

DISERTASI

**ANALISIS HUBUNGAN STATUS MUTASI GEN *FLT3-ITD*, -
TKD (D835) DENGAN JUMLAH *BLAST*, STATUS EKSPRESI
CD34, EKSPRESI *Bcl-xL*, *Cyclin D1* DAN *hENT1* PADA
PENDERITA LEUKEMIA MIELOID AKUT**



PAULUS BUDIONO NOTOPURO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**ANALISIS HUBUNGAN STATUS MUTASI GEN *FLT3-ITD*, -
TKD (D835) DENGAN JUMLAH *BLAST*, STATUS EKSPRESI
CD34, EKSPRESI *Bcl-xL*, *Cyclin D1* DAN *hENT1* PADA
PENDERITA LEUKEMIA MIELOID AKUT**

PAULUS BUDIONO NOTOPURO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**ANALISIS HUBUNGAN STATUS MUTASI GEN *FLT3-ITD*, -
TKD (D835) DENGAN JUMLAH *BLAST*, STATUS EKSPRESI
CD34, EKSPRESI *Bcl-xL*, *Cyclin D1* DAN *hENT1* PADA
PENDERITA LEUKEMIA MIELOID AKUT**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan
Dipresentasikan di hadapan Panitia Ujian Akhir
Tahap 1 (Tertutup)**

Oleh :

**PAULUS BUDIONO NOTOPURO
011717017306**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

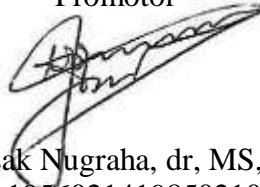
ANALISIS HUBUNGAN STATUS MUTASI GEN *FLT3-ITD*, *-TKD (D835)*
DENGAN JUMLAH *BLAST*, STATUS EKSPRESI *CD34*, EKSPRESI *Bcl-xL*,
CYCLIN D1 DAN *hENTI* PADA PENDERITA LEUKEMIA MIELOID AKUT

YANG TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 5 JUNI 2020

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr, MS, SpPK(K)
NIP. 195602141985021001

Kopromotor



Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS
NIP. 19491213 1976031 001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
Oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)
pada Tanggal 5 Juni 2020**

Panitia penguji :

- Ketua : 1. Dr. Ni Wayan Tirthaningsih, dr, MS, PA(K)
Anggota : 2. Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr, MS, SpPK(K)
3. Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS
4. Prof. Sutjipto, dr, MS, PhD
5. Prof. Dr. IDG Ugrasena, dr, SpA(K)
6. Assoc. Prof. Rahajoe Imam Santosa, dr, SpPK(K)
7. Dr. Budi Utomo, dr, M.Kes

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi**

No : 2323/UN3.1.1/DL/2020

Tanggal : 15 Mei 2020

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Paulus Budiono Notopuro

NIM : 011717017306

Program Studi : Ilmu Kedokteran jenjang Doktor FK UNAIR

Alamat / No telp : Klampis Semolo Timur AB 233 Surabaya / 081 2357 9714

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun Perguruan Tinggi lainnya.
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan.
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan Peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, 5 Juni 2020

Yang membuat pernyataan



Paulus Budiono Notopuro
NIM 011717017306

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala pujian, syukur dan hormat bagi Tuhan Yesus Kristus, atas semua kemurahan, rahmat, karunia, dan berkat-Nya sehingga disertasi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Disertasi ini dapat selesai atas dorongan, bimbingan, arahan, saran serta koreksi dari Promotor, Ko-Promotor dan Tim Penguji. Pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr, MS, SpPK(K) sebagai pembimbing akademik dan promotor saya, yang telah membimbing dengan tulus ikhlas, penuh pengertian, perhatian dan kesabaran, memberikan semangat, motivasi, arahan, dan bimbingan serta berbagai diskusi mengenai hambatan dalam masa pendidikan saya serta meluangkan waktu untuk berkonsultasi sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Saya menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beliau.

Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS sebagai Ko-Promotor yang dengan penuh kesabaran dan pengertian memberikan saya bimbingan, waktu dan arahan, di sela jadwal beliau yang padat. Beliau juga banyak memberikan bantuan, arahan, motivasi, dan dukungan dalam proses penelitian disertasi saya ini. Saya menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beliau.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah pula saya menghaturkan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Dr. M Nasih, Se, MT, Ak., selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Soetojo, dr, SpU(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr, MSc., SpPD-KR, selaku Koordinator Program Studi (KPS) Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas dan dukungan kepada saya selama menjalani dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD selaku Tim Penguji materi kualifikasi, proposal, kelayakan, dan ujian tertutup disertasi yang telah banyak meluangkan waktunya. Beliau juga sebagai dosen Mata Kuliah Penunjang Disertasi saya yang telah banyak memberi masukan, terutama dalam hal pemeriksaan biologi molekuler.

Prof. Dr. IDG Ugrasena, dr, SpA(K) selaku Tim Penguji materi kualifikasi, proposal, kelayakan, dan ujian tertutup disertasi yang telah banyak meluangkan waktunya di tengah kesibukan beliau memberikan arahan dan masukan kepada saya dalam hal klinis hematologi onkologi.

Assoc. Prof. Rahajoe Imam Santosa, dr, SpPK(K) selaku Tim Penguji materi kualifikasi, proposal, kelayakan, dan ujian tertutup disertasi yang telah banyak

meluangkan waktunya ditengah kesibukan beliau memberikan arahan dan masukan kepada saya dalam hal pemeriksaan laboratorium hematologi.

Dr. Ni Wayan Tirthaningsih, dr, MS selaku Tim Penguji materi kualifikasi, proposal, kelayakan, dan ujian tertutup disertasi yang telah banyak meluangkan waktunya ditengah kesibukan beliau memberikan arahan dan masukan kepada saya dalam hal pemeriksaan laboratorium biologi molekuler.

Dr. Budi Utomo, dr, MS selaku selaku Tim Penguji materi kualifikasi, proposal, kelayakan, dan ujian tertutup disertasi yang telah banyak meluangkan waktunya ditengah kesibukan beliau memberikan bimbingan, arahan dan masukan kepada saya dalam hal metodologi penelitian, analisis data dan interpretasinya. Beliau juga merupakan dosen Mata Kuliah Penunjang Disertasi saya yang telah banyak memberi masukan, terutama dalam hal metodologi penelitan.

Dr. Yetti Hernaningsih, dr, SpPK(K) selaku Ketua Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, M. Robiul Fuadi, dr, SpPK(K) selaku Sekretaris Departemen, Arifoel Hajat, dr, SpPK(K) selaku Kepala Divisi Hematologi, Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, serta seluruh staf dan jajarannya yang telah banyak memfasilitasi dan memberikan dukungan kepada saya selama menjalani dan menyelesaikan pendidikan Doktor.

Dr. Joni Wahyuhadi, dr, SpBS(K) selaku Direktur RSUD Dr. Soetomo beserta jajaran direksi, Dr.Hartono Kahar, dr, SpPK(K) selaku Kepala Instalasi Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo yang telah mengizinkan saya melakukan pemeriksaan laboratorium dalam disertasi ini di Instalasi Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo.

melakukan penelitian ini. Semoga semua kebaikan Bapak dan Ibu beserta keluarga tercinta yang terlibat penelitian ini mendapatkan pahala dan dicatat sebagai amal ibadah yang mulia.

Rasa terima kasih dan hormat juga saya haturkan kepada kedua orangtua saya Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS dan Ibu Hany Solaiman yang telah dengan sabar mendukung, dan selalu menyertai, mendoakan perjuangan saya mulai taman kanak-kanak sampai selesainya pendidikan S3 saya. Rasa terima kasih dan penghargaan juga saya sampaikan kepada bapak dan ibu mertua saya, Drs. Med Rudy Subrata dan Ibu Indrijani Sutanto atas doa dan semangat dalam menyelesaikan pendidikan ini. Kepada istri saya tercinta Lisa Angraini Subrata, dr, SpA yang selalu memotivasi saya untuk menyelesaikan pendidikan saya. Kepada ananda tersayang Michael Timothy Notopuro, semoga perjuangan *daddy* menyelesaikan pendidikan dapat menjadi motivasi belajar dalam mengejar cita-cita.

Kepada semua pihak yang belum dapat saya sebutkan satu-persatu, saya mohon maaf sebesar-besarnya. Untuk itu saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan semoga Tuhan senantiasa melimpahkan rahmat pada semua pihak yang telah ikut terlibat memberikan dorongan, semangat, dan doa restu selama saya menempuh pendidikan dari awal sampai selesai.

Sebagai manusia tentu tidak ada yang sempurna, untuk berbagai kesalahan dan kekurangan berkaitan dengan pelaksanaan pendidikan Program Studi Pendidikan Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, maka dari lubuk hati yang terdalam saya mohon maaf yang sebesar-besarnya kepada Promotor, Ko-Promotor, para dosen dan semua pihak.

Akhirnya, semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan, terutama untuk penderita leukemia mieloid akut, dan semoga Tuhan melimpahkan rahmat-Nya kepada kita semua.

Saya menyadari bahwa disertasi ini masih banyak kekurangan karena keterbatasan peneliti, untuk itu masukan dan saran yang bersifat membangun sangat diperlukan untuk penyempurnaan disertasi ini.

Surabaya, Juni 2020

Penulis

RINGKASAN

Leukemia mieloid akut (LMA) merupakan penyakit keganasan hematologi yang menjadi masalah kesehatan yang makin meningkat di Indonesia bahkan di dunia. Angka kegagalan terapi pada penderita LMA baik anak dan dewasa cukup tinggi yang ditandai tingginya angka kekambuhan, rendahnya ketahanan hidup bebas penyakit yaitu sekitar 15 – 20% dalam 5 tahun. Hal ini disebabkan karena belum ditentukannya pemilihan terapi berdasarkan klasifikasi resiko prognosis secara tepat.

Deteksi kelainan sitogenetik dan mutasi gen memiliki peranan penting pada klasifikasi dan penentuan prognosis LMA lebih lanjut. Mutasi gen *FLT3-ITD* merupakan mutasi yang cukup sering ditemukan pada penderita LMA. Deteksi mutasi gen *FLT3* sangat penting dilakukan sebagai dasar pertimbangan terapi LMA berdasarkan kelompok resiko prognosis, karena penderita LMA dengan mutasi gen *FLT3* akan dikelompokkan ke dalam kelompok resiko buruk.

Beberapa studi terdahulu menunjukkan adanya kontroversi hubungan mutasi gen *FLT3* dengan jumlah *blast* sumsum tulang dan status ekspresi *CD34*. Efek mutasi gen *FLT3-ITD* dan *FLT3-TKD* pada aktivasi jalur sinyal dibawahnya (*STAT5*) mengakibatkan terjadinya hambatan fosfatase seluler yang menyebabkan amplifikasi dan multiplikasi efek proliferasi, hambatan proses apoptosis yang ditandai peningkatan protein anti apoptosis dan blokade diferensiasi yang menentukan jumlah sel *blast* sumsum tulang dan status ekspresi *CD34*. Belum ada penelitian yang mengaitkan hubungan mutasi gen *FLT3* pada LMA dengan ekspresi *Bcl-xL* sebagai penanda aktivitas antiapoptosis dan *cyclin D1* sebagai penanda proliferasi sel.

Beberapa penelitian melaporkan kejadian resistensi sel *blast* LMA terhadap *ara-C* karena adanya gangguan kuantitatif dan kualitatif *hENT1*, suatu *transporter* influks *ara-C* masuk sel *blast*. Penelitian *in vitro* melaporkan bahwa mutasi *FLT3-ITD* yang diekspresikan pada sel kultur deret mieloid manusia dan tikus menyebabkan *downregulation* ekspresi *hENT1*. Hubungan mutasi gen *FLT3-ITD*, -*TKD(D835)* dan ekspresi *hENT1* sel *blast* pada penderita LMA belum pernah diteliti secara *in vivo*.

Penelitian ini menggunakan rancangan *cross sectional* yang mengambil sampel sebanyak 35 penderita LMA *de novo* di rumah sakit di Surabaya non RSUD dr Soetomo secara *consecutive sampling*. Pemeriksaan status mutasi gen *FLT3-ITD*, -*TKD(D835)* dilakukan dengan metode *PCR* dan *PCR-RFLP*. Pemeriksaan jumlah *blast* dilakukan secara mikroskopik. Pemeriksaan ekspresi *CD34*, *cyclin D1*, *Bcl-xL* dan *hENT1* dilakukan dengan metode *immunophenotyping flowcytometry*.

Hasil penelitian ini menunjukkan frekuensi mutasi gen *FLT3-ITD* sebesar 22,9% dan tidak ditemukan adanya mutasi gen *FLT3-TKD(D835)* pada penderita LMA di Surabaya. Hasil pemeriksaan mikroskopik menunjukkan rerata jumlah *blast* pada penderita LMA dengan mutasi *FLT3-ITD* berbeda (lebih tinggi) bermakna dari penderita tanpa mutasi. Terdapat hubungan moderat bermakna antara mutasi gen

FLT3-ITD dengan jumlah *blast* penderita LMA. Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan bermakna antara status ekspresi *CD34* penderita LMA dengan status mutasi gen *FLT3-ITD*. Penderita LMA dengan mutasi gen *FLT3-ITD* menunjukkan ekspresi *cyclin D1* berbeda (lebih tinggi) bermakna, ekspresi *hENT1* berbeda (lebih rendah) bermakna dari penderita tanpa mutasi. Status mutasi gen *FLT3-ITD* penderita LMA memiliki hubungan moderat bermakna dengan ekspresi *cyclin D1* dan hubungan negatif kuat bermakna dengan ekspresi *hENT1*. Tidak didapatkan perbedaan bermakna ekspresi *Bcl-xL* antara penderita LMA dengan dan tanpa mutasi gen *FLT3-ITD*. Tidak didapatkan hubungan bermakna antara status mutasi *FLT3-ITD* dengan ekspresi *Bcl-xL*. Pada analisis uji model didapatkan adanya pengaruh langsung mutasi gen *FLT3-ITD* terhadap jumlah *blast* tanpa melalui peningkatan ekspresi *cyclin D1* dan ekspresi *Bcl-xL*.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa status mutasi gen *FLT3-ITD* pada LMA berhubungan dengan jumlah *blast* dan ekspresi *cyclin D1*, mutasi tersebut tidak berhubungan dengan ekspresi *Bcl-xL*. Hubungan mutasi dengan jumlah *blast* tidak disertai hubungan ekspresi *cyclin D1* maupun ekspresi *Bcl-xL* dengan jumlah *blast*. Mutasi *FLT3-ITD* pada LMA memiliki hubungan negatif kuat dengan ekspresi *hNET1*. Hasil ini mendorong perlunya pemeriksaan ekspresi *hENT1* khususnya pada penderita LMA yang disertai dengan mutasi *FLT3-ITD*.

SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) is one of the hematologic malignancy that increasing health problems in Indonesia and in the world. The rate of treatment failure in AML patients is quite high. AML has been associated with high relapse rate, low disease free survival. The problem is that there has not been chosen treatment yet based on risk classification.

The detection of cytogenetic abnormalities and genetic mutations in AML patients is very important to do because of their role in treatment protocol selection based on risk classification. *FLT3-ITD* gene mutation is a common mutation in AML patients. Its detection is very important because AML patients carrying this mutation are classified as poor prognosis patients.

Some previous studies reported that there were controversies between the association of *FLT3* gene mutation with blast cell count and CD34 expression status. These *FLT3-ITD,-TKD(D835)* will affect STAT5 causing the blockade of cellular phosphatase that contributed to amplification and multiplication of proliferation, inhibition of apoptosis, and differentiation. There is no research focusing in the association between these mutations and the expression of cyclin D1 as marker of proliferation and Bcl-xL as marker for antiapoptosis.

There were some research reported the resistance of blast cells in AML to ara-C because of the hENT1 impairment. Some investigators reported that AML cell culture with *FLT3-ITD* mutation caused downregulation of hENT1 expression. The association between the mutations status in AML patients has never been investigated in vivo.

This study is a cross sectional study with 35 newly diagnosed de novo AML patients in hospitals in Surabaya. The patients were selected based on consecutive sampling. The *FLT3* mutation status was examined using *PCR* and *PCR-RFLP*. Blast cell counts were examined microscopically. The expression of CD34, cyclin D1, Bcl-xL, and hENT1 were examined using immunophenotyping flowcytometry.

The frequency of *FLT3-ITD* gene mutation is 22,9%, and there was no *FLT3-TKD(D835)* gene mutation in this study. The mean of blast cells count in AML patients with *FLT3-ITD* gene mutation is significantly higher than patients without mutation. There was moderate association between the *FLT3-ITD* mutation status of with blast cell count. There was no association between *FLT3-ITD* mutation status with CD34 expression status. AML patients with *FLT-ITD* mutation has higher cyclin D1 expression and lower hENT1 expression than in patients without mutation. *FLT3-ITD* mutation status has a moderate association with cyclin D1 expression and negative strong association with hENT1 expression. There were no differences in Bcl-xL expression in AML patients with and without mutation. There was no association between *FLT3-ITD* mutation status with Bcl-xL expression. The results of

association analysis showed that *FLT3-ITD* gene mutation is associated the blast cell count and the expression of cyclin D1 as the marker of proliferative pathway, but cyclin D1 did not have association with the blast count. In this study, this mutation did not have association with the anti-apoptotic pathway Bcl-xL. Other markers of proliferative and anti-apoptotic pathway should be reanalyzes in order to know the patogenesis of *FLT3-ITD* gene mutation in AML.

This study conclude that FLT3-ITD gene mutation in AML associates with blast cell count, cyclin D1 expression, it has no association with Bcl-xL expression. Its association with blast cell count is not accompanied with the association of cyclin D1 and Bcl-xL expressions with blast cell count. AML patients with *FLT3-ITD* gene mutation have strong negative association with hENT1 expression. This result contributes the importance of hENT1 expression analysis especially in the AML patients carrying *FLT3-ITD* gene mutation.