

EFEK PEMBERIAN KALSITRIOL ($1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$) TERHADAP KADAR CYCLIC AMP KULTUR KARDIOMIOSIT

Cut Sidrah Nadira*

Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Malikussaleh

Lhokseumawe-Aceh, 24352, Indonesia

*Corresponding Author: sidrahnadira@gmail.com

Abstrak

Defisiensi kalsitriol dapat meningkatkan faktor risiko terjadinya penyakit kardiovaskular. Hal ini dikaitkan dengan penurunan fosforilasi troponin I (TnI) di Ser23/24. Fosforilasi TnI di Ser23/24 berperan dalam regulasi Mg-ATPase miofilamen dan sensitivitas miofilamen terhadap Ca^{2+} yang selanjutnya mempengaruhi respon frekuensi dan kekuatan ejeksi ventrikel. Ser23/24 TnI ini diketahui merupakan substrat spesifik PKA. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari apakah efek kalsitriol terhadap peningkatan fosforilasi TnI mempunyai jalur mekanisme aksi yang juga melalui cAMP/PKA. Penelitian ini merupakan eksperimental murni menggunakan rancangan *pre-post test with control group* dengan sampel kultur primer kardiomiosit *Sprague-Dawley* jantan dewasa. Kardiomiosit diinkubasi kalsitriol selama 5 menit kemudian kadar cAMP diukur menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian tidak menunjukkan adanya korelasi antara peningkatan TnI terfosforilasi dengan kadar cAMP ($p > 0,05$). Penelitian ini masih belum dapat membuktikan adanya jalur aktivasi cAMP/PKA oleh kalsitriol dalam mekanisme peningkatan TnI terfosforilasi pada kardiomiosit.

Kata kunci: cAMP; kalsitriol; kontraktilitas; kardiomiosit; troponin I.

CALCITRIOL ($1\alpha,25$ (OH) $_2$ D $_3$) EFFECT ON CYCLIC AMP LEVEL OF CULTURED CARDIOMYOCYTES

Abstract

Calcitriol deficiency increases the risk of cardiovascular diseases. It is associated with decreasing phosphorylated-TnI at Ser23/24. Phosphorylated Ser23/24-TnI contributes in regulation of myofilament Mg-ATPase and Ca²⁺ sensitivity which control ventricular ejection force and frequency response. Ser23/24-TnI is known to be one of PKA specific substrat. The aim of this research is to studi if the calcitriol effect on increasing cardiomyocytes phosphorylated-TnI involves cAMP/PKA signaling cascade. This is a true experimental study by pre-post test with control group design. It used primary cultured cardiomyocytes of adult male Sprague-Dawley ventricles as the samples. Cardiomyocytes was incubated in calcitriol for 5 minutes, then cAMP level was measured by ELISA method. The results showed decreasing of cAMP level in each groups, and there was also no significant correlation observed between increased phosphorylated-troponin I and cAMP level in this research ($p>0,05$). In this research,the involvement of cAMP/PKA signaling cascade in elevated cardiomyocytes phosphorylated-TnI was still undetermined.

Keywords : calcitriol; contractility; cardiomtocytes; cAMP; phosphorylated-troponin I.

Pendahuluan

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa defisiensi vitamin D berkaitan dengan peningkatan faktor risiko terjadinya penyakit kardiovaskular. Rendahnya kadar 25(OH)D $_3$ serum berkorelasi positif dengan derajat klasifikasi gagal jantung menurut *New York Heart Association* (NYHA).¹ Kardiomiosit pada kondisi gagal jantung tidak mampu meningkatkan kemampuan kontraksi dan kecepatan relaksasinya jika diberi stimulus stress ataupun latihan.^{2,3} Penurunan kontraktilitas ini karena adanya penurunan densitas reseptor β dan *down regulation* dari reseptor β , penurunan aktivitas PKA serta fosforilasi troponin I pada Ser23/24.^{4,5} Penurunan fosforilasi troponin I akan menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan pergerakan filament (*sliding filament*) dan peningkatan sensitivitas kalsium yang berakibat pada penurunan kemampuan kontraksi dan kecepatan relaksasi kardiomiosit.^{4,5}

Peran kalsitriol pada jalur konduksi sinyal, kontraksi miokardium, serta fungsi diastolik^{6,7} terjadi melalui regulasi influks kalsium; pelepasan kalsium cadangan intraseluler dari retikulum sarkoplasma; modulasi adenilat siklase, fosfolipase C, dan aktivitas protein kinase; serta perubahan status fosforilasi protein seluler seperti phospholamban dan troponin I.^{7,8,9} Fosforilasi troponin I dapat diperantarai oleh protein kinase A (PKA) maupun protein kinase C (PKC).¹⁰

Jalur mekanisme kalsitriol dalam transduksi sinyal dan kontraktilitas kardiomiosit masih diperdebatkan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mempelajari keterlibatan jalur cAMP/PKA oleh kalsitriol terhadap peningkatan fosforilasi TnI pada kultur kardiomiosit tikus.

Metode

Kultur Kardiomiosit

Kultur primer kardiomiosit berasal dari tikus jantan galur Sprague-Dawley usia dewasa (≥ 16 minggu). Metode isolasi dan kultur kardiomiosit yang dipakai pada penelitian ini menggunakan modifikasi metode Yamashita *et al.* (1997), dimana jantung tikus dieksisi, dicuci dengan larutan PBS dingin kemudian dicacah sampai dengan ukuran 1-2 mm.¹¹ Enzim yang digunakan pada proses digesti ini adalah kolagenase 1 mg/mL¹¹ dan medium yang digunakan adalah Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) yang mengandung FBS 10%, Penisillin/Streptomisin 1%, dan Fungizone 0,5%. Hasil kultur kardiomiosit kemudian disubkultur di wadah kultur 24 sumuran menggunakan medium kultur yang mengandung FBS 10% pada 24 jam pertama dan FBS 5% pada 24 jam kedua. Kultur kardiomiosit tersebut selanjutnya dibagi menjadi kelompok pretest (tanpa perlakuan), K(-) (ethanol 0,2% + aminofilin 63,3 $\times 10^{-6}$ M), D1 (kalsitriol 0,5 $\times 10^{-8}$ M + aminofilin 63,3 $\times 10^{-6}$ M), D2 (kalsitriol 1 $\times 10^{-8}$ M (4,2 ng/mL) + aminofilin 63,3 $\times 10^{-6}$ M), D3 (kalsitriol 2 $\times 10^{-8}$ M (8,4 ng/mL) + aminofilin 63,3 $\times 10^{-6}$ M), dan K(+) (epinefrin 2 $\times 10^{-6}$ M + 63,3 $\times 10^{-6}$ M). Waktu inkubasi untuk setiap kelompok adalah 5 menit. Jumlah sampel yang digunakan adalah 4 sampel untuk kelompok pre-test dan 4 sampel untuk masing-masing kelompok post test. Jumlah kardiomiosit yang digunakan untuk pemeriksaan kadar cAMP adalah 4 $\times 10^5$ sel per sampel.

Analisis kadar cAMP

Kadar cAMP diperiksa menggunakan teknik ELISA sesuai dengan manual produk (*Rat/Mouse cAMP parameter assay kit - RnD #KGE012*), dengan hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan pmol/mL

Statistik

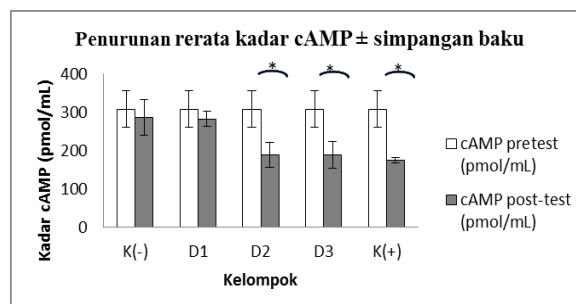
Data kadar cAMP dianalisis menggunakan *Wilcoxon signed ranks test* dan Uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Korelasi antara peningkatan fosforilasi troponin I dan kadar cAMP dianalisis menggunakan uji korelasi Pearson.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Kadar cAMP

Penurunan kadar cAMP yang bermakna ($p < 0,05$) dijumpai pada kelompok D2, D3, dan K(+) (Gambar 1).



Gambar 1. Diagram batang rerata kadar cAMP ± simpangan baku sebelum dan sesudah inkubasi: ethanol 0,2% + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M (K(-)); kalsitriol $0,5 \times 10^{-8}$ M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M (D1); kalsitriol 10^{-8} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M (D2); kalsitriol 2×10^{-8} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M (D3); dan epinefrin 2×10^{-6} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M (K(+)) selama 5 menit. Pada kelompok D2, D3, dan K(+) dijumpai penurunan kadar cAMP yang bermakna.

Perbedaan kadar cAMP yang bermakna ($p < 0,05$) dijumpai antara kelompok K(-) dengan kelompok D2, D3, dan K(+); dan antara kelompok D1 dengan kelompok D2 dan D3 ($p < 0,05$) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil analisis Kruskal-Wallis kadar cAMP setelah perlakuan selama 5 menit

		N	Median (minimum dan maksimum) (pmol/mL)	P
Kadar cAMP post test	K(-)	4	287.84 (227.38 - 340.63) ^{a,b,c}	0,010
	D1	4	274.49 (270.74 - 311.70) ^{d,e}	
	D2	4	213.32 (165.80 - 245.12) ^{a,d}	
	D3	4	175.09 (165.80 - 239.72) ^{b,e}	
	K(+)	4	177.55 (165.80 - 179.90) ^c	

Uji Kruskal-Wallis. Keterangan: K(-): kelompok ethanol 0,2% + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M; D1: kelompok kalsitriol $0,5 \times 10^{-8}$ M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M; D2: kelompok kalsitriol 10^{-8} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M; D3: kelompok kalsitriol 2×10^{-8} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M; dan K(+): kelompok epinefrin 2×10^{-6} M + aminofilin $63,3 \times 10^{-3}$ M.

Uji post hoc Mann-Whitney:

- Kadar cAMP kelompok K(-) berbeda bermakna dengan kelompok D2
- Kadar cAMP kelompok K(-) berbeda bermakna dengan kelompok D3
- Kadar cAMP kelompok K(-) berbeda bermakna dengan kelompok K(+)

d. Kadar cAMP kelompok D1 berbeda bermakna dengan kelompok D2

e. Kadar cAMP kelompok D1 berbeda bermakna dengan kelompok D3

Uji korelasi Spearman antara kadar cAMP dengan kelompok dosis kalsitriol menunjukkan adanya korelasi yang kuat dengan arah korelasi negatif ($p = 0,002$, $r = -0,785$).

Hubungan antara fosforilasi troponin I dan kadar cAMP

Uji korelasi Pearson menunjukkan tidak adanya korelasi yang bermakna ($p > 0,05$) antara peningkatan fosforilasi

troponin I dan penurunan kadar cAMP setelah inkubasi kalsitriol selama 5 menit.

Pembahasan

Regulasi respon frekuensi dan kekuatan pada proses ejeksi ventrikel oleh troponin I diduga melalui proses transduksi langsung sinyal fosforilasi-yang-diinduksi oleh PKA yang dihantarkan troponin I ke sisi regulatorik troponin C. Ini akan mengubah sensitifitas dan afinitas troponin C terhadap ion kalsium, meningkatkan siklus pertukaran ion kalsium pada troponin C dan meningkatkan percepatan relaksasi.¹² Semakin panjang sarkomer otot teregang, maka semakin tinggi pula sensitivitas troponin C terhadap ion kalsium, taut antar filament juga semakin sempit dan pelepasan dan pengambilan kembali ion kalsium dari dan oleh retikulum sarkoplasma juga semakin besar. Keadaan ini terjadi sebagai mekanisme persiapan untuk menghasilkan kekuatan kontraksi yang lebih besar pada depolarisasi berikutnya.^{13,14}

Pemberian kalsitriol akut secara langsung meregulasi kecepatan dan kekuatan kontraksi kardiomyosit.⁶ Peningkatan percepatan kontraksi dan relaksasi ini terjadi bersamaan dengan peningkatan fosforilasi troponin I dan *phospholamban* kardiomyosit.⁷ Fosforilasi troponin I dapat diperantarai oleh protein kinase A (PKA) maupun protein kinase C (PKC).¹⁰ Untuk mengetahui keterlibatan jalur cAMP/PKA dalam mekanisme aksi kalsitriol terhadap fosforilasi troponin I, pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar cAMP. Akan tetapi tidak dijumpai adanya peningkatan kadar cAMP pada kelompok D1,D2,D3 maupun K(+). Keterlibatan cAMP/PKA dalam mekanisme aksi kalsitriol terhadap peningkatan troponin I yang terfosforilasi pada penelitian ini belum dapat dibuktikan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kurang optimalnya dosis aminofilin yang diberikan

sebagai penghambat fosfodiesterase (PDE), sehingga degradasi cAMP terjadi dengan cepat dan tidak lagi dijumpai adanya peningkatan saat dilakukan pemeriksaan ELISA. Kemungkinan lain yang mungkin terjadi adalah adanya aktivasi jalur aksi kalsitriol selain cAMP/PKA. Sisi fosforilasi spesifik Ser 23/24 sebelumnya diketahui sebagai sisi fosforilasi spesifik troponin I yang menjadi target PKA. Akan tetapi, beberapa isozim PKC ternyata dapat menyerupai aktivitas PKA dengan memfosforilasi substrat spesifik PKA troponin I di Ser23/24.^{15,16} Ser23/24 troponin I dapat difosforilasi oleh PKC- δ ¹⁰ dan juga PKC β _{II}.² Fosforilasi troponin I di Ser23/24 baik oleh PKA maupun PKC berperan dalam regulasi sensitivitas miofilamen terhadap Ca²⁺ dan Mg-ATPase miofilamen.^{15,16}

Kesimpulan

Pemberian kalsitriol dapat meningkatkan fosforilasi troponin I secara bermakna, akan tetapi keterlibatan cAMP/PKA dalam mekanisme aksi kalsitriol tersebut belum dapat dibuktikan pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Pilz S, März W, Wellnitz B, Seelhorst U, Fahrleitner-Pammer A, Dimai HP et al. Association of vitamin D deficiency with heart failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patients referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3927-3935.
2. Messer AE, Jacques AM, Marston SB. Troponin I phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(1):247-59.

3. Pi Y, Zhang D, Kemnitz KR, Wang H, Walker JW. Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament Ca²⁺ sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium. *J Physiol* 2003;552(3):845-57.
4. Messer AE, Marston SB. Investigating the role of uncoupling of troponin I phosphorylation from changes in myofibrillar Ca²⁺-sensitivity in the pathogenesis of cardiomyopathy. *Front Physiol* 2014;5:315.
5. Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PAW. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 1997;96(5):1495-500.
6. Zhao G, Simpson RU. Interaction between vitamin D receptor with caveolin-3 and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in adult rat cardiomyocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1-2):159-63.
7. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41(2):350-9.
8. Ün İ, Kurt AH, Batuş A, Büyükaşar K. Alfacalcidol suppresses α -receptor-mediated vasoconstriction via an endothelium dependent mechanism. *Turk J Med Sci* 2013;43:238-244.
9. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the T-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology* 2008;149(2):558-564.
10. Rapundalo ST. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 1998;38(3):559-88.
11. Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, Igarashi J, Taniguchi N, Tada M et al. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1805-1813.
12. Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. The unique function of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369(1): 82-87.
13. Hoit BD, Walsh RA. Normal physiology of the cardiovascular system. In Fuster V, Walsh RA, O'Rourke RA, Poole-Wilson P, editors. *Hurst's The Heart*. New York: McGraw-Hill, 2008:83-109.
14. Guyton AC, Hall JE. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed. 11. Jakarta: EGC, 2008.
15. Noland TA, Guo X, Raynor RL, Jideama NM, Averyhart-Fullard V, Solaro J, Kuo JF. Cardiac troponin I mutants: phosphorylation by protein kinases C and A and regulation of Ca²⁺-stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1. *J Biol Chem* 1995;270:25445-54.
16. Swiderek K, Jaquet K, Meyer HE, Schachtele C, Hofmann F, Heilmeyer LMG. Sites phosphorylated in bovine cardiac troponin T and I: Characterization by ³¹P-NMR spectroscopy and phosphorylation by protein kinases. *Eur J Biochem* 1990;190:575-82.