

INTISARI

PENGARUH PEMBERIAN KALSITRIOL TERHADAP FRAKSI AREA FIBROSIS, EKSPRESI mRNA TGF- β , prepro-ET-1, ET_AR, ET_BR, DAN eNOS PADA TIKUS MODEL GAGAL GINJAL KRONIS DENGAN NEFREKTOMI SUBTOTAL 5/6

Latar Belakang: Fibrosis ginjal merupakan luaran akhir yang muncul pada hampir semua gagal ginjal kronis (GGK) progresif. Fibrosis interstisial dengan pembentukan miofibroblas merupakan ciri khas dari fibrosis ginjal. Jalur sinyal Endothelin telah diketahui berperan dalam proses fisiologis dan patofisiologi ginjal. Vitamin D memiliki efek proteksi pada ginjal melalui penghambatan inflamasi dan fibrosis. Namun, interaksi antara vitamin D dengan jalur sinyal Endothelin pada model GGK belum diketahui dengan baik.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kalsitriol pada fibrosis interstisial dan jalur sinyal ET-1/eNOS pada model GGK.

Metode: Nefrektomi subtotal 5/6 (SN) dilakukan untuk menginduksi GGK pada Tikus jantan galur Sprague-Dawley (berusia 3 bulan, 150-250gram). Tikus dibagi menjadi 4 kelompok (6 ekor/kelompok): SN, 2 kelompok yang menerima injeksi intraperitoneal kalsitriol dengan dosis berbeda (0.01 μ g/100grBB/hari (SN-D1), and 0.05 μ g/100grBB/hari (SN-D2)), dan kelompok *Sham Operation* (SO) dengan pemberian aqua pro injeksi. Tikus diterminasi dan diambil darah serta ginjalnya pada hari ke-14 setelah operasi. Serum kreatinin diukur untuk mengetahui fungsi ginjal. Potongan paraffin dibuat untuk pemeriksaan histologis. Fraksi area fibrosis dikuantifikasi menggunakan pewarnaan Sirius Red. Pengecatan imunohistokimia dilakukan untuk melokalisasi fibroblast (PDGFR β) dan miofibroblas (α -SMA). Dilakukan *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) untuk mengukur ekspresi mRNA TGF- β 1, prepro-ET-1, ET_AR, ET_BR, and eNOS.

Hasil: Kelompok SN menunjukkan model GGK dengan kadar kreatinin, ekspresi mRNA TGF- β 1, dan fraksi area fibrosis interstisial yang lebih tinggi dibandingkan kelompok SO ($p < 0,05$). Temuan ini berkaitan dengan lebih banyak ekspansi sel fibroblas dan miofibroblas, ekspresi mRNA prepro-ET-1 dan ET_AR yang lebih tinggi ($p < 0,05$), serta ET_BR and eNOS yang lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok SO. Pada kelompok yang menerima kalsitriol didapatkan kadar kreatinin, ekspresi mRNA TGF- β 1, dan fraksi area fibrosis interstisial, serta ekspansi fibroblas dan miofibroblas yang lebih rendah ($p < 0,05$). Ditemukan juga ekspresi mRNA prepro-ET-1, ET_BR, dan eNOS yang lebih tinggi ($p < 0,05$), sedangkan ET_AR yang lebih rendah ($p < 0,05$). Kelompok SN-D1 dan SN-D2 memiliki efek yang sama pada berbagai ekspresi mRNA yang diperiksa, tetapi kelompok SN-D2 secara konsisten menunjukkan perbedaan signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok SO atau SN.

Kesimpulan: Kalsitriol dapat meringankan fibrosis ginjal pada model GGK dengan cara meningkatkan jalur sinyal ET-1/eNOS.

Kata Kunci: gagal ginjal kronis, fibrosis, kalsitriol, endothelin-1, eNOS

ABSTRACT

Effects of Calcitriol Supplementation to Fibrosis Area Fraction, TGF- β , prepro-ET-1, ET_AR, ET_BR, and eNOS mRNA expressions in Rat with Chronic Kidney Disease Model using 5/6 Subtotal Nephrectomy

Background: Kidney fibrosis is the common final outcome of almost all progressive chronic kidney diseases (CKD). Interstitial fibrosis with myofibroblast formation are the hallmarks of kidney fibrosis. Endothelin signaling has been known to play role in physiology and pathophysiology in kidney. Vitamin D has reno-protective effect through inhibiting inflammation and fibrosis. However, the interaction between vitamin D and endothelin signaling in CKD model has not been elucidated yet.

Objective: Aim of this study is to determine the effect of calcitriol in interstitial fibrosis and Endothelin-1/eNOS signaling in CKD model.

Methods: We performed 5/6 subtotal nephrectomy (SN) to induce CKD in Sprague-Dawley background rats (3-month-old, 150-250gr). Rats were divided into 4 groups (6 rats/group): SN, 2 groups were treated with different doses of intraperitoneal calcitriol injection (0.01 μ g/100grBW/day (SN-D1), and 0.05 μ g/100grBW/day (SN-D2)), and Sham Operation (SO) group with aqua pro injection only. We sacrificed and harvested the rat's blood and kidneys on the 14th day after operation. Creatinine serum was measured to assess the renal function. The paraffin sections for histological analysis were made. Fibrosis area fraction was quantified based on Sirius Red staining. Immunostaining was done for localizing fibroblasts (PDGFR β) and myofibroblasts (α -SMA). We did Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) to measure TGF- β 1, prepro-ET-1, ET_AR, ET_BR, and eNOS mRNA expression.

Results: SN group represented CKD model with significantly higher ($p < 0.05$) creatinine level, TGF- β 1 mRNA expression, and interstitial fibrosis area fraction compared to SO group. These findings were associated with greater expansion of fibroblasts and myofibroblasts, higher prepro-ET-1 ($p < 0.05$) and ET_AR ($p < 0.05$), with lower ET_BR ($p < 0.05$) and eNOS ($p < 0.01$) mRNA expression. In calcitriol treated groups, we discovered significantly lower ($p < 0.05$) creatinine level, TGF- β 1 mRNA expression, and interstitial fibrosis area fraction along with fewer fibroblasts and myofibroblasts expansion in comparison to SN group. Further, the mRNA expression of prepro-ET-1 ($p < 0.05$), ET_BR ($p < 0.05$), and eNOS ($p < 0.01$) were higher, whilst ET_AR was lower ($p < 0.05$). SN-D1 and SN-D2 groups had similar effect toward the examined mRNA expressions, yet SN-D2 consistently showed statistically significant differences whenever compared to either SO or SN groups.

Conclusion: Calcitriol might attenuate kidney fibrosis in CKD model by upregulating ET-1/eNOS signaling.

Keywords: chronic kidney disease, fibrosis, calcitriol, endothelin-1, eNOS