

PENGARUH PERBEDAAN JUMLAH PAPARAN HIPOKSIA HIPOBARIK INTERMITEN TERHADAP DAYA TAHAN JANTUNG MELALUI EKSPRESI PROTEIN BCL-2, MNSOD, LDH, CASPASE-3 DAN KADAR ASAM LAKTAT PADA TIKUS JANTAN *SPRAQUE DAWLEY*

ACHMAD HIDAYAT

Universitas Padjadjaran

email korespondensi: hidayat_achmad@yahoo.com

Abstract

Hipoksia hipobarik intermiten (HHI) sering dialami oleh para awak pesawat. Jika hipoksia berlanjut menyebabkan apoptosis. Tujuan penelitian menganalisis efek paparan HHI terhadap stres oksidatif, glikolisis dan apoptosis melalui ekspresi Bcl-2, MnSOD, LDH dan Caspase-3 pada sel jantung tikus. Penelitian eksperimental dilakukan pada 5 kelompok tikus jantan Spraque Dawley, yang masing-masing terdiri dari tujuh ekor tikus. Kontrol tidak dipaparkan HHI, sedangkan empat kelompok yang lain dipaparkan HHI dengan interval satu minggu menggunakan ruang udara bertekanan rendah (RUBR). Tekanan RUBR berturut-turut disesuaikan setara ketinggian 35.000 kaki selama 1 menit, 25.000 kaki selama 5 menit, dan 18.000 kaki selama 25 menit. Ekspresi protein Bcl2, MnSOD, LDH dan Caspase-3 sel jantung tikus diperiksa dengan metoda Imunohistokimia dan Western Blot. Hasil pemeriksaan kadar asam laktat dengan Elisa cenderung menurun dengan makin seringnya terpapar hipoksia hipobarik. Dari pemulasan Imunohistokimia dapat diinterpretasi ekspresi protein Bcl-dan MnSOD tersebut cenderung meningkat dengan makin seringnya terpapar hipoksia hipobarik, sebaliknya ekspresi protein LDH dan Caspase-3 cenderung menurun. Selanjutnya terdapat korelasi negatif antara kadar asam laktat dengan ekspresi protein Bcl-2 dan MnSOD ($r=-0,52$; $r=-0,41$), sedangkan terhadap ekspresi protein LDH dan caspase-3 berkorelasi positif ($r=0,65$; $r=0,79$). Terdapat korelasi yang sangat kuat antara kadar asam laktat di sirkulasi dengan ekspresi protein Bcl-2, MnSOD, LDH dan Caspase-3 ($R=0,84$, $p<0,00$) Begitu pula hasil pemeriksaan Western Blot.

Kata kunci: hipoksia hipobarik intermiten, Bcl-2, MnSOD, LDH, Caspase-3

Abstract

Intermittent hypobaric hypoxia (IHH) is often experienced by airplane crews. When this hypoxia continues, it may cause apoptosis. This study aimed to analyze effects of IHH on oxidative stress and apoptosis through the measurement of MnSOD and caspase-3 levels. Experimental study was conducted during February to April 2010 on five groups of Spraque Dawley male rats. Each group consisted of seven rats. Control group was not exposed by IHH, while the other four groups were exposed by IHH with one week interval using type I chamber flight profile. The pressure in chambers was consecutively adapted to altitude 35.000 feet for a minute, 25.000 feet for five minutes, and 18.000 feet for 25 minutes. MnSOD protein and Caspase-3 expression of cardiomyocytes were examined by Immunohistochemistry & Western blot method. Result: The trend of decreasing Lactic acid level with the higher frequency of IHH exposure. From the Immunohistochemistry staining expression of Bcl-2 and MnSOD protein show an increasing trend according with the higher frequency of IHH exposures, while a reverse trend was found for LDH and Caspase-3 protein expressions. In detail what can be seen from the experiment is that has negative correlation between lactic acid level with Bcl2 and MnSOD protein expression ($r=-0,52$; $r=-0,41$) in the same time there have positive correlation between lactic acid level with LDH and Caspase-3 protein expression ($r=0,65$; $r=0,79$) There are correlation between lactic acid level with Bcl-2, MnSOD, LDH and Caspase-3 protein expressions ($R=0,84$, $p<0,00$) which also concurred with the Western Blot result.

Keywords: intermitten hypobaric hypoxic, Bcl-2, MnSOD, LDH, Caspase-3

Pendahuluan

Pada ketinggian penerbangan 30.000 kaki, tekanan udara di dalam kabin pesawat maksimal dapat disesuaikan hanya sampai setara ketinggian 6000-8000 kaki (560-590 mmHg). Jika tekanan dipaksa sesuai dengan ketinggian permukaan laut (720 mmHg), diperlukan alat kompresor oksigen yang besar dan kemungkinan menyebabkan ledakan. Akan tetapi, manusia dapat beradaptasi terhadap kekurangan oksigen dalam keadaan tekanan yang rendah tersebut, sehingga tidak terjadi gangguan fisiologis.

Hipoksia hipobarik sering dialami para penerbang dan awak pesawat. Jika hipoksia di atas berlanjut, terjadi aktivasi gen HIF-1 (*hypoxia induced factor-1*) dan gangguan pada mitokondria yang dapat menyebabkan terjadi metabolisme anaerobik dan apoptosis sel. Gen HIF-1 akan menginduksi ratusan gen, antara lain gen

BNIP3 (Bcl-2 family pro apoptosis), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), dan sebagainya. Sedangkan gangguan pada mitokondria akan menyebabkan kebocoran membran luar, sehingga sitokrom C akan ke luar sel dan memacu apoptosis melalui kaskade caspase. Di samping itu pada keadaan hipoksia, produksi ROS (*reactive oxygen species*) meningkat di mitokondria, sehingga diperlukan antioksidan, seperti MnSOD, untuk mencegah terjadinya stres oksidatif. Juga pada hipoksia akan terjadi proses glikolisis dimana akan dihasilkan asam laktat, dan untuk merubah menjadi piruvat diperlukan protein LDH.

Adaptasi terhadap hipoksia hipobarik dapat dilakukan dengan upaya hipoksia hipobarik intermiten (HHI). Mekanisme HHI untuk adaptasi dalam mengatasi kekurangan oksigen, termasuk peran protein seperti

Bcl2, MnSOD, LDH dan caspase-3 belum banyak diteliti, termasuk di Indonesia. Untuk mengetahuinya, pada fase awal perlu dilakukan penelitian pada hewan coba tikus. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis efek paparan HHI terhadap stres oksidatif, glikolisis dan apoptosis sel jantung tikus dengan memeriksa ekspresi Bcl2, MnSOD, LDH dan caspase-3 serta kadar asam laktat.

Metode

Penelitian dilakukan di Lembaga Kesehatan Penerbangan dan Ruang Angkasa Dr. Saryanto (Lakespra Saryanto) Jakarta pada hewan coba tikus jenis Sprague Dawley jantan berumur dua minggu dengan berat antara 150-200 gr. Penelitian dilakukan pada Februari sampai April 2010.

Hewan coba tikus terdiri dari satu kelompok kontrol yang tidak mendapat paparan hipobarik hipoksia dan empat kelompok yang mendapat paparan hipobarik hipoksia. Masing-masing kelompok terdiri dari tujuh ekor tikus.

Keempat kelompok perlakuan dipaparkan hipobarik hipoksia menggunakan *type I chamber flight profile* (ruang udara bertekanan rendah – RUBR) yang dimodifikasi. Semua tikus di kelompok perlakuan dimasukkan ke dalam RUBR untuk kemudian tekanan RUBR disesuaikan setara ketinggian 35.000 kaki (11.660m) selama 1 menit, disusul ketinggian 25.000 kaki (8.330m) selama 5 menit, dan selanjutnya disesuaikan setara ketinggian 18.000 kaki (6.000m) selama 25 menit. Keempat kelompok perlakuan mendapatkan paparan dengan interval satu minggu setiap paparan, sebagai berikut: kelompok pertama mendapat satu kali paparan; kelompok kedua mendapat dua kali paparan; kelompok ketiga mendapat tiga kali paparan; dan kelompok keempat mendapat empat kali paparan.

Paparan pertama terhadap kelompok pertama dilakukan pada ketinggian 18.000 kaki (6.000m). Setelah tampak gejala hipoksia yang ditandai dengan tidak ada reaksi dan ekor tikus tidak bergerak, dilakukan anestesi umum dengan ketamin intramuskuler dan jantung tikus dikeluarkan sebagai sediaan.

Pengambilan sediaan untuk kelompok lain dilakukan pada paparan kedua untuk kelompok kedua, pada paparan ketiga untuk kelompok ketiga, dan paparan keempat untuk kelompok keempat.

Ekspresi protein diperlihatkan dengan metode *Western Blot* menggunakan reagen sebagai antibodi primer, yakni *Bcl-2 Rabbit polyclonal to Bcl-2* (Abcam[®] Katalog ab7973) *MnSOD Rabbit polyclonal to Superoxide Dismutase 2* (Abcam[®] Katalog ab86087), *LDH goat polyclonal to LDH* (Abcam[®] Katalog ab71494), *caspase-3 Rabbit polyclonal to caspase-3* (Abcam[®] katalog ab59388), dan antibodi sekunder seperti *Goat polyclonal to Rabbit IgG-H&L* (Abcam[®] katalog ab6721) serta *Rabbit polyclonal to Goat IgG-H&L* (Abcam Katalog ab6741). Interpretasi untuk imuno-histokimia

dengan nilai intensitas dan nilai distribusi, sedang untuk *Western Blot* adalah dengan mengkonversi pita yang terekam dalam gel menjadi data ordinal dalam skala piksel menggunakan program Adobe Photoshop.

Analisis statistik menggunakan tes t dengan program Stata versi 9. Penelitian ini mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

Hasil dan Pembahasan

Ekspresi protein Bcl-2

Pada Tabel 1 terlihat juga bahwa dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan satu HHI terjadi peningkatan apoptosis sel yang terlihat pada penurunan ekspresi protein Bcl-2 (P=0,029). Selanjutnya, dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan dua, tiga dan empat kali HHI terjadi penurunan apoptosis sel yang terlihat pada peningkatan ekspresi protein Bcl-2 (masing-masing P=0,563, P=0,861 dan P=0,745). Dengan demikian terjadi pengurangan apoptosis sel setelah paparan duakali HHI (P=0,563).

Ekspresi protein MnSOD

Pada Tabel 1 terlihat bahwa dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan satu kali HHI terjadi penurunan ekspresi protein MnSOD (P=0,038), selanjutnya ekspresi protein MnSOD meningkat pada subjek yang mendapat paparan dua, tiga dan empat kali (masing-masing P=0,427, P=0,693 dan P=0,873). Bahkan pada paparan dua kali HHI ekspresi protein MnSOD hampir mendekati kontrol (P=0,427). Dengan demikian terjadi peningkatan ekspresi protein MnSOD yang berarti terjadi penurunan stres oksidatif setelah paparan dua kali HHI (P=0,0427)

Tabel 1. Skoring ekspresi protein Bcl2 dan MnSOD dengan metode Imunohistokimia

Kelompok	Ekspresi protein Bcl-2 (n=35)		Ekspresi protein MnSOD (n=35)	
	Rerata ± SD	P*	Rerata ± SD	P*
Kontrol	6,44 ± 0,509	Rujukan	6,19 ± 0,379*	Rujukan
Hipoksia hipobarik				
Satu kali	4,57 ± 0,684* ^Δ	0,029	5,14 ± 0,538* ^Δ	0,038
Dua kali	6,23 ± 0,500	0,563	5,99 ± 0,429	0,427
Tiga kali	6,38 ± 0,525	0,563	6,04 ± 0,779	0,693
Empat kali	6,59 ± 0,459 ^Δ	0,745	6,14 ± 0,689 ^Δ	0,873

*Uji tes t

Ekspresi protein LDH

Pada Tabel 2 terlihat juga bahwa dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan satu, dua, tiga dan empat kali HHI terjadi peningkatan apoptosis sel yang terlihat pada peningkatan ekspresi protein LDH (masing-masing P=0,000, P=0,002, P=0,001 dan P=0,320). Selanjutnya, dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan tiga kali HHI belum terjadi penurunan apoptosis sel yang terlihat pada peningkatan ekspresi protein LDH. Dengan demikian terjadi pengurangan apoptosis sel cenderung setelah paparan empat kali HHI (P=0,320).

Eksresi protein Caspase-3

Pada Tabel 2 terlihat juga bahwa dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan satu dan dua kali HHI terjadi peningkatan apoptosis sel yang terlihat pada peningkatan ekspresi protein caspase-3 (masing-masing $P=0,000$ dan $P=0,000$). Selanjutnya, dibandingkan dengan kontrol, subjek yang mendapat paparan tiga dan empat kali HHI terjadi penurunan apoptosis sel yang terlihat pada penurunan ekspresi protein caspase-3 (masing-masing $P=0,019$ dan $P=0,000$). Dengan demikian terjadi pengurangan apoptosis sel setelah paparan tiga kali HHI ($P=0,019$).

Tabel 2. Skoring ekspresi protein LDH dan Caspase-3 dengan metode imunohistokimia

Kelompok	Ekspresi protein LDH (n=35)		Ekspresi protein Caspase-3 (n=35)	
	Rerata ± SD	P*	Rerata ± SD	P*
Kontrol	4,39 ± 0,433*	Rujukan	2,33 ± 0,330*	Rujukan
Hipoksia hipobarik				
Satu kali	6,38 ± 0,525* ^Δ	0.000	5,09 ± 0,917* ^Δ	0.001
Dua kali	6,09 ± 0,568*	0.002	4,40 ± 0,535*	0.000
Tiga kali	5,99 ± 0,429*	0.001	3,77 ± 1,003*	0.136
Empat kali	4,71 ± 0,557 ^Δ	0.320	2,95 ± 0,487* ^Δ	0.340

*Uji tes t

Pada penelitian ini terlihat bahwa ekspresi protein Bcl-2 dan MnSOD menurun pada kelompok paparan HHI dua kali dan tiga kali dibanding dengan kelompok kontrol, selanjutnya ekspresi protein ini meningkat pada paparan HHI lebih dari satu kali. Ekspresi protein Bcl-2 pada kelompok paparan dua kali hampir mendekati ekspresi Bcl-2 pada kelompok kontrol, juga ekspresi protein MnSOD pada kelompok paparan HHI dua kali hampir mendekati ekspresi protein MnSOD pada kelompok kontrol. Peningkatan ekspresi protein Bcl2 dan MnSOD terjadi seiring dengan peningkatan frekuensi paparan HHI. Hal ini berarti protein Bcl2 sebagai protein yang menjaga permeabilitas membran luar mitokondria dan protein MnSOD antioksidan pada keadaan adanya stres oksidatif dipergunakan lebih sedikit pada peningkatan frekuensi paparan hipoksia hipobarik yang intermiten.

Kondisi tersebut sesuai teori Gustafson bahwa terjadi beberapa reaksi biokimia di dalam sel, terutama di mitokondria. Organel sel tersebut merupakan sumber utama ROS hasil aktifitas transpor elektron. Sebanyak 0,2-2% molekul oksigen dikonsumsi mitokondria selama proses respirasi dan diubah menjadi superoksida utama dalam bentuk kompleks I dan III. Molekul oksigen bersifat elektrofilik dan terjadi produksi superoksida pada saat oksigen ditangkap oleh elektron dari kompleks I dan/atau ubisemiquinone yang terletak di kompleks III.

Peningkatan konsentrasi oksigen pada reperfusion jaringan menyebabkan kehilangan kemampuan menurunkan kofaktor pada rantai pernafasan dan meningkatkan pembentukan ROS mitokondria. Selanjutnya, penurunan aktifitas kompleks I akan memperlihatkan peningkatan superoksida. Tingginya densitas mitokondria pada sel kardiomyosit dan aktifitas fosforilasi oksidatif kemudian meningkatkan

jumlah superoksida secara bermakna. Dalam keadaan normal superoksida didetoksifikasi oleh enzim antioksidan MnSOD, katalase, dan glutathion peroksidase (GPx). Stres oksidatif terjadi jika peningkatan ROS tidak diantisipasi oleh sistem antioksidan, Smith dan Murray menyimpulkan bahwa SOD (superoksida dismutase) sangat penting dalam regulasi superoksida sebagai hasil fosforilasi oksidatif.

Tingkat reduksi-oksidasi (redoks) pada sel telah terbukti berperan penting di berbagai macam apoptosis, termasuk kematian sel oleh *tumor necrosis factor* (TNF), ultra-iolet, serta berkurangnya faktor pertumbuhan dan seramide. Diketahui bahwa gen Bcl-2 dapat memberi proteksi pada sel dari *oxidant-induced apoptosis*, meskipun sampai sekarang belum jelas apakah hal ini disebabkan oleh fungsi *scavenging* atau regulasi terhadap produksi ROS.

Produksi ROS oleh mitokondria akan meningkat jika terjadi blok terhadap transpor elektron, kemudian akan terjadi hiperpolarisasi yang dapat menyebabkan respon pada sinyal *Fas* dan ekspresi berlebihan dari Bax yang berikutnya dapat terjadi apoptosis. Burtschers melaporkan bahwa jika terjadi hipoksia berlanjut maka akan terjadi kelebihan ion kalsium intrasel dan penurunan antioksidan yang akan mendorong terbentuknya ROS pada mitokondria. Keadaan itu akan makin menambah hiperpolarisasi. Sebaliknya, jika hipoksia terjadi secara intermiten, maka terbentuknya ROS akan mengikuti pola intermiten dan akan terjadi adaptasi oleh sel, sehingga reaksi penggunaan antioksidan pun menjadi lebih efisien.

Di sisi lain, penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi protein LDH dan caspase-3 cenderung menurun dengan makin seringnya terpapar hipoksia. Hal ini karena peran asam laktat yang terjadi akibat glikolisis yang memerlukan protein LDH untuk menjadi piruvat dan peran Bcl-2 yang akan berubah pada keadaan hipoksia. Bcl-2 berfungsi menjaga permeabilitas membran luar mitokondria, dan jika Bcl-2 turun maka akan terjadi kebocoran sitokrom C dan masuk pada kaskade caspase.

Ternyata pada keadaan hipoksia, gen yang sangat sensitif yaitu HIF-1 tetap stabil. Selanjutnya melalui hypoxia response element, sejumlah gen akan diinduksi oleh gen HIF-1, termasuk di antaranya BNIP3. Gen BNIP3 akan bersaing dengan Bcl-2. Jika rasio BNIP3 dan Bcl-2 lebih besar, maka terjadi celah pada membran, sehingga sitokrom-c akan keluar dan kemudian masuk dalam kaskade caspase. Dengan HHI maka ekspresi HIF-1^R dapat stabil dan terdegradasi secara teratur. Keadaan ini juga mempengaruhi ekspresi ROS dan ekspresi BNIP3 yang akan berubah-ubah, sehingga ekspresi MnSOD sebagai antioksidan, Bcl-2 dan LDH pun berubah sesuai dengan hipoksia intermiten, dan selanjutnya protein caspase-3 pun akan berubah dan cenderung menurun. Dengan menurunnya caspase-3 menyebabkan apoptosis sel kardiomyosit akan menurun dan akan terjadi efek kardioprotektif.

Simpulan

Pada peningkatan paparan HHI terjadi penurunan stres oksidatif, glikolisis maupun apoptosis sel jantung tikus jantan Spraque Dawley, sehingga terjadi peningkatan daya tahan jantung.

Daftar Pustaka

- Achmad Hidayat. *Kedokteran penerbangan kemarin, hari ini, dan esok*. Pengukuhan Dokter Spesialis Kedokteran Penerbangan. Jakarta. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2005.
- Sadikin M. Alam berkembang jadi guru: *kendali genetik terhadap cekaman oksidatif [Pengukuhan guru besar ilmu Kedokteran Universitas Indonesia]*. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.
- Gustafson AB, Gotlieb R. Heart mitochondria: *gates of life and death*. *Cardiovascular Research*. 2008;77; 2: 334-43.
- Graham RM, Frazier DP, Thomson JW, Haliko S, Li H, Wasserlauf B. dkk. *A unique pathway of cardiac myocytes death caused by hypoxia acidosis*. *J Exp Biol*. 2004; 207: 3189-200.
- Markas Besar Angkatan Udara. *Buku penunjuk teknis TNI AU tentang indoktrinasi dan latihan aerofisiologis awak pesawat ABRI/TNI AU*. Jakarta: TNI AU; 1998.
- Hernowo BS. Laboratory manual. *Proceedings of the Workshop molecular biology, biotechnology and immunohistochemistry*. Bandung; Universitas Padjadjaran; 2009.
- Bakonyi T, Radak Z. *High altitude and free radical*. *J Sport Sci Med*. 2004; 3: 64-9.
- Chang JC, Kou SJ, Lin WT, Liu CS. *Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis*. *World J Cardiol*. 2010; 6: 150-9.
- Smith RA, Murray MP. *Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ*. *Annal New York Acad Sciences*. 2010; 1201: 96-103.
- Eemenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. *Regulations of genes expression by HIF-1 alpha, in Wiley, Chichester. Signaling pathways in acute oxygen sensing*, Novartis Foundation Symposium. 2005; 272: 2-14.
- Burtscher M, Pachinger M, Ehrenbourg I, Mitterbauer G, Faulhaber M, Puhlinger R, dkk. *Intermittent hypoxia increased exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease*. *Int J Cardiol*. 2004; 96: 247-54.
- Derek J, Hausenloy, Marisol Ruiz, *Not just the powerhouse of the cell, emerging roles for mitochondria in the heart*. *Cardiovasc Research*. 2010; 88: 5-6.
- Yang J, Wang J, Zhu S, Chen X, Wu H, Yang D, Zhang J. *C-reactive protein augments hypoxia induced apoptosis through mitochondria-dependent pathway in cardiac myocytes*. *Mol Cell Biochem*. 2008; 310: 215-26.
- Gradwell DP. Hypoxia and hyperventilation. In: *Rainford DJ, Gradwell DP, editors. Ernsting's Aviation Medicine*. 4th ed. London: Hodder Arnold. 2006. p. 41.
- Chalah A, Khosrovi FR. *The mitochondria death pathway*. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 615: 25-45.
- Andreas G. *Caspase are central initiator and executioner of apoptosis*. *Apo Review*. 2003 [sitasi 16 September 2010]. Diunduh dari <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>