

Aktifitas Caspase 3 sebagai Indikator Apoptosis pada Sel Kanker Ovarium

Bambang Dwipoyono

Staf Medik Fungsional Ginekologi Onkologi RS. Kanker "Dharmais", Jakarta

Abstrak

Kematian yang diakibatkan oleh kanker ovarium masih tetap tinggi meskipun sudah dengan penanganan yang agresif. Pemberian kemoterapi merupakan bagian penting selain tindakan operasi di dalam pengobatan kanker ovarium. Obat sitostatika yang digunakan bertujuan mempengaruhi DNA dan pada akhirnya memicu henti siklus sel dan apoptosis.

Untuk mengetahui aktifitas caspase 3 sebagai indikator terjadinya apoptosis pada sel kanker ovarium setelah terpapar dengan sitostatika.

Penelitian *in vitro* dengan memaparkan sel kanker ovarium primer yang berasal dari asites dan/atau "established" sel kanker ovarium dengan sitostatika dengan dosis dan waktu yang berbeda. Kemudian dilakukan perhitungan aktifitas caspase 3 dari kedua sel kanker ovarium tersebut.

Penelitian ini dilakukan terhadap penderita kanker ovarium yang dilakukan operasi pada "Yale New Haven Hospital". Sel tumor yang berasal dari cairan asites menjalani isolasi dan kultur untuk mendapatkan kultur primer. Dilakukan pemaparan sel kanker ovarium primer dan "established" dengan carboplatin dan docetaxel selama 24 dan 48 jam dengan dosis yang berbeda. Apoptosis yang terjadi diketahui dengan melihat aktifitas spesifik caspase 3 dari masing-masing kelompok sel kanker ovarium tersebut.

Dari 11 pasien kanker ovarium stadium lanjut (III-IV, FIGO) dengan jenis epithelial didapatkan bahwa carboplatin dosis 100-400mg/ml dapat menginduksi aktifitas caspase 3 dari "established" sel kanker ovarium maupun sel kanker ovarium primer. Docetaxel dosis 5ng/ml dan 500ng/ml juga dapat menginduksi aktifitas caspase 3 pada kedua kelompok sel kanker ovarium.

Aktifitas caspase 3 dapat ditimbulkan dengan melakukan pemaparan sel kanker ovarium baik primer maupun "established" terhadap carboplatin dan docetaxel.

Kata kunci: caspase 3, apoptosis, kanker ovarium.

Abstract

Despite of aggressive treatments of ovarian cancer are already establish, the death due ovarian cancer still high. Chemotherapy is important after a certain surgery in ovarian cancer management and cytotoxic agent have a purpose to stop and to kill cancer cells.

This research has a purpose to fine out if caspase 3 could establish as an indicator of apoptosis after ovarian cancer cell treated with cytotoxic agent.

This is in vitro research was conducted at Yale New Haven Hospital. Tumor's cell was established by isolation procedure and its came from ascites. After culturing with carboplatin and or docertaxel for 24 and 48 hours with different dosage, than caspase 3 activities was counted for every ovarian cancer groups.

From 11 advanced epithelial ovarian cancer patients (stage III-IV, FIGO), carboplatin dosage 100-400_g/ml and docetaxel 5 ng/ml induced activity of caspase 3 from "established" ovarian cancer cell and primary ovarian cancer cell as well, respectively.

Caspase 3 activity can be induced by exposure ovarian cancer cell with carboplatin and docetaxel.

Keywords: caspase 3, apoptosis, cancer ovarium

PENDAHULUAN

Salah satu masalah yang sering dihadapi dalam penanganan kanker ovarium adalah, hampir sebagian besar penderita (75%) datang dalam stadium yang sudah lanjut. Hal ini disebabkan kanker ovarium jarang memberikan keluhan yang spesifik sebelum penyakit-

nya menjadi lanjut dan seperti sudah diperkirakan prognosinya sangat berhubungan dengan stadiannya¹. Selain itu, sudah dikenal beberapa faktor yang berpengaruh terhadap hasil keluaran *outcome* dari pengobatan dan hal tersebut dikenal sebagai faktor-faktor prognostik. Beberapa diantaranya dapat dikelompokkan sebagai faktor-faktor patologik seperti: jenis his-

tologik, bentuk lesi dan derajat diferensiasi sel, faktor-faktor biologik: ploidi sel, ekspresi proto-onkogen dan onkogen, faktor-faktor klinik: stadium (FIGO), sisa tumor pasca operasi, asites, usia pasien dan penampilan pasien^{1,2}. Akhir-akhir ini para ilmuwan menambahkan apoptosis sebagai faktor yang baru dimana hal ini diperkirakan dapat menggantikan faktor lain yang kekuatannya kurang. Kerr dkk pada 1972 mengusulkan istilah apoptosis, yaitu untuk menggambarkan kematian sel yang secara morfologik dapat dibedakan dengan nekrosis, merupakan cara kematian pasip yang terjadi akibat kerusakan seluler. Selain itu apoptosis harus dilihat sebagai proses penting pada tingkat seluler yang fisiologik³.

Dalam penanganan kanker ovarium, pemberian khemoterapi merupakan modalitas pengobatan yang pemberiannya pada umumnya diberikan setelah tindakan operasi. Khemoterapi dapat diberikan secara tunggal maupun kombinasi dengan khemoterapi lain⁴. Pemberian khemoterapi bertujuan untuk mengeliminasi seluruh sel kanker di dalam tubuh, khususnya di dalam rongga perut. Idealnya, sitostatika itu hanya berefek pada sel kanker, akan tetapi, efek samping yang ditimbulkannya (juga pada organ-organ tubuh lainnya) berbanding lurus dengan dosis yang diberikan. Hal lain yang akhir-akhir ini harus mulai diperhatikan adalah munculnya sel-sel kanker yang resisten terhadap sitostatika tertentu. Oleh karena itu lebih dipertimbangkan pemberian kombinasi sitostatika dari 2 atau lebih obat. Akhir-akhir ini sitostatika dan kombinasi sitostatika dalam pengobatan kanker ovarium adalah (1) Obat-obat dengan basis platinum seperti cis-platin, carboplatin, (2) Taxan (paclitaxel dan docetaxel), suatu anti kanker yang dapat menstabilkan mikrotubul sehingga mempengaruhi pertumbuhan sel, atau (3) gabungan dari (1) dan (2)⁴. Para peneliti telah membuktikan bahwa apoptosis (*programmed cell death*) adalah penyebab kematian sel kanker akibat sitostatika. Setelah cisplatin memasuki sel, maka secara langsung ataupun tidak langsung ikatan dengan chlorin akan digantikan oleh air, ikatan ini bereaksi dengan makromolekul yang ada di DNA⁵. Ikatan cisplatin di dalam DNA terjadi pada 2 lokasi sehingga terbentuk "interstrand cross-links dan interstrand adducts"⁶, yang akhirnya akan mencetuskan terhentinya siklus sel dan apoptosis^{5,7}. Kedua taxan, paclitaxel (Taxol-Bristol Myers-Squibb) dan docetaxel (Taxotere-Aventis) akan mengikat b-subunit dari tubulin yang berakibat menstabilkannya, *non-functional microtubule bundles* dan berpengaruh terhadap proses mitosis. Paclitaxel berperan pada fase G₂/M dan docetaxel di fase S. Selain itu taxan juga menginduksi

proses apoptosis dan mempunyai efek sebagai anti-angiogenik⁸.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini merupakan hasil kerjasama antara departemen Obstetri dan Ginekologi "Yale University", "Therapeutic Radiology at Yale University dan "University of New Haven". Didapatkan 11 pasien yang memenuhi kriteria.

Semua pasien dilakukan operasi oleh satu orang ginekologik-onkologik (TR) di "Yale New Haven Hospital". Faktor-faktor klinis seperti umur, stadium (FIGO 1988), histolo-patologik, derajat diferensiasi, asites (ada or tidak), jenis operasi (optimal or non-optimal debulking atau operasi sito-reduksi), kondisi pasien saat ini seperti tidak ada penyakit, masa bebas penyakit, kambuh, atau meninggal^{1,9,10,11}.

Tahapan penelitian:

Tahap I.A:

Pada tahap ini dilakukan optimalisasi sistim yang akan digunakan. Dimulai dengan melakukan kultur terhadap "established ovarian cancer cell lines" yaitu A2780 dan CP 70. A2780 adalah sel kanker ovarium yang sensitif terhadap cisplatin, sedangkan CP 70 adalah sel kanker ovarium yang resisten terhadap cisplatin. Kultur sel dilakukan selama 24 dan 48 jam dengan memperhatikan teknik kultur, mencegah terjadinya pencemaran, kurva pertumbuhan, konsentrasi awal sel pada awal kultur.

Tahap I.B:

Pada tahapan ini dilakukan perlakuan pada "established ovarian cancer cell lines" dengan memberikan sitostatika selama periode waktu kultur tertentu dan kemudian dilakukan "harvesting" dari protein yang dihasilkan sel-sel tersebut. Kadar protein dihitung dengan menggunakan metoda Bradford.

Tahap I.C:

Pada tahap ini sesuai dengan tahap I.B hanya saja juga dilakukan evaluasi ekspresi Caspase-3 dengan menggunakan Promega CaspACE' kit (Promega, cat. # G7220). Sistem esei kolorimetri CaspACE' berdasarkan penilaian kuantitas dari aktifitas protease caspase-3 (DEVDase). Prinsipnya adalah kolorimetri substrat (Ac-DEVD-pNA) yang disertakan pada sistem esei "CaspACE' Assay System" yang dilabel dengan chromophore p-nitroaniline (pNA). pNA akan dilepaskan jika terjadi pemotongan substrat oleh DEVDase. PNA yang bebas akan menghasilkan warna kuning yang dapat dimonitor secara spektrofotometri dengan menggunakan panjang gelombang 405nm.

Intensitas warna kuning yang dihasilkan proses pemotongan tersebut akan sebanding dengan aktifitas DEVDase yang terdapat di dalam sampel.

Tahap II:

Pada tahapan ini dilakukan perlakuan seperti tahap I.C dengan menggunakan sel kanker yang berasal dari pasien yang sudah melalui tahapan-tahapan seperti preparasi cairan asites, kultur sel kanker, pemberian sitostatika dan sebagai tahap akhir adalah "memanen sel", analisa protein dan aktifitas caspase-3.

Persiapan carian asites :

Tahapan melakukan isolasi dimaksudkan sebagai upaya memisahkan sel tumor terhadap sel-sel lain seperti sel limfosit, sel darah merah (SDM, sel darah putih (SDP) dan sel-sel lainnya (debris). Pengemparan dan pengemparan dengan menggunakan larutan garam berimbang ditujukan untuk memisahkan sel-sel berdasarkan ukurannya dan densitasnya. Pengemparan dengan kecepatan rendah akan memisahkan SDM dan SDP dengan sel-sel tumor. Larutan penyangga pemisah limfosit digunakan untuk menarik limfosit sehingga terpisah dari larutan. Tahap akhir dari proses separasi adalah teknik "immuno-magnetic"¹²

Kultur sel dan perlakuan kultur sel:

Sel A2780 (diperoleh dari Dr. T.C. Hamilton) ditumbuhkan pada media DME/F12 (Sigma, cat # D8900) yang disuplemen dengan serum 10% fetal bovine (Gibco) dan L-glutamine dengan konsentrasi akhir 584 mg/ml pada kondisi 37°C, 5% CO₂ dan 95% "humidified air".

Sel kanker ovarium primer yang diperoleh dari cairan asites dikultur pada media M105/199 (Sigma, cat # M6395 and cat #5017) yang disuplemen dengan serum 15% fetal bovine (Gibco, cat # 160000-036), Hepes buffer (Gibco, cat # 12379-012), MEM non essential amino acids (Gibco, cat # 1140-050), 100mM sodium pyruvate (Gibco, cat # 11360-070), penicillin/streptomycin dan 0.1ng/ml epidermal growth factor pada kondisi 37°C, 5% CO₂ and 95% "humidified air".

Sel A2780 dan sel kanker ovarium primer dikultur pada tabung T25 sampai mencapai kepadatan 70%-80% sebelum dilakukan perlakuan. Sel dilepaskan dari tabung kultur dengan melakukan tripsinasi dengan memberikan 0.05% trypsin dan 0.02% EDTA (Sigma) selama 1-2 minutes. Tahapan untuk ekstraksi protein akan diterangkan berikutnya.

Semua perlakuan dilakukan secara duplo, 1 (satu) tabung sebagai kontrol atau tanpa perlakuan. Sitostatika seperti carboplatin (Catalog # C2538, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) disiapkan sebagai stok 10

mg/ml dalam ddH₂O. Taxotere (Sigma Chemical Co.) disiapkan sebagai stok 1 mg/ml stock dalam Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Dilakukan pemaparan sel terhadap Carboplatin dengan dosis 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, dan 400 mg/ml selama 24 jam atau 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml selama 48 jam. Sel-sel juga dipaparkan terhadap Taxotere dengan dosis 5ng/ml, 50ng/ml, dan 500ng/ml untuk 24 dan 48 hours.

1. Ekstraksi protein dan Esei aktivitas Caspase 3:

Dilakukan lisis dari sel dan ditampung dalam keadaan dingin dalam 10 M Tris, pH 7.5, 10mM Na Phosphates buffer, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10mM Na Pyrophosphate yang ditambahkan Protease Inhibitor Cocktail (20ml/ml, Sigma P8340) and 2mM PMSF. Lisat diinkubasi di dalam es selama 30 menit, dilakukan pencampuran setiap 5 menit secara vortexing. Debris-debris di endapkan dengan jalan mengempar pada 4°C, > 10,000x g selama 5 min. Supernatan yang diperoleh dibekukan dan disimpan pada suhu -70°C. Kadar protein ditentukan dengan esei "BioRad Protein Assay" (BioRad).

2. Sensitivitas sel terhadap khemoterapi:

Aktivitas spesifik Caspase-3 menunjukkan bahwa sel sedang dalam proses apoptotik, hal ini digunakan untuk menentukan sensitifitas sel terhadap obat sitostatika tertentu. Untuk sel-sel kanker yang baku seperti A2780 telah dibuktikan sensitif terhadap cisplatin (Henkels et al, 1997). Oleh karena carboplatin dan cisplatin berada dalam satu golongan maka A2780 juga diasumsikan sensitif terhadap carboplatin. Selain itu, akhir-akhir ini telah dibuktikan bahwa A2780 sensitif terhadap taxotere¹³.

3. Dosis obat dan waktu paparan.

Dalam penelitian ini dosis obat dan lama paparan sel terhadap obat carboplatin adalah 50, 100, 200, dan 400mg/ml selama 24 dan 48 jam. Untuk docetaxel dosisnya adalah 5, 50, 500ng/ml, selama 24 dan 48 jam. Dosis dan lama paparan diambil berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Flick dkk, dan Mor dkk^{14,15}.

HASIL

Pada penelitian ini didapatkan 11 sel "lines" kanker ovarium primer yang diisolasi dari asites. Seluruh pasien menjalani operasi yang dilakukan oleh 1 (satu) orang ginekologis onkologis (TR) di "Yale New Haven Hospital". Cairan asites dikumpulkan pada waktu operasi, untuk kemudian disiapkan untuk kultur sel.

Tabel 1. Karakteristik sel kanker ovarium primer dan faktor prognostik

"Cell lines"	Faktor Prognostik						
	Umur	Diff	Histo	Stad	Surg	Res	Asc
R182	77	Well	Pap-ser	IIIC/R	Debulk	(-)	(+)
R218	57	Mod	End&Clear	IIIB	Debulk	(-)	(-)*
R127	67	Poor	AdenoCa	IV	No	(+)	(+)
R178	38	Mod	Pap-ser	IIIC/R	Debulk	(-)	(+)
R229	55	Poor	Pap-ser	IIIC	Debulk	(-)	(+)
R186	70	Well	Bor-Mucin	I	Debulk	(-)	(-)*
R242	---	---	---	---	---	---	---
R203	48	Poor	Endo	IIIC	Debulk	(-)	(-)*
R222	---	---	---	---	---	---	---
R250	69	Well	Ser	IC	Debulk	(-)	(+)
R257	48	Poor	Ser	IIIC	Debulk	(-)	(+)

Catatan :

Umur (tahun)

Diff : Diferensiasi (baik, sedang, buruk),

Histo : Histological cell type (pap-ser:

papillary serous, bor-mucin:

borderline mucinous, endo:

endometrioid, endo&clear: mixed

endometrioid and clear, endo&pap:

mixed endometrioid and serous,

adenoca: adenocarcinoma)

Stadia : I: A, B, C; II: A, B, C; III: A, B, C;

IV (FIGO)

Surg : surgery

Asc : ascites (+ or -)

Res : residu

Tabel 1 menginformasikan tentang karakteristik, faktor prognostik dari setiap pasien atau "cell lines". Usia rata-rata adalah 58 tahun. Seluruh pasien adalah kanker ovarium jenis epithelial dengan jenis seperti: "papillary serous cell", "clear cell", "mucinous cell", "endometrioid" and "mixed endometrioid-clear cell", derajat diferensiasi tumor antara baik sampai buruk. Sebagian besar kasus adalah kanker ovarium stadium lanjut (III-IV, FIGO). Semua kasus menjalani operasi cito-reduksi or debulking. Sekitar 66.6% kasus, dari laporan sitologi ditemukan sel kanker di dalam cairan asites atau bilasan peritoneum, tetapi tidak ditemukan pada 3 kasus (*) lainnya. Hanya 1 kasus didapatkan

sisa tumor setelah operasi primer. Keluaran (outcome) pasien, sekitar 42.8% (3 dari 7) pasien meninggal, 57.1% (4 dari 7) pasien masih hidup dan tidak didapatkan data 4 dari 11 pasien.

Toksitas dan sensitifitas sel

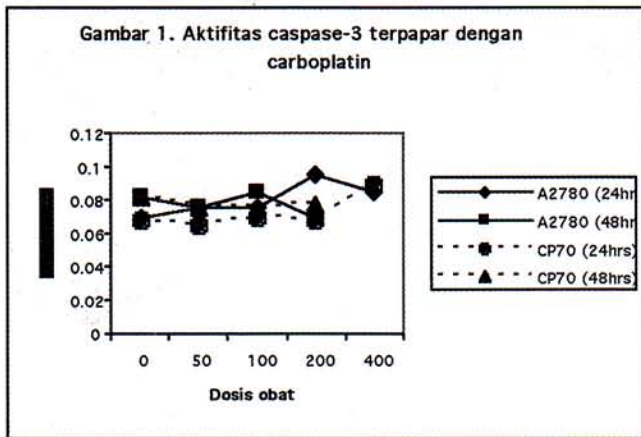
Toksitas-sensitifitas sel terlihat sebagai kematian sel yang diakibatkan oleh pemaparan sel-sel dengan khemoterapi yang akan mencetuskan kematian sel yang terprogram atau apoptosis.

Toksitas Carboplatin terhadap "established ovarian cancer cell lines"

Sebagai langkah awal dilakukan pemantapan sistim yang ada dengan melakukan tahapan-tahapan perlakuan pada 2 "established ovarian cancer cell lines" yaitu A2780 (sensitif) dan CP 70 (resistan). Dilakukan pemaparan terhadap carboplatin dengan berbagai dosis obat selama 24 dan 48 jam. Hasil yang diperoleh adalah carboplatin dapat menimbulkan aktivitas caspase-3 untuk A2780, dan juga CP 70. Seperti kita bisa melihat pada gambar 1, pemaparan terhadap carboplatin selama 24 jam, dosis 200mg/ml akan menginduksi aktivitas caspase-3 tertinggi untuk A2780; kondisi yang sama dapat terjadi untuk CP 70 tetapi memerlukan dosis 400mg/ml. Dalam pemaparan selama 48 jam dosis 200mg/ml akan menginduksi aktivitas caspase-3 kedua-duanya, A2780 dan CP 70. Selain itu terlihat aktifitas caspase-3 A2780 lebih tinggi jika di-

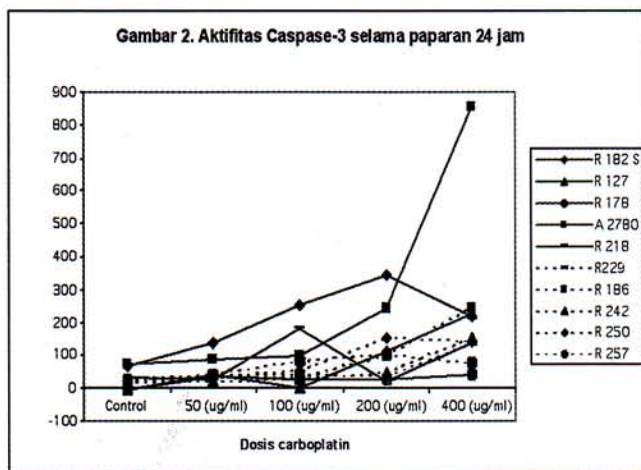
bandingkan pada aktivitas caspase-3 CP70, sehingga dapat dikatakan bahwa A2780 lebih sensitif terhadap carboplatin jika dibandingkan terhadap CP 70. Maka disimpulkan bahwa aktifitas caspase-3 dapat ditimbulkan dengan memberikan atau memaparkan dengan dosis tinggi tetapi dalam waktu singkat atau dosis rendah tetapi membutuhkan waktu yang lebih lama.

Data LD₅₀ pemberian carboplatin untuk CP 70 adalah 75.7 mg/ml dan untuk A2780 adalah 3.4 mg/ml. Hal ini berarti CP 70 lebih resisten jika dibandingkan (Flick M)¹⁴.

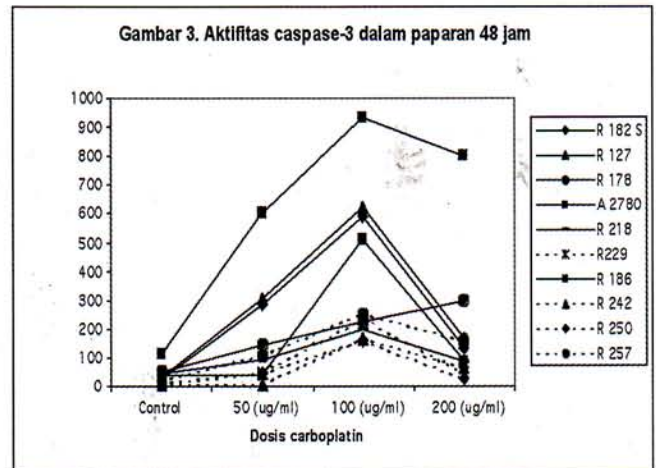


Toksitas Docetaxel pada "established ovarian cancer cell line"

Gambar 4 dan 5 menunjukkan pemaparan A2780 terhadap docetaxel selama 24 dan 48 jam dan akan menginduksi aktifitas spesifik caspase-3. Seperti dapat dilihat pada gambar 4, pemaparan selama 24 jam dengan dosis 50ng/ml akan menginduksi aktivitas spesifik caspase-3 yang tertinggi, sedangkan dalam pemaparan selama 48 jam (gambar 5), dosis 5ng/ml menginduksi aktivitas spesifik caspase-3 tertinggi sebelum turun ke level yang lebih rendah.

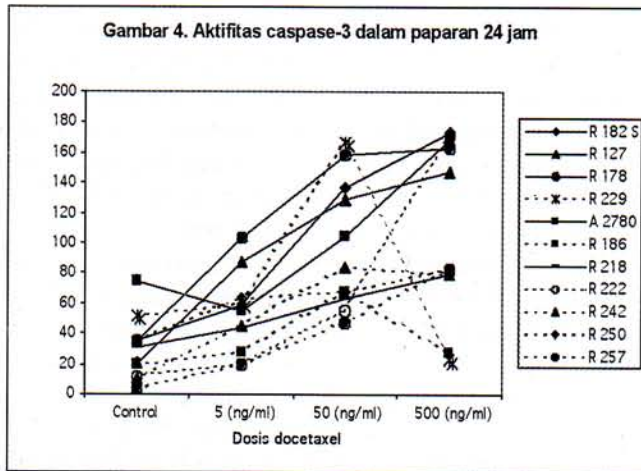


Gambar 2 menunjukkan aktifitas caspase-3 dari "established ovarian cancer line", A2780 dan "ovarian cancer line" primer. Maka terlihat hampir semua "ovarian cancer cell lines" primernunjukkan aktifitas caspase-3 yang lebih rendah dibandingkan A2780 ketika sel-sel tersebut dipaparkan pada carboplatin selama 24 jam dengan konsentrasi obat yang berbeda. Dosis obat tertinggi (400 mg/ml) cenderung mengakibatkan aktifitas caspase-3 yang tinggi pula dibandingkan dosis rendah. Sel R 182 menunjukkan aktifitas caspase-3 tertinggi pada dosis 200mg/ml untuk kemudian aktifitas caspase-3 turun pad dosis yang lebih tinggi (400mg/ml) jika dibandingkan dengan A2780. Fenomena tersebut juga terlihat pada R218 hanya saja pada dosis obat yang berbeda (100mg/ml). Pada dosis carboplatin 100mg/ml, sel-sel (R218 and R182) menunjukkan aktifitas spesifik caspase-3 tertinggi jika dibandingkan dengan "ovarian cancer cell line" primer lainnya. Pada posisi ini kedua "cell lines" R218 dan R182 lebih sensitif dibandingkan A2780.

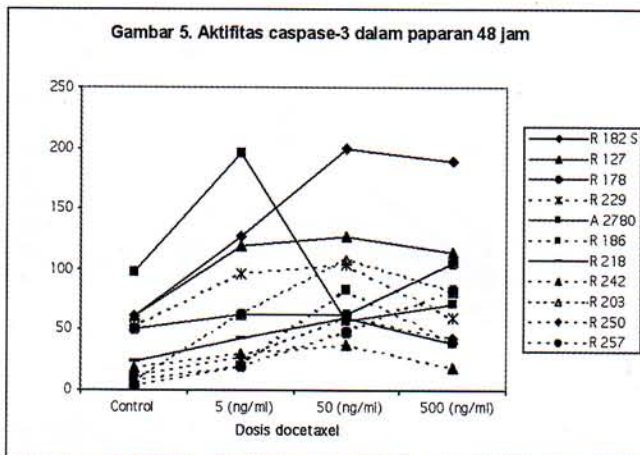


Gambar 3 menunjukkan bahwa A2780, "established ovarian cancer cell line" mempunyai aktifitas caspase-3 tertinggi jika dibandingkan dengan "ovarian cancer cell line" lainnya yang terpapar carboplatin selama 48 jam dengan berbagai dosis obat. Dosis carboplatin 100ug/ml dapat dipertimbangkan sebagai "cut off point" atau ambang, dimana seluruh sel menunjukkan aktifitas caspase-3 tertinggi sebelum turun ke level yang lebih rendah, kecuali untuk R 178. Beberapa "ovarian cancer cell lines" primer seperti R 182, R 127, R 186 juga menunjukkan fenomena tersebut, hanya saja aktifitas caspase-3 nya tidak setinggi yang ditunjukkan oleh A2780.

Pada gambar 4 terlihat bahwa beberapa "ovarian cancer cell line" primer, aktifitas caspase-3 tertinggi jika sel-sel tersebut dilakukan treatment dengan doce-



taxel dengan dosis 50ng/ml selama 24 jam; kemudian beberapa sel (R 186 dan R229) akan kehilangan aktifitas caspase-3nya. Sedangkan untuk sel-sel seperti A2780, R182, R127, R222 dan R178, aktifitas caspase-3 tertinggi jika mereka dilakukan tretmen dengan docetaxel dengan dosis 500ng/ml selama 24 jam. Dosis-dosis docetaxel 50ng/ml dan 500ng/ml merupakan dosis penting dalam paparan selama 24 jam.



Jika "ovarian cancer cells lines" primer terpapar dengan docetaxel selama 48 jam maka dosis 5ng/ml dan 50ng/ml merupakan titik ambang dari aktifitas caspase-3, pada dosis yang lebih tinggi maka seluruh sel akan terlihat kehilangan aktifitas caspase-3 nya (gambar 5).

DISKUSI

Kejadian kanker ovarium jenis epithelial jarang terjadi pada anak gadis atau perempuan muda, akan tetapi kejadiannya akan meningkat dengan bertambahnya umur¹⁶. Pada penelitian ini didapatkan umur

rata-rata adalah 58 years. Hal ini sama seperti di dalam kepustakaan berkisar antara 50 – 55 tahun.

Selain itu didapatkan gambaran klasik penderita kanker ovarium yaitu 6 dari 11 pasien berada dalam stadium lanjut, III-IV ketika pertama kali datang berobat. Hal ini ditunjang oleh penelitian Schwartz PE¹⁷ yang mendapatkan hampir 70% penderita tidak merasakan adanya gejala (symptomless) atau gejalanya tidak spesifik sampai penyakitnya sudah menyebar lebih lanjut.

Dari berbagai faktor-faktor prognosis, stadium penyakit yang lanjut (III-IV, FIGO) akan memberikan hasil keluaran yang lebih buruk jika dibandingkan stadium awal (I-II, FIGO). Dalam penelitian ini 10 dari 11 penderita adalah penderita kanker ovarium stadium III-IV. Dalam mengobati kanker ovarium, stadium lanjut adalah keadaan yang tidak menguntungkan ketahanan hidup pasien^{18,19}. Selain itu ketika sel-sel kanker menyebar ke jaringan sekitarnya dan pembuluh darah dan limfe, maka akan terjadi pembentukan cairan di dalam perut yang dikenal sebagai. Penelitian yang dilakukan oleh Chi dkk¹⁸; dan Puls dkk²⁰ mendapatkan adanya hubungan yang sangat erat antara stadium lanjut dan adanya asites, walaupun masing-masing tidak saling bergantung dan keduanya dihubungkan dengan kurangnya outcome penderitanya.

Pada penelitian ini 8 dari 11 penderita menjalani operasi sitoreduksi atau debulking dengan tanpa atau kurang dari 1 cm sisa tumor. Situasi ini sangat menguntungkan untuk penderita secara teoritis maupun klinis. Tujuan dari operasi sitoreduksi adalah mengusahakan melakukan pengangkatan massa tumor sebanyak-banyaknya. Pembeneran tindakan operasi sitoreduksi adalah berdasarkan penelitian empiris yang dilakukan oleh Griffiths²¹. Mereka menemukan dan juga penelitian lainnya mendukung konsep semakin sedikit sisa tumor pada operasi pertama semakin besar kesempatan pasien untuk sembuh dan mempunyai masa hidup yang panjang (Hoskins)²². Sitoreduksi yang optimal tidak meninggalkan sisa tumor setelah operasi. Diameter tumor pada saat operasi tidak berhubungan dengan survival, akan tetapi sisa tumor besar dari 2 cm akan mempengaruhi survival penderita^{23,24}.

Tidak seperti tumor-tumor lain, penegakan stadium kanker ovarium dilakukan setelah tindakan operasi. Oleh karenanya seorang ahli patologi memegang peran penting dalam penegakan stadium. Sebagian besar kanker ovarium berasal dari lapisan epitel dan jenis histopatologi serous merupakan jenis yang tersering ditemukan. Jenis-jenis kanker ovarium epithelial lain adalah musinous, endometrioid, sel jer-

nih, dan campuran ("mixed type"). Tipe serosa mempunyai outcome yang lebih buruk dibandingkan jenis yang lain². Dalam penelitian ini, seluruh jenis histologis kanker ovarium adalah epithelial dengan spesifikasi 1 adenocarcinoma, 5 serous dan atau/papillary serous cell adenocarcinoma, 1 mucinous borderline adenocarcinoma, 1 endometrioid adenocarcinoma, 1 mixed type endometrioid dan clear cell adenocarcinoma, dan tidak didapatkan data pada 2 kasus. Jenis histopatologik yang sering ditemukan adalah serous adenocarcinoma². Kami menemukan 5 dari (55%) adalah. Jenis ini mempunyai sifat yang lebih agresif dibandingkan jenis yang lain.

Toksitas-sensitivitas Carboplatin dan doksetaxel terhadap ovarian cancer cell lines

Pengobatan utama pada kanker ovarium lanjut (stadium III atau IV) adalah pengobatan sistemik. Pada era 70an, melphalan adalah jenis khemoterapi yang digunakan. Penelitian yang dilakukan oleh "Gynecologic Oncology Group" dan juga "Eropean scientist" menemukan bahwa kombinasi dengan platinum lebih efektif dibandingkan platinum secara tunggal dan penggantian cisplatin dengan carboplatin memberikan hasil pengobatan. Mereka juga mempertimbangkan menggunakan kombinasi berbasis taxan sebagai khemoterapi standard pada kanker ovarium stadium lanjut^{25,26}. Penggunaan obat platinum masih tetap penting sebagai khemoterapi pada kanker ovarium, akumulasi toksisitas dapat menghambat penggunaannya. Toksisitasnya dapat berupa nefrotoksik, neurotoksik dan ototoksik untuk cisplatin dan mieolopresi untuk carboplatin²⁷.

Pada penelitian ini efek toksik carboplatin terhadap "established ovarian cancer cell lines" diindikasikan dengan adanya aktivitas caspase-3. Seperti kita ketahui, kematian sel yang terprogram adalah bentuk bunuh diri yang ada di alam. Proses tersebut di cetuskan oleh beberapa rangsangan/stimulan diantaranya cytokine, hormon, virus, dan zat beracun. Zat anti kanker diperkirakan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel-sel yang memungkinkan²⁸. Budihardjo dkk²⁹ melakukan evaluasi jaras apoptosis dan menemukan bahwa didapatkan pada jaras apoptosis terjadi pengaktifan caspase 3; yang berperan dalam regulasi kematian sel yang terprogram dan juga berperan eksekutor pada proses apoptosis. Dalam penelitian ini aktifitas caspase-3 dapat terjadi pada pemberian carboplatin dosis tinggi dalam waktu pendek atau carboplatin dosis rendah dalam waktu yang lebih lama (gambar 1). Efek sitotoksik dari cisplatin dan carboplatin terhadap panel sel kanker ovararium dengan

menggunakan esei MTT dilakukan oleh Fanning dkk³⁰. Mereka menemukan median 50% inhibitory concentration (ID₅₀) untuk carboplatin adalah 490mg/ml, dan efek itu menjadi lebih besar setelah terpapar lebih dari 24 jam jika dibandingkan terpapar selama 1 jam. Perez dkk³¹ menemukan bahwa efek carboplatin sebagai obat anti kanker sebagai akibat terjadinya ikatan pada DNA (inter atau intra-strand) yang menimbulkan kerusakan pada DNA yang dikenal sebagai "DNA adducts". Efek sitotoksik carboplatin dan derivat cisplatin pada "human ovarian carcinoma cell lines", A2780 dan CP 70 juga akan terjadi walaupun lebih lambat jika dibandingkan cisplatin³².

Pada penelitian ini dibandingkan aktivitas spesifik caspase-3 dari A2780 ("established ovarian cancer cell lines) sebagai standar terhadap aktivitas spesifik caspase-3 dari "primary ovarian cancer cell line" yang diperoleh dari asites. Henkels dan Turchi pada tahun 1997 membuktikan bahwa sel A2780 adalah "established ovarian cancer cell line" yang sensitif terhadap cisplatin. Mereka menemukan bahwa kematian sel A 2780 setelah dilakukan pemberian cisplatin selama 48 jam terjadi melalui proses apoptosis sebagai akibat terjadi akumulasi kerusakan DNA oleh karena cisplatin. Apoptosis juga terjadi pada "cisplatin-resistant ovarian cancer cell line" seperti CP70. Kojima dkk³³ menemukan bahwa cisplatin dapat menimbulkan pelepasan cytochrom c dan aktivasi caspase-3 oleh mitochondria. Hal lainnya, pada sel "human osteosarcoma", cisplatin akan menginduksi terjadi apoptosis melalui aktivasi yebururutan dari caspase -8, caspase-3, dan caspase-6³⁴.

Kami mendapatkan bahwa A2780 "the established ovarian cancer cell" menunjukkan aktifitas spesifik caspase-3 yang tinggi setelah diobati dengan carboplatin atau docetaxel. Tingginya aktifitas tersebut secara relatif terjadi pada inkubasi dengan obat berdosisi tinggi dalam waktu pendek atau obat dengan dosis rendah dengan waktu yang lebih panjang di dalam kultur media. Selain itu terlihat bahwa kepekaan A2780 terlihat terhadap carboplatin dan/atau docetaxel (gambar 2,3,4, dan 5). Pada penelitian ini mendapatkan bahwa sel A2780 adalah sangat sensitive terhadap cisplatin. Penemuan tersebut sesuai dengan Zaffaroni dkk³⁵, mereka melakukan penelitian efek taxol dan cisplatin pada A2780 yang sensitive dan A2780 yang resisten. Sel-sel itu dipaparkan terhadap cisplatin selama 1 jam dan efek antiproliferasi dinilai setelah 96 jam kemudian. Mereka menemukan bahwa induksi terjadinya apoptosis dapat terjadi melalui level kontrol siklus sel yang berbeda-beda.

Meskipun docetaxel adalah anggota keluarga tax-

ane yang masih relatif baru, akan tetapi berbasis molar, docetaxel lebih superior dibandingkan paclitaxel. Beberapa penelitian mendapatkan bahwa docetaxel (taxotere) secara umum lebih toksik 1.3 sampai 12 kali dibandingkan paclitaxel (taxotere)³⁶⁻³⁸, akan tetapi potensi itu berhubungan dengan efek sampingnya.

Docetaxel diproduksi dari bakal yang bersifat non-sitotoksik yang diekstraksi dari *needles of the western European yew, Taxus baccata*. Dalam penelitian fase I dan II, dosis docetaxel adalah 100 mg/m² yang diberikan perinfus selama 1 jam dengan efek samping pruritus, ruam, edem perifer, efusi pleura dan efusi perikardial. Toksisitas lainnya adalah hipersensitifitas, neuropati perifer, dan alopecia mungkin dapat ditemukan dalam persentase yang kecil. Dari seluruh penelitian, edem perifer selevelau ditemukan, dan merupakan toksisitas yang nyata³⁹.

Dalam penelitian ini didapatkan bahwa docetaxel akan mengindus aktifitas spesifik caspase-3 terhadap "establish cisplatin-sensitive ovarian cancer cell line", A2780 dan pada banyak sel kanker ovarium primer yang berasal dari asites. Pada A2780, aktivitas spesifik caspase-3 tercapai jika sel terpapar dengan docetaxel dosis 500ng/ml selama 24 jam atau 5ng/ml selama 48 jam, selain itu dosis-dosis tersebut juga memberikan persentase peningkatan aktivitas caspase-3. Kolfshoten dkk⁴⁰ mendapatkan bahwa A2780 adalah "cell line" yang paling sensitive setelah dipaparkan selama 1 jam dengan docetaxel dan 72 jam tanpa obat. Menurut mereka the IC (inhibitory concentration)₅₀ untuk A2780 adalah $2.8 (\pm 0.7) \times 10^{-9}M$ dan aktivitas caspase-3 tinggi pada pengobatan selama 72 jam. Konsentrasi rata-rata untuk mendapatkan 50% hambatan pertumbuhan adalah (IC₅₀) $5.1 \times 10^{-10}M$ untuk 6 "human ovarian carcinoma cell lines" yang diobati dengan docetaxel selama 96 jam³⁷. Engblom dkk⁴¹ melakukan paparan 7 "ovarian cancer cell lines" terhadap beberapa obat-obat anti kanker dan menemukan IC₅₀ dari docetaxel adalah 0.23-2.3 nM, dengan nilai rata-rata adalah 0.88nM. Secara molar, doxetacel adalah 1.2 sampai 2.6 kali lebih aktif dibandingkan dengan paclitaxel pada 6 "cell lines". Dari beberapa penelitian didapatkan estimasi dosis docetaxel yang dibutuhkan untuk menurunkan survival sel sebesar 50% (IC₅₀) (reviewed by Bissery MC)⁴² berkisar antara 4 - 35ng/ml, dan tergantung dengan waktu dan konsentrasi obat. Selain itu Kolfshoten dkk¹³ melakukan penelitian kinetik dari apoptosis terhadap 4 "human ovarian cancer cell lines", termasuk A2780, setelah diberi terapi dengan docetaxel. Mereka mendapatkan bahwa docetaxel dapat mengaktifkan caspase-3 dan menimbulkan apoptosis di dalam sel dan terlihat sebagai

G2/M "arrest".

Toksisitas-sensitifitas Carboplatin dan/atau Docetaxel terhadap "primary ovarian cancer cell lines"

Walaupun cisplatin dan analognya (e.g. carboplatin) secara luas telah digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit keganasan, akan tetapi mekanisme kematian sel yang diakibatkan DNA-adduct belumlah betul-betul dikenal.

Meskipun dalam penelitian ini agen khemoterapi, carboplatin dan docetaxel menyebabkan apoptosis pada "established ovarian cancer cell line", A2780, dan juga "ovarian cancer cell lines" primer, akan tetapi bagaimana obat-obat tersebut menginduksi aktifitas caspase-3 belumlah pasti. Seperti kita ketahui caspase-3 adalah salah satu dari beberapa caspase yang ikut pada regulasi dan eksekusi proses apoptosis, dan di dalam sel normal berada sebagai enzim yang tidak aktif. Saat ini telah dikenal dengan baik 2 jaras yang meregulasi apoptosis: 1). Berawal dari reseptor kematian dipermukaan sel, 2). Dicituskan akibat perubahan integritas mitochondria (reviewed by Budihardjo et al, 1999)²⁹.

Khemosensitivitas pada "ovarian cancer cell lines" primer ditentukan oleh produksi aktivitas spesifik caspase-3 setelah sel-sel diterapi dengan carboplatin dan/atau docetaxel dengan berbagai dosis obat dan waktu paparannya. Kesensitifan sel ditegakan berdasarkan perbandingan kadar aktivitas caspase-3 "ovarian cancer cell lines" primer terhadap A2780 dengan waktu paparan yang sama. Pada umumnya dosis carboplatin 400mg/ml selama 24 jam menunjukkan aktifitas caspase-3 yang tertinggi, kemudian diikuti oleh dosis 200 mg/ml (tabel 8). Untuk paparan selama 48 hours jam dosis carboplatin 100mg/ml menunjukkan aktifitas caspase-3 yang tertinggi untuk semua grup sel. Fanning dkk³⁰ mendapatkan dosis median carboplatin dalam pemberian 24 dan 48 jam untuk memberikan 50% penghambatan adalah 319mg/ml dan 390mg/ml. Sebagai tambahan Agiostratidou dkk⁴³ melakukan penelitian *in vitro chemo-sensitivity/chemoresistance* untuk mengevaluasi efek sitotoksik pada penderita kanker ovarium. Sel-sel kanker diletakkan di dalam tempat dan dikultur di dalam media yang berisi carboplatin dengan dosis 0.5mg/ml atau 5mg/ml selama 24 jam. Mereka menemukan bahwa 76% dari sampel adalah resistan untuk carboplatin dosis rendah (0.5mg/ml). Jika melihat hanya dari dosis carboplatin yang digunakan agaknya dosis obat dalam penelitian ini sudah cukup tinggi untuk dapat mengakibatkan efek toksik terhadap sel A2780 atau "ovarian cancer cell lines" primer. Didapatkan 2 "cell

lines" yaitu R182 dan R218, mereka adalah "ovarian cancer cell lines" primer adalah sensitive secara kualitatif dan kuantitatif terhadap carboplatin.

Kesimpulan

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi adanya hubungan antara toksisitas-sensitifitas sel terhadap docetaxel dan carboplatin dengan waktu paparan dan dosis yang berbeda-beda. Berdasarkan pengetahuan bahwa obat anti kanker dapat memodulasi terjadinya apoptosis pada sel-sel kanker yang sensitive dan aktifasi dari beberapa caspase merupakan kunci terjadinya apoptosis dan juga adanya fakta bahwa caspase-3 berperan dalam proses regulasi dan eksekusi proses apoptosis, maka kesimpulan penelitian ini adalah:

1. Carboplatin dan/atau docetaxel akan menimbulkan aktifitas caspase-3 pada "establishing cisplatin-sensitive", A2780, atau "cisplatin resistant", CP70, "ovarian cancer cell lines", dan juga pada "ovarian cancer cell lines" primer yang berasal dari asites.
2. Aktifasi caspase-3 dapat terjadi jika sel-sel tersebut terpapar oleh carboplatin dan/atau docetaxel dengan dosis tinggi dalam waktu paparan pendek atau dosis rendah dengan waktu paparan yang lebih panjang

Daftar Rujukan:

1. Berek. JS. Epithelial Ovarian Cancer. In: Berek JS and Hacker NF, eds. Practical Gynecology Oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
2. Beale PJ, Friedlander ML. Prognostic variables in ovarian cancer. In: Lawton FG, Neijt JP, Swenerton KD. Epithelial Cancer of the Ovary. BMJ Pub, 1995.
3. Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA. Apoptosis: final control point in cell biology. Trends Cell Biol 1992; 2: 263-7
4. Marsden DE, Friedlander M, Hacker NF. Current Management of Epithelial Ovarian Carcinoma: A Review. Seminars in Surgical Oncology 2000; 19: 11-19
5. Kartalou M, Essigman JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutation Research 2001; 478: 23-43
6. Fichtinger-Shepman AMJ, van Oosteram AT, Lohman PHM, Berenda F. Cis-diamminechloroplatinum (II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cisdiamminechloroplatinum (II). Cancer Res 1987; 47: 3000-4
7. Gonzales VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is Cisplatin Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? Mol Pharmacol 2001; 59: 657-63
8. Crown J, O'Leary Michael. The Taxanes: Update. Lancet 2000; 335: 1176-78
9. Clark TG, Stewart ME, Altman DG, Gabra H, Smyth JF. A prognostic model for ovarian cancer. British Journal of Cancer 2001; 85(7): 944-52
10. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. Seminars in Surgical Oncology 2000; 19: 3-10
11. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. Lancet 2001; 357: 176-82
12. Dyer PA, Brown P, Edward R. Immunomethods: magnetic, column, and panning techniques. In: Fisher D, Francis GE, Rickwood D, eds. Cell Separation. A Practical Approach. Oxford University Press 1998.
13. Kolfshoten GM, Hulscher TM, Duyndam MCA et al. Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. Biochemical Pharmacology 2002; 63: 733-43
14. Flick M (personal communication).
15. Mor G (personal communication).
16. Adami HO, Bergstrom R, Persson I, et al. The incidence of ovarian cancer in Sweden, 1960-1984. Amer J Epidemiol 1990; 132: 446-52
17. Schwartz PE. Current Diagnosis and Treatment Modalities of Ovarian Cancer. In: Stack MS, Fishman DA, eds. Ovarian Cancer. Kluwer Academic Publishers, 2002.
18. Chi DS, Liao JB, Leon LF, et al. Identification of Prognostic Factors in Advanced Epithelial Ovarian Carcinoma. Gynecologic Oncology 2001; 82: 532-37
19. Makar AP, Baekelandt M, Tropé CG, et al. The Prognostic Significance of Residual Disease, FIGO substage, Tumor Histology, and Grade in Patients with FIGO Stage III Ovarian Cancer. Gynecologic Cancer 1995; 56: 175-80
20. Puls LE, Duniho T, Hunter JE, et al. The Prognostic Implication of Ascites in Advanced- Stage Ovarian Cancer. Gynecologic Oncology 1996; 61: 109-12
21. Griffiths CT et al. Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian cancer. Monogr Natl Cancer Inst 1975; 45: 101-04
22. Hoskins WJ. Surgical staging and cytoreduction surgery of epithelial ovarian cancer. Cancer 1993; 71: 1534-40
23. Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, et al. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 974-80

24. Marsoni S, Torri V, Valsecchi MG, et al. Prognostic factors in advanced epithelial ovarian cancer. *British J Cancer* 1990; 62: 444-50
25. Colombo N, Maggioni A, Vignali M et al. Options for Primary Chemotherapy in Advanced Ovarian Cancer: The European Perspective. *Gynecologic Oncology* 1994; 55: S108-13
26. Thigpen T, Vance R, Punecky L et al. Chemotherapy in Advanced Ovarian Carcinoma; Current Standards of Care Based on Randomized Trails. *Gynecologic Oncology* 1994; 55: S97-S107
27. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB. Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Annals of Oncology* 2001; 12: 1195-203
28. Mow BMF, Blajeski AL, Chandra J, Kaufmann SH. Apoptosis and the response to anticancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 453-62
29. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M et al. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999; 15: 269-90
30. Fanning J, Biddle WC, Goldrosen M, et al. Comparison of Cisplatin and Carboplatin Cytotoxicity in Human Ovarian Cancer Cell Lines Using the MTT Assay. *Gynecologic Oncology* 1990; 39: 119
31. Perez RP, O'Dwyer PJ, Handel LM, et al. Comparative cytotoxicity of CI-973, cisplatin, carboplatin and tetraplatin in human ovarian carcinoma cell lines. *Int. J Cancer* 1991; 48(2): 265
32. Sharma M, Jan R, Inonescu E, et al. Capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence detection of the major DNA adduct of cisplatin and carboplatin. *Anal Biochem* 1995; 228(2): 307
33. Kojima H, Endo K, Moriyama H, et al. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 1998; 273: 16647-50
34. Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, et al. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3, -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 199-206
35. Zaffaroni N, Silvestrini R, Orlandi L et al. Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian cancer cells. *British Journal of Cancer* 1998; 77(9): 1378-85
36. Hill BT, Whelan RDH, McClean S et al. Differential cytotoxic effects of docetaxel in a range of mammalian tumor cell lines and certain drug resistant sublines invitro. *Invest New Drugs* 1994; 12: 169-82
37. Kelland LR, Abel G. Comparative in vitro cytotoxicity of taxol and Taxotere against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 30: 444-50
38. Riou JF, Naudin A, Lavelle F. Effects of Taxotere on murine and human tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 164-70
39. Trimble EL, Arbuck SG, McGuire WP. Options for Primary Chemotherapy of Epithelial Ovarian Cancer: Taxanes. *Gynecologic Oncology* 1994; 55: S114-21
40. Kolfschoten GM, Hulscher TM, Schrier SM, et al. Time-dependent Changes in Factor Involved in the Apoptosis Process in Human Ovarian Cancer Cells as a Response to Cisplatin. *Gynecologic Oncology* 2002; 84: 404-12
41. Engblom P, Rantanen V, Kulmala J, et al. Taxane Sensitivity of Ovarian Carcinoma in Vitro. *Anticancer Research* 1997; 17: 2475-80
42. Bissery MC. Preclinical Pharmacology of Docetaxel. *European Journal of Cancer* 1995; 31A (Supp 4): S1-S6
43. Agiostratidou G, Sgouros I, Galani E, et al. Correlation of In Vitro Cytotoxicity and Clinical Response to Chemotherapy in Ovarian and Breast Cancer Patients. *Anticancer Research* 2001; 21: 455-60