

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Laporan WHO tahun 2012 menunjukkan bahwa osteosarcoma adalah tumor tulang primer paling umum dengan estimasi kejadian 4-5/1.000.000 per tahun. (Yunita *et al.*, 2014) Sementara itu di Indonesia, kejadian tertinggi osteosarcoma selama masa remaja sampai dengan dewasa awal yang didominasi laki laki sebesar 60%. (Coggins, 2005)

Hasil riset dasar kesehatan 2013 di Indonesia didapatkan prevalensi dari penyakit kanker sebesar 1,4 per mil (%). Tumor tulang didapatkan odds ratio sebesar 4%. (Oemiati *et al.*, 2011), sedangkan kejadian tumor tulang ganas di Indonesia sebesar 1.6% dari seluruh jenis tumor ganas pada manusia, hal ini menunjukkan kecenderungan adanya peningkatan tumor tulang setiap tahunnya. (Khan *et al.*, 2014)

Osteosarcoma merupakan neoplasma yang dapat didiagnosa berdasarkan pemeriksaan histologi terhadap produksi osteoid berhubungan dengan *malignant mesenchymal cells*. Osteosarcoma umumnya adalah tumor yang bersifat agresif dan cenderung bermetastasis secara dini dan memiliki beberapa tipe, dimana secara konvensional dibagi berdasarkan tipe sel (*osteoblastik*, *chondroblastic* dan *fibroblastic*). (Luetke *et al.*, 2014)

Kejadian tumor tulang di RSUPN Ciptomangunkusumo sebesar 1.2%, dimana kejadian tumor tulang ganas sebesar 1.3%. Berdasarkan data sistem informasi rumah sakit tahun 2005 kejadian osteosarcoma termasuk dalam lima besar kasus kanker ditemukan pada usia 1-17 tahun. Sementara itu berdasarkan evaluasi profil tumor tulang

pada anak di RSUPN Ciptomangunkusumo tahun 1995-2004, menunjukkan sebesar 73.7% kasus yang merupakan kasus osteosarcoma. (Khan *et al.*, 2014)

Di RSUD dr. Soetomo Surabaya pada evaluasi profil tahun 1991-1995 terhadap tumor ganas tulang sebanyak 373 kasus yang terdiri dari tumor ganas tulang primer sebanyak 183 kasus, dengan perbandingan antara pria dan wanita 1.4 : 1, dengan jumlah kasus primer 44 kasus per tahun, terutama osteosarcoma sebesar 62.4% kasus. (Jaffe *et al.*, 2013) Beberapa kasus osteosarcoma di RSUD dr. Soetomo memiliki gambaran karakteristik yang tidak sesuai dengan gambaran klinis osteosarcoma secara umum (klasik osteosarcoma) yang sering dikenal *uncommon osteosarcoma*. Hal ini sangat sulit untuk melakukan terapi dini secara optimal. (Khan *et al.* 2014)

Badan Kesehatan Dunia (WHO) telah melaporkan bahwa kematian akibat kanker sekitar 8,5 juta, dan diketahui penyebabnya lebih dari 100 jenis kanker. Karena itu alternative model terapi sangat diperlukan. Terapi yang telah digunakan pada kasus osteosarcoma selama ini adalah terapi konvensional antara lain terapi dengan cara pembedahan, chemoterapi, radioterapi, namun kurang menunjukkan adanya progress yang baik karena angka keberhasilan hanya (45%), hal ini disebabkan pendekatan terapi ini hanya menghambat pertumbuhan dan metastasis tumor, tetapi bukan membunuh tumor serta kurang efektif. (Agarwal, 2012) Karena itu secara keseluruhan survival rate 5 tahun hanya menunjukkan sebesar 10-20%. (Khan, *et al.*, 2014) Disamping itu dengan pendekatan multimodal therapy osteosarcoma dapat berasosiasi dengan kelainan jantung, ginjal, fungsi reproduktif dan pendengaran. (Capper *et al.*, 2018)

Terapi osteosarcoma sampai saat ini sudah cukup banyak dikembangkan untuk mencari efikasi mulai dari konvensional sampai pada terapi terkini yaitu terapi imun (*immune therapy*), terapi gen (*gen therapy*). Terapi secara konvensional osteosarcoma meliputi antara lain terapi dengan cara pembedahan, chemoterapi, radioterapi, namun

kurang menunjukkan adanya efektivitas yang baik karena angka keberhasilan hanya (45%), hal ini disebabkan pendekatan terapi ini hanya menghambat pertumbuhan dan metastasis tumor, tetapi bukan membunuh tumor serta kurang efektif. (Agarwal, 2012) Karena itu secara keseluruhan *survival rate* 5 tahun hanya menunjukkan sebesar 10-20%. (Khan *et al*, 2014) Dengan demikian masih diperlukan alternative terapi dengan target pada *deoxy ribonucleat* (DNA) yang menyebabkan fragmentasi DNA dikenal dengan apoptosis. Selain itu juga terapi dengan target pada organel intra seluler yang mengakibatkan peristiwa intrasitoplasmik dan intra nuclear dengan target akhir sel menjadi apoptosis dan atau nekrosis yaitu kematian sel secara premature akibat faktor eksternal sel atau jaringan seperti infeksi atau trauma. (Bielack *et al*, 2009)

Apoptosis berasal dari Bahasa Yunani yang brarti apo adalah dari, dan ptosis berarti jatuh. Oleh karena itu apoptosis sering digunakan istilah dalam proses biologi yang merupakan kematian sel terprogram (*programed cell death*) untuk menyingkirkan sel yang tidak berfungsi terhadap jaringan tubuh, dan kematian yang tidak terprogram karena adanya infeksi mikroorganisme. Hal ini terjadi sangat sistematis untuk melepaskan dari sel sekitarnya dari jaringan dan protoplasmanya memadat dan selanjutnya terikat membrane, selanjutnya mitokondria hancur dengan mengeksresi molekul seperti sitokrom C kedalam sitoplasma dan juga enzim endonuclease berakibat DNA menjadi terfragmentasi. (Brentnall *et al.*, 2013)

Kematian sel dapat terjadi melalui berbagai dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsic. Jalur ekstrinsik disebabkan karena tekanan dari luar (external stressor) yang menginisiasi terjadinya proses apoptosis melalui ligand dan fasligan reseptor yang dapat mengaktivasi FADD/TRADD sehingga terjadi aktivasi procaspase. Mekanisme ini berlangsung terus sehingga diakhiri apoptosis, disisi lain terdapat molecule yang anti apoptosis antara lain HSP70, namun terdapat molekul proaptosis seperti HSP 27,

90, 30, 50. Proses apoptosis jika terjadi penurunan HSP70 maka mekanisme apoptosis terjawab, tetapi jika HSP70 meningkat maka terjadi *survive*. Disamping itu juga terdapat jalur transduksi, jalur reaktif oksigen, jalur growth factor, dan jalur sitokin, sedang jalur intrinsik adalah proses apoptosis yang melibatkan mitokondria dependent sitokrom C, apaf-1 dan *caspase* 9, dan diakhiri dengan *caspase* 3, dan factor transkripsi seperti BCL2, BAX, BAK. (Korsmeyer *et al.*, 2000)

Berbagai proses kematian sel diatas kemungkinan besar imunoterapi menjadi pilihan dalam terapi osteosarcoma seperti menggunakan sel imun darah perifer atau *peripheral blood mononuclears* (PBMCs). Imunoterapi adalah terapi kanker dengan menggunakan immunoglobulin spesifik kanker antara lain antibody monoclonal, vaksin kanker, dan jenis lainnya seperti sel T terapi. *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMCs) adalah sel berinti yang aktif dalam pembuluh darah perifer. PBMCs secara fisiologi mempunyai sifat atau berfungsi sebagai *clock mekanisme* yang mengatur faktor transkripsi dan translasi di jaringan dan sel imun yang menghasilkan berbagai macam molekul pro dan anti inflamasi, ligand dan sitokin lainnya dari sel imun. PBMCs terdiri dari beberapa sel (*limfosit* (*Th1*, *Th2*, *Th17*), monosit, Natural Killer Cell, dendritic Cell, makrofage yang mempunyai fenotip dan aktivasi berbeda dalam sistem imun (Perkins *et al.*, 2016) Karena itu PBMCs memegang peranan penting dalam mengendalikan sistem imun melalui cytokine network atau interleukin, sekresi dan ekspresi seperti fasligand, perforin, granzyme B, TRAIL yang dapat memacu terjadinya apoptosis dan juga nekrosis sel melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik. (Wang and Tjandra, 2013)

Beberapa sifat dan tingkat aktivasi PBMCs dalam kecepatan sebagai perusak sel yang dianggap benda asing dalam hal ini sel kanker masih belum jelas. Walaupun PBMCs dari banyak hasil penelitian dapat ditigkatkan aktivasinya dengan pemberian

antioksidan, lipo polisakarida, atau jenis herbal lainnya yang mengandung tannin. Tetapi hal lain yang belum banyak diteliti dan dikaji lebih jauh dalam sensitivasi dan pengaktifan *PBMCs* adalah sekretom (Tarek and Lee, 2008)

Sekretom (*secretom*) adalah produk metabolit yang disekresikan oleh *mesenchymal stem cell (multipoten stem cell)* yang banyak mengandung *small* dan *large molecule* termasuk eksosom, ekstrasikula molekul, sitokin dan *growth factor* sebagai pemicu aktivasi sel endogenous termasuk sel imun secara normal yang dapat mengenali dan memicu berbagai macam reseptor yang diekspresikan oleh sel. Berdasarkan hal tersebut kemungkinan besar sekretom mempunyai peranan penting dalam aktivasi *PBMCs* secara fisiologis baik *in vivo* maupun *in vitro*. Molekul lain yang mempunyai sifat stimulasi dan aktivasi adalah *molecule* yang dihasilkan oleh makrofage dikenal dengan *colony stimulating factor* (CSF)(Tong *et al.*, 2017). Molekul tersebut termasuk molekul yang mempunyai peranan penting dalam factor transkripsi dan proliferasi sel imun termasuk NK-cell, CTL, monosit sehingga dapat meningkatkan aktivitas mononuclear cells melalui sekresi *TNF-alfa*, *IL-2*, *IL-6* yang berefek *paracrine*. Tetapi sejauh mana kekuatan dalam akselerasi peningkatan aktivasi sel imun dalam proses apoptosis terhadap *mesenchymal stem cell osteosarcoma* masih belum jelas.

Pendekatan terapi tersebut diatas mendorong penemuan model terapi yang baru dikenal dengan imunoterapi. Model ini antara lain menggunakan immuno conjugates yang digabung dengan obat toxic, radionuclide atau toxin model ini relative potensial untuk terapi berbagai macam atau tipe tumor (Bielack *et al.*, 2009), dan banyak diunakan untuk terapi pada stadium lanjut. Imunoterapi adalah terapi kanker dengan menggunakan immunoglobulin spesifik kanker antara lain antibody monoclonal, vaksin kanker, dan jenis lainnya lainnya seperti sel T terapi. Jenis terapi lainnya adalah gen terapi yang menggunakan urutan nucleotide yang dapat merubah sifat gen dengan cara

mengganti atau merubah urutan nucleotida dari gen penyandi kanker (Ando *et al.*, 2013). Berdasar pada hasil terapi kanker dengan menggunakan berbagai model pendekatan diatas masih belum jelas tingkat keberhasilannya. Karena itu diperlukan alternatif lain yang dapat membunuh sel kanker atau tumor melalui percepatan apoptosis.

Peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) adalah sel berinti dalam pembuluh darah perifer. *PBMCs* secara fisiologi mempunyai sifat atau berfungsi sebagai clock mekanisme yang mengatur faktor transkripsi dan translasi di jaringan dan sel imun yang menghasilkan berbagai macam molekul pro dan anti inflamasi, chemokine dan sitokin lainnya dari sel imun. *PBMCs* terdiri dari beberapa sel (*limfosit (Th1, Th2, Th17), monosit, macrophage, Natural Killer Cell, dendritic Cell*) yang mempunyai fenotip dan aktivasi berbeda dalam sistem imun (Perkins *et al.*, 2016) Karena itu *PBMCs* memegang peranan penting dalam mengendalikan sistem imun melalui cytokine network, serta menghancurkan sel yang dianggap asing bagi tubuh melalui sekresi perforin dan granzyme. Jika *PBMCs* teraktifasi oleh small molecule seperti kynurenine and kynurenic acid (KYN) dan aryl hydrocarbon receptor (Ahr) maka dapat mengaktifkan CD8 dan CD4, selain itu juga mengaktifkan TNF-alpha dan TRAIL.

Protein TRAIL dikodekan oleh gen yang dipetakan pada kromosom 3 di posisi 3q26. Situs ini mencakup kira-kira 20 kb, mencakup lima ekson dan empat intron, dan diatur oleh kombinasi faktor, termasuk faktor transkripsi, faktor epigenetik, dan adanya polimorfisme nukleotida tunggal dan isoform yang secara fungsional berbeda (Griffits *et al.*, 199) Seperti anggota lain dari keluarga TNF, protein TRAIL dapat dideteksi sebagai protein tipe trans-membran dan sebagai protein larut (Fanget *et al.*, 1999) TRAIL memberikan efek biologisnya melalui interaksi dengan sistem reseptor ligan kompleks dari lima reseptor serumpun, yang dapat diikat dengan afinitas yang berbeda

di bawah kondisi fisiologis normal (Kamohara, *et al.*, 2003) Pada manusia, TRAIL dilepaskan oleh beberapa jenis sel, dan mampu mengikat reseptor kematian pro-apoptosis trans-membran TRAIL-R1 / DR4 dan TRAIL-R2 / DR5. Ia juga mengikat ke dua reseptor pemikat transmembran TRAIL-R3 / DcR1 dan TRAIL-R4 / DcR2, yang tidak memiliki domain kematian yang utuh. Oleh karena itu TRAIL dalam penelitian ini digunakan sebagai marker awal adanya induksi molekul yang bersifat proapoptosis melalui sekresi TNF-alpha dan TRAIL dengan jalur ekstrinsik. Molekul TRAIL merupakan grup dari Tumor Necrose Factor (TNF) dalam sekresi ke medium dipengaruhi waktu, yang berarti semakin lama semakin banyak yang disekresikan sehingga dapat berpengaruh terhadap lingkungan mikro (Kamohara *et al.*, 2003).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka permasalahan penelitian ini dapat dirumuskan

1. Apakah sensitivasi *PBMCs* dengan sekretom dan CSF-2 dapat meningkatkan sekresi *TNF-alpha* pada *mesenchymal stem cell* osteosarcoma ?
2. Apakah sensitivasi *PBMCs* dengan sekretom dapat meningkatkan ekspresi *sTRAIL* pada *mesenchymal stem cell* osteosarcoma ?
3. Apakah sensitivasi *PBMCs* dengan CSF-2 dapat meningkatkan ekspresi *sTRAIL* pada *mesenchymal stem cell* osteosarcoma ?
4. Apakah sensitivasi *PBMCs* dapat meningkatkan ekspresi *Caspase 8, caspase 3, annexine* pada *mesenchymal stem cell* osteosarcoma ?
5. Apakah sensitivasi *PBMCs* dapat menyebabkan *mesenchymal stem cell* osteosarcoma *Apoptosis* berdasarkan fragmentasi *DNA* dengan marker *Anexine*

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Menjelaskan sensitivitas *PBMCs* dalam menginduksi percepatan *apoptosis* berdasarkan sekresi sekresi *sTRAIL*, dan sekresi *TNF-alpha*, *caspase-8*, *caspase-3*, dan *anexine*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Isolasi dan karakterisasi fenotip *stem cell osteosarcoma* berdasarkan ekspresi CD133+ dan CD44+
2. Menganalisis peningkatan sekresi *TNF-alpha* pada sensitivasi *PBMCs* dengan sekretom dan *makrofage stimulating factor (CSF)*
3. Menganalisis peningkatan ekspresi *sTRAIL* pada sensitifikasi *PBMCs* dengan sekretom dan *makrofage stimulating factor (CSF)*
4. Menganalisis ekspresi *caspase 8* pada *stem cell osteosarcoma* setelah dikokultivasi dengan sensitivasi *PBMCs*
5. Menganalisis ekspresi *caspase 3* pada *stem cell osteosarcoma* setelah dikokultivasi dengan sensitivasi *PBMCs*
6. Menganalisis jumlah *stem cell osteosarcoma* yang *Apoptosis* berdasarkan fragmentasi *DNA* dengan marker *Anexine*

1.3.3 Manfaat Penelitian

1. **Manfaat Ilmiah** : hasil penelitian ini dapat memberikan penjelasan secara scientific bahwa proses apoptosis *mesenchymal osteosarcoma* yang merupakan efek transduksi dan sensitisasi dari *PBMCs* melalui molekul sekretom, dan *SCF*
2. **Manfaat Praktis** : hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa *PBMCs* yang distimulasi dengan sekretom dan CSF dan dapat dikembangkan menjadi terapi alternatif terhadap osteosarcoma

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Osteosarcoma

Osteosarcoma merupakan neoplasma yang terbentuk dari *primitive bone-forming mesenchymal stem cell*.(Berner *et al.*, 2015) Berdasarkan data *SERR (Surveillance, Epidemiology and End Result)* National Cancer Institute, Angka kejadian osteosarcoma sekitar 0,2% dari total neoplasma dan merupakan keganasan terbanyak ke delapan dari seluruh keganasan pada anak dan remaja (2,4% dari seluruh keganasan pada anak dan remaja). Namun dari seluruh keganasan primer pada tulang, osteosarcoma ini adalah tumor tulang ganas dengan insiden atau angka kejadian yang paling tinggi untuk keganasan non-hematopetik. Insiden osteosarcoma di Amerika dilaporkan sebesar 4.0 (3.5 – 4.6) per tahun per satu juta penduduk untuk rentang usia 0-14 tahun dan 5.0 (4.6 – 5.6) per tahun per satu juta penduduk untuk rentang usia 0-19 tahun.(Berner *et al.*, 2015)

Berdasarkan distribusi usia, osteosarcoma mempunyai distribusi yang khas dibandingkan keganasan yang lain yaitu adanya dua puncak distribusi (*bimodal distribution*) dengan puncak pertama pada dekade kedua kehidupan dan puncak kedua pada usia lebih dari 60 tahun.(Louis *et al.*, 2016) Puncak pertama dari insiden osteosarcoma ini terjadi pada usia sekitar 15 tahun dan menurun secara signifikan pada dekade berikutnya. Angka kejadian ini meningkat kembali pada usia lebih dari 60 tahun (*second peak distribution*) yang seringkali dihubungkan dengan adanya preexisting conditon dari pasien tersebut misalnya adanya paget's disease, riwayat radiasi, bone infark, kronik osteomyelitis dan adanya kista dari *degenerative joint disesase*.(Greenspan , 2007)