

EFEK PAPARAN GLUKOSA KONSENTRASI TINGGI TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS ISOZIM PROTEIN KINASE C (PKC)-ALPHA PADA KULTUR SEL STROMA PROSTAT

¹Basuki B. Purnomo, ¹I Wayan Widharse, ²Aulani'am

¹Lab. Ilmu Bedah/SMF Urologi, FK Universitas Brawijaya/RS Dr. Saiful Anwar, Malang

²Lab. Biokimia Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Objective: To prove that glucose treatment in human prostatic stromal cells (HPSC) culture would increase PKC alpha isozyme activity. **Materials and Methods:** Primary cultures of HPSC were obtained from patients with bladder outlet obstruction caused by benign prostatic enlargement. The effects of various concentrations of glucose (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 micro-Mol) on PKC-alpha isozyme activity were examined quantitatively by spectrophotometry methods. **Results:** Spectrophotometry analysis, which is used to assess isozyme activity quantitatively, showed that exposures to various doses of glucose resulted in increased isozyme activity. The increment of activity is linear with the increment of glucose dose. There is a strong correlation between glucose doses and PKC-alpha activity, with $R^2 = 0,91$. **Conclusion:** At different concentrations glucose increases PKC-alpha isozyme activity of HPSC.

Keywords: Protein kinase, human prostatic stroma cell culture, high glucose, dynamic component.

Correspondence: Basuki B. Purnomo, c/o: Lab. Ilmu Bedah/SMF Urologi, FK Universitas Brawijaya/RS Dr. Saiful Anwar. Jl. J.A. Suprpto No. 2, Malang.

PENDAHULUAN

Keluhan miksi atau *lower urinary tract symptoms* (LUTS) yang dikemukakan oleh pasien hiperplasi prostat benigna atau BPH, terdiri atas keluhan gangguan pengosongan (*emptying*) dan gangguan penyimpanan (*storage*) urine oleh kandung kemih.¹ Hal ini terjadi akibat obstruksi saluran uretra prostatika yang semakin lama menyebabkan perubahan struktur dan fungsi kandung kemih.¹⁻³ Telah diketahui bahwa obstruksi saluran kemih ini disebabkan oleh komponen statis, yakni massa prostat yang membesar dan atau komponen dinamis berupa kekuatan (tonus) otot sfingter uretra interna maupun otot polos prostat itu sendiri yang secara fungsional mempersempit lumen uretra.^{2,3}

Dari berbagai pengamatan klinik dikatakan bahwa keluhan LUTS yang dinyatakan oleh pasien BPH yang juga menderita diabetes mellitus (DM) lebih berat daripada yang tidak menderita.⁴⁻⁶ Penelitian klinik yang dilakukan oleh Michel *et al* (2000) didapatkan bahwa pasien BPH yang menderita DM menunjukkan keluhan yang lebih berat daripada pasien BPH non DM pada usia yang sama.⁴

Diabetes yang sudah berlangsung lama dapat menyebabkan disfungsi kandung kemih, akibat suatu neuropati otonomik, yang semakin lama terjadi denervasi fungsional sistem otonomik.⁵ Kegagalan fungsi detrusor menyebabkan menurunnya laju maksimum aliran urine dan tersisnya urine di dalam kandung kemih pasca miksi.⁶

Pembesaran prostat jinak atau BPH memberikan keluhan yang hampir mirip, dengan patomekanisme yang sedikit berbeda, yakni masalah utama bukan pada kegagalan fungsi detrusor, tetapi pada obstruksi leher kandung kemih yang semakin lama mengakibatkan kegagalan fungsi detrusor.¹⁻³ Pengaruh DM pada berbagai organ telah banyak dipelajari. Tikus yang telah dibuat DM dengan pemberian streptozotocin (STZ) menunjukkan regresi kelenjar prostat.⁷⁻⁹ Masih belum ada kejelasan tentang pengaruh dosis glukosa tinggi terhadap komponen dinamis kelenjar prostat. Hal ini tidak mustahil bahwa selain pengaruhnya pada kontraktilitas otot detrusor sendiri, glukosa mungkin berpengaruh terhadap kontraktilitas otot polos (stroma) prostat, yaitu yang bertanggung jawab terhadap komponen dinamis obstruksi pada uretra prostatika.

Proliferasi dan kontraksi sel banyak dihubungkan dengan peran enzim Protein Kinase C (PKC).¹⁰⁻¹³ Penelitian yang dilaporkan oleh Preston & Haynes (2003) menunjukkan bahwa kontraksi sel otot polos prostat setelah mendapat stimulasi obat alfa adrenergik dimediasi oleh isozim PKC-alfa, melalui dibukakannya kanal kalsium tipe L.¹³ Demikian pula halnya dengan proliferasi sel stroma prostat yang diteliti oleh Guh *et al* (1998), ternyata juga dimediasi oleh isozim PKC alfa.¹¹

Pengaruh kadar gula tinggi pada berbagai jenis sel tubuh mempengaruhi transduksi sinyal intraseluler dengan meningkatkan kadar diasilgliserol (DAG) dan PKC.^{11,14-16} Paparan glukosa kadar tinggi terhadap sel otot polos prostat mungkin juga berpengaruh terhadap kontraktilitas atau proliferasi sel stroma prostat, melalui mekanisme yang mirip dengan sel otot polos vaskular. Oleh karena itu, penelitian pada kultur sel stroma prostat yang diambil dari pasien BPH bergejala ini, bertujuan membuktikan bahwa paparan glukosa pada berbagai konsentrasi dapat meningkatkan aktivitas isozim PKC-alfa.

TUJUAN PENELITIAN

Membuktikan bahwa paparan glukosa pada kultur sel stroma prostat dapat meningkatkan aktivitas isozim protein kinase C (PKC)-alfa.

BAHATAN CARA

Jaringan prostat diperoleh dari pasien BPH bergejala yang menjalani reseksi prostat transuretra (TURP).¹³ Dipilih hasil kerokan (*chip*) yang paling besar, dicuci dengan larutan garam fisiologis, dan membuang jaringan yang terbakar karena kerokan listrik. *Chips* prostat dimasukkan ke dalam medium RPMI 1640 (mengandung 200 U/mL penisillin, 0,2 µg/mL streptomisin, dan 1 µg/mL fungizone).

Tahap pertama dilakukan pembiakan sel stroma prostat, yakni *chips* dicuci kembali menggunakan RPMI 1640 yang mengandung *Gentamycin* 50 mg, diulang 3 – 4 kali, kemudian dicacah hingga ukuran ± 1 mm lalu dimasukkan ke dalam media RPMI yang mengandung *collagenase* tipe I 0,5 mg/ml yang sudah disaring dengan saringan 0,2 µ (seluruh jaringan terendam media). Diinkubasi dalam inkubator CO₂ bersuhu 37°C selama 18 jam. Setelah itu dipindahkan dalam *tube* 15 ml, disentrifuge 1000 rpm 1 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan PBS yang mengandung gentamicin, diulang sebanyak 3 kali. Endapan ditanam pada media kultur RPMI + FBS 10% dalam *plate* selama 14 hari. Sel yang telah

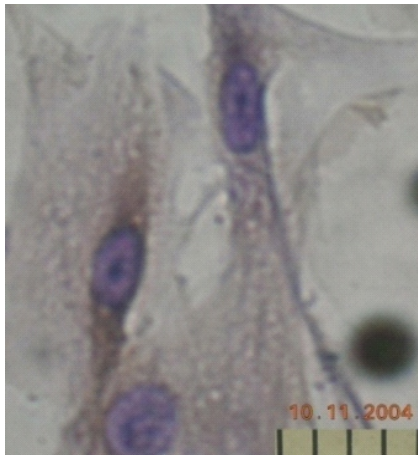
konfluen dilakukan pengujian dengan pewarnaan imunositokimia untuk membuktikan bahwa sel tersebut adalah suatu sel stroma prostat yang mengekspresikan isozim PKC-alfa. Di samping itu sel dipapar dengan glukosa dari dosis 0 (kontrol), 5, 10, 15, 20, 25, dan 35 mMol, dan dilakukan isolasi isozim PKC-alfa dari sel stroma, yang selanjutnya ditentukan aktivitasnya dengan metode spektrofotometer.

Tahap selanjutnya dilakukan pewarnaan imunositokimia, yakni meletakkan sel stroma prostat yang telah konfluen pada obyek gelas. Kemudian dilakukan fiksasi dengan metanol absolut selama 5 menit. Dicuci dengan PBS pada pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida (dalam DI atau *distilled water*) selama 5 – 10 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Direndam pada 1% bovine serum albumin (BSA)/NGS dalam PBS selama 10 – 30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibodi primer selama satu jam pada suhu ruang [bermacam-macam antibodi primer yang dipakai yaitu (1) *rabbit anti human PKC-α*, (2) *α-smooth muscle actin*], kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibodi sekunder anti rabbit IgG selama satu jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*) selama 30 – 60 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan zat pewarna kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 10 – 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam *DI water* selama 3 kali 5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan Meyer hematoxilen eosin selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan air kran selama 3 kali 5 menit, aquades selama 3 kali 5 menit. Dikeringkan dan dilakukan *mounting*. Pengamatan dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel/100 sel dengan dilakukan perulangan sebanyak 3 kali.

Tahap yang terakhir adalah isolasi dan penentuan aktivitas isozim PKC-alfa. Hasil kultur sel dari berbagai pengamatan ditambah dengan *buffer* ekstrak pH 7,4 yang mengandung sukrosa 0,25 M dan imidazol 3 mM sebanyak 10x volumenya. Selanjutnya dihomogenkan dengan alat vortex, disonikasi selama 15 menit, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, temperatur 4°C selama 1 jam. Supernatan yang diperoleh, ditentukan aktivitasnya dengan metode spektrofotometri sesuai metode dari Dewi (2000).¹⁷

HASIL PENELITIAN

Hasil imunositokimia sel stroma prostat disajikan pada gambar 1, terlihat sel berbentuk *spindle* dan mengekspresikan isozim PKC-alfa yang terwarnai dengan merah pada sitosol dan perinuklear.



Gambar 1. Ekspresi isozim PKC-alfa pada sel stroma prostat pada pewarnaan imunositokimia. 1 bar=0,001 mm.

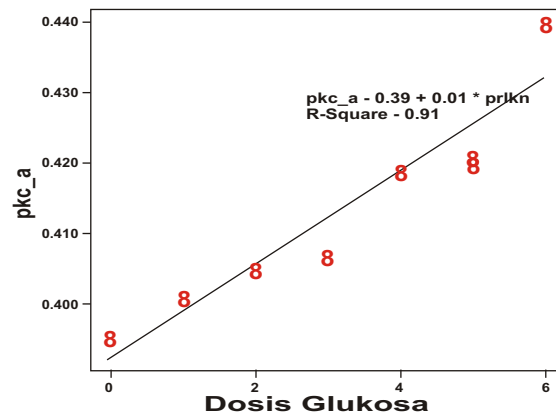
Perhitungan aktivitas isozim PKC-alfa menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi glukosa yang dipaparkan, aktivitasnya semakin meningkat, seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata aktivitas isozim PKC-alfa setelah terpapar glukosa dari berbagai dosis

Dosis glukose (mMol)	Rerata aktivitas isozim PKC-alfa dari 4 sample ($\bar{x} \pm SE$) Unit
Kontrol (0)	0,39465±0,000253
5	0,40050±0,000289
10	0,40450±0,000289
15	0,40675±0,000250
20	0,41850±0,000289
25	0,42000±0,000408
35	0,43950±0,000289

Dari analisis statistik *multiple comparisons dependent variable* PKC-alfa, Tukey HSD didapatkan nilai probabilitas $p=0,000$, hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna rerata peningkatan aktivitas enzim dengan paparan glukosa dari dosis 5, 10, 15, 20, 25, dan 35 mmol.

Untuk mencari korelasi antara dosis glukosa dengan aktivitas enzim disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik hubungan antara dosis glukosa yang dipaparkan pada sel stroma dengan aktivitas PKC-alfa. Terdapat korelasi di antara variabel dengan $R^2=0,91$.

PEMBAHASAN

Pasien BPH bergejala yang disertai penyakit DM merasakan keluhan yang lebih berat daripada yang tidak menderita DM.⁴⁻⁶ Telah diketahui bahwa kedua penyakit tersebut masing-masing dapat mengakibatkan keluhan miksi yang mirip, yakni menurunkan laju pancaran urine dan meningkatkan residu urine pasca miksi. Dalam hal ini, DM menyebabkan kelainan primer pada kandung kemih,^{5,6} sedangkan BPH kelainan primernya adalah pada penyempitan saluran uretra.^{2,3} Lebih jauh diuraikan bahwa diabetik sistopati ini adalah manifestasi dari neuropati perifer yang diikuti dengan perubahan histopatologi dan fungsi kandung kemih.⁵ Penelitian terhadap otot polos kandung kemih pada binatang coba tikus yang dibuat DM menunjukkan adanya peningkatan respon kontraksi otot terhadap rangsangan listrik (*elictrical field stimulation*/EFS) maupun rangsangan dengan nor-epinefrin.^{18,19}

Pengaruh DM pada berbagai organ telah banyak diungkapkan dengan berbagai mekanisme mediator yang berperan dalam merusak organ tersebut, di antaranya adalah melalui peningkatan kadar DAG dan aktivitas enzim PKC, yang keduanya berperan dalam transduksi sinyal intraseluler dalam kontraksi dan proliferasi sel. Peningkatan aktivitas enzim PKC-alfa akibat DM yang berkepanjangan, menyebabkan kerusakan berbagai sel atau organ, di antaranya retina, ginjal, jantung, bahkan terganggunya pertumbuhan suatu embrio.^{14,15,20}

Pengaruh paparan glukosa dosis tinggi menyebabkan regresi kelenjar prostat pada tikus,⁷⁻⁹ hal ini disebabkan kemungkinan karena diabetes meningkatkan ekspresi *transforming growth factor* (TGF) beta,⁹ yakni suatu

protein yang menekan pertumbuhan suatu organ. Pada penelitian lain didapatkan bahwa pada tikus yang dibuat DM terjadi peningkatan ekspresi *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF),⁸ suatu *growth factor* yang bersifat mitogenik pada sel stroma maupun epitel prostat. Berkurangnya volume prostat ini mungkin akan mengurangi efek statis obstruksi saluran uretra, namun belum jelas tentang struktur histologis prostat yang berkurang ukurannya ini. Tidak menutup kemungkinan bahwa justru komponen sel stroma yang meningkat, sehingga dapat meningkatkan komponen dinamis.

Ekspresi isozim PKC-alfa pada sel otot polos prostat telah banyak diungkapkan, baik sebagai mediator kontraksi maupun proliferasi sel.^{11,13} Sodium nitroprusid (SNP), suatu donor nitrik oksid (NO) mampu menurunkan aktivitas enzim PKC pada kultur sel otot polos prostat, yang selanjutnya menyebabkan penurunan laju proliferasi sel otot tersebut.¹¹

Peranan isozim PKC-alfa pada kontraktilitas sel otot polos prostat ditunjukkan pada kultur sel stroma prostat. Paparan fenilefrin, yaitu suatu obat adrenergik alfa agonis menyebabkan peningkatan kadar inositol tri fosfat (IP3), ekspresi kalsium intrasel, translokasi isozim PKC ke permukaan sel membran, dan kontraksi sel stroma prostat.¹³ Ditunjukkan pula bahwa antagonis adrenergik alfa mampu menghambat kontraksi otot polos melalui mekanisme yang sama.

Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa paparan glukosa mampu meningkatkan aktivitas isozim PKC-alfa, dan semakin tinggi kadar glukosa semakin tinggi pula aktivitasnya. Terdapat korelasi antara variabel tersebut dengan $R^2 = 0,91$. Oleh karena itu mungkin pengaruh DM pada saluran kemih sebelah bawah, tidak hanya menyebabkan kelainan yang permasalahan primernya pada kandung kemih (*storage factor*), tetapi juga dapat menyebabkan kelainan pada prostat (*voiding factor*).

Selain dapat meningkatkan kontraktilitas otot polos pada berbagai organ, peningkatan aktivitas isozim ini dapat memacu produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan menghambat enzim *inducible nitric oxide synthase* (i-NOS) pada otot polos vaskuler.^{21,22} Kemampuan relaksasi otot polos yang dimediasi oleh nitrik oksid (NO) pada DM juga terganggu, hal ini terbukti pada otot polos korpus kavemosum tikus wistar yang dibuat DM, sehingga dapat menerangkan mekanisme terjadinya disfungsi ereksi pada pasien DM.²³

Dapat diringkaskan bahwa penyakit DM pada saluran kemih sebelah bawah tidak hanya menyebabkan kelainan pada kandung kemih saja, namun perlu dipikirkan adanya

penyulit pada prostat, terutama yang mengganggu komponen dinamis, yaitu kegagalan otot polos atau stroma prostat dalam relaksasi. Banyak mekanisme yang dapat menerangkan terjadinya kelainan itu, yakni melalui peningkatan produksi ROS, penurunan iNOS, atau kegagalan NO, peningkatan aktivitas enzim PKC, atau mungkin melalui mekanisme lain yang belum dibahas.

SIMPULAN

Paparan glukosa dosis tinggi mampu meningkatkan aktivitas isozim PKC-alfa. Di samping itu tidak menutup kemungkinan bahwa peningkatan aktivitas enzim ini dapat meningkatkan kontraksi sel stroma prostat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Glasser DB, Carson C 3rd, Kang JH, Laumann EO. Prevalence of storage and voiding symptoms among men aged 40 years and older in a US population-based study: Results from the Male Attitudes Regarding Sexual Health Study. *Int J Clin Pract* 2007; 61(8): 1294-300.
2. Roehrborn CG, McConnell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Campbell's Urology, edisi ke 7. editor: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, dan Wein AJ. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002. p. 1297-330.
3. Nordling J, Artibani W, Hald T, Horn T, Keuppens F, Levin R, et al. Pathophysiology of the urinary bladder in obstruction and ageing. In: Chatelain Ch, Denis L, Foo KT, Khoury S, McConnell J (editors). Benign prostatic hyperplasia. 5th International consultation on BPH. London: Health Publication Ltd; 2001. p. 519-35.
4. Michel MC, Mehlburger L, Schumacher H, Bressel H, Goepel M. Effect of diabetes on lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia. *J. Urol* 2000; 163: 1725-9.
5. Öztürk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 69.
6. Boon TA, Van Venrooij GE, Eckhardt MD. Effect of diabetes mellitus on lower urinary tract symptoms and dysfunction in patients with benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep* 2001; 2(4): 297-301.
7. Ramasamy S, Hodgson WC, Ventura S. Protein kinase C and the sub-sensitivity and sub-reactivity of the diabetic rat prostate gland to noradrenaline. *European Journal of Pharmacology* 2002; 434: 151-61.
8. Wang ZJ, Ikeda K, Wada Y, Foster Jr HE, Weiss RM, Latifpour J. Expression and location of basic fibroblast growth factor in diabetic rat prostate. *BJU International* 2000; 85: 945-52.
9. Ikeda K, Wada Y, Foster Jr HE, Wang JY, Weiss RM, Latifpur J. Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor-beta. *J Urol* 2000; 164: 180-5.

10. Itoh H, Yamamura S, Ware JA, Zhuang S, Mii S, Liu B, et al. Differential effect of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H359-H370.
11. Guh JH, Hwang TL, Ko FN, Chueh SC, Lai MK, Teng CM. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor. *Mol Pharm* 1998; 53: 467-74.
12. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-Type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 2000; 87: 1095-102.
13. Preston A, Haynes JM. Alpha1-Adrenoceptor effects mediated by protein kinase C in human cultured prostatic stromal cells. *Brit Jour of Pharmacology* 2003; 138: 218-24.
14. Hiramatsu Y, Sekiguchi N, Hayashi M, Isshiki K. Diacylglycerol and protein kinase C activity are increased in mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetes* 2002; 41: 2804-10.
15. Koya D, King GL. Protein kinase C kinase activation and development of diabetic complication. *Diabetes* 1998; 47 (6): 859-66.
16. William B, Schreier RW. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1992; 41 (11): 1464-72.
17. Dewi N. Karakterisasi ekstrak kasar enzim protein kinase C- α hasil isolasi dari serum darah penderita pre-ekalmsia. Skripsi. Unibraw; 2000.
18. Waring JV, Wendt IR. Effects of streptozotocin-induced diabetes mellitus on intracellular calcium and contraction of longitudinal smooth muscle from rat urinary bladder. *J Urol* 2000; 163: 323-30.
19. Bezuijen MWF, Levendusky MC, Longhurst PA. Functional response of bladder strips from streptozotocin diabetic rats on bladder mass. *J Urol* 2003; 169: 2397-401.
20. Liu X, Wang J, Takeda N, Binaglia L, Panagia V, Dhalla NS. Changes in cardiac protein kinase C activities and isozymes in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol (Endocrinol Metab. 40)* 1999; 277: E798-E804.
21. Inoguchi T, Li P, Umeda F. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in culture vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939-45.
22. Muniyappa R, Srinivas PR, Ram JL, Walsh MF, Sowers JR. Calcium and protein kinase C mediate high glucose-induced inhibition of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998, 31 (part2): 289-95.
23. Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JFB. Advanced glycation end products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation in diabetes. *BJU International* 2001; 87: 401-7.