

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi umat manusia pada umumnya dan ilmu kedokteran pada khususnya dan semoga Allah SWT melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi.

Agustus 2015

Penulis



RINGKASAN

HUBUNGAN APOPTOSIS, EKSPRESI *CATALASE*, *HEAT SHOCK PROTEIN 70*, *CYTOKERATIN 19* DAN *PHOSPHATIDYLINOSITOL TRIPHOSPHATE* DENGAN KEJADIAN RESISTENSI KANKER SERVIKS YANG DILAKUKAN RADIOTERAPI

Kanker serviks masih merupakan salah satu masalah kesehatan wanita di dunia. Keganasan ini menjadi penyebab terbanyak kematian kanker ginekologis di dunia yang sebagian besar terjadi di negara berkembang termasuk Indonesia. Kebanyakan pasien datang pada stadium lanjut meskipun pencegahan primer sudah banyak dilakukan. Pada stadium awal operasi menjadi pilihan, sedangkan pada stadium lanjut, radioterapi menjadi pilihan utama. Selain memperbaiki pencegahan primer dan fasilitas skrining, dengan fakta tingginya kasus baru kanker serviks pada stadium lanjut, maka peran radioterapi menjadi sangat penting.

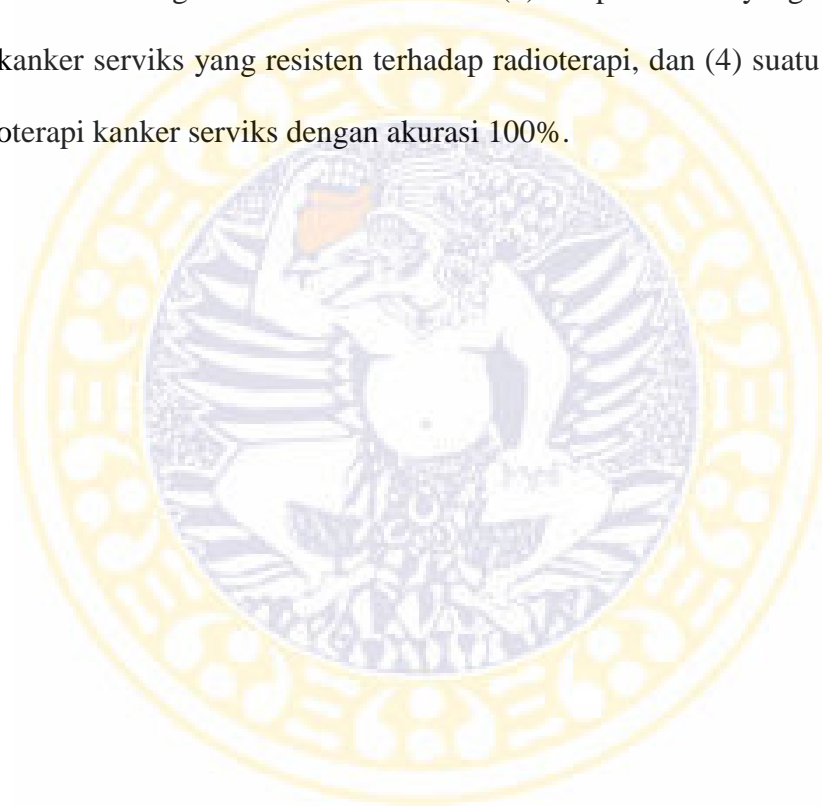
Kanker serviks telah diketahui sebagai salah satu tumor yang bersifat radioresponsif sehingga radioterapi menjadi terapi yang paling sering digunakan. Resistensi terhadap radioterapi dapat menghambat efektifitas terapi dan menjadi salah satu penyebab utama kegagalan radioterapi. Didapatkan variasi sensitivitas sel dan jaringan terhadap efek radiasi ionisasi. Radiosensitivitas dapat bergantung pada kehadiran dari subpopulasi sel dari tumor yang kecil dan resisten. Proses kematian sel akibat radioterapi terbanyak melalui apoptosis sehingga apoptosis dan jalur yang melibatkan apoptosis dapat digunakan sebagai indikator untuk mengetahui sensitivitas radioterapi. Studi ini mencoba mengungkap hubungan apoptosis, *catalase* (CAT), *heat shock protein* (Hsp)70, *cytokeratin* (CY)19 dan *Phosphatidylinositol Triphosphate* (PIP3) dikaitkan dengan terjadinya resistensi radioterapi kanker serviks, dengan harapan akan diperoleh indikator yang bermanfaat untuk menentukan keberhasilan radioterapi.

Sampel penelitian ini adalah 40 penderita kanker serviks stadium IIB-III yang mendapatkan radiasi eksterna lengkap sebanyak 35 kali di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan terbagi menjadi 20 sampel radiosensitif dan 20 sampel radioresisten. Tiga bulan setelah radioterapi terakhir dilakukan evaluasi klinis dengan konfirmasi pemeriksaan sel kanker pada biopsi serviks. Biopsi serviks yang dilakukan untuk pemeriksaan histopatologi, juga digunakan untuk melihat jumlah sel apoptosis melalui metode *Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling* (TUNEL) dan pemeriksaan ekspresi CAT, Hsp70, CY19, PIP3 dengan metode imunohistokimia. Penelitian analitik observasional ini menggunakan rancang bangun *cross sectional*.

Dari 40 pasien pada penelitian ini didapatkan hasil usia rerata 50,93 tahun dan jenis histopatologi *squamous* sebanyak 60 %. Didapatkan perbedaan antara resistensi radioterapi dengan jenis patologi anatomi, namun tidak didapatkan perbedaan dengan umur dan stadium. Pada penelitian ini juga didapatkan sel apoptosis lebih rendah disertai ekspresi CAT, Hsp70, CY19 dan PIP3 yang lebih tinggi secara signifikan pada kanker serviks radioresisten dibandingkan radiosensitif. Dari analisis diskriminan kelima variabel (apoptosis, CAT, Hsp70, CY19 dan PIP3), semuanya dapat dijadikan indikator sensitivitas radioterapi dengan ekspresi PIP3 yang paling dominan dan Hsp70 yang paling kecil peranannya. Fungsi diskriminan yang diperoleh dari penelitian ini dapat memberikan akurasi indikator resistensi kanker serviks hingga 100% dengan *cut off* skor sebesar – 1,54.

Kesimpulan penelitian ini adalah adanya jumlah sel apoptosis yang lebih rendah diikuti ekspresi *catalase, heat shock protein 70, cytokeratin 19* dan *phosphatidylinositol triphosphate* yang lebih tinggi dimana semuanya memiliki peranan dalam jalur apoptosis pada jaringan kanker serviks yang resisten terhadap radioterapi dibandingkan dengan yang sensitif. Kesimpulan lain dari

penelitian ini adalah adanya resistensi radioterapi kanker serviks yang lebih sering terjadi pada jenis histopatologi *non squamous* dan juga didapatkannya fungsi diskriminan untuk indikator sensitivitas radioterapi kanker serviks dengan akurasi hingga 100%. Temuan baru pada penelitian ini adalah: (1) Ekspresi CAT yang lebih tinggi pada jaringan tumor kanker serviks yang resisten terhadap radioterapi dengan menggunakan imunohistokimia pada manusia secara langsung, (2) Ekspresi CY19 yang lebih tinggi pada jaringan tumor kanker serviks yang resisten terhadap radioterapi dan dibuktikan signifikan secara statistik. (3) Ekspresi PIP3 yang lebih tinggi pada jaringan tumor kanker serviks yang resisten terhadap radioterapi, dan (4) suatu model prediktor sensitivitas radioterapi kanker serviks dengan akurasi 100%.



SUMMARY

APOPTOSIS, CATALASE,

HEAT SHOCK PROTEIN 70, CYTOKERATIN 19 AND

PHOSPHATIDYLINOSITOL TRIPHOSPHATE EXPRESSION

RELEVANCE WITH RADIOTHERAPY RESISTANCE

OF CERVICAL CANCER

Cervical cancer is still considered to be one of the main women health problems in the world. This malignancy is the most common cause of gynecological cancer related death in the world and majority occurs in developing countries, including Indonesia. Most patients were diagnosed in advanced stages despite our effort in primary prevention. In the early stages surgery will be the best option, while in advanced stages radiotherapy is the principal treatment. While we tried hard to improve primary prevention and screening facility, the facts about fast number of high new advanced stage cervical cancer cases hallmark the paramount role of radiotherapy in this country. This study tried to unravel the radiotherapy resistance mechanism in cervical cancer in our efforts to increase the role, sensitivity and effectivity of radiotherapy to improve the survival rate of advanced stage cervical cancer patients.

Cervical cancer has been known to be as one of the radioresponsive cancer and thus radiotherapy become the most commonly used therapy in that regard. Resistance to radiotherapy can inhibit the efficacy and became one of the main culprit of treatment failure. There are variety of cells and tissues sensitivity to the effects of ionizing radiation. Radiosensitivity depends on the presence of a small and resistant subpopulation of tumor cells. Radioresponsive tumor will undergo more radiation induced apoptosis, thus apoptosis and all the pathways involved can be used as indicators to determine radiosensitivity. This study tried to reveal a relationship between

apoptosis and several biomarkers that have an important role in apoptosis pathway such as catalase (CAT), heat shock protein (Hsp) 70, cytokeratin (CY) 19 and phosphatidylinositol triphosphate (PIP) 3 with the occurrence of cervical cancer radiotherapy resistance, in hopes to obtained a useful indicator to determine the success of radiotherapy.

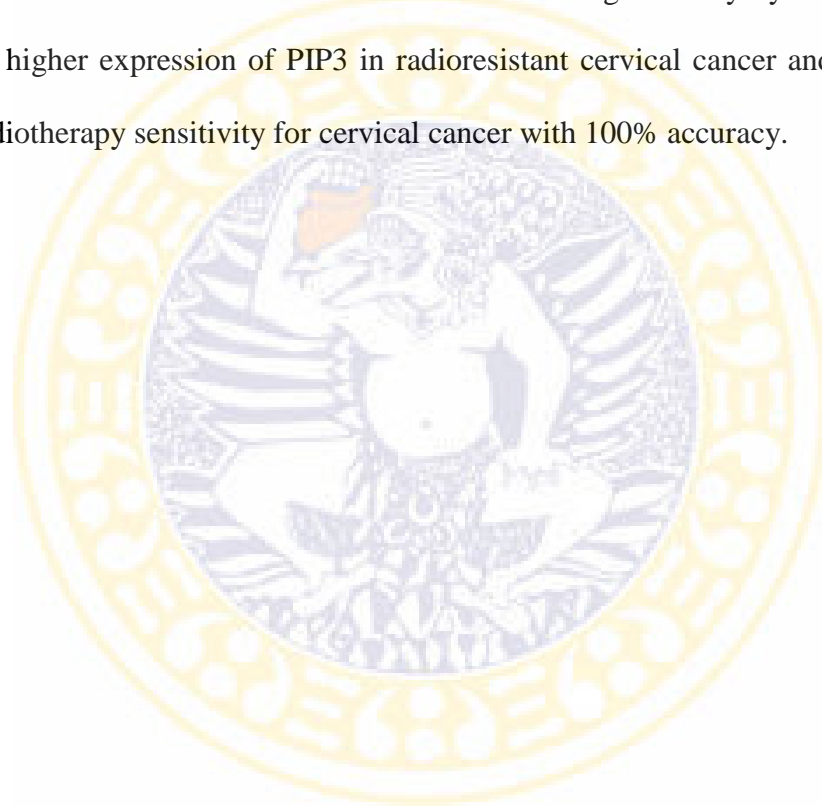
In this research we included 40 patients with cervical cancer stage IIB-III all of which has underwent complete external beam radiotherapy (35 times) in Soetomo Hospital, Surabaya and divided into 20 radiosensitive and 20 radioresistant sample group. Three months after the last radiotherapy, all patients underwent clinical evaluation and cervical biopsy. We examined apoptotic cells with Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling (TUNEL) and CAT, Hsp70, CY19, PIP3 expression used immunohistochemistry. This observational analytic research used cross sectional design.

Forty cases included in this study had mean age of 50.93 years old with histopathologic type of *squamous* in 60% cases. There was a significant difference between radiotherapy resistance and histopathology result, nevertheless there were no difference between patients age and stage of cervical cancer. This study also found a lower apoptotic cells with a higher in CAT, Hsp70, CY19 and PIP3 expression in radioresistant cervical cancer compared with radiosensitive ones. From the five variables used (apoptosis, CAT, Hsp70, CY19 and PIP3), we did discriminant analysis. All of which can be used as indicators to radiotherapy sensitivity, with PIP3 expression as the most dominant and Hsp70 expression had the least role. Discriminant function obtained from this study can provide indicators of cervical cancer resistance with up to 100% accuracy and a cut off score of $-1,54$.

As a conclusion, there were a lower number of cells undergoing apoptosis with higher expression of *catalase*, *heat shock protein 70*, *cytokeratin 19* dan *phosphatidylinositol*

triphosphate which all have roles in the disruption of apoptosis pathway in radioresistant cervical cancer tissue. Additional conclusions from this research were an increase of radiotherapy resistance in non squamous histopathology of cervical cancer and also discriminant function for cervical cancer radiotherapy sensitivity indicator with an accuracy up to 100%.

The new findings in this study are: (1) there was a higher expression of CAT in radioresistant human cervical cancer tissue examined by immunohistochemistry, (2) there was a higher expression of CY19 in radioresistant cervical cancer significantly by statistical analysis, (3) there was a higher expression of PIP3 in radioresistant cervical cancer and (4) a predictor model of the radiotherapy sensitivity for cervical cancer with 100% accuracy.



ABSTRAK

**HUBUNGAN APOPTOSIS, EKSPRESI *CATALASE*,
HEAT SHOCK PROTEIN 70, *CYTOKERATIN 19* DAN
PHOSPHATIDYLINOSITOL TRIPHOSPHATE DENGAN KEJADIAN
 RESISTENSI KANKER SERVIKS YANG DILAKUKAN RADIOTERAPI**

Poedjo Hartono

Latar Belakang : Banyaknya kasus kanker serviks yang datang dalam stadium lanjut masih menjadi masalah di negara berkembang seperti Indonesia. Dengan radioterapi sebagai terapi utamanya, ternyata banyak kasus resistensi yang tidak memberikan respon baik bahkan kekambuhan. Radiosensitivitas bergantung subpopulasi sel yang resisten. Dengan mengetahui indikator dari sel radioresisten diharapkan dapat diketahui bagaimana suatu resistensi terjadi untuk membuka jalan evaluasi dan terapi kanker serviks radioresisten yang lebih baik.

Tujuan : Mengetahui hubungan resistensi kanker serviks terhadap radioterapi, melalui kajian apoptosis, *catalase* (CAT), *heat shock protein* (Hsp) 70, *cytokeratin* (CY) 19 dan *Phosphatidylinositol Triphosphate* (PIP3).

Metode : Penelitian analitik observasional, *cross sectional* dilakukan pada 40 pasien kanker serviks stadium IIB-III yang mendapat radioterapi eksterna 35 kali dan terbagi menjadi 20 sampel radioresisten dan radiosensitif. Resistensi radioterapi dinilai dari evaluasi klinis dengan konfirmasi histopatologi sel kanker 3 bulan setelah radioterapi terakhir. Biopsi serviks dilakukan untuk melihat sel apoptosis, ekspresi CAT, Hsp70, CY19 dan PIP3 secara imunohistokimia.

Hasil : Dari 40 pasien didapatkan usia rerata 50,93 tahun dengan jenis histopatologi *squamous* sebanyak 60 %, Didapatkan perbedaan antara resistensi radioterapi dengan jenis patologi anatomi ($p=0,01$), namun tidak didapatkan perbedaan dengan umur ($p=0,95$) dan stadium ($p=0,57$). Didapatkan sel apoptosis lebih rendah disertai ekspresi CAT, Hsp70, CY19 dan PIP3 yang lebih tinggi secara signifikan ($p<0,001$) pada kanker serviks radioresisten dibandingkan radiosensitif. Dari analisis diskriminan kelima variabel, semuanya dapat dijadikan indikator sensitivitas radioterapi dengan ekspresi PIP3 yang paling dominan dan Hsp70 yang paling kecil peranannya.

Kesimpulan : Didapatkan sel apoptosis lebih rendah dengan ekspresi CAT, Hsp70, CY19 dan PIP3 yang lebih tinggi pada kanker serviks radioresisten.

Kata kunci : Kanker serviks, radioterapi, radioresisten