibodi anti fragmen collagen tipe IV yang diproduksi oleh mencit dengan antigen fragmen collagen tipe IV yang diinduksi oleh whole sel *Perviromonas gingivalis*.

Hasil uji imunisasi serta produksi antibodi monoclonal fragmentasi collagen type IV

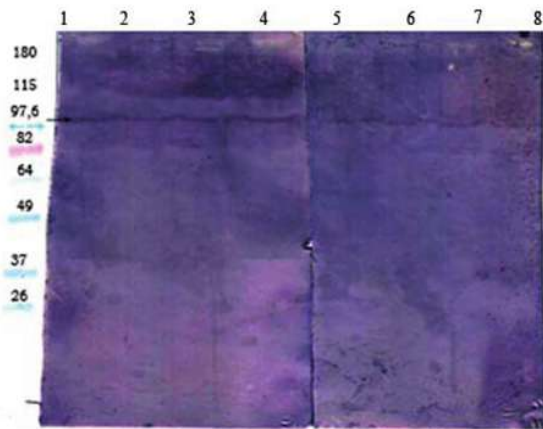
Hasil imunisasi pada mencit dengan menggunakan fragmentasi collagen type IV disertai dengan freund adjuvant complete dan incomplete sehingga dapat diproduksi sel limfosit.

Selanjutnya dilakukan isolasi sel limfosit. Juga dilakukan isolasi dan penumbuhan sel myeloma. Kemudian dilakukan fusi antara sel limfosit dengan sel myeloma sehingga terbentuk hibridoma. Dilanjutkan dengan seleksi klon hibridoma (gambar 3).



Gambar 3. Hasil fusi limfosit sel dengan sel myeloma sehingga terbentuk sel hibridomadan Sel Hibridoma yang ditumbuhkan hari ke 10

Hasil hibridoma yang tumbuh selanjutnya dilakukan seleksi Clon Hibridoma serta dilakukan pengujian hasil seleksi klon dengan teknik Western Blotting. Hasilnya sebagai berikut :



Gambar 4. Analisa hasil seleksi klon dengan teknik western blotting didapatkan hasil berupa 97,6 kDa

Keterangan:

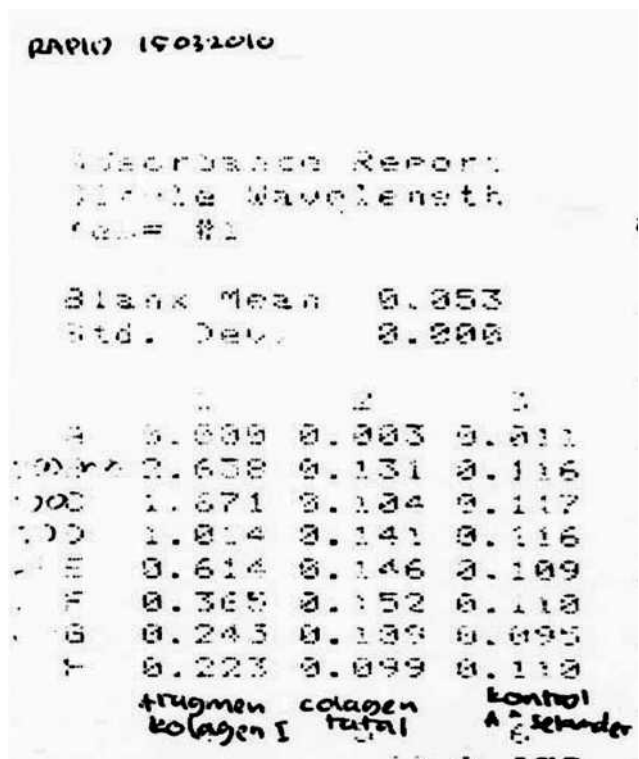
- A. : Supernatant hibridoma (dikerjakan di lab. Pusvetma)
- B. : Supernatant hibridoma (dikerjakan di lab. Biomedik)
- 1,2,5,6 : antigen fragmentasi collagen tipe IV (A)
- 3,4,7,8 : antigen fragmentasi collagen tipe IV oleh Perviromonas gingivalis (B)

Hasil menunjukkan dengan menggunakan teknik western blotting diperoleh 1 pita spesifik fragmen 1 collagen tipe IV dengan berat molekul 97,6 kDa (gambar 4). Selanjutnya hasil seleksi klon dilakukan pengujian dengan teknik Elisa.

Hasil seleksi klon tersebut berupa titer antibody yang tertinggi disiapkan untuk insersi intraperitoneal pada mencit. Hasil klon yang terbaik dilakukan insersi lewat intraperitoneal dibantu dengan pemberian prestan sehingga terbentuk ascites. Ascites ditumbuhkan.

Selanjutnya dilakukan pengujian dengan teknik Elisa didapatkan antibody cukup tinggi sebesar 2,584 (gambar 5).

Hasil uji interaksi antara anti-serum yang diproduksi oleh mice yang diinduksi oleh antigen fragmentasi collagen tipe IV (gambar 6). Totolan warna biru keunguan menunjukkan interaksi positif antara anti serum mice terhadap antigen fragmen collagen tipe IV sampai pada pengenceran seperlima ribu.



Gambar 5. Pengujian Prototype Monoklonal Antibody Fragmentasi Collagen Type IV. Hasil pengujian ascites secara laboratorium dengan Teknik Elisa.

Keterangan:

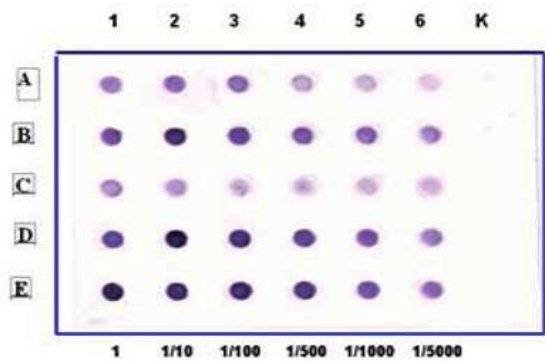
Kolom 1 : antigen fragmen 1 oleh infeksi P9 collagen type IV
 Kolom 2 : antigen collagen type IV

Konsentrasi antigen :

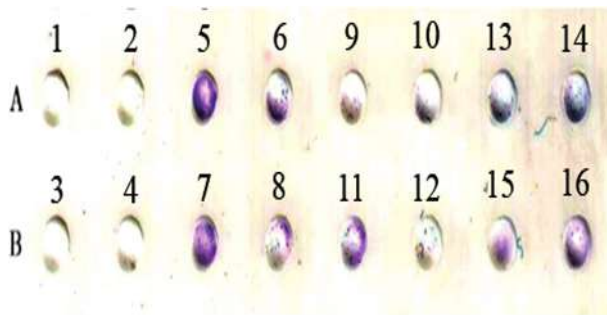
- A. 0 ng
- B. 200 ng
- C. 100 ng
- D. 50 ng
- E. 12,5 ng
- F. 25 ng
- G. 6,25 ng
- H. 3,125 ng

Sedangkan dengan pemeriksaan dengan Teknik Elisa menunjukkan hasil sebesar 2,632.

Pada pengujian terhadap 1 – 12 penderita IMA dilakukan dengan teknik dot blot dengan perbandingan kontrol 4 sampel orang sehat sedangkan untuk hasil dari 1-12 penderita IMA semua menunjukkan hasil positif. Sedangkan untuk kontrol menunjukkan hasil yang negatif. Tidak tampak jelas totalan dot warna biru (gambar 7).



Gambar 6. Hasil uji interaksi antara serum mice anti dan antigen fragmen kolagen tipe IV dengan teknik dot blot menunjukkan hasil interaksi positif biru keunguan dengan pengenceran sampai 1/5000, analisis corel versi 12.



Gambar 7. Pengujian dengan Teknik Dot Blot

3.2 Pembahasan

Secara teoritik diketahui bahwa *Perviomonas gingivalis* mengandung protein whole sel yang bersifat antigenic yang merupakan antigen yang dapat dikenali oleh sistem imun spesifik sedangkan kelompok lipid A merupakan antigen yang dapat dikenali oleh sistem imun nonspesifik.¹¹

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, whole sel dari mikroorganisme dapat melibatkan sistem toll-like reseptor (TLR4) yang dapat mengaktifasi NFK β dan mengekspresikan gen-gen yang mengkode protein yang penting dalam berbagai komponen respon imun non spesifik yang meliputi sitokin inflamatori (TNF- α , IL-2 dan IL-12), molekul leukocyte-endhotelial adhesion molekul (seperti E dan P-selectin) dan protein yang terlibat di dalam mekanisme killing mikroba (seperti iNOS).¹²

Masih menurut Abbas,¹² produksi sitokin yang meningkat akan mengaktifkan fagosit dan TNF yang diproduksi oleh sitokin akan mengerahkan netrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan antigen.

Pada penelitian ini telah membuktikan bahwa dengan paparan whole sel *Perviomonas gingivalis* dapat mengaktifasi neutrofil untuk memproduksi enzim MMP. Hal ini dibuktikan dengan pengujian produksi enzim MMP yang dihasilkan oleh neutrofil dengan menggunakan zymography, sampel neutrofil penderita IMA yang telah dipapar whole sel *Perviomonas gingivalis* (S2 sampai S3) menunjukkan adanya pita coklat transparan yang terbentuk pada berat molekul 96 kDa dan 72 kDa (gambar 1).

Aktivitas MMP-9 pada berat molekul 72 kDa – 96 kDa memberikan suatu indikasi bahwa neutrofil yang diisolasi dari penderita IMA merupakan neutrofil yang telah mengandung proMMP-9, sehingga pada waktu pemaparan whole sel *Perviomonas gingivalis* proMMP-9 tersebut langsung aktif. Hal ini mungkin ada hubungannya dengan kondisi pasien penderita IMA yang telah mengalami inflamasi selama perkembangan aterosklerosis. Berdasarkan mekanisme kerja Sitokin inflamatori dan faktor pertumbuhan yang dihasilkan selama terjadi aterosklerosis dapat mengekspresikan MMPs dan ekspresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat.¹³ Menurut Kalela,¹⁴ MMP-9 banyak dihubungkan dengan inflamasi arteri. Peningkatan MMP-9 dalam serum, pernah dilaporkan pada pasien dengan infark miokard dan unstable angina.

MMPs dapat diaktifkan oleh tiga mekanisme yaitu aktivasi stepwise, aktivasi intraseluler dan aktivasi pada permukaan sel. Walaupun semua MMPs mempunyai keluarga protease, struktur dan fungsi yang sama, tetapi MMPs dapat diaktifkan dengan mekanisme awal yang berbeda.¹⁵ Awal fragmentasi terjadi di dalam propeptida dan kemudian dari propeptida berpindah ke intramolekuler melalui beberapa intermedit sehingga terjadi proses fragmentasi.¹⁶ Aktivasi kimia yang peranannya juga diperlihatkan pada percobaan *in vivo*, dimana NO mengaktifkan proMMP-9 selama proses *cerebral ischemia* disebabkan karena adanya reaksi dengan kelompok sistem thiol.¹⁷ Selama inflamasi proMMP-9 dapat diaktifkan oleh *reactive oxygen species* atau ROS, seperti hidrogen peroksida dan radikal hidroksil. Aktivasi kimia atau oksidatif ini dianggap penting pada penyakit inflamasi.¹⁸

Menurut hasil penelitian Worthly *et al*,¹⁹ bahwa meskipun beberapa enzim terlibat dalam destruksi ECM misalnya MMP-1, dan MMP-3), tetapi hanya MMP-9 yang mempunyai hubungan kuat terhadap terjadinya ruptur plak aterosklerotik. Dikatakan bahwa MMP-9 mampu mendegradasi komponen matriks yang tidak mampu didegradasi oleh enzim proteolitik lainnya.

Sehubungan dengan kemampuan MMP-9 dalam mendegradasi komponen matriks, maka pada penelitian ini pula dilakukan uji degradasi collagen tipe IV oleh MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil yang dipaparkan whole sel *Perviomonas gingivalis*. Berdasarkan hasil SDS-PAGE didapatkan hasil 97,6 kDa, kemudian dilanjutkan dengan uji Western Blotting diperoleh profil fragmen hasil degradasi collagen tipe IV yang menggunakan MMP-9 dari neutrofil penderita IMA dengan pita sebesar 60 – 80 kDa. Penentuan degradasi tersebut berdasarkan pada pita terendah collagen tipe IV berada pada berat molekul 65 kDa sehingga diasumsikan berat molekul yang terbentuk lebih kecil dari 65 kDa adalah pita hasil degradasi collagen tipe IV. Penentuan degradasi tersebut seperti yang dilakukan oleh Suzanne EG, *et al*²⁰ pada penelitiannya tentang Cleavage of intact type 1 collagen by MMP-1.

Sedangkan pola fragmen hasil degradasi collagen tipe IV yang menggunakan MMP-9 dari neutrofil darah orang sehat menunjukkan berat molekul 60 kDa. Distribusi degradasinya sangat kecil, hal itu mungkin tergantung aktivitas MMP-9 yang diperoleh. Pada neutrofil yang diambil dari orang sehat kemungkinan belum terpapar oleh keadaan inflamasi sebelumnya sehingga kemungkinan proMMP-9 pada neutrofil penderita IMA sudah terbentuk sebelumnya, dalam hal ini paparan whole sel *Perviomonas gingivalis* akan cepat menghasilkan MMP-9 yang aktif. Kemungkinan pula pada MMP-9 yang diperoleh dari neutrofil orang sehat terjadi suatu aktivitas MMP-9 yang parsial sehingga mampu mendegradasi collagen tipe IV walaupun hanya pada berat molekul 60 kDa

Pada proses inflamasi, sel-sel radang yang teraktivasi akan meningkatkan produksi proenzim, diantaranya Matrix Metalloproteinases atau MPs. Proenzim ini dapat diubah menjadi enzim aktif yang menyebabkan lisisnya collagen.³ Apabila proses ini terjadi pada permukaan plak aterosklerotik maka serabut collagen yang melindungi plak akan mengalami lisis sehingga menjadi tipis dan akhirnya mudah ruptur.

MMP-9 atau dikenal sebagai gelatinase B merupakan kelompok gelatinase yang mempunyai berat molekul 92 kDa dan diidentifikasi sebagai suatu gelatin-binding protein yang disintesis oleh sel leukosit. Ekspresi MMP-9 dapat diinduksi oleh pemicu yang adekuat. Diketahui monosit, neutrofil, sel dendritik, limfosit, sel endothelial, sel eplitel dan osteoblast dapat memproduksi gelatinase B.¹³

Mengingat antibody monoklonal yang dibuat tersebut protein antigennya dibuat dari protein fragmentasi collagen type IV yang dipapar dengan metalo proteinase 9 terhadap collagen type IV murni dimana produksi MMP 9 berasal dari isolasi sel monosit dari darah penderita IMA yang dipapar dengan whole sel *Perviomonas gingivalis*. Dengan demikian diharapkan biomarker ini dapat mendeteksi fase awal IMA atau fase dini IMA yang diinfeksi oleh *Perviomonas gingivalis*. Dari laporan penelitian serologis⁸ didapatkan hasil bahwa hampir 100% penderita IMA yang diuji secara serologis menunjukkan reaksi yang positif dengan tes anti *Perviomonas gingivalis*. Sehingga dapat diprediksi bahwa pada darah penderita IMA yang diperiksa tersebut terinfeksi *Perviomonas gingivalis*. Diharapkan pada penelitian berikutnya dapat membuktikan bahwa biomarker antibody fragmentasi collagen type IV dapat mendeteksi fase awal dari IMA yaitu pada saat keluhan angina pectoris serta membandingkan akurasi pada akurasi penderita IMA dibandingkan dengan metode konvensional.

Degradasi collagen tipe IV dapat terjadi secara langsung oleh protease yang dihasilkan oleh mikro-organisme atau bila terdapat inflamasi yang signifikan, akan terjadi degradasi yang lebih besar oleh aktivitas MMPs.³ Diketahui pada struktur MMP-2 dan MMP-9 mempunyai 3 daerah yang sama dari fibronektin tipe II di dalam daerah katalitiknya, diduga pada waktu MMP-9 aktif, maka 3 daerah yang sama dari fibronektin tipe II ini akan berinteraksi dengan kolegen tipe IV, selain itu *C-terminal hemopexin-like domain* yang dimiliki MMP-9 digunakan untuk membelah bentuk collagen yang tripel heliks.¹⁶

Produksi sel limfosit yang dilakukan pada mencit dengan cara melakukan imunisasi menggunakan antigen fragmentasi collagen type IV menggunakan adjuvan freund complete dan incomplete. Secara normal antibody yang dihasilkan memberikan respon terhadap sebagian besar antigen (Ag). Untuk persiapan fusi dilakukan dengan penumbuhan sel myeloma. Kemudian dilakukan fusi untuk membentuk sel

hibridoma. Hasilnya ternyata sel hibridoma tumbuh cukup sehat dan subur dengan memproduksi antibodi. selanjutnya dilakukan seleksi klon hibridoma memilih klon yang terbaik kemudian dilakukan pengujian prototype antibody fragmentasi collagen type IV dengan teknik western blotting dengan munculnya pita sebesar 97,6 kDa (gambar 4) diperkuat dengan teknik elisa mendapatkan hasil yang cukup tinggi sebesar 2,658. Hasil clon yang terbaik dapat memproduksi titer yang tinggi yang dipersiapkan untuk insersi ke intraperitoneal mencit sehingga terbentuk ascites mencit. Kemudian dilakukan pengujian terhadap titer antibody dengan menggunakan teknik Elisa (gambar 5).

Hasilnya berupa monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV sebagai prototype antibody monoklonal. Produksi Ab antara lain ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu pemilihan jenis hewan, dosis dan bentuk Ag, penggunaan adjuvan, perosedur dan jumlah suntikan yang diberikan, serta selang waktu antara dua suntikan yang berurutan. Berdasarkan hasil uji dot blot dari antibodi anti fragment collagen tipe IV dengan antigen fragmen collagen tipe IV telah diperoleh reaksi sampai pengenceran 1/5000 (gambar 6). Hal ini berarti bahwa antibodi anti fragmen collagen tipe IV berinteraksi positif dengan antigen fragmen collagen tipe IV sehingga antibodi yang diperoleh benar merupakan antibodi yang berasal dari induksi antigen fragmen collagen tipe IV.

Uji blotting terhadap 17 serum penderita IMA dengan antibodi anti fragmen collagen tipe IV menunjukkan adanya interaksi positif yang ditandai dengan pita-pita yang tolotan-tolotan dot yang berwarna biru pada semua penderita IMA menunjukkan hasil yang positif sedangkan pada sampel orang normal hasilnya negatif karena tidak terdapat tolotan warna biru (gambar 7).

Penelitian yang kami lakukan adalah penelitian eksperimental murni dengan teknik observasional tanpa analisa data, hanya bersifat ada dan tidaknya reaksi positif terhadap biomarker yang diuji.

Kami tidak menggunakan kontrol positif penderita infeksi *Perviromonas gingivalis*. Sebaiknya harus ada, akan tetapi pada penelitian kami⁸ telah mendapatkan hasil test antara *Perviromonas gingivalis* pada penderita IMA. Sedangkan untuk kontrol penderita infeksi *Perviromonas gingivalis* tanpa IMA belum kami lakukan oleh karena keterbatasan sarana dan finansial dan ini adalah merupakan kelemahan penelitian. Akan tetapi untuk penelitian tahap II akan kami sertakan kontrol infeksi *Perviromonas gingivalis* tanpa IMA.

Kesimpulan : kami menemukan bahwa biomarker monoklonal antibody fragmentasi collagen tipe IV dapat menunjukkan reaksi pada serum darah 12 penderita IMA. Enzim lain seperti CPK CK-MB, Troponin IdanT, mioglobin, juga dapat positif mendeteksi IMA. Jadi biomarker monoklonal antibodi fragmentasi collagen tipe IV yang dibuat untuk uji coba secara kualitatif untuk mendeteksi IMA jugadapat dibuat untuk mendeteksi lebih dini serta untuk penentuan pengujian kualitatif berdasarkan atas peningkatan titer monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV. Pada penelitian yang berikutnya akan digunakan sampel dari penderita angina pectoris untuk menguji bahwa apakah juga menunjukkan hasil positif pada fase awal IMA.

Biomarker kami yang dikenal dengan novel biomarker baru monoklonal antibodi fragmentation collagen tipe IV, juga dapat diprediksi penyebab IMA seperti infeksi mikroorganisme *Perviromonas gingivalis*.

Penelitian yang kami lakukan adalah pengujian biomarker monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV terhadap penderita IMA yang sudah diuji dengan biomarker yang sudah ada dan menunjukkan hasil yang sama. Asumsi kami, bahwa pada pengujian biomarker yang sudah ada, baru menunjukkan reaksi positif (+) bila sudah terjadi IMA oleh karena keluarnya enzim troponin. Sedangkan biomarker baru ini tanpa menunggu keluarnya enzim troponin akan bereaksi positif bila pada darah penderita mengandung antigen fragmentasi collagen type IV yang kami prediksi bisa dideteksi lebih awal. Contohnya penderita angina pectoris pada fase awal IMA. Hal tersebut akan kami laksanakan pada penelitian tahap II. Sekaligus menguji tentang sensitifitas dan spesifisitasnya pada penderita IMA serta pada kelompok kontrol. Dan yang dipakai sebagai Gold Standar adalah pemeriksaan enzim troponin A dan T pada penderita IMA dan kontrol.

Biomarker ini berupa monoklonal antibody fragmentasi collagen type IV dapat divariasikan sesuai dengan kebutuhan. Bisa untuk screening test atau rapid test dengan menggunakan teknik imunohistokimia, yang dimodifikasi menjadi rapid tes. Juga dapat digunakan untuk mengetahui derajat keparahan dari IMA dengan teknik Elisa. Serta dapat pula dijadikan prediktor IMA dengan mengamati titer antibodi fragmentasi collagen type IV dari teknik Elisa. Dapat juga digunakan sebagai pedoman untuk melihat kemampuan antibodi untuk mengikat antigen serta karakter dari

fragmentasi collagen type IV hasil dari ruptur plak yang ada dalam darah penderita IMA dengan teknik dot blot atau imunoblotting.

Penelitian ini lebih difokuskan pada produksi dan pengujian biomarker baru antibody fragmentasi collagen type IV.

Kesimpulan

Kesimpulan yang ditarik dari penelitian ini adalah bahwa monoklonal antibodi fragmentasi collagen tipe IV pada sampel darah pasien IMA dengan teknik dot blot menunjukkan semua sampel darah IMA menunjukkan hasil positif.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh dan hibah yang diperoleh dari Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional. Terima kasih atas dukungan yang diberikan.

Daftar Pustaka

- Braunwald E. Heart Disease a textbook of Cardiovascular Medicine. 5th Edition. United State, America, 1997.
- Ross R., Atherosclerosis - An Inflammatory Disease (review). *New Eng J Med.* 1999; 340: 115-123.
- Romanelli R., Mancini S., Laschinger C., Overall GM, Sodek J, McCulloch CAG. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and Immunity.* 1999; 69 (5):2319-26.
- Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1997; 17:1859-67.
- Ortega N, Werb Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci.* 2002; 115: 4201-14.
- Cimpean S, Calonianu M. Matrix metalloproteinases with role in collagen biodegradation. *Rom J Biol Sci.* 1997; 1 (2): 1 – 14.
- Ameriso SF, Esteban AF, Ramon CL, Gustavo ES. Detection of helicobacter pylori in human carotid atherosclerosis plaques. *Stroke.* 2001; 32 (3):385.
- Muliartha, Ali M. Seroepidemiology to detect IMA related microorganism. *Life Sci J.* 2005; B: 5-8.
- Fong IW. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. *CMAJ.* 2000; 13 (1): 49–56.
- O'Connor S., Taylor C., Campbell L.A., Epstein., and Libby P., 2001. Potential Infectious Etiologies of Atherosclerosis: A Multifactorial Perspective. *CDC Upcoming Issue, (7):5.*
- Burgess, G.W., 1995. Teknologi Elisa Dalam Diagnosis dan Penelitian. Edisi pertama. Gadjah Mada University press. Yogyakarta. p.177-187.
- Abbas A.K., and Lichtman A.H. 1991. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition. The Curtis Center, Philadelphia. P.296-349.
- Opdenakker G., Van den Steen P.E., and Van Damme J., 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 22 (10) : 571-579.
- Kalela A., 2002. Factor Affecting Sen. in Matrix Metalloproteinase-9 with Special Reference to Atherosclerosis. University of Tampere, Tampere. p. 728-730.
- Ramos-DeSimone N., Hahn-Dantona E., Siple J., Nagase H., French D.L., and Quigley J.P., 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274(19): 13066-13076.
- Nagase, Ramos-DeSimone N., Hahn-Dantona E., Siple J., French D.L., and Quigley J.P., 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274(19): 13066-13076.
- Gu Z., M. Kaul., Yan B., Kridel S.J., Cui J., Strongin A., Smith J.W., Liddington R.C., Lipton S.A., 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases : signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297(5584): 1186-1190.
- Weiss S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320 (6) : 365-376.
- Worthly S.G., Osende J.I., Hetft G., Badimon J.J., Fuster V., 2001. Coronary Artery disease: Pathogenesis and Acute Coronary syndrome. The Mount.
- Suzanne E.G., et al 2002. Cleavage of intact type I collagen by MMP-1. *Biochemistry.*