

**PENINGKATAN EKSPRESI GEN TGF- β 1 SEBAGAI PENANDA PROLIFERASI
AORTA VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS AKIBAT INDUKSI
LIPOPOLISAKARIDA : STUDI IN VITRO**

Adzikia Fachrunisyah¹, Rita Hamdani², Hirowati Ali³
^{1,2,3}Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia
adzikiaiffa@gmail.com

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease characterized by accumulation of lipids, macrophage infiltration, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and formation of connective tissue leading to thrombus formation. Lipopolysaccharide (LPS) that contained on the outer membrane of gram-negative bacteria has a role as an inflammatory mediator by the activation of inflammatory cytokines such as TGF- β 1. Previous studies have shown the elevated of TGF- β 1 expression would increase the Smad-dependent and Smad-independent signalling pathway that causes VSMCs phenotypic switching which could increase the proliferation of VSMCs that participates in the pathogenesis of atherosclerosis. This study aimed to analyse the effect of LPS induction on TGF- β 1 gen expression in aortic VSMCs. This study was a true experimental-the post test only control group design using organ culture. The aorta of wistar rats were collected into 12 groups, 6 of which were control groups not induced by LPS and 6 groups treated by LPS 10 μ g/ml for 48 hours. Expression of TGF- β 1 gene was then analyzed using PCR conventional and calculated using ImageJ. The data was then processed into SPSS using independent T-Test. The results showed an increase in TGF- β 1 gene expression treated by LPS group with an average of $7,167 \pm 1,268$. Independent T-Test showed a significant difference between two groups of samples ($p = 0,000$). This study concluded that the increase of TGF- β 1 gen expression has the potential to be a marker of VSMCs proliferation and taking effect in pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, TGF- β 1, Proliferation of VSMCs, LPS.

ABSTRAK

Aterosklerosis adalah sebuah penyakit yang ditandai dengan akumulasi lipid, infiltrasi makrofag, proliferasi dan migrasi vascular smooth muscle cells (VSMCs) serta pembentukan jaringan ikat yang mengakibatkan pembentukan trombus. Lipopolisakarida (LPS) yang terdapat pada membran luar bakteri gram negatif memiliki peran sebagai mediator inflamasi melalui aktivasi sitokin inflamasi seperti TGF- β 1. Penelitian sebelumnya menunjukkan peningkatan ekspresi TGF- β 1 akan meningkatkan jalur sinyal Smad-dependent dan Smad-independent yang menyebabkan terjadinya peralihan fenotipik VSMC yang dapat meningkatkan proliferasi VSMC serta berperan dalam patogenesis aterosklerosis. Penelitian ini

bertujuan untuk menganalisis pengaruh induksi LPS terhadap ekspresi gen TGF- β 1 pada VSMC aorta. Penelitian ini merupakan penelitian dengan *true experimental-the post test only control group design* menggunakan kultur organ. *Aorta tikus wistar* dikumpulkan menjadi 12 kelompok, 6 di antaranya adalah kelompok kontrol yang tidak diinduksi LPS dan 6 kelompok yang diinduksi LPS 10 μ g/ml selama 48 jam. Ekspresi gen TGF- β 1 kemudian dianalisis menggunakan PCR konvensional dan dihitung menggunakan *ImageJ*. Data kemudian diolah ke dalam SPSS dengan menggunakan *independent T-Test*. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen TGF β -1 pada kelompok yang diberi perlakuan LPS dengan rerata 7.167 ± 1.268 . Uji Independen *T-Test* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dua kelompok sampel ($p = 0,000$). Penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan ekspresi gen TGF- β 1 berpotensi sebagai penanda proliferasi VSMC dan berperan dalam *patogenesis aterosklerosis*.

Kata Kunci: *Aterosklerosis, TGF- β 1, Proliferasi VSMCs, LPS.*

A. Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab mortalitas tertinggi di dunia. Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2019 mencatat 17,9 juta kematian akibat penyakit kardiovaskular, di mana 85% di antaranya disebabkan oleh serangan jantung dan stroke akibat aterosklerosis. Di Indonesia, Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018 melaporkan bahwa prevalensi penyakit jantung mencapai lebih dari 2,7 juta jiwa.

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang diawali oleh disfungsi endotel, *infiltrasi lipid* (oxLDL), *adhesi leukosit*, serta *akumulasi plak ateromatosa*. Selain faktor risiko konvensional seperti dislipidemia, hipertensi, diabetes

melitus, dan merokok, sekitar 40% kasus baru aterosklerosis dikaitkan dengan infeksi kronis bakteri gram negatif. *Lipopolisakarida* (LPS) yang berada pada membran luar bakteri gram negatif terbukti menginduksi pelepasan mediator inflamasi serta radikal bebas.

Secara molekuler, LPS berikatan dengan protein CD14 dan mengaktifkan reseptor Toll-like Receptor 4 (TLR4) pada dinding pembuluh darah. Aktivasi ini merangsang produksi sitokin proinflamasi dan profibrotik, salah satunya adalah *Transforming Growth Factor-Beta 1* (TGF- β 1). Peningkatan TGF- β 1 mengaktifkan jalur persinyalan *Smad-dependent* maupun *Smad-independent* (seperti PI3K/Akt), yang memicu peralihan

fenotipik *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMCs) dari tipe "kontraktil" menjadi "sintetik". Fenotip sintetis ditandai dengan peningkatan kemampuan proliferasi, migrasi dari tunika media ke tunika intima, serta sintesis matriks ekstraseluler (ECM).

Meskipun TGF- β 1 memegang peranan krusial dalam migrasi dan proliferasi VSMCs, perannya dalam pembentukan plak aterosklerosis masih terus diteliti karena sifatnya yang ganda (dapat berperan proinflamasi maupun antiinflamasi). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh induksi LPS terhadap peningkatan ekspresi gen TGF- β 1 pada VSMCs aorta tikus secara *in vitro* sebagai penanda proliferasi vaskular pada *aterosklerosis*.

B. Metode Penelitian

Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental - the post-test only control group design*. Eksperimen dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas pada bulan Februari 2023 hingga Maret 2024. Persetujuan etik diperoleh dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran

Universitas Andalas (No. 579/UN.16.2/KEP-FK/2023).

Sampel dan Kelompok Perlakuan

Sampel penelitian adalah jaringan aorta dari tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2–3 bulan dengan berat badan 180–200 gram. Menggunakan perhitungan rumus Federer, sampel dibagi menjadi 12 kelompok kultur organ (*cell dish* berisi $>5 \times 10^5$ sel/ml):

1. Kelompok Kontrol (6 sampel): Kultur organ aorta tanpa induksi LPS.
2. Kelompok Perlakuan (6 sampel): Kultur organ aorta yang diinduksi LPS dosis 10 μ g/ml selama 48 jam.

Kriteria inklusi mencakup jaringan aorta VSMCs yang tumbuh sehat dan berdiferensiasi baik, sedangkan kriteria eksklusi adalah sampel yang terkontaminasi oleh bakteri atau jamur.

Prosedur Laboratorium

1. Organ Kultur: Isolasi aorta dilakukan dari bifurcatio aorta hingga *aorta femoralis*. Aorta dikultur dalam medium DMEM yang ditambah 15% FBS, 100 U/mL penisilin, 100 mg/mL streptomisin, dan 4.500 mg/mL

glukosa pada suhu 37°C dengan 5% CO₂.

2. Isolasi RNA dan Sintesis cDNA:

RNA diisolasi menggunakan reagen TRIzol dan kloroform, diendapkan dengan isopropanol, serta dicuci dengan etanol 70%. RNA disamakan pada konsentrasi 1000 ng. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit SuperScript™ II RTase (iScript cDNA synthesis, Bio-Rad).

3. Amplifikasi PCR & Elektroforesis:

Amplifikasi gen TGF-β1 (Forward: 5'-aaagccctgtatgccgtctc-3',

Reverse: 5'-cagcaacaattcctggcggtt-3')

gen housekeeping GAPDH (Forward: 5'-

acacattgggggtaggaaca-3',

Reverse: 5'-aagggtcatgaccacagtc-3')

dilakukan selama 40 siklus. Visualisasi pita DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 1,5% pada tegangan 100V selama 45 menit.

4. Kuantifikasi dan Analisis Data:

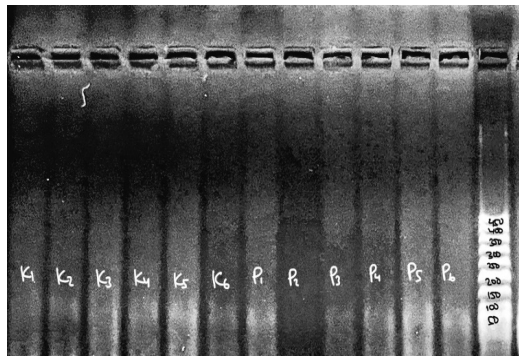
Pengukuran intensitas pita DNA dilakukan secara semi-kuantitatif menggunakan aplikasi ImageJ. Data diuji normalitasnya (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitasnya

(*Levene Test*), lalu dianalisis menggunakan uji *Independent T-Test* pada SPSS.

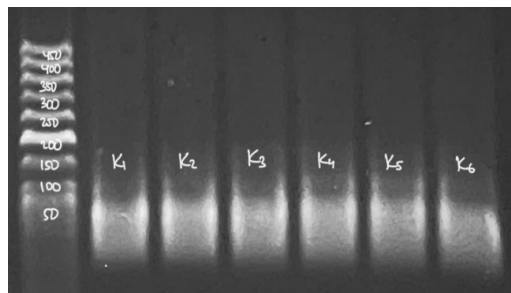
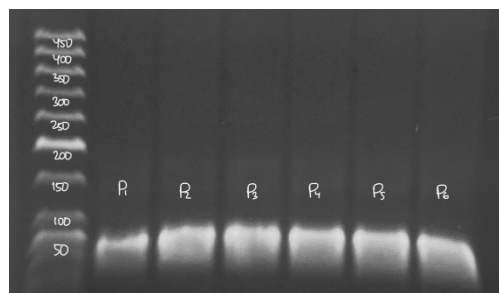
C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pada penelitian ini, dilakukan pemeriksaan elektroforesis pada gen TGF-β1 dan gen GAPDH sebagai kontrol untuk melihat ekspresi gen pada keduanya. Sampel yang terdiri dari masing-masing 6 sampel penelitian tumbuh dengan baik tanpa ada kontaminasi setelah diinkubasi selama 48 jam. Namun, dari hasil elektroforesis didapatkan *smear* yang sedikit kabur pada ekspresi gen TGF-β1 yang dapat dipengaruhi oleh primer yang digunakan, penggunaan PBS (*Phospat Buffer saline*) dan kombinasi inkubasi suhu tinggi yang dapat mengisolasi DNA virus. Meskipun demikian, setelah dilakukan analisis data menggunakan SPSS, hasil akhir penelitian menyatakan bahwa terdapat pengaruh induksi LPS 10 µg/ml terhadap peningkatan ekspresi gen TGF-β1.

Hasil Elektroforesis



Gambar 5.1 Ekspresi gen TGF- β 1 kelompok perlakuan (P₁-P₆) dan kelompok kontrol (K₁-K₆) pada gel agarose 1,5%



Gambar 5.2 Ekspresi gen GAPDH kelompok perlakuan (P₁-P₆) dan kelompok kontrol (K₁-K₆) pada gel agarose 1,5%

Berdasarkan gambar di atas didapatkan hasil elektroforesis pada gen TGF- β 1 dan gen GAPDH yang diinduksi LPS dosis 10 μ g/ml dengan masing-masing 6 kelompok kontrol dan 6 kelompok perlakuan yang terbaca dengan angka 130 bps untuk TGF β -1 dan 207 bps untuk GAPDH.

Penilaian pita masing-masing gen dilakukan menggunakan aplikasi

ImageJ dan dilanjutkan dengan melihat perbandingan untuk mengetahui ekspresi gen TGF- β 1 pada masing-masing sampel.

Ekspresi Gen TGF- β 1 pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan yang di induksi LPS dosis 10 μ g/ml

Tabel Rata-Rata Kadar Ekspresi Gen TGF- β 1 Pada Kelompok Kontrol.

Kelompok	Ekspresi	Mean $\pm$ Standar Deviasi (pg/ml)
Kontrol	1	2,260
	2	2,357
	3	2,795
	4	3,155
	5	4,345
	6	2,807
		2,953 $\pm$ 0,756

Berdasarkan tabel, rata-rata kadar ekspresi gen TGF- β 1 pada kelompok kontrol tanpa induksi LPS didapatkan sebesar 2,953 $\pm$ 0,756 pg/ml.

Tabel Rata-Rata Kadar Ekspresi Gen TGF- β 1 Pada Kelompok Perlakuan.

Kelompok	Ekspresi	Mean $\pm$ Standar Deviasi (pg/ml)
Perlakuan	1	8,229
	2	5,288
	3	7,603
	4	5,854
	5	8,141
	6	7,890
		7,167 $\pm$ 1,268

Berdasarkan tabel, rata-rata kadar ekspresi gen TGF- β 1 pada kelompok perlakuan dengan induksi LPS didapatkan sebesar $7,167 \pm 1,268$ pg/ml.

Analisis Hasil Ekspresi Gen TGF- β 1

Hasil ekspresi gen TGF- β 1 masing-masing kelompok kemudian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Hasil uji normalitas didapatkan data terdistribusi normal dengan $p > 0,05$. Data yang terdistribusi normal kemudian dilakukan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Hasil uji homogenitas didapatkan data homogen dengan $p > 0,05$. Selanjutnya data dilakukan uji *Independent T Test* untuk mengetahui perbedaan ekspresi gen TGF- β 1 pada kelompok kontrol tanpa induksi LPS dan kelompok perlakuan dengan induksi LPS.

Tabel Analisis Ekspresi Gen TGF- β 1 pada jaringan aorta VSMCs.

Kelompok	Level Ekspresi TGF- β 1 (pg/ml)	Uji Independent T Test
Kontrol	$2,953 \pm 0,756$	$p < 0,000$
Perlakuan	$7,167 \pm 1,268$	

***p < 0,05 signifikan**

Berdasarkan tabel, diketahui bahwa p value didapatkan sebesar 0,00 sehingga dapat disimpulkan secara statistik terdapat pengaruh yang bermakna terhadap perbedaan perlakuan yang diberikan pada kedua variabel penelitian dengan hasil nilai rata-rata pada kelompok kontrol sebesar $2,953 \pm 0,756$ pg/ml dan kelompok perlakuan mengalami peningkatan menjadi $7,167 \pm 1,268$ pg/ml.

Pembahasan

Peran LPS Terhadap Peningkatan Ekspresi TGF- β 1

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *Lipopolisakarida* (LPS) dengan dosis 10 μ g/ml selama 48 jam secara signifikan meningkatkan kadar ekspresi gen TGF- β 1 pada kultur organ aorta tikus Wistar ($7,167 \pm 1,268$ pg/ml) dibandingkan kelompok kontrol tanpa LPS ($2,953 \pm 0,756$ pg/ml) dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Peningkatan ini membuktikan bahwa paparan komponen dinding sel luar bakteri Gram-negatif memicu respon molekuler berupa peningkatan transkripsi gen sitokin profibrotik pada sel vaskular.

Secara mekanistik, LPS berikatan dengan *Lipopolysaccharide-Binding Protein* (LBP) dan protein CD14, yang kemudian memfasilitasi interaksinya dengan kompleks reseptor Toll-like Receptor 4 (TLR4) dan MD-2 pada permukaan sel. Aktivasi kaskade TLR4 ini merangsang sinyal hilir (melalui jalur MyD88-dependent maupun *independent*) yang mengaktifkan faktor transkripsi seperti NF- κ B, sehingga meregulasi peningkatan ekspresi dan sintesis *Transforming Growth Factor-Beta 1* (TGF- β 1). Temuan ini sejalan dengan studi literatur yang menunjukkan bahwa paparan endotoksin memperkuat kaskade sinyal TGF- β 1 pada berbagai model jaringan yang mengalami respon inflamasi kronis.

Peran Peningkatan TGF- β 1 Dalam Proliferasi VSMCs

Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF- β 1) merupakan sitokin multifungsi yang memegang peranan krusial dalam mengatur homeostasis dan pemulihan jaringan pembuluh darah. Dalam keadaan fisiologis, *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMCs) pada tunika media berada dalam fenotip "kontraktil" yang

ditandai dengan laju proliferasi sangat rendah dan diferensiasi sel yang stabil. Namun, peningkatan konsentrasi TGF- β 1 akibat stimulasi kondisi patologis bertindak sebagai pemicu utama peralihan fenotipik (*phenotypic switching*).

Pengikatan TGF- β 1 pada reseptor permukaan (T β RI/T β RII) mengaktifkan jalur persinyalan Smad-dependent (Smad2/3) serta jalur *Smad-independent* seperti *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK/ERK) dan PI3K/Akt. Aktivasi kaskade molekuler ini menurunkan penanda diferensiasi kontraktil (seperti α -SMA dan SM22a) serta meningkatkan fenotip "sintetik". Fenotip sintetik ini dicirikan oleh peningkatan laju sintesis matriks ekstraseluler (kolagen dan proteoglikan), kemampuan migrasi dari tunika media ke tunika intima, serta peningkatan laju proliferasi sel secara progresif.

Peran LPS Terhadap Peningkatan Proliferasi VSMCs

Induksi LPS pada pembuluh darah tidak hanya memicu respon imun lokal, tetapi secara langsung mempercepat proliferasi VSMCs melalui kaskade inflamasi yang saling berkaitan. Selain menginduksi

produksi TGF- β 1, interaksi LPS-TLR4 meningkatkan aktivasi Rac-1/Akt dan merangsang pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) serta sitokin proinflamasi lain seperti TNF- α , IL- β 1, dan IL-6. Lingkungan mikro yang kaya akan mediator inflamasi dan stres oksidatif ini bertindak sebagai mitogen kuat bagi VSMCs.

Kombinasi antara peningkatan ekspresi TGF- β 1 dan pelepasan mediator akibat induksi LPS secara kumulatif menstimulasi VSMCs untuk terus membelah dan berproliferasi. Proliferasi berlebihan dari VSMCs berfenotip sintetik ini menyebabkan akumulasi sel dan pembentukan matriks di bawah lapisan endotel, yang menjadi cikal bakal penebalan intima patologis (*neointimal hyperplasia*) serta pembentukan fibrous cap pada plak aterosklerosis. Dengan demikian, peningkatan ekspresi gen TGF- β 1 akibat induksi LPS mengonfirmasi keterlibatan paparan kuman atau endotoksin bakteri dalam menggerakkan proliferasi vaskular pada patogenesis awal aterosklerosis.

D. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh

induksi *Lipopolisakarida* (LPS) terhadap ekspresi gen TGF- β 1 pada *Vascular Smooth Muscle Cells* (VSMCs) aorta tikus Wistar, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Rata-rata kadar ekspresi gen TGF- β 1 pada kelompok kontrol (tanpa induksi LPS) adalah sebesar $2,953 \pm 0,756$ pg/ml.
2. Rata-rata kadar ekspresi gen TGF- β 1 pada kelompok perlakuan yang diinduksi LPS 10 μ g/ml selama 48 jam mengalami peningkatan signifikan menjadi $7,167 \pm 1,268$ pg/ml.
3. Induksi LPS secara signifikan ($p = 0,000$) meningkatkan ekspresi gen TGF- β 1 pada VSMCs aorta. Peningkatan ekspresi gen TGF- β 1 ini merefleksikan peralihan fenotipik VSMCs dari tipe kontraktile ke sintetik yang memicu proliferasi sel vaskular, sehingga berpotensi menjadi penanda molekuler awal pada *patogenesis aterosklerosis*.

DAFTAR PUSTAKA

- American Heart Association. (2022). Heart disease and stroke statistics - 2022 update. Diakses pada 28 Februari 2023, dari <https://professional.heart.org/en/science-news/heart-disease->

- and-stroke-statistics-2022-update
- Balitbangkes RI. (2018). Laporan Riset Kesehatan Dasar 2018 nasional. Jakarta: Lembaga Penerbit Balitbangkes.
- Centner, A. M., Bhide, P. G., & Salazar, G. (2020). Nicotine in senescence and atherosclerosis. *Cells*, 9(4), 1035.
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 95(11), 1153–1165.
- Datu, O., & Sumalong, F. P. (2020). Efek pemberian alpha lipoic acid pada endotel tikus putih yang diinduksi lipopolisakarida. *Pharmakon*, 9(1), 125–130.
- Erizon, E., & Karani, Y. (2020). HDL dan aterosklerosis. *Human Care Journal*, 5(4), 1123.
- Fuadiyah, D., Ratnawaty, R., & Soebijakto, B. A. (2017). Pengaruh lama paparan LPS (lipopolisakarida) *Porphyromonas gingivalis* sebagai induktor periodontitis terhadap kadar LDL dan HDL tikus Wistar (*Rattus norvegicus*). *E-Prodenta Journal of Dentistry*, 1(2), 54–67.
- Garg, R., Aggarwal, S., Kumar, R., & Sharma, G. (2015). Association of atherosclerosis with dyslipidemia and co-morbid conditions: A descriptive study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 163–168.
- Gorabi, A. M., Kiaie, N., Khosrojerdi, A., Jamialahmadi, T., Al-Rasadi, K., Johnston, T. P., ... Sahebkar, A. (2022). Implications for the role of lipopolysaccharide in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 32(8), 525–533.
- Hermendy, B. E., & Pawarti, D. R. (2017). Peran transforming growth factor beta (TGF- β) pada rinitis alergi. *Jurnal THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga*, 10(1), 27–36.
- Jebari-Benslaiman, S., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J. R., Alloza, I., Vandenbroeck, K., ... Martín, C. (2022). Pathophysiology of atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3346.
- Jiang, D., Yang, Y., & Li, D. (2017). Lipopolysaccharide-induced vascular smooth muscle cells proliferation: A new potential therapeutic target for proliferative vascular diseases.

- Cell Proliferation, 50(2), e12332.
- Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., ... Fazio, S. (2019). The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Endotext*. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151.
- Maharani, A., Sujarwoto, Praveen, D., Oceandy, D., Tampubolon, G., & Patel, A. (2019). Cardiovascular disease risk factor prevalence and estimated 10-year cardiovascular risk scores in Indonesia: The SMARThealth Extend study. *PLoS ONE*, 14(4), e0215219.
- Mulyani, G. T. (2003). Peranan transforming growth factor- β dalam pembentukan lesi aterosklerotik pada tikus putih yang diberi diet aterogenik. *Jurnal Sain Veteriner*, 21(1), 40–41.
- Oktomalioputri, B., Darwin, E., & Decroli, E. (2016). Pengaruh lama pemberian diet tinggi kolesterol terhadap kadar LDL dan TGF- β serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar. *Andalas Journal of Health*, 5(1), 2–6.
- Pirillo, A., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2019). Biological consequences of dysfunctional HDL. *Current Medicinal Chemistry*, 26(9), 1644–1664.
- Puspaseruni, K. (2021). Tatalaksana dislipidemia terkait penyakit kardiovaskular aterosklerosis (ASCVD): Fokus pada penurunan LDL-c. *Cermin Dunia Kedokteran*, 48(10), 395.
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927–946.
- Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Medica Indonesiana*, 39(2), 86–93.
- Sala, L. L., Prattichizzo, F., & Ceriello, A. (2019). The link between diabetes and atherosclerosis. *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2_suppl), 15–24.
- Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G., & He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 319(3), H613–H631.
- Tyrrell, D. J., Goldstein, D. R., & Ageing. (2021). Ageing and

atherosclerosis: Vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6. *Nature Reviews Cardiology*, 18(1), 58–68.

Watson, M. G., Byrne, H. M., Macaskill, C., & Myerscough, M. R. (2018). A two-phase model of early fibrous cap formation in atherosclerosis. *Journal of Theoretical Biology*, 456, 123–136.

Yin, Q., Jiang, D., Li, L., Yang, Y., Wu, P., Luo, Y., ... Li, D. (2017). LPS promotes vascular smooth muscle cells proliferation through the TLR4/Rac1/Akt signalling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(6), 2189–2200.

Zhang, J. (2022). Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 23(2), 73.

Zhuge, Y., Zhang, J., Qian, F., Wen, Z., Niu, C., Xu, K., ... & Zhang, C. (2020). Role of smooth muscle cells in cardiovascular disease. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2741–2751.