THE EFFECT OF 17 β -ESTRADIOL ON RAT α_{1D} ADRENERGIC RECEPTOR DENSITY AND VASCULAR SMOOTH MUSCLE CONTRACTILITY

EFEK 17 β -ESTRADIOL TERHADAP DENSITAS RESEPTOR ADRENERGIK- α_{1D} DAN KONTRAKTILITAS OTOT POLOS PEMBULUH DARAH TIKUS

Nurdiana

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

The incidence of hypertension in menopausal and post menopausal women related to plasma estrogen level and sympathetic nervous activity. Estrogen may have a specific effect to modulate adrenergic vasoconstriction by modulating adrenergic receptors. Blood vessels contractility is regulated mainly by the sympathetic nervous system, in aorta mediated particularly by α_{1D} adrenergic receptor. We hypothesize that 17 β estradiol decreases vascular smooth muscle contractility by decreasing α_{1D} adrenergic receptor density. To prove the above mechanism in the present study we performed several interrelated assays, i.e bioassay using isolated organ and protein blotting. An isolated rat aortic ring without endothelium (2-3 month, 150-200 gram) was incubated in 17 β -estradiol (10^{-5} M, 10^{-4} M, and 10^{-3} M) for two hours prior to stimulation using phenylephrine as α_{1D} adrenergic receptor agonist. The response of the rat aortic ring to the stimulation of α_{1D} adrenergic receptor agonist was measured as the subsequent change on aortic contractility using bioassay, and the change of α_{1D} adrenergic receptor density using Western and dot blot. The result of this study showed that 17 β -estradiol decreases the rat aortic contraction significantly as a response to stimulation of phenylephrine ($p=0.000$). It is demonstrated as the higher level of 17 β -estradiol, the more E_{max} of phenylephrine decreased without altering ED_{50} and pD_{2} , also the amount density of α_{1D} adrenergic receptor. To conclude, in the present study it is proved that 17 β -estradiol decreased aortic smooth muscle contractility which is associated with the decrease of the density of α_{1D} -adrenergic receptor.

Key words: 17 β -Estradiol, α_{1D} -adrenergic receptor, vascular smooth muscle contractility

PENDAHULUAN

Pada wanita menopause dan *postmenopause* telah diketahui terjadi penurunan kadar estrogen dalam darah (1,2). Pada kondisi ini terjadi perubahan pada sistem kardiovaskular, sehingga nampak fenomena berupa penyakit arteri koroner, hipertensi dan lain-lain (3,4,5,6,7). Untuk memperbaiki kondisi ini telah dilakukan terapi sulih hormon (TSH) estrogen dan terbukti diantaranya mengurangi insiden gangguan kardiovaskular diantaranya hipertensi (3,4). Dasar penggunaan estrogen adalah karena estrogen mempunyai efek vasodilatasi, yang telah terbukti secara klinis dan eksperimental, walaupun TSH belum dapat sepenuhnya mengatasi hipertensi pada wanita menopause dan *postmenopause*.

Data klinis menunjukkan bahwa estrogen dapat menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik pada wanita dengan hipertensi dan tekanan darah malam hari pada wanita dengan tekanan darah normal (8,9). Penggunaan estrogen pada wanita *postmenopause* meningkatkan *stroke volume*, mempercepat aliran darah aorta (10). Pemberian 17 β -

estradiol jangka pendek dan panjang meningkatkan aliran darah perifer (11,12). Secara eksperimental terbukti pemberian 17 β -estradiol jangka pendek pada tikus menunjukkan adanya peningkatan aliran darah pada *vascular bed* (13). Pada tikus yang diangkat ovariumnya (*oophorectomy*), kemudian diberi 17 β -estradiol jangka panjang menunjukkan penurunan kontraktilitas maksimum aorta setelah pemberian fenilefrin, dibandingkan dengan tikus *oophorectomy* tanpa pemberian 17 β -estradiol (14). Penelitian lain menunjukkan terdapat efek vasodilatasi pada aorta tikus yang diberi 17 β -estradiol (15,16,17,18). Fakta-fakta tersebut menunjukkan bahwa estrogen terbukti mempunyai efek vasodilatasi.

Telah diketahui bahwa pengendalian kontraktilitas pembuluh darah didominasi oleh sistem saraf simpatis yang bekerja melalui pelepasan neurotransmitter norepinefrin di ujung saraf dan berikatan dengan reseptor adrenergik- α_1 di otot polos pembuluh darah (1,2,19). Dengan demikian timbul pemikiran bahwa estrogen berpengaruh terhadap ekspresi reseptor adrenergik- α_1 di otot polos pembuluh darah, mengingat pada wanita *postmenopause* terjadi peningkatan tekanan darah dengan menurunnya estrogen.

Mekanisme yang berpengaruh terhadap ekspresi reseptor yang berupa protein dalam

kaitannya dengan hormon estrogen, erat hubungannya dengan mekanisme genomik. Mekanisme genomik dari estrogen membutuhkan waktu yang lama, misalnya efek estrogen meningkatkan ekspresi gen untuk enzim vasodilator, *prostacyclin synthase* dan *nitric oxide synthase* di jaringan pembuluh darah (7,20,21). Selain itu interaksi estradiol pada reseptor inti merangsang pertumbuhan sel endotel. Efek estrogen pada pertumbuhan sel endotel nampaknya diperantarai oleh *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang menimbulkan efek migrasi dan proliferasi sel endotel aorta babi (22). Berbeda dengan efek pada endotel, estrogen (17 β -estradiol) pada sel otot vaskular manusia mempunyai efek menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi efek antiproliferasi. Efek estrogen disini menghambat aktivitas MAPK (23,24). Penelitian ini bertujuan membuktikan apakah estrogen mempunyai efek menurunkan jumlah (densitas) reseptor adrenergik- α_1 di otot polos pembuluh darah tikus sehingga menurunkan kontraktilitas pembuluh darah.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.

Untuk mencapai tujuan penelitian, efek 17 β estradiol terhadap kontraktilitas otot polos pembuluh darah diperiksa dengan metoda bioassay organ terpisah cincin aorta tanpa endotel, sedangkan efek terhadap densitas reseptor adrenergik α_1 pada otot polos pembuluh darah diperiksa dengan metoda *blotting*. Pada penelitian ini dipilih pemeriksaan reseptor adrenergik α_{1D} karena di aorta yang dominan adalah reseptor tersebut.

Pemeriksaan respon otot polos aorta tikus yang diinkubasi 17 β estradiol selama dua jam terhadap pemberian fenilefrin.

Untuk membuktikan efek vasodilatasi estrogen (17 β -estradiol) digunakan metoda *bioassay* yaitu percobaan menggunakan cincin aorta tikus betina tanpa endotel (otot polos aorta) yang distimulasi agonis reseptor adrenergik- α_1 (fenilefrin). Untuk mendapat cincin aorta tanpa endotel, mula-mula tikus dikorbkan dengan injeksi ketalar intramuskular (50 mg/Kg BB). Abdomen dan torak dibuka, potongan aorta torakalis diambil dengan cepat dan dibersihkan dari jaringan sekitar dengan hati-hati, kemudian diletakkan dalam larutan Krebs-Henseleit suhu 37 $^{\circ}$ C dan pH 7,4 sambil dialiri gas karbogen (95 % O₂ , 5 % CO₂). Aorta dipotong melintang (bentuk cincin/*ring*) sepanjang $\pm$ 3mm. Endotel dihilangkan dengan mengusap lumen pembuluh darah dengan kawat halus¹⁵. Cincin aorta kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi larutan Krebs dengan pH 7,4 dan suhu 37 $^{\circ}$ C serta dialiri gas karbogen. Salah satu

ujung dari aorta ring dihubungkan dengan *tissue holder* dari kawat *stainless* dan ujung lainnya dihubungkan dengan *transducer* isotonik (Ugobasil No. 7004) dengan tonus 430 μ V (2 g) yang dihubungkan dengan alat pencatat Macintosh LC 575, Mac Lab./8e AD Instrument, Program Chard versi 3,5. Hasil rekaman berupa grafik yang dapat diukur besarnya, yaitu besar respon aorta dalam μ V. Selanjutnya dilakukan *ekuilibrasi* aorta di dalam larutan Krebs supaya stabil (selama $\pm$ 90 menit) dan larutan diganti setiap 10 menit. Pemberian obat dimulai dari dosis minimum dan ditingkatkan secara kumulatif sampai dosis maksimum tercapai.

Prosedur di atas dilakukan pada kelompok aorta tikus kontrol. Pada kelompok tikus dengan perlakuan, aorta diinkubasi dengan 17 β -estradiol yang dilarutkan dalam larutan Krebs sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan, yaitu dosis 10⁻⁵ M , 10⁻⁴ M, dan 10⁻³M. Waktu inkubasi 17 β -estradiol yang digunakan selama dua jam berdasarkan penelitian Thomas dkk yang melaporkan bahwa inkubasi aorta tikus selama dua jam adalah waktu yang optimal, karena sudah menunjukkan terjadi sintesis protein di endoplasmik retikulum, yang sejajar dengan perubahan respon kontraksi pembuluh darah terhadap fenilefrin (25).

Untuk memastikan keberadaan endotel diberikan satu dosis fenilefrin (10⁻⁵M), pada saat kurva kontraksi mencapai puncak diberikan satu dosis asetilkolin (10⁻⁶M), apabila tidak terjadi penurunan kurva kontraksi berarti sudah tidak ada endotelnya (15).

Selanjutnya respon kontraktilitas aorta diamati dengan pemberian dosis logaritmik kumulatif fenilefrin. Setelah satu pengamatan selesai cairan di *organ bath* diganti setiap 10 menit secara serial sampai kontraksi aorta kembali ke baseline (26,27).

Respon kontraksi aorta terhadap fenilefrin dicatat pada komputer McLab (μ V), berupa Emaks (respon maksimal terhadap agonis). Dari data yang didapat dikonversikan dalam persen efek. Efek maksimum adalah efek 100 %. Dari data ini dapat ditentukan ED50 atau dosis yang menimbulkan 50 % efek. Penghitungan ED50 dilakukan dengan cara membuat *kurva dosis respon* berdasar data respon kontraksi aorta dosis kumulatif pada kertas logaritmik, akan didapat kurva berbentuk sigmoid. Dari ED₅₀ ini selanjutnya dihitung nilai pD₂ fenilefrin yang menggambarkan afinitas agonis terhadap reseptornya atau kemampuan agonis menempati 50 % reseptornya (26,28).

Pemeriksaan densitas reseptor adrenergik- α_{1D} di otot polos aorta tikus yang diinkubasi 17 β -estradiol selama dua jam

Untuk membuktikan 17 β -estradiol mempunyai efek menurunkan jumlah reseptor adrenergik- α_{1D} di otot polos aorta dilakukan pemeriksaan densitas atau

jumlah reseptor dengan metoda *blotting* meliputi pemeriksaan dengan metoda SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul reseptor adrenergik α_{1D} , dot blot yang dapat dikuantifikasi dengan *Corel draw* dan *western blot* (29,30). Pemeriksaan reseptor adrenergik α_{1D} dipilih karena pada aorta tikus dominan terdapat reseptor adrenergik- α_{1D} (31). Pada penelitian ini pemeriksaan jumlah/densitas reseptor adrenergik- α_{1D} menggunakan antibodi poliklonal untuk reseptor adrenergik- α_{1D} .

ANALISIS DATA

Analisis data dilakukan dengan analisa kualitatif dan kuantitatif.

1. Untuk mengetahui perbedaan efek 17 β -estradiol pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan analisa statistik terhadap kontraksi maksimal (Emaks), afinitas (pD_2 yang dihitung berdasar ED50). Untuk mengetahui perbedaan antar variabel secara serentak dilakukan uji multivariat/Manova. Perbedaan pengaruh dosis untuk satu variabel digunakan Anova. Perbedaan antar dosis dilakukan uji t.
2. Data densitas reseptor adrenergik- α_{1D} , hasil blotting masing-masing untuk metoda SDS PAGE, dot blot dan Western blot adalah : 1/ SDS-PAGE untuk mencari BM protein sampel yang sesuai dengan protei yang dicari, menggunakan kurva baku BM protein standar. 2/ Dot blot untuk membuktikan bahwa hasil dari metoda 1/ adalah memang protein yang dicari dan hasil berupa noda (dot) dapat dikuantifikasi dengan program *Corel Draw* 11. Hasil pembacaan *Corel Draw* dianalisa dengan Anova, kemudian dilanjutkan dengan uji t. 3/ Western blot untuk melihat pita protein yang terbentuk adalah reseptor adrenergik α_{1D} .
3. Untuk mengetahui pengaruh estrogen terhadap kontraktilitas otot polos pembuluh darah tikus melalui stimulasi reseptor adrenergik α_{1D} dilakukan analisa regresi antara konsentrasi 17 β -estradiol dengan Emaks, ED50 dan pD_2 fenilefrin.
4. Untuk mengetahui pengaruh estrogen terhadap densitas reseptor adrenergik- α_{1D} , dilakukan uji regresi antara konsentrasi 17 β -estradiol dengan densitas reseptor adrenergik- α_{1D} .

HASIL PENELITIAN

Efek 17 β -estradiol terhadap respon kontraksi otot polos aorta tikus tanpa endotel dan afinitas rereptor adrenergik α_1 terhadap agonis reseptor adrenergik α_1 (fenilefrin).

Berdasar pengamatan hasil percobaan pada aorta tikus tanpa endotel dapat diketahui bahwa terjadi penurunan respon kontraksi otot polos aorta

tikus seiring dengan peningkatan dosis 17 β -estradiol (Gambar 1)

Gambar 1. Kurva dosis respon fenilefrin pada aorta tikus tanpa endotel setelah direndam 17 β -estradiol dosis 10^{-5} M (do1), 10^{-4} M (do2), 10^{-3} M (do3) selama 2 jam.

Replikasi/n setiap perlakuan = 6 1/2 Emaks adalah respon kontraksi sebesar 1/2 kontraksi maksimal (Emaks), yang dicapai dengan ED50. K_D =ED50 yang relatif sama untuk menghasilkan efek 50% masing-masing kelompok percobaan. Tinggi grafik menunjukkan efek maksimal fenilefrin. No 1-12, menunjukkan log dosis fenilefrin yang dimulai dari 10^{-10} M, 3.10^{-10} M, 10^{-9} M, 3.10^{-9} M, 10^{-8} M, 3.10^{-8} M, 10^{-7} M, 3.10^{-7} M, 10^{-6} M, 3.10^{-6} M, dan 10^{-5} M. Besar kontraksi setiap dosis pada kurva adalah prosentase terhadap efek maksimal.

Dari kurva dosis respon dilakukan penghitungan ED50 (dosis yang menimbulkan 50 % respon kontraksi maksimal) (Gambar 1). pD_2 fenilefrin yang menunjukkan afinitas reseptor adrenergik- α_1 dihitung dengan rumus: $pD_2 = -\log ED50^{28,32}$. Efek maksimum (Emaks) diukur pada hasil rekaman kontraksi dari *base line* (titik awal mulai timbul kontraksi) sampai tercapai efek maksimal. Rangkuman hasil Emaks, ED50 dan pD_2 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata efek maksimal (Emaks), ED50 dan pD₂ fenilefrin pada otot polos aorta setelah direndam dengan 17β-estradiol dosis 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M dan 10⁻³ M selama 2 jam

	Kontrol	17β-estradiol dosis 10 ⁻⁵ M (n=6)	17β-estradiol dosis 10 ⁻⁴ M (n=6)	17β-estradiol dosis 10 ⁻³ M (n=6)	Sig (p)
Emaks (μV)	1208,00± 105,75	570,92 ± 35,513	299,562±19,044	113,17± 4,902	0,000
ED50 [M]	2,192.10 ⁻⁹ ±1,325.10 ⁻¹⁰	2,350.10 ⁻⁹ ±7,583.10 ⁻¹¹	2,476.10 ⁻⁹ ±6,540.10 ⁻¹¹	2,242.10 ⁻⁹ ±1,705.10 ⁻¹⁰	0,394
pD ₂	8,7408 ± 4,123E-02	8,6254 ± 2,390E-02	8,5980 ± 1,736E-02	8,6945 ± 0,1669	0,651

Peningkatan dosis 17β-estradiol berpengaruh secara bermakna terhadap respon kontraksi otot polos aorta akibat stimuli fenilefrin (uji Wilks' lambda=0,000). Hasil Emaks fenilefrin pada keempat kelompok otot polos aorta tikus menunjukkan penurunan yang bermakna seiring peningkatan dosis 17β-estradiol (Anova, p= 0,000). Hasil ED50 dan pD₂ fenilefrin menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna (Anova, p = 0,394 dan p = 0,651).

Dari hasil pemeriksaan SDS-PAGE isolat protein ekstrak aorta tanpa endotel (lapisan otot polos aorta) tikus, didapat pita protein berwarna ungu dengan nilai kDa mendekati berat molekul reseptor adrenergik-α_{1D} yaitu 64,57 kDa (Gambar 2) (14). Untuk memastikan pita protein hasil SDS-PAGE adalah reseptor adrenergik-α_{1D}, dilakukan pemeriksaan *Western blot* menggunakan antibodi primer reseptor adrenergik-α_{1D}, dan didapat hasil berupa pita yang sesuai dengan berat molekul reseptor adrenergik pada SDS-PAGE. Selain itu pada kelompok lapisan otot polos aorta yang direndam 17β-estradiol, semakin meningkat dosis 17β-estradiol, semakin tipis pita yang terbentuk. Hasil ini menunjukkan densitas protein reseptor adrenergik-α_{1D} yang menurun (Gambar 2). Pada penelitian ini dilakukan juga metode *dot blot* dengan hasil berupa noda berwarna biru keunguan yang menunjukkan densitas protein reseptor adrenergik-α_{1D}. Hasil *dot blot* juga menunjukkan penipisan noda seiring dengan peningkatan dosis 17β-estradiol, yang menunjukkan penurunan densitas protein reseptor adrenergik-α_{1D} di lapisan otot polos aorta tikus (Gambar 2).

Densitas reseptor adrenergik-α_{1D} di aorta tanpa endotel (lapisan otot polos aorta tikus) setelah direndam 17β-estradiol selama 2 jam, diperiksa dengan metoda *blotting*

A. SDS-PAGE
Lane 1-4= isolat protein dari aorta tikus tanpa endotel (pita ungu).
Lane 1=kontrol
Lane 2=E2 10⁻⁵M
Lane 3=E2 10⁻⁴M
Lane 4=E2 10⁻³M
M = marker
kDa = kilodalton
BM rerata = 64,57±0,6018 kDa
~BM reseptor adrenergik α_{1D}

B. Western blot
(α_{1D}) primer reseptor adrenergik α_{1D} → pita keunguan menunjukkan reseptor adrenergik α_{1D}
K=kontrol
Lane 1=E2 10⁻⁵M
Lane 2=E2 10⁻⁴M
Lane 3=E2 10⁻³M
Makin tinggi dosis E2= 17β-estradiol, makin tipis pita yang terbentuk. E2 menurunkan ekspresi reseptor adrenergik α_{1D}

C. Dot blot
Gambar noda biru keunguan menunjukkan adanya reseptor adrenergik α_{1D} yang menipis dengan peningkatan dosis. N= kontrol. 1=E2 10⁻⁵M. 2=E2 10⁻⁴M. 3=E2 10⁻³M

Gambar 2. Pemeriksaan Reseptor adrenergik-α_{1D} dengan metode SDS-PAGE (A), *western blot* (B) dan *dot blot* (C).

Hasil menunjukkan pita ungu (tanda panah merah) dengan BM yang sesuai dengan Reseptor adrenergik α_{1D} (SDS-PAGE), pita keunguan (tanda panah biru) (*western blot*) dan noda biru keunguan (*dot blot*) menunjukkan ekspresi dan kepadatan reseptor adrenergik α_{1D} di lapisan otot polos aorta.

Hasil metode *blotting* menunjukkan 17β-estradiol menurunkan ekspresi reseptor adrenergik α_{1D} di lapisan otot polos aorta. Kuantifikasi hasil dot blot menggunakan program *Corel draw 11* dengan prosedur sebagai berikut. Hasil pembacaan warna paling gelap sampai paling terang ditunjukkan dengan *range/batas* 0-255. Angka pembacaan noda (x) dimasukkan dalam rumus : Nilai noda = [(255-x) x 100]/255. Hasil penghitungan nilai noda reseptor adrenergik-α_{1D} dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Hasil pembacaan noda reseptor adrenergik- α_{1D} hasil dotblot dengan program Corel draw 11

17 β estradiol	Nilai noda $\pm$ SE (<i>arbitrary unit</i>)
Kontrol	97,135 $\pm$ 0,423
10 ⁻⁵ M	76,361 $\pm$ 1,113
10 ⁻⁴ M	65,246 $\pm$ 2,611
10 ⁻³ M	46,517 $\pm$ 1,876

Hasil pembacaan program Corel draw menunjukkan semakin tinggi dosis 17 β -estradiol, semakin rendah nilai noda yang menunjukkan kepadatan ekspresi reseptor adrenergik α_{1D} di lapisan otot polos aorta tikus. Hasil Anova menunjukkan penurunan densitas reseptor adrenergik α_{1D} yang bermakna ($p=0,000$). Uji LSD antar kelompok perlakuan juga menunjukkan penurunan densitas reseptor adrenergik- α_{1D} yang signifikan antara kelompok kontrol dengan 17 β estradiol dosis 10⁻⁵M ($p=0,000$), 10⁻⁴M ($p=0,000$) dan 10⁻³M ($p=0,000$).

PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian efek 17 β -estradiol terhadap kontraksi aorta tikus tanpa endotel (otot polos aorta), dan densitas reseptor adrenergik- α_{1D} . Dari uraian hasil penelitian, inkubasi 17- β -estradiol selama 2 jam terhadap otot polos aorta tikus, kemudian distimuli fenilefrin sebagai agonis reseptor adrenergik- α_1 , terdapat penurunan respon kontraksi, kontraksi maksimal (Emaks) dan tidak terdapat perubahan afinitas (pD_2) fenilefrin terhadap reseptor adrenergik- α_1 . Selain itu inkubasi 17 β -estradiol menurunkan ekspresi reseptor adrenergik- α_{1D} di otot polos aorta tikus.

Temuan hasil penelitian berupa penurunan respon kontraksi otot polos aorta setelah inkubasi 17 β -estradiol, serupa dengan temuan peneliti terdahulu, antara lain bahwa estrogen merupakan mediator pada respon kontraksi pembuluh darah tikus (7,15,16). Hal ini sejalan dengan penelitian epidemiologi yang menunjukkan resiko peningkatan tekanan darah dan penyakit jantung koroner pada masa menopause dan postmenopause (4,5,6,7). Penelitian hemodinamik pada wanita *postmenopause* menunjukkan estrogen meningkatkan *stroke volume* dan mempercepat aliran darah di aorta (10,11,12). Disamping itu terapi sulih hormon pada wanita postmenopause ternyata dapat tidak berpengaruh terhadap kontraksi pembuluh darah. Hal ini disebabkan pada wanita *postmenopause* pembuluh darah "refrakter" terhadap terapi sulih hormon, karena disamping terjadi penurunan kadar estrogen dalam darah, juga terjadi penurunan ikatan estrogen dengan reseptornya karena proses penuaan (32).

Pada penelitian ini digunakan agonis reseptor adrenergik- α_1 , fenilefrin, yang merangsang reseptor adrenergik α_1 di membran otot polos pembuluh darah sehingga terjadi respon kontraksi. Telah diketahui bahwa semua reseptor adrenergik- α_1 adalah anggota superfamili *G protein Coupled Receptor* (GPCR), yaitu protein di membran otot polos yang memperantarai efek katekolamin endogen norepinefrin dan epinefrin dalam sistem signal transduksi distal reseptor di intra sel, sampai timbul efek kontraksi otot polos pembuluh darah (33,34). Suatu agonis yang bekerja pada reseptor di membran sel akan berikatan dengan reseptornya. Kekuatan ikatan tergantung pada afinitas agonis dengan reseptornya. Setelah agonis berikatan dengan reseptor terjadilah aktivitas intrinsik berupa aktifnya sistem GPCR, terjadi transduksi signal sampai terjadi kontraksi otot polos pembuluh darah. Pada penelitian ini terjadi penurunan kontraksi maksimal (Emaks) dan tidak terdapat perubahan afinitas (pD_2) fenilefrin terhadap reseptor adrenergik- α_1 . Dari kajian teoritik farmakodinamik fenilefrin dalam menimbulkan kontraksi otot polos pembuluh darah dan data kontraksi otot polos aorta setelah distimuli fenilefrin yang didahului inkubasi 17 β -estradiol selama 2 jam, dapat dijelaskan sebagai berikut. Data penelitian ini menunjukkan penurunan Emaks tanpa perubahan pD_2 (afinitas) (Tabel 1). Selain itu gambaran kurva dosis respon fenilefrin (Gambar 1), menunjukkan tidak ada pergeseran kurva ke kanan yang menunjukkan tidak terjadi perubahan afinitas reseptor, hanya terdapat penurunan kurva Emaks. Secara teoritik penurunan Emaks tanpa perubahan afinitas menunjukkan perubahan hanya pada aktivitas intrinsik reseptor. Dengan demikian 17 β -estradiol hanya menyebabkan perubahan aktivitas intrinsik reseptor adrenergik- α_1 di otot polos pembuluh darah tikus, sehingga dapat disimpulkan 17- β estradiol merupakan antagonis non kompetitif terhadap reseptor adrenergik- α_1 .

Efek 17 β estradiol (inkubasi 2 jam) sesuai dengan mekanisme genomik dari estrogen (7,17). Pada penelitian ini telah dikonfirmasi juga bahwa waktu 2 jam inkubasi 17 β -estradiol memang menurunkan kontraktilitas otot polos aorta, yang sesuai dengan hasil Thomas et.al (25).

Pada penelitian ini ditemukan 17 β -estradiol hanya berpengaruh pada besar kontraksi otot polos aorta. Besar kontraksi otot polos aorta merupakan resultante respon organ terhadap stimuli agonis reseptor adrenergik- α_1 . Efek agonis terhadap target organ sesuai dengan fraksi reseptor yang ditempati. Emaks menggambarkan jumlah reseptor yang ditempati agonis, artinya efek suatu agonis berbanding lurus dengan dengan jumlah reseptor yang ditempati dan efek suatu agonis akan mencapai maksimal jika seluruh reseptornya ditempati agonis (28). Jadi nilai Emaks fenilefrin dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah maksimal reseptor adrenergik

α_1 yang ditempati fenilefrin untuk menimbulkan efek maksimum (respon maksimum). Dengan demikian penurunan respon kontraksi aorta disebabkan oleh berkurangnya jumlah atau densitas reseptor adrenergik α_1 di otot polos aorta tikus, yang disebabkan pengaruh 17 β -estradiol. Hasil ini ditunjang dengan analisa regresi yaitu terdapat hubungan linier dan bermakna antara peningkatan konsentrasi 17 β -estradiol dengan penurunan Emaks. Hal ini sesuai dengan beberapa kemungkinan mekanisme yang mendasari respon organ terhadap agonis, diantaranya perubahan jumlah, struktur atau fungsi transduksi sinyal reseptor yang akan menimbulkan respon yang berbeda (34).

Telah diuraikan terdahulu bahwa respon organ dalam hal ini otot polos aorta ditentukan oleh jumlah reseptor. Pada penelitian ini telah dibuktikan pengaruh 17 β -estradiol yang bersifat nonkompetitif, yang dikaitkan dengan efek genomik pada perubahan aktivitas intrinsik reseptor adrenergik- α_1 dengan salah satu mekanisme adalah perubahan jumlah reseptor adrenergik- α_1 . Efek genomik disini tentunya terjadi intrasel, karena 17 β -estradiol adalah kelompok steroid yang mempengaruhi metabolisme protein intrasel (17,18). Efek farmakodinamik 17 β -estradiol dalam hal ini adalah terhadap reseptor adrenergik- α_1 yang merupakan makromolekul protein di intrasel otot polos aorta, diduga mempengaruhi reseptor reseptor adrenergik- α_1 di membran sel. Dugaan ini berdasarkan perkembangan teori tentang reseptor adrenergik- α_1 yang telah maju pesat, diantaranya didapatkan bahwa reseptor adrenergik- α_1 mempunyai beberapa sub tipe yaitu reseptor adrenergik α_{1A} , α_{1B} dan α_{1D} (34). Beberapa peneliti melaporkan bahwa pada satu pembuluh darah terdapat beberapa sub tipe reseptor adrenergik- α_1 dengan proporsi yang berbeda, yang terdapat pada manusia dan tikus (28,35,36,37). Pada aorta tikus distribusi sub tipe reseptor adrenergik- α_{1D} yang paling banyak, sedangkan sub tipe reseptor adrenergik- α_{1A} dan α_{1B} lebih sedikit, maka dapat diasumsikan bahwa pengaruh 17 β -estradiol terhadap kontraktilitas aorta tikus melalui pengaruhnya terhadap reseptor adrenergik- α_{1D} .

Untuk membuktikan dugaan pengaruh 17 β -estradiol terhadap reseptor adrenergik- α_{1D} dilakukan pemeriksaan densitas/ jumlah reseptor adrenergik α_{1D} pada otot polos aorta tikus yang diinkubasi 17 β -estradiol. Pemeriksaan reseptor adrenergik- α_{1D} dilakukan dengan metoda *blotting* meliputi SDS-PAGE, *Western blot* dan *dot blot*.

Hasil karakterisasi isolat protein ekstrak lapisan otot polos aorta dengan metoda SDS-PAGE didapatkan pita protein dengan rata-rata berat molekul (BM) 64,565 $\pm$ 0,301 kDa, yang berada pada kisaran BM reseptor adrenergik α_{1D} yaitu 60

kDa¹⁴ (lihat gambar 3). Untuk mengkonfirmasi bahwa pita dengan BM 64,565 $\pm$ 0,301 kDa adalah reseptor adrenergik- α_{1D} pemeriksaan dilanjutkan dengan *Western blot*.

Hasil uji *Western blot* menggunakan *rabbit polyclonal antibody* reseptor adrenergik- α_{1D} menunjukkan pita berwarna ungu, berarti protein dengan BM 64,565 $\pm$ 0,301 kDa adalah reseptor adrenergik- α_{1D} . Pita yang terbentuk juga menunjukkan pengaruh dosis 17 β -estradiol dibandingkan dengan kontrol. Tampak pita dari isolat kontrol lebih tebal dibandingkan isolat dengan perlakuan 17 β -estradiol. Semakin tinggi dosis 17 β -estradiol semakin tipis pita yang terbentuk. Ketebalan pita menunjukkan kerapatan reseptor.

Hasil uji *dot blot* terjadi karena reaksi spesifik antara reseptor adrenergik α_{1D} dan antibodinya yang tampak berupa noda yang berwarna biru keunguan seperti tampak pada Gambar 3. Ketebalan noda ini dikuantifikasi dengan program *Corel Draw 11* dan didapat nilai rata-rata noda (arbitrary unit) menurun secara bermakna searah dengan peningkatan dosis 17 β -estradiol (Tabel 2). Hasil ini ditunjang dengan analisa regresi yaitu terdapat hubungan linier dan bermakna antara peningkatan konsentrasi 17 β -estradiol dan penurunan nilai noda. Hasil percobaan menggunakan metoda *blotting* menunjukkan bahwa inkubasi 17 β -estradiol selama dua jam mempunyai efek menurunkan ekspresi reseptor adrenergik α_{1D} pada otot polos aorta tikus. Hal ini sejalan dengan hasil penemuan yang melaporkan penurunan ekspresi reseptor adrenergik α_{1D} pada arteri mesenterika kelompok tikus *oophorectomy* dengan pemberian 17 β -estradiol dibandingkan dengan tikus *oophorectomy* tanpa pemberian 17 β -estradiol (14). Hasil pemeriksaan densitas reseptor adrenergik α_{1D} mendukung hasil temuan pengaruh respon 17 β -estradiol terhadap respon kontraksi otot polos aorta, yaitu jumlah reseptor adrenergik α_{1D} terbukti menurun seiring dengan meningkatnya dosis 17 β -estradiol.

KESIMPULAN

1. 17 β -estradiol merupakan antagonis nonkompetitif terhadap reseptor adrenergik- α_1 pada sel otot polos aorta tikus .
2. 17 β -estradiol mempunyai efek menurunkan kontraktilitas otot polos aorta tikus dengan menurunkan densitas reseptor adrenergik- α_{1D} di otot polos aorta tikus

SARAN

Perlu penelitian lanjutan untuk mencari mekanisme jalur transduksi sinyal yang dilalui 17 β -estradiol - reseptor adrenergik- α_{1D} yang memberikan efek penurunan kontraktilitas otot polos aorta tikus.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Guyton A.C. *Textbook of Medical Physiology*. Eight Edition. United State of America: WB Saunders Company;1991;87-94.
2. Martini. *Fundamentale of anatomy & physiology*. sixth edition. San Franscisco: Pearson Education, Inc,2004;722-735.
3. Stampfer MJ,Golditz GA,Willett WC. *Postmenopausal Estrogen Therapy and cardiovascular disease*.N Eng J Med,1991;325:756-762.
4. Belchetz, P.E. *Hormonal Treatment of Postmenopausal women*. N.Engl J. Med,1994;330:1062-1071.
5. Barret-Connor E, Bush T.*Estrogen And Coronary Heart Disease in Women*. JAMA,1991;265:1861-1867.
6. Wenger N.K., Speroff L., Packard B. *Cardiovascular Health And Disease in Women*. New England, Journal of Medicine,1993;329: 247-256.
7. Ho and Liao. *Non-nuclear Actions of Estrogen: New Targets for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease*, Molecular Intervention,2002; 2:219-228.
8. Lutuola H. *Blood Pressure and Hemodynamic in Postmenopausal Woman During Estradiol-17 β Substitution*. Annals of Clinical Research, 1983,(Suppl.38);15:1-121.
9. Cagnacci A, Rovati L, Zanni A, Malmusi S, Facchinetti F, and Volpe A. *Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women*. Am J Physiol Heart Circ Physiol,1999; 276: H1355-H1360.
10. Pines A *The Effects of Hormon Replacement therapy in Normal Postmeno pausal Women: Measurement of Doppler-Derived Parameters of Aortic Flow*. American Journal of Obstetrics and Ginecology,1991;164: 806-812.
11. Ginsburg J., Hardiman P. *Cardiovascular Effects of Transdermal Oestradiol in Postmenopausal Women*. Annals of the New York Academy of Sciences,1990;592:424-425
12. Volterrani M, Rosano, G. M. C., Collins P. **Effect of Estradiol -17 β Upon Forearm Blood Flow on Menopausal Women : A Double Blind Randomized Study*, Circulation,1993;88;4 (Suppl.2):1-376.
13. Magnes
14. Zhang Y, Davidge S.T. *Effect of estrogen replacement on vasocons trictor responses in rat mesenteric arteries*. Hypertension,1999; 34:1117-1122.
15. Freay AD, Curtis SW,Korach KS, Rubanyi GM. *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta role of nuclear estrogen receptor and Ca++ uptake*. Circulation Research,1997;81:242-248.
16. Andersen H.L., Weis J.U., Fjalland B., Korsgaard N. *Effect of Acute And Long-term Treatment With 17- β -Estradiol on The Vasomotor Responses in The Rat Aorta*, British Journal of Pharmacology,1999;126: 159-168.
17. Gruber CJ,Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. *Production and Action of Estrogens*. The New England Journal of Medicine, 2002; 346:340-352.
18. Mendelsohn M.E., Karas R.H.*The Protective Effect of Estrogen on the Cardiovascular System*. N Engl J Med,1999; 340(23):1801.
19. Hoffman B.B.,and Taylor P. *Neurotrasmission, The Autonomic and Somatic Motor Nervous System in Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Editors Hardman J.G., Limbird L.E., Consulting Editor Goodman Gilman A, Tenth Edition, USA, The McGraw-Hill Companies, 2001:115-155.
20. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. *Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones*. USA,Proc Natl Acad Sci,1994;91:5212-5216.
21. Binko J, Majewski H. 17 β -Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. Am J Physiol , 1998;274:H853-H859.
22. Geraldde P, Sirois MG, Bernatchez PN,Tanguay JF. *Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase*. 2002; Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1585-1590.
23. Dubey RK, Gillespie DG., Imthurn B., Rosselli M., Jackson EK and Keller PJ. *Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells*. Hypertension, 1999;33:177-182
24. Bacakova L, Kunes J.*Gender differences in growth of vascular smooth muscle cells isolated from hypertensive and normotensive rats*. Clin Exp Hypertens, 2000;22:33-44. (abstract)
25. Thomas G., Ito K, Zikic E., Bhatti T., Han C and Ramwell PW. *Specific Inhibition of The Contraction of The Aorta by Estradiol 17 β* . J Pharm Exp Therapy, 1995;273:1544-1550.
26. Gosh MN.Fundamentals of Experimental Pharmacology.Calcuta, Scientific Book Agency, 1971;27-69.
27. Perry WLM. *Pharmacological Experiments on Isolated Preparation*, 2nd Ed, Edinburg: E & S Livingstone, 1970:58-87.

28. Bowman W.C, Rand M.J. *Textbook of Pharmacology*, 2nd ed, Blackwell Scientific Publication, Melbourn; 1984.
29. Piascik M.T., Hrometz S.L., Edelmann S.E., Guarino R.D.m Hadley R.W. and Brown R.D. *Immunocytochemical Localization of The α_{1b} Adrenergic receptor and The Contribution of This and The Other Subtype to Vascular Smooth Muscle Contraction Analysys With Selective Ligands and Antisense Oligonucleotides*. J Pharmacol Exp Ther, 1997;283: 854-868.
30. Hrometz, S.L., Edelmann, S.E., McCune, D.F., et al. *Expression of Multiple alpha 1-adrenergic receptors on Vascular Smooth Muscle Correlation With the Regulation of Contraction*. J.Pharmacol. Exp. Ther, 1999; 290:452-463.
31. Ross, E.M. *Pharmacodynamics: Mechanism of Drug Actions and The Relationship Between Drug Concentration And Effect* in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eight edition, Vol.1, Editor Goodman Gilman, A, Rall T.W., Nies AS, Taylor P., New York: Pergamon Press, 1991; p33-48.
32. Wynne F.L., Payne J.A., Cain A.E., Reckelhoff J.F., Khalil R.A. *Age Related Reduction in Estrogen Receptor- mediated Mechanisms of Vascular Relaxation in Female Spontaneously Hypertensive Rats, Hypertension*. 2004;43:405.
33. Insel P.A. *Adrenergic Receptor- Evolving Concepts and Clinical Implications*. The New England Journal of Medicine, 1996;334: 580-585.
34. Piascik MT, Perez DM. *α_1 -adrenergic receptor: New insight and directions*. J Pharm. Exp. Ther., 2001; 298:403-410.
35. Bourne HR, Von Zastrow M. *Drug Receptor & Pharmacodynamics* in Basic & Clinical Pharmacology, Eight edition, Editor: Katzung BG, International Edition, Lange Medical books/McGraw-Hill, London, 2001; 9-34.
36. Rudner X.L., Berkowitz D.E., Booth J.V., et al. *Subtype Specific Regulation of Human Vascular Alpha (1)- Adrenergic Receptor by Vessel Beds and Age*, Circulation, 1999;100:2336-2343.
37. Guarino RD, Perez DM and Piascik MT. *α_1 -Adrenergic receptor Subtypes*. Cell Signal, 1996 8:323-333.