

# **EKSPRESI PROTEIN BCL-2, CD-44, COX-2 DAN VEGF PADA KARSINOMA NASOFARING RESPONS TINGGI DAN RESPONS RENDAH PASCA RADIOTERAPI**

**Widiastuti**

Promotor : Prof.Dr.H.Trijono KSP.,dr.,SpRad (K)

RADIOTHERAPY ; NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

KKA KK Dis K 07/12 Wid e

Copyright© 2011 by Airlangga University Library Surabaya

## **RINGKASAN**

Karsinoma Nasofaring (KNF) merupakan penyakit keganasan dengan angka kejadian tertinggi dan menjadi salah satu penyebab kematian utama di bidang Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok-Bedah Kepala dan Leher baik di Indonesia maupun di Asia Tenggara. Radioterapi (RT) sebagai terapi tunggal hingga saat ini masih merupakan pilihan utama untuk KNF yang belum metastasis jauh, diharapkan dapat memperbaiki kualitas hidup dan memperpanjang kelangsungan hidup penderita, oleh karena KNF termasuk keganasan yang dapat disembuhkan dengan RT. Kenyataan klinis sampai saat ini hasil RT belum memuaskan. Kegagalan RT dalam memberantas KNF ditunjukkan oleh jumlah KNF respons rendah yang masih tinggi, sekitar 35%-57%. Residu tumor sebagai bentuk manifestasi klinis dari KNF respons rendah biasanya akan berkembang menjadi tumor residif yang menunjukkan suatu prognosis buruk.

Berbagai penelitian menunjukkan terdapat hubungan yang erat antara progresivitas pertumbuhan sel kanker dengan keainan tingkat molekuler, yang merupakan akumulasi dari lesi genetik yang sangat kompleks, baik karena aktivitas gen pemicu pertumbuhan tumor (proto onkogen misalnya BCL-2), tidak adanya aktivitas gen penghambat tumor dan gen pengendali apoptosis, yang menyebabkan proto onkogen menjadi dominan sehingga akan memicu aktivitas proliferasi sel kanker secara berlebihan. Mekanisme BCL-2 dalam meningkatkan angiogenesis adalah melalui peningkatan siklus proliferasi sel, hal ini akan memicu peningkatan proses desak antar sel, berakibat terjadinya peningkatan pengeluaran phospholipase A2 dan memacu pengeluaran *arachidonic acid*. Asam arakhidonat ini dipengaruhi oleh COX-2 (Cyclooxygenase-2) akan diubah menjadi prostaglandin yang akan menyebabkan sekresi angiopoitin 2 dan selanjutnya menginduksi ekspresi protein CD-44 dan VEGF, menyebabkan terjadinya angiogenesis dan progresivitas sel kanker. Progresivitas meningkat ditunjukkan oleh adanya peningkatan ekspresi protein BCL-2 maupun COX-2. Hal ini menandakan adanya respons rendah KNF pasca RT.

Protein CD-44 merupakan molekul adesi leukosit atau molekul permukaan sel, berperan saat limfosit melekat pada endotelium, selanjutnya keluar dari sirkulasi darah. CD-44 mempunyai peranan penting dalam imunitas seluler, adesi ke matriks interseluler, transduksi sinyal melalui membran sel, proses proliferasi sel, migrasi sel, angiogenesis dan sekresi faktor pertumbuhan. Protein CD-44 berperan penting untuk aktivitas fisiologis sel normal maupun aktivitas patologis sel kanker, sehingga pasca RT tidak selalu menimbulkan perbedaan ekspresi protein penderita KNF respons tinggi dan respons rendah.

Proses angiogenesis dan vaskulogenesis berhubungan erat dengan peran protein VEGF yang sangat berhubungan dengan prognosis buruk suatu karsinoma. Ekspresi protein VEGF pada KNF pasca RT yang berlebihan merupakan petanda peningkatan angiogenesis dan progresivitas sel kanker. Hal ini ditunjukkan oleh adanya respons rendah KNF pasca RT, atau sebaliknya.

Masalah penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut: Apakah terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2, CD44, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT?

Tujuan penelitian ini yaitu mendapatkan perbedaan ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT.

Penelitian ini dengan jenis Observasional (eksplanatorik), rancangan *Cross Sectional Analytic Study*. Populasinya adalah penderita KNF yang berobat ke Unit Rawat Jalan Poliklinik Onkologi THT-KL RSUD Dr. Moewardi Surakarta, usia 40-60 tahun, histopatologis KNF *undifferentiated* stadium III dan IV tanpa metastasis jauh, setuju ikut sebagai sampel penelitian dengan menanda-tangani *informed consent*. Kriteria penolakan yaitu menderita penyakit DM, Infark jantung, Sepsis, TBC dan penyakit berat lainnya, pernah mendapat pengobatan definitif untuk KNF baik radioterapi maupun kemoterapi sebelumnya. Sebanyak 18 penderita KNF mendapatkan Radioterapi dengan sinar gamma dari pesawat Cobalt<sup>60</sup>, dosis 200 cgy per fraksi, 5 kali per minggu tanpa selang waktu (teknik konvensional), mencapai dosis total 6.600 cgy selama 6-7 minggu untuk tumor primer di nasofaring dan kelenjar getah bening di leher. Spesimen berasal dari jaringan biopsi penderita KNF pra dan pasca radioterapi, dilakukan pewarnaan hematoksilin-eosin dan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi protein dinilai secara semi kuantitatif oleh dua orang yaitu peneliti dan Dokter Spesialis Patologi Anatomi senior tanpa mengetahui keadaan kliniko-patologis, 10 lapang pandang di bawah mikroskop cahaya (pembesaran 400x). Hasil positif bila didapatkan warna merah kecoklatan pada sel tumor dan dinyatakan persen perlapang pandang.

Respons tumor dianalisis berdasarkan perubahan Volume Tumor Nasofaring (VTN), dalam satuan cc, dihitung secara komputersasi dari hasil CT Scan kepala, penghitungan VTN oleh seorang Dokter Spesialis Radioterapi didampingi oleh seorang ahli fisika medis. Menurut *WHO Offset Publications* No 48 tahun 1979 respons terapi dibagi menjadi 4 tingkat respons yaitu Respons Lengkap (RL) apabila tidak didapatkan sel kanker lagi atau pengecilan tumor 100%. Respons Sebagian (RS) apabila massa tumor berkurang 50% atau lebih. Tidak ada Respons (TR) apabila tidak ada perubahan pada ukuran tumor atau pengecilan tumor kurang dari 50%. Progresif (P) apabila volume tumor atau salah satu tumor justru membesar lebih dari 25% dari ukuran awal atau timbul tumor baru. RL di kategorikan dalam respons tinggi, sedangkan RS, TR dan P di kategorikan sebagai respons rendah.

Analisis yang digunakan dalam penelitian adalah *independent-t test* dan analisis diskriminan, untuk mendapatkan perbedaan ekspresi protein BCL-2, COX-2, CD-44 dan VEGF pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT, serta kekuatan pembedanya.

Hasil penelitian didapatkan penderita laki laki 12 dan perempuan 6, dengan ratio laki laki dibandingkan perempuan adalah 66,67% : 33,33% atau 2 : 1. Umur antara 40 – 60 tahun dengan nilai mean: 49,5 ± SD 7,333. Stadium III 8 (44,40%), stadium IV A 8 (44,40%) dan stadium IVB 2 (11,20%).

VTN (Volume Tumor Nasofaring) pra RT dengan mean:  $39,9156 \pm SD 18,36474$ , pasca RT mean:  $15,7256 \pm SD 11,65385$ . Pasca radioterapi didapatkan: respons tinggi (RTG) 3 (16,70%) dan respons rendah (RR) 15 (83,30%), terinci menjadi respons sebagian (RS) 9 (44,40%), tidak ada respons (TR) 4 (22,20%) dan progresif (P) 2 (16,70%).

Hasil penelitian didapatkan bahwa pra-RT rerata ekspresi protein BCL-2 pada KNF respons tinggi adalah  $54,33 \pm 33,32$ , respons rendah adalah  $44,07 \pm 30,17$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan hasil ( $p = 0,603$ ), berarti ekspresi protein BCL-2 pada KNF pra-RT antara respons tinggi dan respons rendah didapatkan perbedaan tidak bermakna oleh karena ( $p > 0,05$ ). Pasca RT pada KNF respons rendah secara bermakna memperlihatkan ekspresi protein BCL-2 yang lebih banyak yaitu  $37,80 \pm 26,13$  dibanding respons tinggi sebesar  $4,33 \pm 0,58$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein BCL-2 antara respons tinggi dan respons rendah pasca RT didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Hipotesis ke 1 yaitu terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT terbukti.

Pra-RT rerata ekspresi protein CD-44 pada KNF respons tinggi adalah  $49,00 \pm 43,30$ , respons rendah adalah  $37,13 \pm 26,15$ . Berdasarkan hasil uji statistik ( $p = 0,525$ ), berarti ekspresi protein CD-44 antara respons tinggi dan respons rendah pra-RT didapatkan perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Pasca-RT didapatkan rerata ekspresi protein CD-44 pada KNF respons tinggi adalah  $27,00 \pm 41,58$ , respons rendah adalah  $66,53 \pm 27,37$ . Meskipun ekspresi protein CD-44 respons tinggi pasca RT lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok respons rendah, namun berdasarkan hasil uji statistik, ekspresi protein CD-44 antara respons tinggi dibandingkan respons rendah pasca RT, didapatkan nilai ( $p = 0,05$ ), berarti ekspresi protein CD-44 antara respons tinggi dan respons rendah pasca-RT didapatkan perbedaan tidak bermakna ( $p = 0,05$ ). Hipotesis ke 2 yaitu terdapat perbedaan ekspresi protein CD-44 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT tidak terbukti.

Pra-RT, rerata ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi adalah  $31,33 \pm 15,31$ , respons rendah adalah  $33,67 \pm 25,62$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,883$ ), berarti ekspresi protein COX-2 antara respons tinggi dan respons rendah pra-RT didapatkan perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Pasca RT rerata ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi adalah  $2,00 \pm 1,00$ , respons rendah adalah  $52,47 \pm 30,69$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein COX-2 antara respons tinggi dan respons rendah pasca RT didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Hipotesis ke 3 yaitu terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT terbukti.

Pra RT rerata ekspresi protein VEGF pada KNF respons tinggi adalah  $32,00 \pm 14,73$ , respons rendah adalah  $17,73 \pm 21,14$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,286$ ), berarti ekspresi protein VEGF antara respons tinggi dan respons rendah pra-RT didapatkan perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Pasca-RT rerata ekspresi protein VEGF pada KNF respons tinggi adalah  $2,00 \pm 1,00$ , respons rendah adalah  $46,93 \pm 29,05$ . Berdasarkan hasil uji statistik ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein VEGF pada KNF antara respons tinggi dan respons rendah pasca-RT didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Hipotesis ke 4 yaitu terdapat perbedaan ekspresi protein VEGF pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT terbukti.

Hasil analisis diskriminan didapatkan ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada KNF pra-RT antara respons tinggi dan respons rendah terdapat perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Artinya pada pra-RT, semua ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada KNF tidak ada perbedaan tingkat respons. Berdasarkan hasil uji statistik ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pasca-RT didapatkan nilai ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT terlihat berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ). Ekspresi protein CD-44 pada KNF pasca RT didapatkan ( $p = 0,050$ ), berarti dari hasil uji statistik didapatkan perbedaan tidak bermakna, sehingga hipotesis ditolak. Berdasarkan analisis diskriminan didapatkan skor diskriminan dengan nilai tengah atau *Cut-off* untuk memisahkan kelompok respons tinggi dan respons rendah = -1,3. Apabila  $D < -1,3$  maka termasuk respons tinggi atau kelompok dengan prognosis lebih baik sedangkan apabila didapatkan  $D > -1,3$  maka termasuk respons rendah atau kelompok dengan prognosis buruk. Dilihat dari hasil validasi (*Cross-Validated*) maka tampak angka kekuatan pembeda sebesar 88,9% sama dengan angka sebelumnya (*Original*) 88,9%. Semakin besar harga kekuatan pembeda tersebut, maka model diskriminan semakin *significant* digunakan untuk mengklasifikasikan kelompok yang diamati. Menurut Tim Penelitian dan Pengembangan Wahana Komputer (2005), di atas 50% berarti baik untuk digunakan sebagai pembeda.

Dengan rancangan penelitian ini, dapat diketahui dengan baik perbedaan ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pasca radioterapi. Ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pasca RT pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca radioterapi, dapat digunakan sebagai pembeda tingkat respons tumor, dengan kekuatan pembeda sebesar 88,9%. Hipotesis ke 5 yaitu ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pasca RT pada penderita KNF dapat digunakan sebagai pembeda tingkat respons antara respons tinggi dan respons rendah pasca-RT terbukti dengan angka kekuatan pembeda sebesar 88,9%.

Kesimpulan: Tidak terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pra RT. Terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT, tidak untuk ekspresi protein CD-44. Ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF, pada penderita KNF respons tinggi, lebih rendah ekspresinya dibanding respons rendah pasca RT, ekspresi protein CD-44 tidak ada perubahan. Jadi mekanisme respons tinggi pada KNF pasca RT ditunjukkan oleh penurunan ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF dan tidak diikuti oleh perubahan ekspresi protein CD-44 dan sebaliknya. Ekspresi protein COX-2, VEGF dan BCL-2 pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons tinggi dan respons rendah, didapatkan nilai *cut off* - 1,3 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 88,9%. Ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons sebagian dan tidak ada respons, didapatkan nilai *cut off* - 0,268 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%. Ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok tidak ada respons dan kelompok progresif, didapatkan nilai *cut off* 0,184 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%. Ekspresi protein BCL-2 sebagai protap untuk menentukan keberhasilan RT pada KNF.

## ABSTRAK

Morbiditas dan mortalitas karsinoma nasofaring (KNF) masih tinggi. Radioterapi (RT) sebagai terapi pilihan utama, namun hasil terapi RT untuk KNF masih belum memuaskan. Berbagai penelitian menunjukkan terdapat hubungan yang erat antara progresivitas pertumbuhan sel kanker dengan kelainan di tingkat molekuler seperti protein BCL-2, CD 44, COX-2 dan VEGF.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan perbedaan ekspresi protein BCL-2, COX-2, CD-44 dan VEGF pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT yang hingga saat ini masih belum jelas.

Jenis penelitian Observasional (eksplanatorik), rancangan *Cross Sectional Analytic Study*. Spesimen berasal dari jaringan biopsi 18 penderita KNF pra-RT dan pasca RT yang mendapat sinar- $\gamma$  dosis radiasi 200 cgy per fraksi, 5 kali/minggu tanpa selang sampai dosis total 6.600 cgy selama 6-7 minggu pada tumor primer di nasofaring dan kelenjar getah bening di leher. Dilakukan pewarnaan hematoxilin-eosin dan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi protein dinilai semi kuantitatif, positif berwarna merah kecoklatan pada sel tumor, dinyatakan persen per-lapang pandang. Respons tumor dianalisis berdasarkan perubahan Volume Tumor Nasofaring (VTN) satuan ml, dari hasil CT Scan kepala menggunakan program *D.Com*. Analisis data dengan *independent-t test* dan analisis diskriminan.

Hasil penelitian didapatkan pra-RT rerata ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah tidak didapatkan perbedaan. Sebelum radioterapi semua variabel tidak ada perbedaan tingkat respons untuk BCL-2 ( $p=0,603$ ), CD-44 ( $p=0,525$ ), COX-2 ( $p=0,883$ ) dan VEGF ( $p=0,286$ ). Pasca RT rerata ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pada KNF respons tinggi dibandingkan respons rendah didapatkan perbedaan ( $p=0,007$ ), sedangkan protein CD-44 tidak terdapat perbedaan ( $p=0,05$ ). Hasil analisis diskriminan didapatkan ekspresi protein COX-2, VEGF dan BCL-2 pasca-RT merupakan variabel pembeda antara respons tinggi dan respons rendah dengan nilai *cut off* – 1,3 dan kekuatan pembeda sebesar 88,9%.

Kesimpulan: Tidak terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pra RT. Terdapat perbedaan ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT, sedangkan ekspresi protein CD-44 tidak. Ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF, pada penderita KNF respons tinggi, lebih rendah ekspresinya dibanding respons rendah pasca RT, ekspresi protein CD-44 tidak ada perubahan. Jadi mekanisme respons tinggi pada KNF pasca RT ditunjukkan oleh penurunan ekspresi protein BCL-2, COX-2 dan VEGF dan tidak diikuti oleh perubahan ekspresi protein CD-44 dan sebaliknya. Ekspresi protein COX-2, VEGF dan BCL-2 pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons tinggi dan respons rendah, didapatkan nilai *cut off* – 1,3 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 88,9%. Ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons sebagian dan tidak ada respons, didapatkan nilai *cut off* - 0,268 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%. Ekspresi protein BCL-2, CD-44, COX-2 dan VEGF respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok tidak ada respons dan kelompok progresif, didapatkan nilai *cut off* 0,184 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%. Ekspresi protein BCL-2 sebagai protap untuk menentukan keberhasilan RT pada KNF

**Kata kunci:** radioterapi, KNF, BCL-2, CD-44, COX-2, VEGF, respons tumor

## ABSTRACT

The morbidity and mortality of nasopharynx carcinoma (NPC) are still high up until now in our country. Radiotherapy (RT) is the primary choice of therapy, but the results of RT for NPC are not satisfactory. Several studies reported a close relationship between the progression of the cancer cells growth and abnormalities at the molecular level.

The aim of this study was to find out the differences of protein expression of BCL-2, CD-44, COX-2 and VEGF in high and low response in NPC after radiotherapy.

The design was an observational Cross Sectional Analytic study. Specimens were obtained from biopsy of 18 NPC patients on before and after RT with  $\gamma$ -ray, 200 cgy dose radiation per fraction, 5 times/week with no interval to reach total doses of 6600 cgy during 6-7 weeks, targeted on primary tumor in the nasopharynx and cervical lymph nodes. State with haematoxylin-Eosin staining and immunohistochemistry examination. Protein expressions were semi-quantitatively value, positive expressions were noted if a brownish-red colour were found on the tumor cells and expressed as percent per field of view. Tumor responses were analyzed based on nasopharynx tumor volume (NTV) changes in cc, as calculated from the results of head CT scan using a D-Com program. Data were analyzed with independent t-test and discriminant analyse.

There was no significant differences of mean protein expression of BCL-2, CD-44, COX-2 and VEGF in NPC high response compared with low response pre-RT. Before RT there was no differentiation response level of all variables, confirm with statistical analyse of BCL-2 ( $p=0,603$ ), CD-44 ( $p=525$ ), COX-2 ( $p=0,883$ ) and VEGF ( $p=0,286$ ). Mean protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF between high and low response group after RT were different significantly ( $p=0,007$ ) while for CD-44 protein expression was not different significantly ( $p=0,05$ ). In discriminant analyse showed that protein expression of COX-2, VEGF and BCL-2 after RT were distinct variables and those variables were capable of discriminating NPC patients into high or low response group with cut off -1,3 its accuracy value was 88.9%.

The conclusions, there were no differences between protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF in NPC patient with high and low response before RT. There were differences protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF in NPC patient with high and low response after RT, but not for CD-44. Protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF in high response of NPC patient were lower than those of in the low response after RT and no change in CD-44 protein expression. Thus the high response mechanism in NPC patient after RT, indicated for decreased protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF without alteration in CD-44 protein expression and vice versa. Protein expression of BCL-2, COX-2 and VEGF were differentiating variable into high and low response group in NPC patient after RT with cut off -1,3 its accuracy value was 88.9%. Protein expression of BCL-2, CD-44, COX-2 and VEGF low response after RT, were differentiating variable into part and no response group in NPC patient after RT with cut off value was -0,268 and different significant of accuracy value 60%. Protein expression of BCL-2, CD-44, COX-2 and VEGF low response after RT, were distinct variable into no response and progressive group in NPC patient after RT with cut off value was 0,184 and different significant of accuracy value 60%. BCL-2 protein expression is a standart procedure to determine the result of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma.

**Keywords :** radiotherapy, nasopharyngeal carcinoma, BCL-2, CD-44, COX-2, VEGF, tumor response