

KARYA AKHIR

*EXPRESSION OF CANCER STEM CELL MARKER CD133 IN
IDH-MUTANT AND IDH-WILDTYPE ASTROCYTOMA
(ISOCITRATE DEHYDROGENASE)*

*EKSPRESI MARKER CANCER STEM CELL CD133 PADA
ASTROSITOMA YANG IDH-MUTANT DAN IDH-WILDTYPE
(ISOCITRATE DEHYDROGENASE)*

OLIVIA DESTY SABUNGA

C075181003



PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

**EKSPRESI *MARKER CANCER STEM CELL* CD133
PADA ASTROSITOMA YANG IDH-*MUTANT* DAN
IDH-*WILDTYPE (ISOCITRATE DEHYDROGENASE)***

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis Patologi
Anatomi

Disusun dan Diajukan Oleh

OLIVIA DESTY SABUNGA

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

KARYA AKHIR

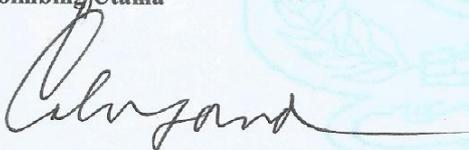
EKSPRESI MARKER CANCER STEM CELL CD133 PADA ASTROSITOMA YANG IDH-MUTANT DAN IDH-WILDTYPE (ISOCITRATE DEHYDROGENASE)

Disusun dan diajukan oleh :
dr. Olivia Desty Sabunga
C075181003

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis
Program Studi Ilmu Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 07 Desember 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

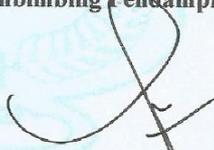
Menyetujui

Pembimbing Utama



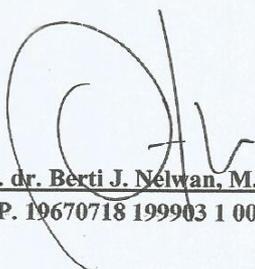
dr. Cahyono Kaelan, PhD, SpS, Sp.PA(K)
NIP. 19501023 197403 1 001

Pembimbing Pendamping



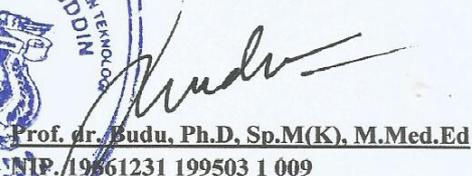
dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)
NIP. 19740330 200501 2 001

Ketua Program Studi
Ilmu Patologi Anatomi



Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)
NIP. 19670718 199903 1 002

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : OLIVIA DESTY SABUNGA

NIM : C075181003

Program Studi : Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi
Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 07 Desember 2021

Yang menyatakan,



(Olivia Desty Sabunga)

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulisan tesis ini merupakan salah satu syarat penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Patologi Anatomi di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Dalam penelitian dan penulisan karya akhir ini, penulis mendapat sangat banyak bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **dr. Cahyono Kaelan, PhD, SpPA(K), SpS** sebagai pembimbing pertama dalam penelitian ini atas segala perhatian, bimbingan, dan dorongannya selama proses penelitian sampai penyusunan karya akhir ini, sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. **dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA (K)** sebagai pembimbing kedua yang selalu menyempatkan diri untuk membimbing dan mendorong penulis di tengah kesibukannya.
3. **Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM** yang banyak membimbing dan memberikan masukan kepada penulis dalam hal metodologi penelitian dan analisa statistik tesis ini.
4. Seluruh staf pengajar dibagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin tanpa terkecuali (khususnya

dr. Ni Ketut Sungowati, SpPA(K), dr. Muhammad Husni Cangara, PhD, SpPA, dr. Truly D. Djimahit, Sp.PA(K), dr. Djumadi Achmad, Sp.PA(K), dr. Gunawan Arsyadi, Sp.PA(K), dr. Mahmud Ghaznawie, Ph.D, Sp.PA(K), Dr. dr. Gatot S. Lawrence, Sp.PA(K), Dr. dr. Rina Masadah, M.Phill, Sp.PA(K), Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K) , dr. Juanita, Sp.PA, dr. Imeldy Prihatni Ma'mun, M.Kes, Sp.PA, dr. Jeni Poniman, Sp.PA, dr. Amalia, M.Kes, Sp.PA) atas bimbingan selama penulis menjalani pendidikan maupun dalam penyusunan tesis ini.

5. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta didik pada Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Ilmu Patologi Anatomi Universitas Hasanuddin Makassar.
6. Koordinator Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Universitas Hasanuddin yang senantiasa memantau dan membantu kelancaran pendidikan penulis.
7. Seluruh teman sejawat residen Patologi Anatomi atas semua bantuan, dukungan, doa dan persaudaraan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan hingga menyelesaikan karya akhir ini.
8. Seluruh teknisi dan pegawai laboratorium Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo, Laboratorium Sentra Diagnostik Patologia Makassar dan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

9. Orang tua penulis, Parinto Lebang, Johana Sabunga, Tati Yohana, suami penulis, Ronal Nandang. ST, anak penulis, Aldred Ones Nandang dan Asael Owen Nandang, beserta seluruh keluarga dan sahabat yang senantiasa mendukung, mendoakan dan menjadi sumber inspirasi serta semangat utama bagi penulis selama menjalani pendidikan.
10. Semua pihak yang telah membantu penulis, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis berharap agar karya akhir ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Patologi Anatomi di masa yang akan datang. Akhir kata, penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala khilaf dan salah mulai dari awal penelitian sampai akhir penulisan karya akhir ini.

Makassar, 07 Desember 2021

Yang menyatakan

(Olivia Desty Sabunga)

ABSTRAK

OLIVIA D. SABUNGA. Ekspresi Marker Cancer Stem Cell CD133 pada Astrositoma yang IDH-Mutant dan IDH-Wildtype (Isocitrate Dehydrogenase). (Dibimbing oleh **Cahyono Kaelan, Upik A. Miskad, Andi Alfian Zainuddin**)

Penelitian ini bertujuan untuk melihat perbedaan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada masing-masing klasifikasi Astrositoma.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, pada bulan Oktober 2020 sampai Agustus 2021. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah observasi analitik dengan desain *cross sectional*. Sampel penelitian berasal dari enam puluh tujuh sediaan blok parafin tumor primer otak dengan diagnosa Diffuse Astrositoma (DA), Anaplastik Astrositoma (AA) dan Glioblastoma (GB). Kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal IDH1-R132H dan poliklonal CD133. Penilaian mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya.

Hasil dari penelitian ini dianalisis menggunakan uji Chi-Square, didapatkan terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi IDH1-R132H dengan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada DA, AA dan GB ($p < 0,001$). Astrositoma dengan status molekular IDH-*mutant* akan lebih mengekspresikan *marker cancer stem cell* CD133 dibandingkan IDH-*wildtype*, oleh karena itu CD133 dapat digunakan sebagai salah satu marker keberadaan CSC sehingga dapat memberikan nilai prediktif terhadap keberhasilan pengobatan, prognosis penyakit, rekurensi dan dapat dipertimbangkan untuk dijadikan target terapi kombinasi dengan kemoterapi.

Kata Kunci : CD133, IDH-R132H, IDH-*mutant*, IDH-*wildtype*, Astrositoma

ABSTRACT

OLIVIA D. SABUNGA. Expression of CD133 Cancer Stem Cell Marker in IDH-mutant and IDH-wildtype (Isocitrate Dehydrogenase) Astrocytoma. (Supervised by **Cahyono Kaelan, Upik A. Miskad, Andi Alfian Zainuddin**)

This study aims to see differences in the expression of the cancer stem cell marker CD133 in each astrocytoma classification.

The research was conducted at the Anatomical Pathology Laboratory, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, from October 2020 to August 2021. The method used in this study was analytic observation with a cross sectional design. The research sample came from sixty seven paraffin block preparations for primary brain tumors with the diagnosis of Diffuse Astrocytoma (DA), Anaplastic Astrocytoma (AA) and Glioblastoma (GB). Then, immunohistochemical staining was performed using the monoclonal antibody IDH1-R132H and polyclonal CD133. Microscopic assessment was carried out using a light microscope.

The results of this study were analyzed using the Chi-Square test, it was found that there was a significant relationship between the expression of IDH1-R132H and the expression of the cancer stem cell marker CD133 in DA, AA and GB ($p < 0.001$). Astrocytoma with IDH-mutant molecular status will express more markers of cancer stem cell CD133 than IDH-wildtype, therefore CD133 can be used as a marker for the presence of CSC so that it can provide predictive value on treatment success, disease prognosis, recurrence and can be considered as target combination therapy with chemotherapy.

Keywords: CD133, IDH-R132H, IDH-mutant, IDH-wildtype, astrocytoma

DAFTAR ISI

| | |
|--|-----|
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xii |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xv |
| BAB I..... | 1 |
| PENDAHULUAN..... | 1 |
| I.1 Latar Belakang | 1 |
| I.2. Rumusan Masalah..... | 8 |
| I.3. Tujuan Penelitian..... | 8 |
| I.3.1. Tujuan Umum..... | 8 |
| I.3.2. Tujuan Khusus | 8 |
| I.4. Hipotesis..... | 9 |
| I.5.1 Manfaat di bidang akademik..... | 9 |
| I.5.2 Manfaat di bidang profesi | 10 |
| I.5.3 Manfaat di bidang klinis | 10 |
| I.5.4 Manfaat di bidang penelitian..... | 10 |
| BAB II..... | 11 |
| TINJAUAN PUSTAKA | 11 |
| II.1 Neuroglial Sistem Saraf Pusat | 11 |
| II.2 Glioma | 14 |
| II.2.1 Astrositoma | 16 |
| II.2.2 Glioblastoma | 18 |
| II.3 Stem cells normal | 27 |
| II.4 Cancer Stem Cells pada Glioma..... | 29 |
| II.4.1 Mekanisme proliferasi seluler <i>glioma stem cell</i> | 33 |
| II.5 CD 133 Sebagai Penanda <i>Cancer Stem Cell</i> | 39 |

| | |
|---|----|
| II.5.1 Struktur CD133..... | 39 |
| II.5.2 Peran CD133 pada differensiasi sel neuroepithelial | 41 |
| II.5.3 Peran CD133 pada sel normal dan pada sel kanker glioma | 44 |
| II.5.4 Hubungan IDH1 dengan Glioma Stem Cell | 46 |
| II.5.5 Hubungan CSCs terhadap resistensi pengobatan | 48 |
| BAB III | 51 |
| KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP | 51 |
| III.1 Kerangka Teori | 51 |
| III.2 Kerangka Konsep | 52 |
| III.3 Variabel Penelitian..... | 52 |
| BAB IV | 53 |
| METODOLOGI PENELITIAN..... | 53 |
| IV.1 Desain Penelitian | 53 |
| IV.2 Tempat dan Waktu Penelitian | 53 |
| IV.3 Populasi Penelitian..... | 53 |
| IV.4 Sampel dan Cara Pengambilan Sampel..... | 54 |
| IV.5 Perkiraan Besar Sampel | 54 |
| IV.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi..... | 54 |
| IV.6.1 Kriteria Inklusi | 54 |
| IV.6.2 Kriteria Eksklusi | 55 |
| IV.7 Cara Kerja | 55 |
| IV.7.1 Alokasi Subyek | 55 |
| IV.7.2 Prosedur pewarnaan Hematoxylin Eosin..... | 56 |
| IV.7.3 Prosedur pewarnaan imunohistokimia | 57 |
| IV.7.4 Interpretasi Hasil Pewarnaan Imunohistokimia..... | 58 |
| IV.8 Definisi Operasional dan Kriteria Obyektif | 59 |
| IV.8.1. Defenisi Operasional..... | 59 |
| IV.8.2. Kriteria Obyektif | 59 |
| IV.9. Pengolahan dan Analisa Data | 61 |
| IV.10. Alur Penelitian | 62 |
| BAB V | 63 |

| | |
|---|------|
| HASIL DAN PEMBAHASAN | 63 |
| V.1. Hasil Penelitian | 63 |
| V.1.1 Jumlah Sampel | 63 |
| V.1.2 Karakteristik Sampel | 64 |
| V.1.3 Ekspresi IDH1-R132H pada Astrositoma | 66 |
| V.1.4 Ekspresi CD133 pada Astrositoma Berdasarkan Intensitas Warna Ekspresi CD133..... | 67 |
| V.1.5 Karakteristik diagnosa Astrositoma berdasarkan usia | 68 |
| V.1.6 Karakteristik diagnosa Astrositoma berdasarkan lokasi tumor.. | 69 |
| V.1.7 Analisis hubungan antara diagnosa Astrositoma dengan ekspresi IDH1-R132H | 70 |
| V.1.8 Analisis hubungan antara diagnosa Astrositoma dengan skor ekspresi CD133..... | 72 |
| V.1.9 Analisis hubungan ekspresi IDH1-R132H dengan skor ekspresi CD133..... | 73 |
| V.1.10 Analisis hubungan masing-masing diagnosa molekuler dengan skor ekspresi CD133 | 74 |
| V.2 Pembahasan | 75 |
| BAB VI..... | 90 |
| KESIMPULAN DAN SARAN..... | 90 |
| VI.1 Kesimpulan | 90 |
| VI.2 Saran | 91 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 92 |
| LAMPIRAN | xvii |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|------|--|
| WHO | World Health Organization |
| HGG | High Grade Glioma |
| IDH | Isocitrate dehydrogenase |
| BRAF | B-Raf proto-oncogen serine/threonine kinase |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| CSC | Cancer Stem Cell |
| GSC | Glioma Stem Cell |
| PTEN | Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome |
| NF1 | Neurofibromin 1 |
| RB1 | Retinoblastoma protein |
| PIK3 | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| FLIP | <i>FLICE-inhibitory protein</i> |
| SVZ | Zona Subventrikular |
| SGZ | Zona Subgranular |
| RMS | Rostral Migratory Stream |
| GABA | Gamma-Aminobutyric Acid |
| CSF | Cerebrospinal fluid |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor |
| LOH | Losses of Heterozigosity |
| TCF | T-cell Factor |
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| HDAC | Histone deacetylases |

TNBC Triple-negative breast cancer

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Distribusi sampel berdasarkan Demografi dan Karakteristik Klinik

Tabel 2. Karakteristik diagnosa Astrositoma berdasarkan usia

Tabel 3. Karakteristik diagnosa Astrositoma berdasarkan lokasi tumor

Tabel 4. Hubungan antara diagnosa Astrositoma dengan ekspresi IDH1-R132H

Tabel 5. Hubungan antara diagnosa Astrositoma dengan skor ekspresi CD133

Tabel 6. Hubungan ekspresi IDH1-R132H dengan skor ekspresi CD133

Tabel 7. Hubungan masing-masing diagnosa molekuler dengan skor ekspresi CD133

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tipe dari sel glial

Gambar 2.2 Histologi sel glial

Gambar 2.3 Gambaran Histologi Astrocitoma

Gambar 2.4 Histopatologi glioblastoma

Gambar 2.5 Pathways Glioblastoma Primer dan Sekunder

Gambar 2.6 Klasifikasi Tumor Astroitik Derajat Tinggi berdasarkan WHO 2016

Gambar 2.7 Klasifikasi Glioma WHO 2016 dan mutasi IDH dalam Gliomagenesis

Gambar 2.8 Pathway IDH dalam Fisiologi dan Penyakit

Gambar 2.9 Sel-sel pluripoten dari *embryonic stem cells* (ES)

Gambar 2.10 Skematik yang menggambarkan hirarki paralel antara stem cell normal dengan stem cell kanker

Gambar 2.11 Dampak model CSC pada desain dan evaluasi perawatan antitumor

Gambar 2.12 Kontrol *self renewal stem cell* oleh pathway WNT dan BMI 1

Gambar 2.13 Skema yang menunjukkan peran EGFR dalam regulasi *self-renewal*, metabolisme, dormansi, immune escape dan resistensi terapi pada CSC

Gambar 2.14 Regulasi epigenetik dalam CSC

Gambar 2.15 Topologi CD133/Prominin-1

Gambar 2.16 Keterlibatan jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin dalam neurogenesis

Gambar 2.17. Hubungan antara mutasi IDH1/2 dan Glioma

Gambar 5.1 Ekspresi protein IDH1-R132H

Gambar 5.2 Ekspresi protein CD133 berdasarkan intensitas warna

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kanker otak meliputi sekitar 85-90% dari seluruh kanker sistem saraf pusat. Insiden tumor otak primer yang ganas secara signifikan lebih rendah di Asia Timur, Asia Tenggara, dan India. Insiden tertinggi ditemukan di Eropa, Kanada, Amerika Serikat, dan Australia. Data dari Globocan 2018 menunjukkan insiden dari tumor otak dan sistem saraf di seluruh dunia adalah 308.000 (1,6%) dengan angka mortalitas 251.000. (Globocan Observatory, 2020). Astrositoma anaplastik dan glioblastoma meliputi sekitar 38% dari seluruh tumor primer susunan saraf pusat, dan 27% adalah meningioma serta tumor mesenkim lainnya. Sisanya terdiri dari tumor otak primer yang bervariasi, meliputi tumor hipofisis, schwannoma, limfoma SSP, oligodendroglioma, ependimoma, astrositoma derajat rendah, dan meduloblastoma. (KPKN, 2017; Leece et al., 2017)

Di Indonesia sendiri, belum ada data epidemiologi secara nasional yang jelas mengenai tumor otak primer khususnya astrositoma. Sebuah penelitian di Bandar Lampung melaporkan selama periode 2009-2013 terdapat 173 pasien dengan diagnosis tumor otak berdasarkan hasil histopatologi. Pada penelitian tersebut pasien berjenis kelamin perempuan

lebih banyak daripada laki-laki (1,8:1). Jenis tumor yang paling banyak ditemukan adalah meningioma (57,8%) dan astrositoma (28,9%) dengan lokasi tumor terbanyak di regio frontal (30,1%).(EDY, 2013) Pada penelitian lain di RSUP Dr. Kariadi Semarang sepanjang periode Januari 2017 sampai Desember 2018 ditemukan 71 pasien dengan tumor otak primer. Insiden tumor otak primer pada laki-laki lebih banyak (26 kasus, 72,2%) dibandingkan dengan perempuan (27,8%). Kelompok umur kejadian tumor otak primer pada laki-laki yang paling sering adalah kelompok usia 50-59 tahun ditemukan sebanyak 7 orang (19%), diikuti oleh kelompok umur 40-49 sebanyak 6 orang (16%). Jenis tumor otak primer yang paling sering adalah tumor astrositik (22 kasus, 61.1%), diikuti oleh meningeal (6 kasus, 16,7%), oligoastrocitoma (4 kasus, 11,1%). (Madani Hastutyosunu, 2020)

Astrositoma adalah tumor primer intraserebral yang paling sering pada orang dewasa. Meskipun tumor otak dan tumor sistem saraf pusat lainnya jarang, tumor ini menyebabkan morbiditas dan angka kematian yang tidak proporsional dengan kejadiannya. Sebagian besar pasien dengan astrositoma khususnya glioma yang difus memiliki prognosis yang fatal, dan penyakit ini memiliki dampak yang besar pada pasien dan status fisik, psikologis, ekonomi dan sosial keluarga mereka. (Rasmussen et al., 2017a)

Astrocitoma diklasifikasikan dalam subtipe sesuai dengan histologi sel glial dan dibagi ke dalam grade 1 sampai grade 4 berdasarkan morfologi dan perilaku ganas, serta menggunakan informasi molekular seperti yang ditentukan dalam klasifikasi *World Health Organization 2016* (WHO). *High grade* glioma (HGG) atau disebut pula malignant glioma mengalami pertumbuhan tumor yang cepat walaupun jarang metastasis ke luar SSP. Glioblastoma yang termasuk dalam HGG WHO grade 4, dengan kejadian sekitar 75 % dari seluruh HGG (Rasmussen et al., 2017a)

Perubahan klasifikasi dengan memasukkan parameter molekular berdasarkan pada genotipe menciptakan tantangan baru sehubungan dengan pengujian dan pelaporan diagnosa glioma. Pembaharuan klasifikasi tahun 2016 dari klasifikasi WHO 2007 ini menggabungkan parameter molekular ke dalam klasifikasi glioma difus, dan pergeseran ini telah mempengaruhi klasifikasi dalam beberapa cara. Semua tumor astrositik sebelumnya dikelompokkan bersama. Namun saat ini, semua glioma difus (asal astrositik atau tidak) dikelompokkan bersama, atas dasar tidak hanya pola dan perilaku pertumbuhannya, tetapi juga pada ekspresi status genetik IDH1 dan IDH2 (*Isocitrate dehydrogenase 1 dan 2*). (D. N. Louis et al., 2016)

Pada klasifikasi baru ini, kategori glioma difus mencakup tumor astrositik WHO derajat 1 dan 3, oligodendroglioma derajat 2 dan 3, oligoastrocitoma derajat 2 dan 3, glioblastoma derajat 4, dan yang terkait

glioma difus (misalnya pada masa kanak-kanak). Pendekatan ini memisahkan astrositoma yang memiliki pola pertumbuhan lebih terbatas, kekurangan gen IDH, dan kadang-kadang memiliki mutasi BRAF (misalnya astrositoma pilositik, xanthoastrositoma pleomorfik, dan subependimal giant cell astrositoma) dari glioma difus. Adanya mutasi IDH1 dan IDH2 ditemukan hampir pada semua glioblastoma yang berkembang dari astrositoma (glioblastoma sekunder). Secara klinis, glioblastoma primer dengan mutasi IDH1 dapat salah diklasifikasikan dan mungkin sebenarnya merupakan suatu glioma derajat rendah asimtomatik yang telah berkembang dan kemudian bergejala setelah menjadi glioblastoma. Dengan demikian, mutasi IDH1 merupakan tanda molekular yang dapat digunakan untuk memisahkan kelompok glioblastoma yang secara klinis maupun secara histopatologi mungkin identik dengan tipe sekunder.(D. N. Louis et al., 2016; Louis D et al., 2016)

Penelitian genetik dan epigenetik terbaru menunjukkan bahwa mutasi pada gen IDH berperan penting pada patogenesis dan prognosis glioma sehingga identifikasi mutasi IDH1 pada populasi sampel dapat menjadi penanda penting, tidak hanya untuk membantu diagnosis dan menentukan prognosis glioma tersebut, tapi juga untuk pengembangan terapi target seperti kemoterapi yang saat ini sudah menjadi bagian dari pelayanan rutin yang dapat membantu dalam pengambilan keputusan klinis.

Cancer stem cells berperan terhadap glioma yang radioresisten dan kemoresisten dengan cara meningkatkan kapasitas untuk perbaikan DNA melalui respon aktivasi *check point* terhadap kerusakan DNA.(Persano et al., 2015) Populasi CSC memiliki kemampuan memperbarui diri, dapat menghasilkan turunan yang heterogen (pluripotensi), kehilangan kontrol terhadap proliferasi, dan mempunyai potensi malignansi. Keberadaan CSC dikatakan berkaitan dengan perkembangan kanker, rekurensi, metastasis, dan resistansi terhadap terapi konvensional. Diduga bahwa sel tumor dapat lolos dari efek sitotoksik antibodi spesifik dengan cara menurunkan ekspresi antigen permukaan, meningkatkan resistansi terhadap kemoterapi atau dengan mengalami beberapa mutasi.(Altaner, 2008) Oleh karena itu, eradikasi CSC dapat dicapai dengan obat atau molekul spesifik yang menarget jalur signaling CSC, penanda CSC, mekanisme perbaikan DNA, inhibitor apoptosis, lingkungan mikro CSC (*niche*) dan terapi diferensiasi.(Kalkan, 2015)

Resistensi glioblastoma terhadap terapi disebabkan oleh beberapa faktor, selain penyerapan obat yang tidak sempurna karena adanya *blood-brain barrier* dan tekanan interstitial yang tinggi dalam jaringan tumor, sifat invasif dari sel glioblastoma yang memungkinkan sel untuk menyebar jauh di dalam sistem saraf pusat dan tetap berada di bawah *blood-brain barrier* yang utuh, juga yang terpenting adalah kehadiran populasi tumor-inisiating atau *stem cell-like cells* yang memiliki mekanisme resistensi bila

dibandingkan dengan sel-sel tumor dan berkontribusi terhadap heterogenitas seluler. Abnormalitas molekular pada glioblastoma juga menyebabkan mekanisme resisten yang spesifik terhadap terapi akibat beberapa perubahan genetik pada glioblastoma (misalnya PTEN, TP53, EGFR, NF1, RB1, PIK3CA, PIK3R1 dan IDH1).(Louis D et al., 2016)

Telah diketahui bahwa terapi target dapat menghasilkan regresi parsial yang umumnya diikuti oleh munculnya klon tumor baru yang berkembang dari populasi CSC yang ada. Oleh karena itu, mengidentifikasi dan menarget CSC diduga akan menjadi alternatif yang menjanjikan dan efektif dalam pengobatan kanker. Dikatakan bahwa dengan menarget CSC akan menghasilkan regresi tumor yang lebih nyata dan CSC yang stabil umumnya membelah secara lambat sehingga bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi tumor terhadap terapi kanker konvensional.(Louis D et al., 2016)

Beberapa marker permukaan seluler telah digunakan untuk mengidentifikasi CSC, salah satu diantaranya adalah CD133. CD133 dengan jalur pensinyalan Wnt dan Notch, dapat menyebabkan proliferasi sel. Kerjasama Shh bersama dengan Wnt juga dibuktikan sebagai regulator *self renewal* dan pertumbuhan kanker pada *stem cell*. Selain itu, CD133 menghambat apoptosis dan meningkatkan FLICE-*inhibitory protein* (FLIP) yang menyebabkan resistensi kemoterapi. Terapi yang menargetkan CD133 mungkin adalah strategi yang efisien untuk mengecilkan tumor.(Barzegar Behrooz et al., 2019)

Penelitian ini perlu dilakukan untuk melihat ekspresi CD133 sebagai penanda *cancer stem cells* pada glioma khususnya pada tumor difus sel astrosit, sehingga dapat memberikan nilai prediktif terhadap keberhasilan pengobatan, prognosis penyakit, rekurensi dan kecenderungan untuk metastasis.

Di Makassar, data yang tercatat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dan Sentra Diagnostik Patologia Makassar dari tahun 2012 sampai 2020 adalah terdapat 72 pasien didiagnosa sebagai glioma WHO derajat 2 (paling banyak astrositoma difus), 32 pasien didiagnosa sebagai glioma WHO derajat 3 (paling banyak anaplastik astrositoma) dan 38 pasien didiagnosa sebagai glioma WHO derajat 4 (glioblastoma).

Salah satu cara untuk mendeteksi IDH1 selain dengan metode *DNA-sequencing* adalah dengan pemeriksaan imunohistokimia. Pemeriksaan imunohistokimia ini sangat berguna karena cepat, tidak memerlukan peralatan khusus, dan memungkinkan identifikasi sel tumor yang mengandung mutasi IDH1 pada biopsi kecil. Proporsi sel-sel neoplastik mungkin bermasalah untuk *DNA-sequencing* pada kasus biopsi *stereotactic* yang kecil pada glioma derajat rendah. Dalam penelitian Capper *et al*, sekuensing memberikan hasil negatif dalam delapan kasus (8/186) yang ditemukan positif oleh imunohistokimia. (Loussouarn *et al.*, 2012)

Penelitian ini pertama kali dilakukan khususnya dengan menggunakan sampel di Makassar untuk melihat ekspresi marker CSC CD133 pada Astrositoma berdasarkan klasifikasi WHO 2016 yang menggunakan parameter karakteristik molekular melalui pemeriksaan immunohistokimia.

I.2. Rumusan Masalah

Uraian berbagai konsep dan fakta yang dinyatakan dalam latar belakang masalah di atas, penulis ingin mengetahui:

- Apakah terdapat perbedaan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada Astrositoma?

I.3. Tujuan Penelitian

I.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah melihat perbedaan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada masing-masing klasifikasi Astrositoma.

I.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. Menentukan klasifikasi Astrositoma berdasarkan klasifikasi WHO
2. Mengidentifikasi karakteristik sampel Astrositoma berdasarkan usia dan lokasi tumor
3. Menentukan ekspresi *IDH1-R132H* pada Astrositoma melalui pewarnaan immunohistokimia

4. Menentukan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada Astrositoma melalui pewarnaan immunohistokimia
5. Menilai hubungan ekspresi IDH1-R132H terhadap CD133 pada Astrositoma

I.4. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

1. Terdapat perbedaan ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 pada masing-masing klasifikasi Astrositoma, dimana ekspresi *marker cancer stem cell* CD133 lebih tinggi pada Glioblastoma, IDH-*wildtype* dibandingkan kelompok Astrositoma lainnya.

I.5 Manfaat Penelitian

I.5.1 Manfaat di bidang akademik

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang ekspresi IDH1 pada Diffuse Astrositoma, Anaplastik Astrositoma dan Glioblastoma, sehingga dapat memisahkan kelompok Astrositoma yang secara klinis maupun secara histopatologi mungkin identik namun berbeda tipe molekular.
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang ekspresi CD133 sebagai penanda populasi *cancer stem cell* pada Diffuse Astrositoma dan *High Grade* Astrositoma.

I.5.2 Manfaat di bidang profesi

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi ahli patologi untuk menegakkan diagnosis tidak hanya dari gambaran histopatologi namun juga berdasarkan tipe molekular.

I.5.3 Manfaat di bidang klinis

1. Identifikasi mutasi IDH1 dan CD133 pada populasi sampel dapat menjadi penanda penting, tidak hanya untuk membantu diagnosis tapi juga untuk pengembangan terapi target yang membantu dalam pengambilan keputusan klinis.

2. Dengan mengetahui status ekspresi IDH1 dan CD133 pada Diffuse Astrojitoma dan *High Grade* Astrojitoma, dapat memberikan nilai prediktif dan prognosis terhadap respon terapi.

I.5.4 Manfaat di bidang penelitian

1. Hasil penelitian ini dapat menjadi data/ informasi dalam melakukan penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Neuroglial Sistem Saraf Pusat

Sistem saraf pada manusia, sejauh ini adalah sistem paling kompleks dalam tubuh, dibentuk oleh beribu-ribu jaringan sel saraf (neuron) yang dibantu oleh banyak sel pendukung disebut sel glial. Sel glial juga disebut neuroglia atau glia, adalah sel non-neuronal yang menjaga stabilitas dan arsitektur dari keseluruhan sistem saraf. Sebagian besar sel glial berkembang dari sel-sel progenitor embrionik *neural plate*. Selama embriogenesis mamalia, perkembangan sistem saraf pusat dimulai dengan induksi neuroektoderm, yang membentuk *neural plate* dan kemudian melipat membentuk tabung saraf (*neural tube*). (Dongmei Cui, 2011; Lee et al., 2015) Ada lima jenis sel glia pada sistem saraf pusat manusia, yaitu astrosit, oligodendrosit, sel ependimal, sel schwan dan mikroglia. (Anthony L. Mescher, 2013; Weingart, JD;McGirt, 2010)

Neurogenesis terjadi pada dua daerah otak orang dewasa, yaitu pada (1) zona subventrikular (SVZ) yang melapisi ventrikel lateral dan (2) zona subgranular (SGZ) dentate gyrus di hippocampus. Neuroblast dari SVZ bermigrasi di sepanjang *Rostral Migratory Stream* (RMS) untuk menyediakan inhibitor sel granul yang baru dan sel glomerular dalam *olfactory bulb*. Sel-sel baru yang terbentuk dari SGZ bermigrasi ke lapisan

granular gyrus dentate, kemudian sebagian besar sel-sel baru tersebut menjadi sel granul yang tereksitasi. (Stiles & Rowitch, 2008)

Astrodit memiliki banyak peran dalam sistem saraf pusat termasuk pemeliharaan integritas sawar darah-otak, penyerapan dan daur ulang glutamat dan GABA, pemeliharaan lingkungan ionik ekstraseluler dan metabolisme neuron. Peran penting astrodit dalam mendukung fungsi neuron ditegaskan oleh sejumlah besar sel-sel ini yang ada di otak. Astrodit adalah tipe sel glial yang dominan dan terdiri sekitar setengah dari volume otak mamalia dewasa. Lapisan astrodit bersama dinding pembuluh darah membentuk *blood brain barrier*.(Garman, 2011)

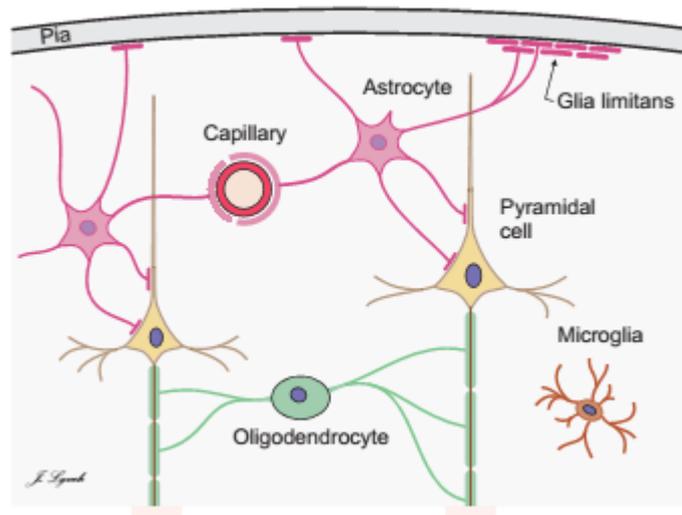
Untuk memenuhi berbagai peran vitalnya, astrodit memiliki tonjolan memanjang sitoplasma yang menyentuh permukaan semua wilayah utama di anatomi neuron (mis., sel tubuh, akson, dendrit, dan sinapsis) dan juga meluas ke permukaan otak untuk membentuk glia *limitans* (membran pembatas glial).(Garman, 2011) Astrodit berkomunikasi langsung satu sama lain melalui *gap junctions*, membentuk jaringan seluler yang sangat besar untuk mengatur regulasi dari aktivitas di berbagai regio otak. (Anthony L. Mescher, 2013)

Oligodendrosit menghasilkan selubung mielin di sekitar akson yang menyediakan isolasi listrik untuk neuron di susunan saraf pusat. Oligodendrosit memiliki prosesus seperti lembaran yang membungkus bagian dari beberapa akson dan menghasilkan selubung mielin serta

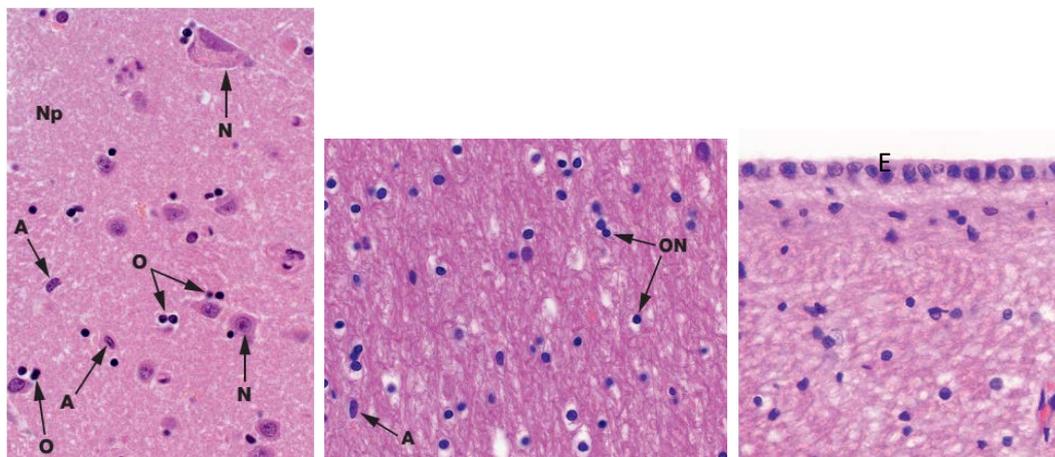
merupakan sel glial yang dominan pada susunan saraf pusat substansia alba, yang berwarna putih karena lipid terkonsentrasi dalam selubung membran yang dibungkusnya. Prosesus dan selubungnya tidak terlihat oleh pewarnaan mikroskop cahaya rutin, di mana oligodendrosit biasanya tampak kecil, sel dengan inti bulat, terkondensasi dan sitoplasma tidak terwarnai. (Anthony L. Mescher, 2013)

Sel ependymal adalah sel kolumnar atau sel berbentuk kubus yang melapisi ventrikel otak dan kanal sentral sumsum tulang belakang. Di beberapa lokasi susunan saraf pusat, ujung apikal sel ependymal memiliki silia, yang memfasilitasi pergerakan cairan serebrospinal (CSF), dan mikrovili panjang, yang kemungkinan terlibat dalam proses absorpsi. (Anthony L. Mescher, 2013)

Mikroglia adalah sel kecil dan pendek dengan prosesus yang tidak teratur dan tidak merata, terletak pada substansia alba dan substansia nigra, jumlahnya lebih sedikit daripada oligodendrosit atau astrosit. (Anthony L. Mescher, 2013) Mikroglia bertindak sebagai fagosit dan elemen sistem kekebalan tubuh. (Dongmei Cui, 2011)



Gambar 2.1. Tipe dari sel glial (Dongmei Cui, 2011)



Gambar 2.2. Histologi sel glial.

A. Astrosit N. Neuron O. Oligodendrosit E. Sel ependimal (Barbara Young, 2014)

II.2 Glioma

Glioma pada orang dewasa letaknya berada di supratentorial dan berasal dari korteks dan hemisfer otak. Pada anak-anak paling sering berada di infratentorial yang berasal dari cerebellum, batang otak, dan mesensefalon. (Frosch & Anthony, 2015)

Tumor otak primer yang ganas yaitu tumor sel glial (glioma), meliputi glioma derajat rendah (astrocitoma derajat 1/2, oligodendroglioma), glioma derajat tinggi (astrocitoma anaplastik derajat 3, anaplastik oligodendroglioma dan glioblastoma derajat 4). Klasifikasi lesi primer sistem saraf pusat dilakukan berdasarkan gambaran histologi, derajat keganasan (grading), gambaran biologi dikombinasi dengan analisis molekular. WHO derajat 1 untuk tumor dengan potensi proliferasi rendah, kurabilitas pasca reseksi cukup baik. WHO derajat 2 untuk tumor bersifat infiltratif, aktivitas mitosis rendah, namun sering timbul rekurensi. Jenis tertentu cenderung untuk bersifat progresif ke arah derajat keganasan yang lebih tinggi. Pada WHO derajat 3 didapatkan gambaran aktivitas mitosis jelas, kemampuan infiltrasi tinggi, dan terdapat anaplasia. Sementara pada WHO derajat 4 terlihat mitosis aktif, cenderung nekrosis, pada umumnya berhubungan dengan progresivitas penyakit yang cepat pada pra/pasca operasi. (Komite penanggulangan Kanker Indonesia, 2017; Kumar, V, 2017)

Glioma yang mengalami rekurensi sering menunjukkan perkembangan ke tingkat dan gambaran histologis yang lebih tinggi. Ini menunjukkan terjadinya evolusi klonal dari tumor yang sama menjadi penyakit baru. Hal yang menarik adalah identifikasi sel-sel yang menginisiasi tumor (*stem-like*) yang mempertahankan pertumbuhan tumor dan, karenanya, mungkin dapat menjadi target utama terapi baru. (Frosch & Anthony, 2015)

II.2.1 Astrositoma

Astrositoma adalah sekelompok neoplasma heterogen yang memberi gambaran lesi berbatas tegas, tumbuh lambat seperti astrositoma pilositik hingga neoplasma infiltratif yang sangat ganas seperti glioblastoma. Tumor astrositik dapat dibagi menjadi astrositoma pilositik, astrositoma infiltratif dan beberapa varian yang jarang. Astrositoma merupakan tipe tumor susunan saraf pusat yang paling banyak (38,6%) dan berlokasi di korteks frontoparietal dan merupakan tumor tersering pada anak dengan insiden puncak usia 5-9 tahun pada laki-laki dan 10-14 tahun untuk perempuan.(Frosch & Anthony, 2015)

- Astrositoma Pilositik

Astrositoma pilositik merupakan tumor WHO grade 1 yang timbul lambat dan berbatas tegas. Pada penampang mikroskopis sering ditemukan daerah kistik, serat Rosenthal yang eosinofilik terang dan butir-butir eosinofilik kaya protein (badan granular hialin). Astrositoma pilositik merupakan tumor otak glioma yang paling sering terjadi tanpa predileksi jenis kelamin yang jelas dan biasanya terjadi pada dua dekade pertama kehidupan.(Frosch & Anthony, 2015)

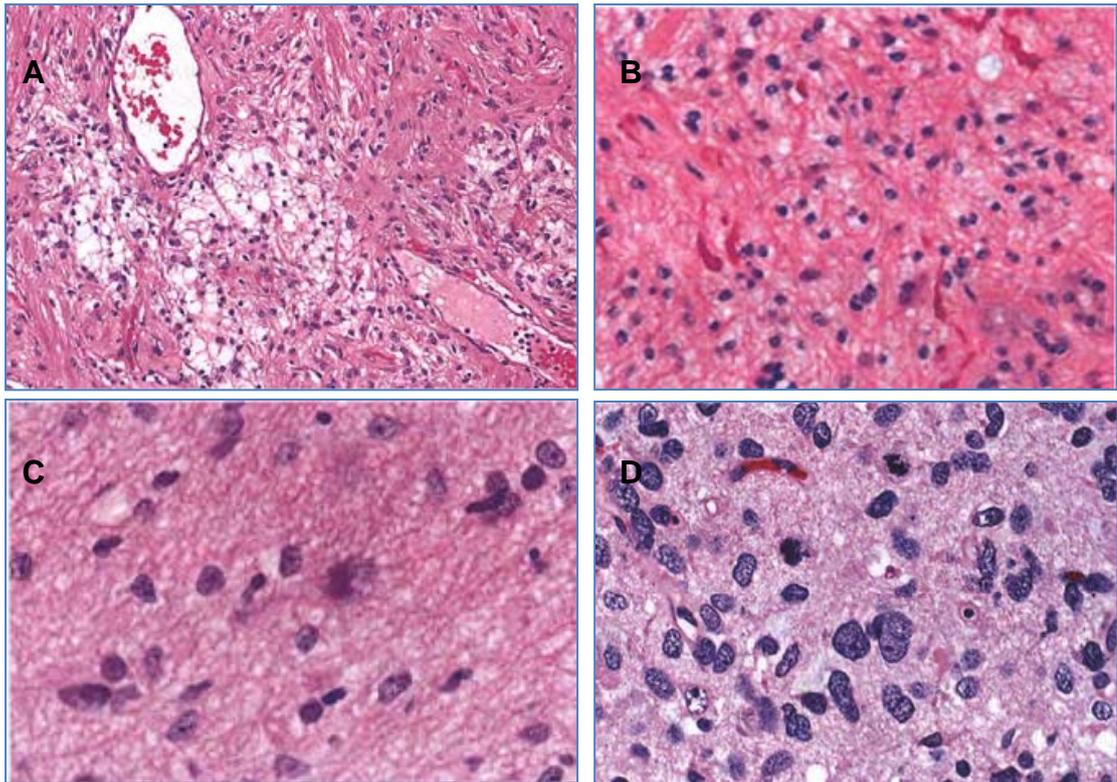
- Astrositoma Difus

Neoplasma astrositik difus merupakan tumor yang biasa terjadi pada dewasa muda dan ditandai dengan tingkat differensiasi seluler yang tinggi dan pertumbuhan yang lambat. Astrositoma difus memiliki

kecenderungan intrinsik untuk berkembang menjadi astrositoma anaplastik dan akhirnya menjadi glioblastoma. Permukaan potongan tumornya bisa keras atau lunak dan seperti gelatin, kistik degenerasi dapat juga terlihat. Tumor mungkin tampak berbatas tegas dari jaringan otak sehat di sekitarnya, tetapi infiltrasi di luar margin luar selalu ada. Secara mikroskopis, astrositoma difus memiliki kepadatan seluler lebih besar dari substansia alba normal. Transisi antara jaringan neoplastik dan normal tidak jelas, dan sel-sel tumor menginfiltrasi jaringan normal agak jauh dari lesi utama.(Frosch & Anthony, 2015)

- Astrositoma Anaplastik

Astrositoma anaplastik lebih padat, lebih seluler dan memiliki pleomorfisme inti yang lebih besar; angka mitosis sering diamati. Istilah astrositoma gemistositik digunakan untuk tumor dimana astrosit neoplastik dominan menunjukkan sel eosinofilik yang cerah berasal dari prosesus yang tebal.(Frosch & Anthony, 2015)



Gambar 2.3 Gambaran Histologi Astrocitoma. A,B. Astrocitoma pilositik C. Astrocitoma difus D. Astrocitoma anaplastik.(D. Louis, 2016)

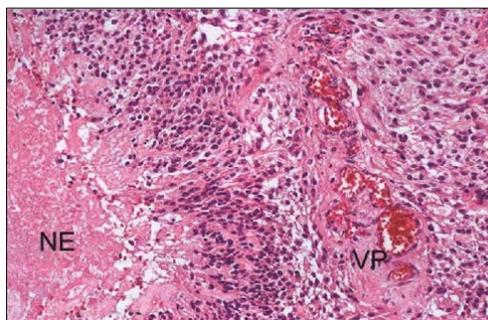
II.2.2 Glioblastoma

Glioblastoma adalah astrocitoma *high grade* (WHO grade 4) dapat timbul cepat secara *de novo*, tanpa lesi prekursor yang sering disebut glioblastoma primer. Sedangkan glioblastoma sekunder berkembang secara perlahan dari astrocitoma difus (WHO grade 2) atau astrocitoma anaplastik (WHO grade 3). Glioblastoma timbul dari jaringan otak normal, menyerang dan bermigrasi jauh dari tumor utama di dalam otak; namun, glioblastoma jarang menyebar di tempat lain di dalam tubuh.(Sarkar & Chiocca, 2012). Karena sifatnya yang invasif, glioblastoma tidak dapat sepenuhnya direseksi dan meskipun mendapat radioterapi atau kemoterapi, kurang dari setengah pasien yang dapat bertahan lebih dari

satu tahun. Prognosis lebih jelek pada pasien usia tua dibandingkan pasien muda.(Frosch & Anthony, 2015)

Glioblastoma dapat bermanifestasi pada usia berapa pun, tetapi paling sering terdapat pada orang dewasa, dengan puncak kejadian di antara usia 45 dan 75 tahun. Infiltrasi dari glioblastoma sering meluas ke korteks yang berdekatan dan melalui corpus callosum ke belahan kontralateral. Glioblastoma yang berlokasi di ganglia basal dan talamus juga tidak jarang, terutama pada anak-anak. Gambaran mikroskopiknya menunjukkan aktivitas mitosis sangat tinggi dengan proliferasi vaskuler, hiperseluler, bentuk sel dan inti sel bermacam-macam, cenderung nekrosis dan umumnya berhubungan dengan pertumbuhan tumor yang cepat.(Weingart, JD;McGirt, 2010)

Secara histologis, glioblastoma dibagi menjadi beberapa klasifikasi, yaitu Small Cell Glioblastoma, Primitive Neuronal Component Glioblastoma, Granular Cell Glioblastoma, Epithelioid Glioblastoma, Adenoid Glioblastoma, Giant Cell Glioblastoma dan Gliosarkoma. (Kumar, V, 2017)



Gambar 2.4. Histopatologi glioblastoma: sel-sel neoplastik tersusun palisading di sekitar zona nekrosis (NE) dengan proliferasi vaskular (VP) yang berdekatan dengan inti nekrotik. (D. N. Louis et al., 2016)

II.2.2.1 Patogenesis/Karsinogenesis Glioblastoma

Perkembangan astrositoma dipengaruhi oleh aktivasi beberapa onkogen dan inaktivasi gen supresi tumor. Aktivasi onkogen dapat berupa amplifikasi dan ekspresi berlebihan, sedangkan inaktivasi gen supresi tumor terjadi akibat mutasi, kehilangan atau delesi. Onkogen yang berperan seperti *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) dan *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), sedangkan gen supresi tumor yang berperan adalah p53.(Heberland, 2007)

Astrositoma anaplastik dapat tumbuh dari astrositoma difus (grade 2) atau *de novo*, serta mempunyai kecenderungan untuk berkembang menjadi glioblastoma. Astrositoma anaplastik dapat berlanjut menjadi glioblastoma. Umumnya, perkembangan dari *low grade* menjadi *high grade* berhubungan dengan inaktivasi *tumor suppressor genes* dan *losses of heterozigosity* (LOH) tertentu. Mutasi TP53 yang mengkode, ekspresi berlebih *Platelet-derived Growth Factor/Receptor* (PDGF/R), hilangnya gen supresi tumor astrositoma anaplastik di kromosom 19 dan 11, amplifikasi gen EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), dan ekspresi gen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) berakibat perkembangan menjadi glioblastoma.(Heberland, 2007)

Ada dua subtype glioblastoma: 1) glioblastoma, tipe *IDH-wildtype* (90%), sering didefinisikan sebagai glioblastoma primer atau *de novo* yang didominasi pada pasien di atas usia 55 tahun; 2) glioblastoma, *IDH-mutant* (10%) yang disebut glioblastoma sekunder dengan transformasi ganas

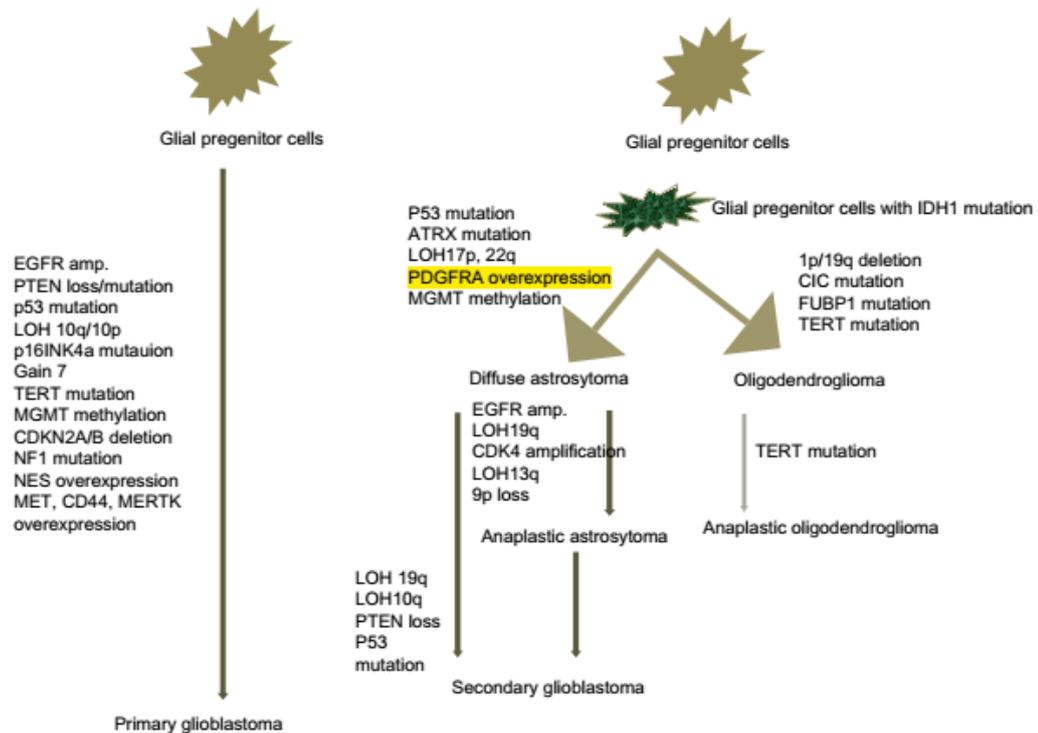
dari glioma tingkat rendah, umumnya terjadi pada pasien yang lebih muda di bawah 45 tahun.(Sarkar & Chiocca, 2012)

Glioblastoma dapat tumbuh secara *de novo* dari sisa sel-sel glia embrional atau *stem cells* (glioblastoma primer) dan transformasi maligna dari astrositoma *lower grade* atau astrositoma anaplastik (glioblastoma sekunder). Glioblastoma primer terutama terjadi pada usia tua dengan riwayat gejala klinis singkat dari beberapa minggu hingga beberapa bulan. Perubahan ciri khas glioblastoma primer ini termasuk mutasi gen dan amplifikasi *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), over ekspresi *Mouse Double Minute 2* (MDM2), delesi p16 dan hilangnya heterozigositas (LOH) dari kromosom 10q yang memegang fosfatase dan tensin homolog (PTEN), mutasi promotor TERT dan mutasi gen INK4aARF.(Hanif et al., 2017; Heberland, 2007)

Fitur karakteristik glioblastoma sekunder termasuk ekspresi berlebihan dari *Platelet-derived Growth Factor A*, dan *Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFA/ PDGFRa), retinoblastoma (RB), LOH 19q dan mutasi *Isocitrate Dehydrogenase 1/2* (IDH1 / 2), TP53 dan ATRX.(Cloughesy et al., 2014; Hanif et al., 2017). Glioblastoma sekunder lebih jarang terjadi, hanya kurang dari 10% dari seluruh glioma dan khususnya menyerang pasien dengan usia yang lebih muda.(Hanif et al., 2017; Heberland, 2007)

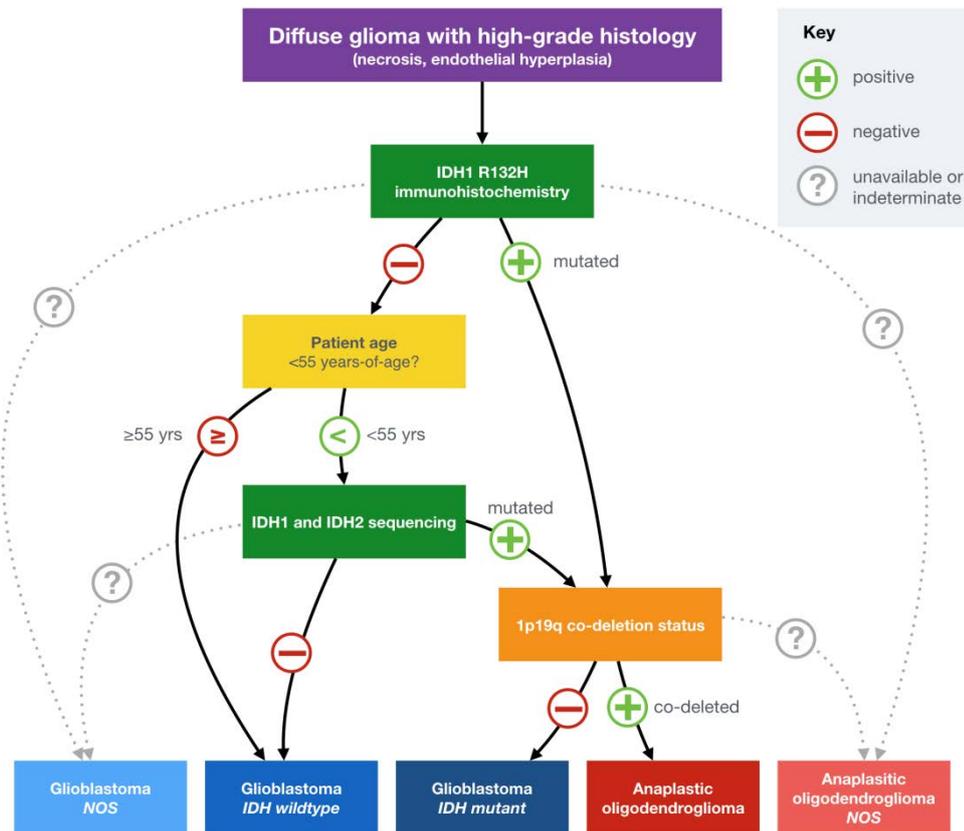
Perubahan genotip yang beragam tersebut adalah yang paling mempengaruhi dua *hallmark* kanker, yaitu sinyal proliferasi dan penghindaran dari gen penekan pertumbuhan. Tirosin kinase merangsang RAS dan PI3K / AKT signaling, yang bekerja bersama untuk mendorong sel dari fase G1 ke fase S pada siklus sel dan untuk menyebabkan deregulasi metabolisme selular untuk mendorong pertumbuhan. Peristiwa lainnya secara langsung atau tidak langsung menghambat fungsi RB dan p53. Berdasarkan seluruh urutan genom, diperkirakan mutasi tersebut yang mengaktifkan RAS dan PI3 kinase dan menonaktifkan p53 dan BPR pada 80% hingga 90% glioblastoma primer. (Frosch & Anthony, 2015)

Di era baru ini, Klasifikasi WHO 2016 telah memasukkan informasi molekuler ke dalam diagnosis. Diagnosis tumor sistem saraf pusat (SSP) dibuat dengan mengidentifikasi dan mengkarakterisasi penampilan fisik dan tingkat pertumbuhan serta fitur genetik. Gen IDH1 mengkodekan enzim metabolisme yang disebut *isocitrate dehydrogenase 1*, yang mengkatalisis konversi dari *isocitrate* ke *alpha-ketoglutarate* (α -KG) sebagai bagian dari fungsi normal metabolisme otak. Mutasi pada gen ini ditemukan dalam persentase kecil pada sampel glioblastoma tahun 2008, dan mayoritas ditemukan pada glioma *low grade* dan glioma sekunder yang *high grade*. (Sarkar & Chiocca, 2012)



Gambar 2.5. Pathways Glioblastoma Primer dan Sekunder. (Kalkan, 2015)

Astrocytoma anaplastik WHO grade III kini dibagi menjadi *IDH-mutant* dan *IDH-wildtype*. Grade 3 glioma tanpa IDH mutan dapat dianggap "preglioblastomas", memiliki prognosis yang lebih buruk daripada IDH tumor mutan. Mutasi IDH1 dapat berfungsi sebagai biomarker prediksi untuk melihat agresifitas tumor. Pasien dengan astrocytoma *IDH1-mutant* ditemukan memiliki prognosis yang lebih baik daripada astrocytoma dengan *IDH1-wildtype*. (Sarkar & Chiocca, 2012)

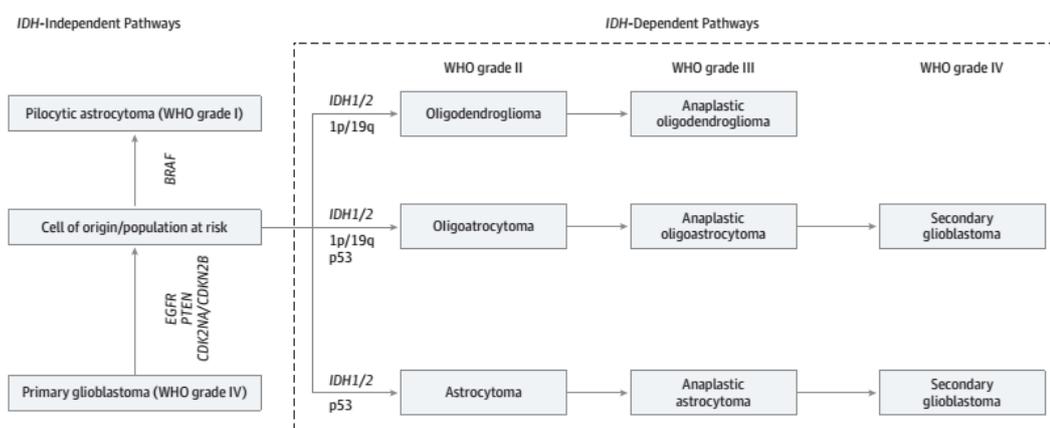


Gambar 2.6 Klasifikasi Tumor Astrositik Derajat Tinggi berdasarkan WHO 2016.(D. Louis, 2016)

II.2.2.2 Mutasi gen IDH1 pada Glioma

Di tahun 2008, sebuah grup penelitian kolaboratif melakukan analisis terhadap lebih dari 20.000 gen pada 22 kasus glioblastoma, suatu astrocitoma maligna (derajat 4) yang sering ditemukan dari seluruh glioma. Hasil penelitian tersebut mengidentifikasi mutasi titik (*point mutation*) pada gen IDH1 pada 12% sampel yang dianalisis. (Adam Cohen, 2013) Ditemukannya mutasi ini memungkinkan diagnosis serta informasi prognosis yang lebih akurat. Mutasi gen IDH1_R132 dilaporkan 55-80% terjadi pada oligodendroglioma dan astrocitoma derajat 2 dan 3. Lebih dari 90% mutasi IDH1 ditemukan di glioblastoma sekunder. Mutasi

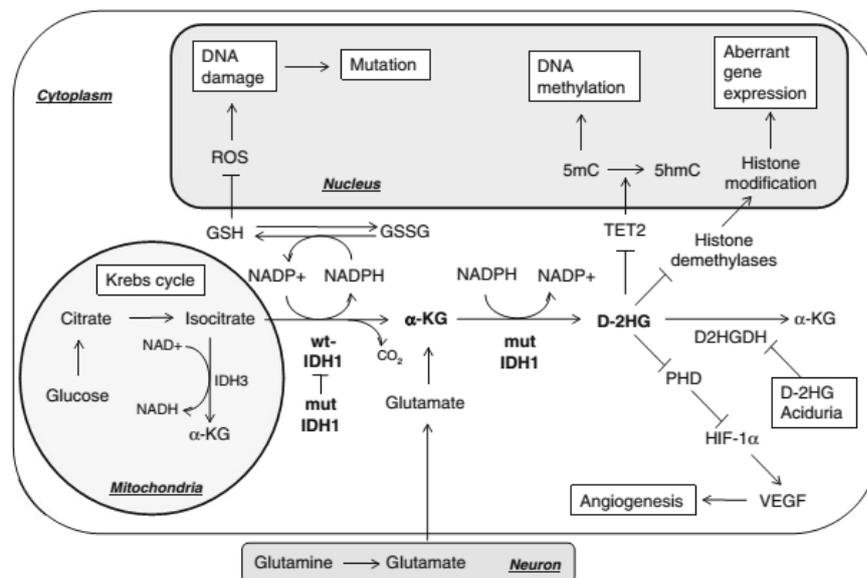
ini jarang ditemukan pada glioblastoma primer maupun glioma derajat rendah (WHO derajat 1) dan berkaitan dengan prognosis yang baik. Mutasi gen IDH2 lebih jarang ditemukan, dengan jenis tumor yang paling sering adalah oligodendroglial. (Van Den Bent et al., 2010)



Gambar 2.7. Klasifikasi Glioma WHO 2016 dan mutasi IDH dalam Gliomagenesis. (Turkalp et al., 2014)

Gen IDH berperan dalam mengode 3 jenis enzim IDH, yaitu IDH 1, 2, dan 3. IDH1 terletak di sitoplasma dan peroksisom, berperan dalam metabolisme lipid dan *glucose sensing*. IDH2 dan IDH3 terletak di mitokondria dan terlibat dalam siklus Krebs. Semua mutasi IDH1 yang dilaporkan berada pada kodon 132, yang paling sering adalah mutasi R132H dan mutasi yang jarang adalah R132C, R132G, R132S dan R132L. Enzim ini berperan dalam mengubah isositrat menjadi alfa-Ketoglutarat (α -KG) dan NADPH yang dalam kondisi normal berfungsi sebagai pertahanan sel terhadap stres oksidatif. Mutasi IDH menimbulkan adanya fungsi gen baru yaitu menurunkan produksi α -KG dan

meningkatkan produksi D-2-Hidroksiglutarat (D-2HG). D-2HG memiliki struktur yang mirip dengan α -KG dan secara kompetitif menghambat aktivitas berbagai macam enzim dioksigenase. Hal inilah yang kemudian berkontribusi terhadap patogenesis glioma. D-2-hidroksiglutarat juga diketahui menginduksi ekspresi VEGF yang akan mempromosikan angiogenesis untuk meningkatkan pertumbuhan tumor. (Ichimura, 2012; Kloosterhof et al., 2011)



Gambar 2.8. Pathway IDH dalam Fisiologi dan Penyakit. (Ichimura, 2012)

HIF-1 α adalah faktor transkripsi yang sangat penting sebagai respon seluler terhadap hipoksia, transaktivasi beberapa gen *downstream* yang memodulasi apoptosis, kelangsungan hidup sel, dan angiogenesis, terutama VEGF. Upregulasi HIF-1 α berkaitan dengan karsinogenesis, melalui angiogenesis yang dimediasi oleh VEGF. Aktivitas HIF-1 α diatur oleh Prolyl Hydroxylase (PHD), yang mempromosikan degradasi PHD.

PHD adalah salah satu dioksigenase independen α -KG. Induksi mutan IDH1 meningkatkan regulasi gen HIF-1 α pada sel glioma. (Ichimura, 2012)

Mutasi IDH1 tidak menginduksi glioma, tetapi mekanisme perlindungan selanjutnya yang mengganggu metabolisme sel tumor, membuat sel-sel tumor rapuh dan rentan terhadap kematian sel. Proses ini akhirnya membantu pasien yang mengalami mutasi IDH untuk bertahan hidup. (Zhu et al., 2011) Diperkirakan peningkatan *survival rate* pada pasien glioma derajat rendah dengan mutasi IDH merupakan indikasi dari pengaruh mutasi IDH pada respons terhadap kemoterapi, bukan akibat perilaku biologis yang berbeda. (Turkalp et al., 2014) Mutasi IDH1/2 akan menurunkan NADPH dan α -KG, yang pada kondisi normal akan mencegah sel mengalami stres oksidatif, sehingga meningkatkan sensitivitas terhadap radioterapi. (Kloosterhof et al., 2011) Hal ini didukung oleh Zhu dkk yang melaporkan bahwa mutasi IDH memberikan mekanisme protektif pada pasien glioma dengan mengganggu metabolisme sel tumor dan membuatnya rentan terhadap kematian sel. (Zhu et al., 2011)

II.3 Stem cells normal

Stem cells adalah sel biologis yang ditemukan pada organisme multiseluler, dapat membelah dan berdiferensiasi menjadi berbagai macam bentuk sel spesifik, juga dapat memperbaharui diri membentuk *stem cells* baru. Pada organisme dewasa, *stem cells* menggantikan sel yang rusak dan mempertahankan populasi jaringan

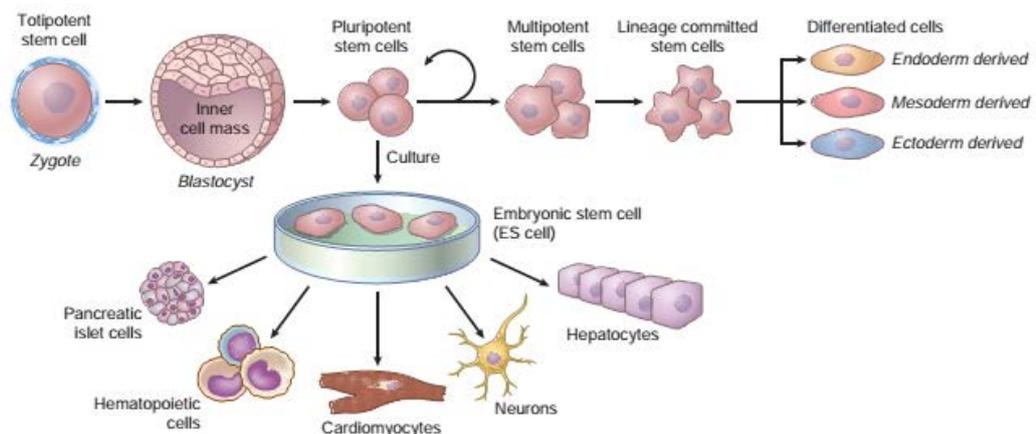
sebagai sel individu diantara sel yang mengalami replikasi penuaan karena pemendekan/ pengurangan telomer.(Adam & Gondhowiardjo, 2014; Mitchell, 2015)

Ada keseimbangan homeostatik di antara replikasi, *self-renewal*, diferensiasi *stem cells*, kematian sel dewasa dan sel yang berdiferensiasi penuh. *Stem cells* memiliki 2 karakter yang penting yaitu: (Mitchell, 2015)

1. *Self-renewal*, adalah kemampuan *stem cell* untuk membentuk *stem cell* lain yang memungkinkan sel induk untuk mempertahankan jumlah sel nya.
2. *Asymmetric division*, di mana satu sel anak masuk ke jalur diferensiasi dan menjadi sel dewasa, sementara yang lain tetap mempertahankan kapasitas *self-renewal* dan tidak berdiferensiasi.

Terdapat dua jenis *stem cells* yang normal yaitu: 1) *Embryogenic stem cells* (ES), adalah yang paling tidak berdiferensiasi, terletak di dalam blastokis, memiliki kapasitas *renewal* yang hampir tak terbatas, dan dapat membentuk setiap jenis sel dalam tubuh (totipoten). Sel ES bisa dipertahankan untuk waktu yang lama tanpa mengalami differensiasi, dapat diinduksi di dalam kultur yang tepat untuk membentuk sel-sel khusus dari ketiga lapisan *germ cells*, termasuk neuron, otot jantung, sel hati, dan sel pulau pankreas. 2) *Tissue stem cells (adult stem cells)*, ditemukan pada sel-sel berdiferensiasi, biasanya dilindungi di dalam *microenvironments* khusus yang disebut *stem cell niches*. Lingkungan

niches ini telah dibuktikan pada banyak organ, termasuk otak, dimana *stem cells* saraf mendiami zona subventrikular dan girus dentate. *Adult stem cells* memiliki kemampuan yang terbatas untuk menghasilkan sel berdiferensiasi dan hanya dapat menghasilkan sel-sel yang normal sesuai dengan *stem cells* jaringan yang diberikan. (Mitchell, 2015)



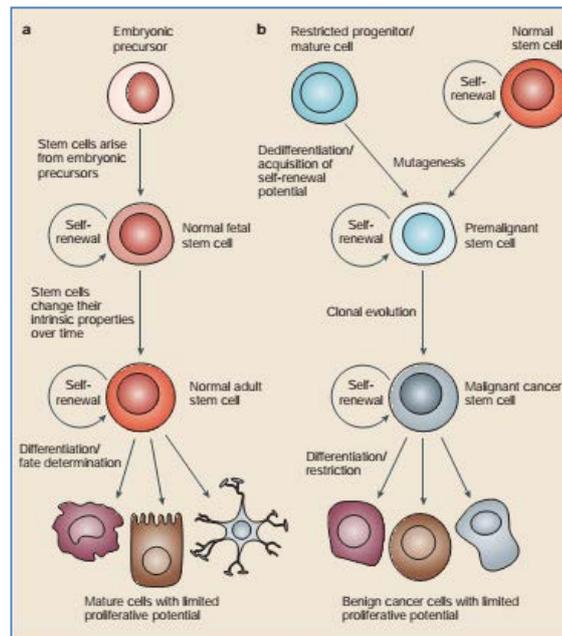
Gambar 2.9. Sel-sel pluripoten dari *embryonic stem cells* (ES), dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel multipel yang berbeda garis keturunan. Dalam embrio, *stem cells* berpotensi majemuk, dapat secara asimetris membelah untuk menghasilkan kumpulan sisa sel ES yang stabil disamping menghasilkan populasi sel yang memiliki kapasitas perkembangan yang semakin terbatas.

II.4 Cancer Stem Cells pada Glioma

Cancer stem cells adalah suatu sel kanker yang memiliki sifat dan potensi yang sama seperti *stem cell* normal, namun mengalami mutasi dan menghasilkan sel-sel kanker yang terdiferensiasi membentuk kanker di berbagai jaringan tubuh. *Stem cell* normal berdiferensiasi membentuk sel normal sedangkan *stem cell* kanker berdiferensiasi menjadi *stem cell* abnormal. Dengan kata lain *stem cell* kanker adalah sel kanker yang mempunyai kemampuan seperti *stem cell*. (Adam & Gondhowiardjo, 2014)

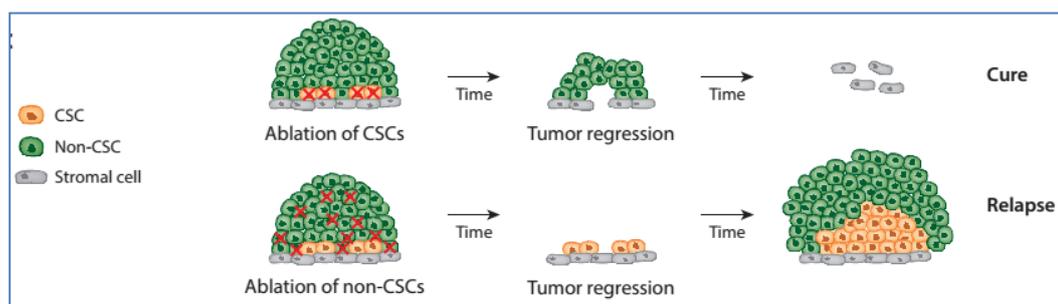
Beberapa tahun yang lalu telah ditemukan bahwa hanya sebagian kecil dari sekelompok sel kanker yang tumbuh secara ekstensif di dalam pengamatan *in vitro* atau *in vivo*, hal ini menjelaskan bahwa didalam sekelompok sel kanker tidak semua sel dapat tumbuh secara ekstensif. Hal ini membuktikan bahwa di dalam jaringan kanker terdapat beberapa sel yang belum terdiferensiasi secara matang dan memiliki kemampuan proliferasi yang tinggi (*cancer stem cell*). (Tannishtha Reya, 2001)

Pada tumor otak telah berhasil ditemukan adanya sekelompok sel yang proliferaatif, heterogen dan dapat melakukan *self renewal*. Kemampuan untuk *self renewal* pada tumor otak sesuai dengan agresifitas tumor, misalnya secara klinis medulloblastoma lebih agresif dibandingkan dengan *low grade* glioma, maka medulloblastoma memiliki kemampuan *self renewal* dan proliferasi yang lebih tinggi. CSCs dari tumor otak ini mengekspresikan marker CD133. Sel-sel yang memiliki marker CD133+ tersebut jika diisolasi dan dilakukan kultur ditempat lain dapat tumbuh menjadi tumor layaknya tumor otak pada tubuh manusia, menunjukkan adanya kriteria dasar sifat *stem cell*. (Singh, Clarke, et al., 2003) Pada glioma yang maligna, progenitor selular dari Glioma *Stem Cell* (GSC) adalah (1) matur sel glia yang berdiferensiasi, (2) progenitor neural yang sifatnya terbatas dan unipoten, dan (3) progenitor neural yang multipoten. (Stiles & Rowitch, 2008)



Gambar 2.10. Skematik yang menggambarkan hirarki paralel antara stem cell normal dengan stem cell kanker; dari sel yang memiliki potensi tinggi hingga yang memiliki potensi terbatas.(Pardal et al., 2003; Sakariassen et al., 2007)

Selain karena faktor onkogenik, hipotesis lain menyatakan bahwa proses *self-renewal* pada *stem cell* normal turut mempengaruhi terbentuknya mutasi CSCs menjadi berbagai jenis kanker. Hal ini menunjukkan bahwa kanker dapat dianggap suatu proses *self-renewal* yang tidak semestinya, sehingga menyebabkan proliferasi *stem cell* normal menjadi neoplasma.(Pardal et al., 2003; Tannishtha Reya, 2001)



Gambar 2.11. Dampak model CSC pada desain dan evaluasi perawatan antitumor. (Nassar & Blanpain, 2016)

Setelah DNA mengalami kerusakan, pada *stem cell* normal akan terjadi fase tenang (*quiescent state*) dan sel akan menghentikan proliferasinya. Tetapi pada glioma *stem cell* (GSC), selnya akan mengekspresikan berbagai protein yang meningkatkan kelangsungan hidup sel, termasuk protein yang menyebabkan resistensi obat seperti MGMT (O-6- methylguanineDNA methyltransferase), gen antiapoptotik yaitu FLIP (FLICE-like inhibitory protein), BCL-2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2), BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large), and cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein-1). Masalah utama dari keganasan ini adalah sifatnya yang infiltratif dan resisten terhadap terapi konvensional. Salah satu sifat dari HGG adalah angiogenesis tumor yang sangat aktif. GSC dapat membuat lingkungan perivaskulernya sendiri melalui sekresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Karakteristik yang lain adalah adanya kondisi hipoksia dari area nekrosis pseudopalisading dengan kadar O₂ yang rendah akan mendukung pemeliharaan sel yang tidak berdiferensiasi. Pada daerah yang nekrosis dan hipoksia ini akan menunjukkan populasi GCS dan marker CD133 yang tinggi. Sel yang normal menggunakan karbon glukosa untuk sintesis palmitat di bawah kondisi O₂ yang normal. Asam lemak yang diproduksi di bawah keadaan yang hipoksia adalah terutama disintesis dari karbon glutamin melalui jalur reduktif, dan pada *knockdown* protein IDH1 akan mengurangi penggunaan metabolisme glutamin reduktif untuk lipogenesis di bawah keadaan

hipoksia sehingga sel bertahan hidup dan berkembang biak walaupun pada kondisi hipoksia.(Kalkan, 2015)

II.4.1 Mekanisme proliferasi seluler *glioma stem cell*

Bmi-1 adalah protein onkogen jenis polycomb yang meregulasi p16 dan p19 yang merupakan gen inhibitor siklus sel. Protein Bmi-1 dibutuhkan oleh DNA untuk reparasi. Kehilangan protein ini akan menyebabkan hilangnya kemampuan untuk perbaikan DNA. Bmi-1 digunakan oleh *stem cell* sebagai bagian dari proses *self renewal* pada sistem saraf pusat maupun perifer namun tidak untuk survival ataupun proses diferensiasi. Selain itu diketahui pula bahwa Bmi-1 menghambat penuaan sel saraf dengan menekan kerja p53. Bmi-1 digunakan untuk proliferasi *stem cell* namun kehilangan Bmi-1 tidak menyebabkan kematian sel. (Lessard & Sauvageau, 2003)

Notch adalah protein membran seluler yang menerima sinyal dari ekstra sel untuk mengirim pesan ke nukleus yang akan memodifikasi ekspresi gen. Cara kerja Notch tidak seperti resptor membran pada umumnya, Notch berkomunikasi dengan sel lain melalui kontak langsung dengan membran sel. Notch berperan dalam regulasi gen yang mengatur proses diferensiasi banyak sel, baik saat embrional maupun saat dewasa. Pada CSCs Notch berperan dalam proses *self renewal* dan diferensiasi sel-sel progenitor. Notch1 dan Notch4 bekerja mengatur pertumbuhan *stem cell* kelenjar payudara normal, namun Notch yang bermutasi dapat ditemukan pada tumor payudara (pada

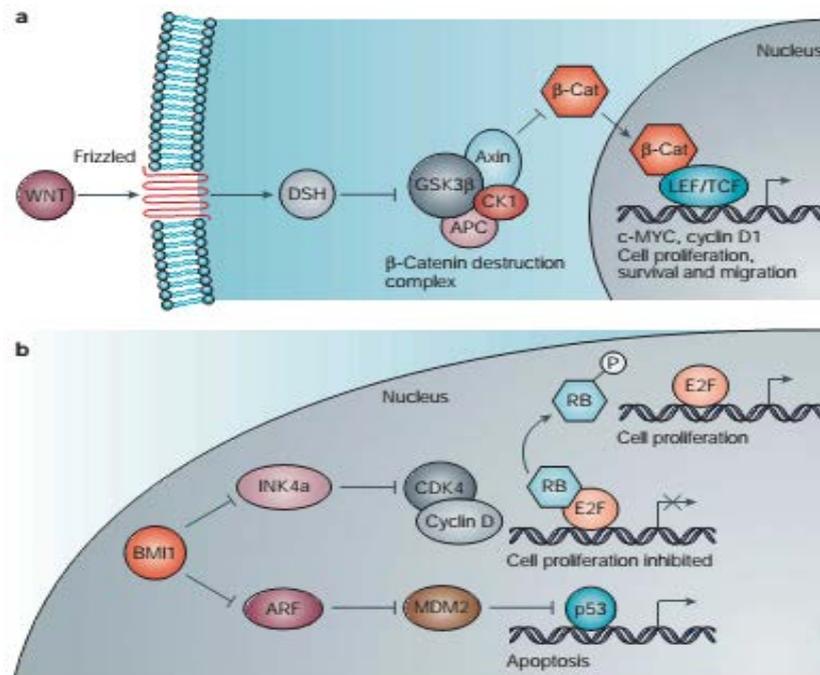
mencit percobaan). Pada percobaan mencit yang dilakukan oleh Gabriela, dkk ditemukan bahwa bila reseptor Notch ini diblok maka tidak akan terjadi *self renewal*, proliferasi maupun diferensiasi sel kelenjar payudara. Dengan ini Notch dinyatakan sebagai onkogen pertumbuhan tumor payudara.(Dontu et al., 2004)

Sonic Hedgehog (SHh) merupakan salah satu protein sinyal dari golongan *pathway* Hedgehog. Golongan Sonic ini merupakan yang paling banyak dipahami dari golongan Hedgehog lainnya. SHh berfungsi mengatur organogenesis pada embrio dan organisasi sel pada *stem cell* dewasa. SHh berperan dalam membentuk banyak sistem organ antara lain: ekstremitas, otak, *spinal cord*, dan gigi. Selain itu, jalur Hedgehog (Hh) adalah salah satu mekanisme pensinyalan yang mengatur diferensiasi seluler dan aktivitasnya terlibat dalam pertumbuhan keganasan. (Valadez, 2014) Mutasi atau defek pada kerja pathway Hedgehog dapat menyebabkan gagalnya pembentukan suatu organ. Kerjasama SHh bersama dengan Wnt juga dibuktikan sebagai regulator *self renewal* dan pertumbuhan kanker pada *stem cell*. Kadar SHh dan Wnt meningkat pada pertumbuhan tumor, dan kedua protein ini dibutuhkan oleh tumor untuk mempertahankan diri. (Beachy et al., 2004) Fungsi inhibitor Hedgehog ini ternyata juga berpotensi menjadi pencegah proses metastasis.(Zhou & Hung, 2005)

Mekanisme utama dimana jalur Hh diaktifkan pada kanker dapat dikaitkan dengan mutasi konstituen jalur Hh (Tipe I: *ligan independent*),

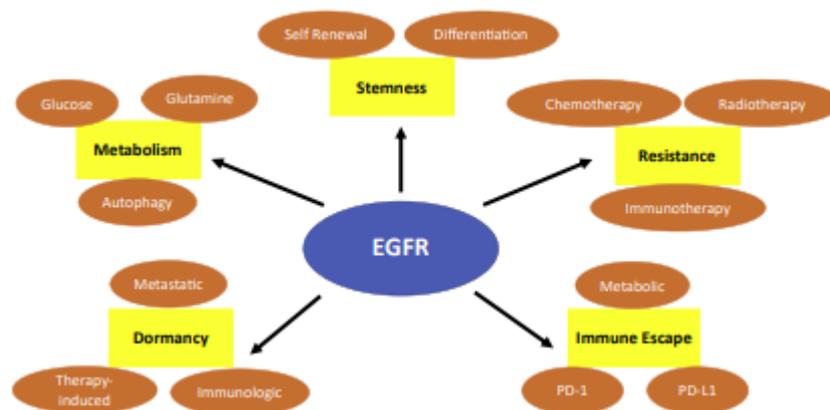
ekspresi berlebihan dari ligan jalur Hh (Tipe II-IIIb: *ligan dependent*) dan generasi fenotip CSCs (Tipe IV). CSC merespon ligan Hh, yang disekresikan oleh sel stroma yang berdekatan, sel tumor atau CSC sendiri, untuk mempertahankan sifat *stemness* dengan regulasi gen pluripoten, termasuk Nanog, Sox2 dan Bmi1. Pensinyalan Hh diyakini mendorong fenotip CSC melalui regulasi gen penentu *stemness*. (Cochrane et al., 2015)

Wnt signaling pathway diketahui berperan pada embriogenesis, diferensiasi sel, pertumbuhan kanker, dan bekerja juga pada fisiologi normal hewan maupun manusia. Protein Wnt melekat di reseptor transmembran dimana kompleks protein tersebut akan mengirimkan sinyal berupa β -Catenin ke dalam nukleus, yang kemudian akan berikatan dengan faktor transkripsi TCF dan menghasilkan ekspresi gen yang spesifik. Proses kontrol aktivitas β -Catenin di dalam sitoplasma diatur oleh Axin dan APC, mereka akan membentuk suatu "*destruction complex*" yang dapat menghancurkan β -Catenin sehingga tidak mencapai nukleus. Bila terjadi mutasi atau kelainan pada APC maupun β -Catenin maka dapat terjadi *self renewal* dan proliferasi yang ekstensif, membuat pertumbuhan suatu jaringan menjadi tidak normal dan terjadilah tumor. Wnt juga merupakan sistem yang menjaga *stem cell* agar tetap pada kondisi *self renewing* dan tidak terdiferensiasi. (Nusse, 2008)



Gambar 2.12. Kontrol *self renewal stem cell* oleh pathway WNT dan BMI 1. (Pardal et al., 2003)

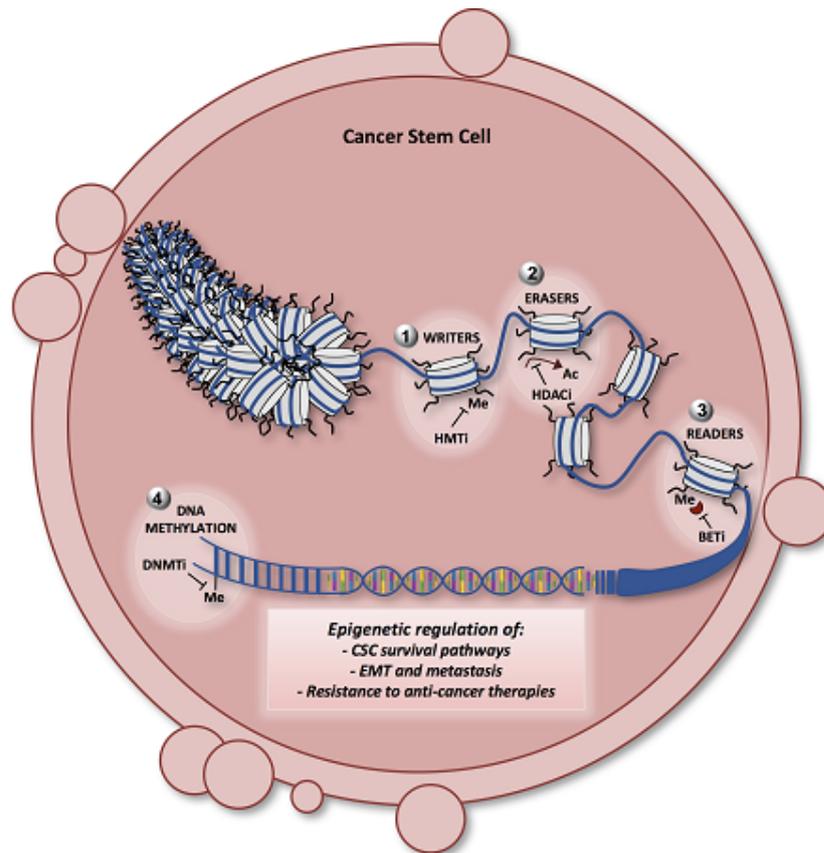
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) juga diketahui bertanggung jawab dalam pemeliharaan dan fungsi dari CSC termasuk sifat *stemness*, metabolisme, aktivitas imunomodulatori, dormansi dan resistensi tumor terhadap terapi. EGFR_{vIII} dilaporkan dapat meregulasi CSC pada glioma melalui jalur MEK/ERK. Dormansi adalah suatu kondisi dimana CSC tetap hidup namun berhenti berproliferasi. EGFR dapat meregulasi CSC yang dormansi secara *in vivo* dan dapat mengubah secara cepat pertumbuhan glioblastoma ke dalam kondisi *dormant-like state*. (Talukdar et al., 2020)



Gambar 2.13. Skema yang menunjukkan peran EGFR dalam regulasi *self-renewal*, metabolisme, dormansi, immune escape dan resistensi terapi pada CSC.(Talukdar et al., 2020)

Pemrograman ulang epigenetik yang dinamis dari subpopulasi CSC menambah heterogenitas inter-tumor dan intra-tumor serta menunjukkan kompleksitas tumor sehingga merupakan rintangan bagi kesuksesan terapi. Salah satu faktor yang berpengaruh adalah adanya faktor epigenetik. Perubahan epigenetik, termasuk DNMT (DNA methyltransferase) dan modifikasi histone adalah manifestasi kunci dari differensiasi *stem cell* menjadi berbagai subtype jaringan. Mekanisme epigenetik yang memainkan peran penting dalam mendukung karakteristik CSC ini antara lain: (1) penanda CSC diatur secara langsung oleh modifikasi epigenetik (mis., CD133), (2) CSC menunjukkan mutasi pada komponen remodeler kromatin (kehilangan fungsi mutasi kompleks PRC2 dan deregulasi EZH2), (3) EMT, yang memberikan sel kemampuan *tumor-initiating* dan properti CSC.(Turdo et al., 2019)

Silencing gen MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) yang dimediasi secara epigenetik pada HGG telah ditunjukkan adanya korelasi dengan peningkatan kelangsungan hidup. MGMT adalah enzim perbaikan DNA yang berkontribusi untuk resistansi HGG. Gen MGMT mengode enzim O-6-methylguanine DNA methyltransferase, sebuah enzim untuk perbaikan DNA dengan menghilangkan gugus alkil dari posisi O-6- guanin, yang penting untuk alkilasi DNA. Penelitian yang dilakukan oleh Later, Beier *et al* menggambarkan tentang TMZ (Temozolamide) yang secara selektif dapat menghilangkan sel-sel klonogenik dan tumorigenik namun hampir tidak mempengaruhi keseluruhan viabilitas, dan penulis menyimpulkan bahwa sel dengan properti seperti *stem cell* secara selektif dihilangkan, terlepas dari status CD133 atau MGMT. Liu, *et al* menunjukkan bahwa sel dengan CD133 + mempunyai viabilitas yang secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan sel tumor CD133 – saat diobati dengan TMZ, dan sel dengan MGMT termetilasi menunjukkan CD133 yang mengandung sifat seperti *stem cell*. Pistollato *et al*, menunjukkan peningkatan resistensi CSC CD133 di daerah sentral dan hipoksik HGG, dibandingkan dengan sel yang berada di bagian tepi, karena peningkatan ekspresi MGMT. Bralten *et al*, menunjukkan bahwa tidak ada ekspresi CD133 terdeteksi dalam glioblastoma sekunder, yang diturunkan dari glioma derajat rendah dan menyimpulkan bahwa mutasi IDH1 sebagian besar ditemukan di glioblastoma sekunder. (Kalkan, 2015)



Gambar 2.14 Regulasi epigenetik dalam CSC.(Turdo et al., 2019)

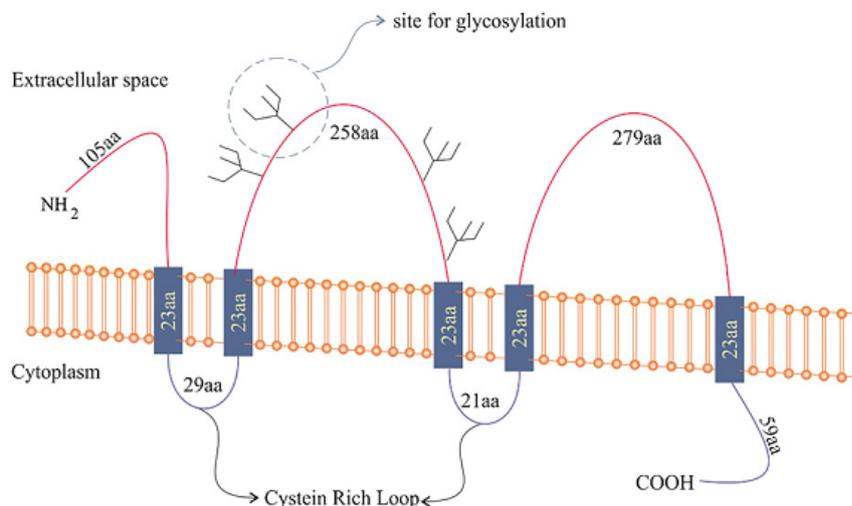
II.5 CD 133 Sebagai Penanda *Cancer Stem Cell*

II.5.1 Struktur CD133

Cancer stem cell (CSC) dianggap bagian dari tumor yang bertanggung jawab untuk memulai dan mempertahankan kanker. CSC secara alami resisten terhadap kemoterapi. Beberapa marker permukaan seluler telah digunakan untuk mengidentifikasi CSC, salah satu diantaranya adalah CD133. Kumpulan bukti penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa CD133 bertanggung jawab terhadap tumorigenesis, metastasis, dan kemoresisten CSC. (Barzegar Behrooz et al., 2019) Pada

tahun 2004, untuk pertama kalinya, Singh dkk, menunjukkan keberadaan CSC pada tumor otak melalui penggunaan CD133 sebagai penanda permukaan sel untuk tumor otak manusia yang diisolasi dari jaringan otak *in vitro*.(Singh, Hawkins, et al., 2003)

CD133 (Prominin-1) adalah pentaspan transmembran glikoprotein yang digunakan untuk identifikasi sel-sel pemicu tumor pada beberapa tumor yang solid , ditemukan sebagai marker CSC pada berbagai jenis tumor otak termasuk glioblastoma, medulloblastoma pada pediatrik, dan ependymoma.(Hermann et al., 2010) CD133 mengandung lima domain transmembran dengan dua loop besar ekstraseluler glikosilasi dan dua loop intraseluler yang lebih kecil yang masing-masing terdiri dari 250 dan 20 residu asam amino. Pada manusia, gen yang mengkode CD133 terletak pada kromosom 4 dan mengandung setidaknya 37 ekson. Pada tahun 2000, sebuah studi yang meneliti keberadaan CD133 pada mikrovili mengungkapkan bahwa CD133 terletak di mikrodomin yang terdapat pada apikal membran plasma.(Corbeil et al., 2001)



Gambar 2.15. Topologi CD133/Prominin-1, adalah pentaspan glikoprotein (lipid mikrodoman) pengikat kolesterol membran plasma, secara khusus terletak pada tonjolan membran plasma dan terakumulasi dalam mikrodoman membran lipid. (Barzegar Behrooz et al., 2019)

II.5.2 Peran CD133 pada differensiasi sel neuroepithelial

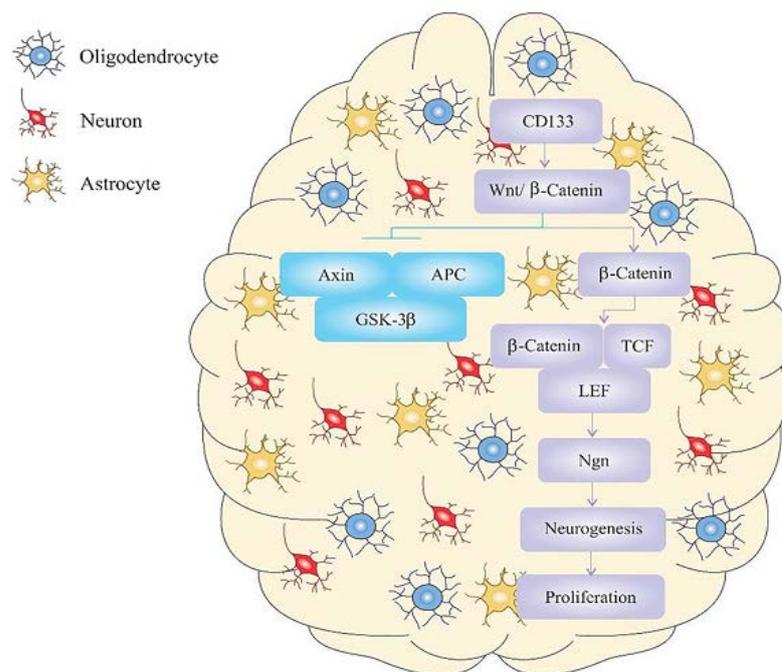
Perkembangan sistem saraf pusat mamalia (CNS), neuron, astrosit dan oligodendrosit muncul dari kumpulan sel neuroepithelial (NE), yang merupakan sel progenitor saraf. Meskipun sel-sel NE ditemukan pada lamina membran basal, sel-sel NE lainnya mengalami mitosis pada membran apikal (ventrikel). Pada tahap awal pertumbuhan sebelum neurogenesis, sel NE terutama ditemukan di *neural plate* dan *neural tubes*, dan berkembang biak untuk menghasilkan lebih banyak sel NE. Pada tahap ini, pembelahan sel sepenuhnya simetris, artinya satu sel induk NE akan menjadi dua sel anak NE yang sama. Namun, saat neurogenesis dimulai, pembelahan sel beralih ke pembelahan sel yang berdifferensiasi, yang dianggap asimetris. Perubahan pada jenis pembelahan sel disertai oleh dua peristiwa (1) perubahan dalam distribusi komponen membran, seperti protein dan kompleks fungsional, dan (2)

pelepasan partikel membran yang mengandung CD133.(Barzegar Behrooz et al., 2019)

Selama transisi dari *neural plate* ke *neural tubes*, peristiwa yang terjadi adalah (1) hilangnya fungsi dari *tight junction* dan downregulasi dari ekspresi occludin, (2) secara paralel, terjadi upregulasi ekspresi dari ZO-1 dan N-cadherin, (3) pengurangan panjang silia primer dan pemanjangan microvilli yang terletak di apikal, (4) downregulasi signal Wnt dan SHH, (5) pengurangan ukuran dari apikal membran neuroepithelial, (6) ekspresi CD133 dipertahankan dalam membran mikrovillar (retensi ini disebabkan oleh kehadiran microdomain baru dari membran yang mengandung kolesterol dimana CD133 berinteraksi langsung dengan kolesterol membran plasma tersebut), (7) pelepasan partikel membran yang mengandung CD133 (fungsinya membantu diferensiasi sel dengan mengurangi atau memodifikasi proses tersebut dari stem sel). Selanjutnya, sel progenitor dengan karakteristik mikrodomain berada dekat dengan apikal membran plasma.(Corbeil et al., 2001)

Sel-sel primer (neuron, oligodendrosit, astrosit) yang membentuk otak berasal dari *neural stem cells* (NSCs). Sel-sel ini terdapat pada kedua sel embrionik maupun sel dewasa dan kemudian bertransformasi dari sel NE menjadi sel glial dan sel astrosit.(Merkle & Alvarez-buylla, 2006) NSCs membentuk berbagai jenis sel di bawah pensinyalan yang berbeda jalur. Salah satu jalur pensinyalan paling substansial di perkembangan SSP adalah Wnt / β -catenin. Diferensiasi dan proliferasi

sel-sel otak dipengaruhi oleh interaksi antara protein jalur Wnt dengan komponen terkait lainnya misalnya adenomateous polyposis coli (APC), glikogen sintase kinase-3 β (GSK-3 β), axin dan conductin dalam jalur pensinyalan ini. Aktivasi jalur pensinyalan Wnt menyebabkan penghambatan pada GSK-3 β *pathway*. Dengan menghambat jalur ini, jumlah β -catenin dalam sitoplasma akan meningkat. Molekul β -catenin kemudian memasuki nukleus dan membentuk kompleks dengan faktor sel-T (TCF) dan *lymphocyte enhance factors* (LEFs). Kompleks β -catenin-TCF-LEF meningkatkan ekspresi protein dasar helix-loop-helix (bHLH), neurogenin 1 (Ngn1) dan Ngn 2, dengan mengaktifkan promotor Ngn 1 dan Ngn 2, dan pada akhirnya meningkatkan neurogenesis. Ketika jalur pensinyalan Wnt tidak aktif, β -catenin difosforilasi oleh kompleks aktin-APC-GSK3 β -konduktor dan terdegradasi oleh sistem ubiquitin-proteasome. Oleh karena itu CD133 dapat mengaktifkan jalur pensinyalan Wnt untuk mendorong pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel saraf. (Barzegar Behrooz et al., 2019)



Gambar 2.16. Keterlibatan jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin dalam neurogenesis. (Barzegar Behrooz et al., 2019)

II.5.3 Peran CD133 pada sel normal dan pada sel kanker glioma

Fungsi fisiologis dari CD133 sebenarnya masih belum jelas, tetapi kehadiran fungsinya pada berbagai organ menunjukkan peran penting dari CD133 ini. Tonjolan membran plasma yang mengandung mikrodomin membran kaya kolesterol, dan tonjolan ini dikaitkan dengan kehadiran prominosom. Prominosom adalah vesikel ekstraseluler yang melekat pada membran plasma yang mengandung protein prominin dan sering dianggap sebagai *organisers* membran plasma. (Iebzehrubl et al., 2008) Salah satu kegunaan yang paling umum untuk CD133 adalah dalam identifikasi dan isolasi sel induk dari jaringan tubuh, tidak hanya pada sel normal seperti otak, hepar, pankreas, paru-paru, kulit, prostat, colon, ovarium dan sarcoma. Dengan kata lain, CD133 adalah biomarker yang

dapat digunakan untuk mengidentifikasi *stem cell* pada jaringan normal dan kanker.(Barzegar Behrooz et al., 2019)

Kehadiran CD133 tidak hanya terbatas pada progenitor NE, tetapi juga ditemukan pada tipe sel epitel dan non-epitel. Selama tahap pertumbuhan dari tahap embrio hingga maturitas, protein ini diekspresikan di berbagai bagian tubuh, misalnya pada tahap embriogenik, CD133 terekspresi dalam sel trophoblasts dan juga ditemukan pada epitel dari ketiga lapisan germinal. Pada orang dewasa, CD133 dapat ditemukan di ginjal, testis, epididimis, duktus deferens, duktus seminalis dan pada prostat. Pada testis, CD133 berperan dalam pembentukan sterosilia epididimis dan ekor dari spermatozoa dan juga pada biogenesis spermatozoa. Pada sel-sel epitel, CD133 dapat terekspresi hanya pada bagian apikal dari domain membran. CD133 juga ditemukan pada sel-sel non-epitelial seperti sel photoreseptor dan sel *bone marrow*.(Barzegar Behrooz et al., 2019; Iebzehrubl et al., 2008)

Grosse-Gehling dkk, telah menunjukkan bahwa CD133 dapat mengatur ekspresi protein *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), sehingga mengindikasikan peran CD133 dalam neovaskularisasi dan angiogenesis. Secara mekanik, CD133 mengaktifkan jalur pensinyalan Wnt, yang menyebabkan peningkatan ekspresi VEGF-A dan interleukin-8 (IL-8). Sebagai respon terhadap peningkatan kedua faktor tersebut (VEGF-A dan IL-8), maka akan meningkatkan proses angiogenesis. CD133 mengaktifkan jalur pensinyalan Wnt / β -catenin dan setelah

aktivasi jalur ini, kemudian sel-sel tumor bertumbuh sebagai akibat dari *stemness* CSC (Grosse-gehling et al., 2013)

Pembentukan pembuluh darah yang berlebihan dan tidak teratur adalah *hallmark* glioblastoma. Saat produksi nutrisi dan oksigen berkurang, sel kanker akan mulai mengkompensasi kekurangan ini dengan angiogenesis. Namun pembuluh darah yang terbentuk memiliki membran basal yang abnormal dan lebih permeabel. Karena pertumbuhan sel tumor sangat cepat, sel pericyte tidak sepenuhnya menutupi permukaan pembuluh darah, dan karena itu pembuluh darah menjadi bocor, dan kehilangan oksigen menyebabkan hipoksia jaringan. Hipoksia akan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang kemudian akan mengaktifkan *Nuclear Factor-kappa beta* (NF- κ B) dan akhirnya mengaktifkan *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT). Hipoksia juga menyebabkan peningkatan *Hypoxia-Inducible 1- α* (HIF-1 α) pada sel kanker dan selanjutnya dengan stimulasi glikolisis, meningkatkan efek Warburg. Fungsi HIF-1 α ini adalah untuk memfasilitasi pertumbuhan tumor pada kondisi yang hipoksia. (Tafari et al., 2016)

II.5.4 Hubungan IDH1 dengan Glioma Stem Cell

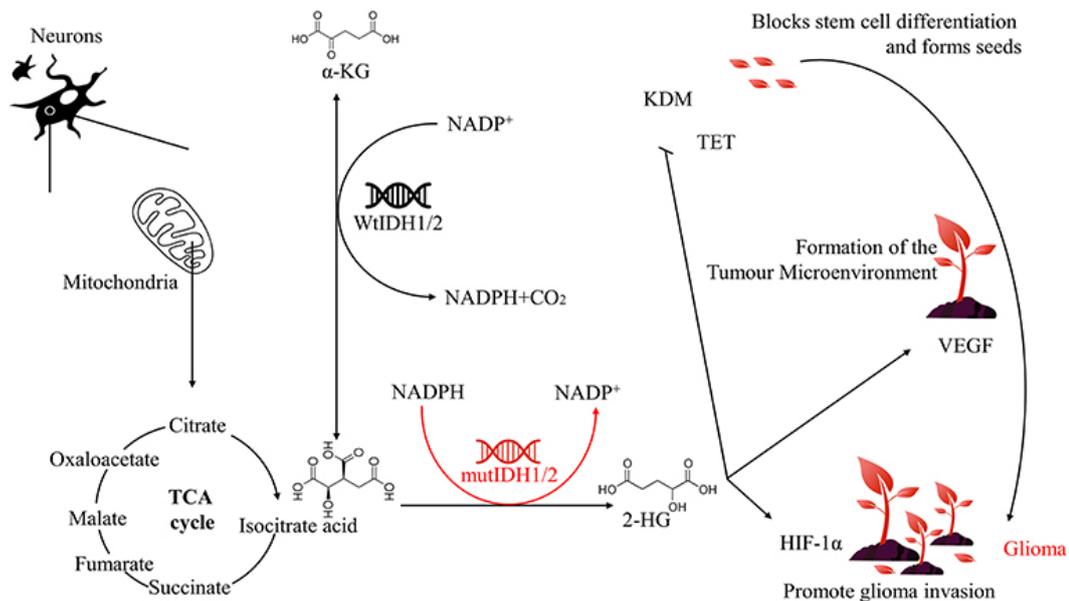
Hubungan antara mutasi IDH1 dan GSC belum sepenuhnya dipahami. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa mutasi IDH1 berfungsi menekan tumor dalam sel glioma dengan secara negatif mengatur pensinyalan Wnt / β -catenin. Salah satu keunggulan *stem cell* adalah kemampuan untuk mempertahankan telomer yang panjang

dengan fungsi gen TERT (Telomerase Reverse Transcriptase). Ekspresi TERT secara langsung ditingkatkan dengan mengikat β -catenin ke daerah promotornya dan dengan demikian menghubungkan aktivitas telomerase dengan pensinyalan Wnt.(Yao et al., 2018)

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Yao Qi, *et al* menunjukkan bahwa hasil positif GSC pada pasien dengan IDH1 secara signifikan kurang dari pasien dengan IDH1-wildtype. Hasil positif GSC berkorelasi dengan mutasi IDH1. Setelah transfeksi *in vitro*, ekspresi berlebih IDH1 menyebabkan berkurangnya proliferasi, migrasi dan invasi GSC, menginduksi apoptosis dan meningkatkan diferensiasi GSC, disertai dengan pengurangan yang signifikan dalam aktivitas β -catenin. Beberapa mediator, efektor dan target pensinyalan Wnt / β -catenin mengalami *downregulasi*. Data menunjukkan bahwa mutasi IDH1 mengurangi perkembangan glioma ganas dengan menyebabkan fenotip GSC yang kurang agresif yang terlibat dalam pensinyalan Wnt / β -catenin.(Yao et al., 2018)

Selain itu, IDH mengkatalisis produksi α -KG dari isocitrate, dan ketika IDH1/2 mengalami mutasi maka fungsi dan produknya akan berubah. Protein ini menghambat diferensiasi GCS dengan memproduksi 2-HG dalam jumlah yang besar. 2-HG yang bertindak sebagai onkometabolit ini akan merusak jalur kunci dari modifikasi histone dan demetilasi DNA sehingga terjadi hipermetilasi. Hipermetilasi ini menyebabkan perubahan ekspresi gen yang berhubungan dengan

differensiasi sel sehingga mutasi pada gen IDH1/2 akan memblokir differensiasi dari GCS. (Huang et al., 2019)



Gambar 2.17. Hubungan antara mutasi IDH1/2 dan Glioma. (Huang et al., 2019)

II.5.5 Hubungan CSCs terhadap resistensi pengobatan

Secara umum, apoptosis dan *autophagy* memiliki efek penghambatan timbal balik satu sama lain. Penelitian telah menunjukkan bahwa kemoterapi dan iradiasi sel-sel dengan CD133-positif dapat mempromosikan autofag pada CSCs dan mencegah apoptosis. Pada sel dengan CD133-positif, ekspresi *ATP-binding cassette transporter* (ABCG5) adalah tinggi. Selain itu, ekspresi FLIP, inhibitor caspase-8, lebih tinggi pada sel CD133-positif daripada sel dengan CD133-negatif. Akibatnya terjadi resistensi terhadap kemoterapi dan apoptosis. (Cells et al., 2010)

Pada CSCs, ekspresi dan aktivasi dari CD133 adalah tinggi. CD133 mengaktifkan jalur PI3K, dan sebagai hasilnya, Akt juga diaktifkan.

Pengaktifan Akt mengarah pada peningkatan aktivitas faktor anti-apoptosis (BCL-2, BCL-XL, MCL-1) dan penurunan aktivitas faktor proapoptosis (Bid, Bax, Bim). Dengan demikian, apoptosis yang dihambat menyebabkan proliferasi sel dapat terjadi. Sebaliknya, FLIP menghambat FADD, dan sebagai hasilnya, caspase 8 yang aktif tidak diproduksi. Ketika caspase 8 tidak diproduksi, maka akan mengganggu apoptosis jalur intrinsik. Akibat dari peristiwa ini adalah peningkatan invasi dari sel kanker.(Wei et al., 2013)

Resistensi glioblastoma terhadap terapi disebabkan oleh beberapa faktor antara lain penyerapan obat yang tidak sempurna karena adanya *blood-brain barrier* dan tekanan interstitial yang tinggi dalam jaringan tumor, sifat invasif dari sel glioblastoma yang memungkinkan sel untuk menyebar jauh di dalam sistem saraf pusat dan tetap berada di bawah *blood-brain barrier* yang utuh, retensi mesin perbaikan DNA yang menghambat keefektifan kemoterapi dan radioterapi, heterogenitas intratumoral dan ketidakstabilan genom yang menghasilkan populasi sel resisten, kehadiran populasi tumor-inisiating atau *stem cell-like cells* yang memiliki mekanisme resistensi bila dibandingkan dengan sel-sel tumor dan berkontribusi terhadap heterogenitas seluler serta adanya perubahan onkogenik sekunder yang disebabkan oleh perkembangan tumor.(D. N. Louis et al., 2016)

Niche adalah lingkungan mikro di mana CSC berada dan di mana CSC berinteraksi dengan tipe sel lain. *Niche* adalah properti intrinsik CSC

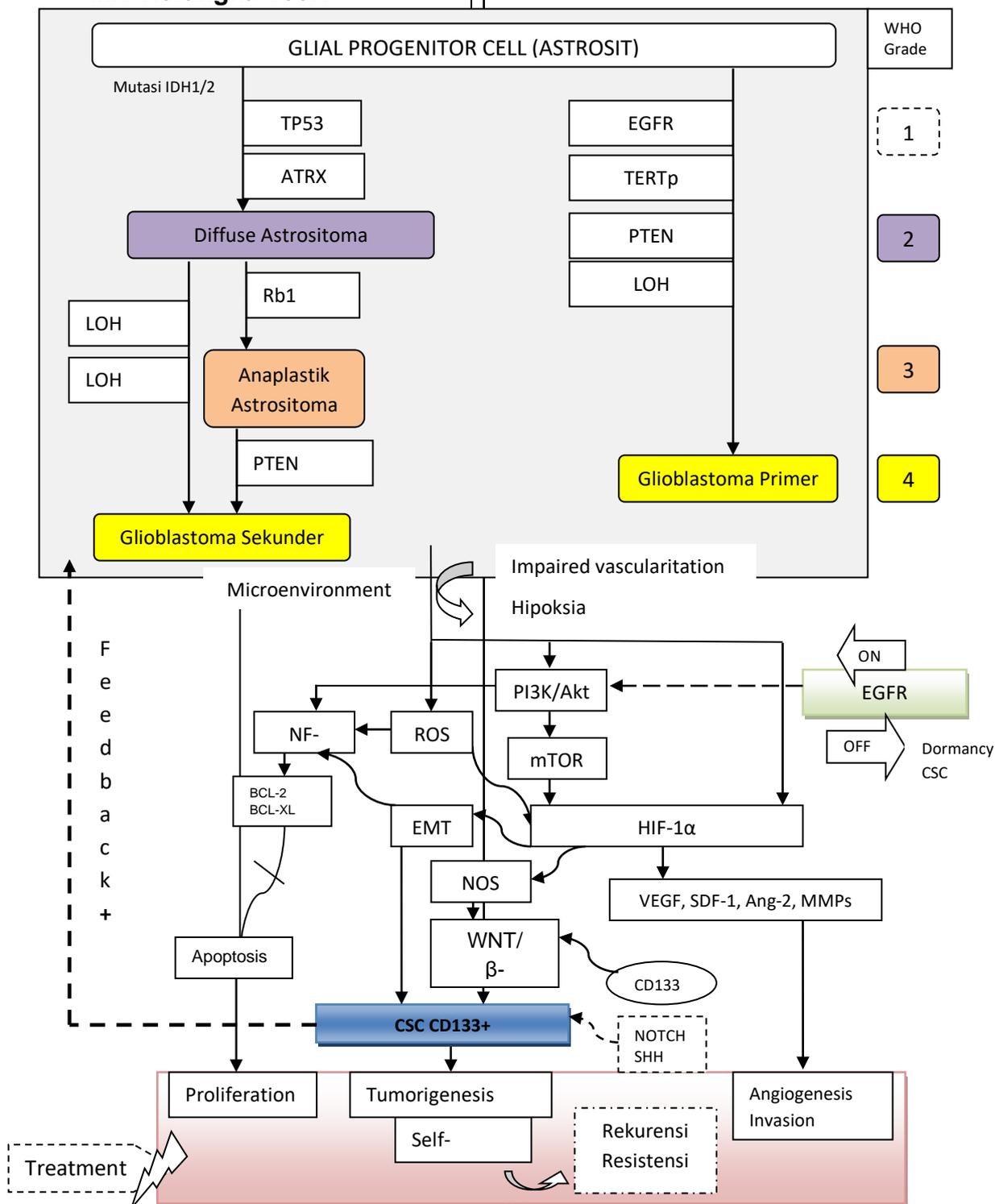
yang memungkinkan CSC bersembunyi pada jaringan dan menghindari kemoterapi. Inflamasi dapat mempertahankan lingkungan yang suportif untuk CSC dengan merekrut sel imun yang mengekspresikan sitokin. Salah satu contoh adalah IFN- β yang dapat merusak pembuluh darah *niche* CSC glioma. (Vinogradov, 2013)

Lingkungan mikro glioblastoma menunjukkan banyak perubahan dibandingkan dengan lingkungan mikro otak yang normal. Kebocoran *blood-brain barrier*, hipoksia, asidosis, akumulasi mediator terlarut, dan tarikan sel stroma dari sirkulasi perifer sangat mengubah imunobiologi glioma. Daerah nekrosis dari tumor menunjukkan kondisi hipoksia yang tinggi dan mengandung banyak CSC dan ekspresi marker CD133. Salah satu penjelasan yang meyakinkan adalah bahwa kumpulan sel yang resisten dan berproliferasi lambat yang disebut *glioma-initiating cells*, terletak di perivaskular atau *niche* yang hipoksia, dapat bertindak sebagai sumber untuk repopulasi tumor yang padat, sehingga mempersulit pendekatan imunoterapi. (D. N. Louis et al., 2016)

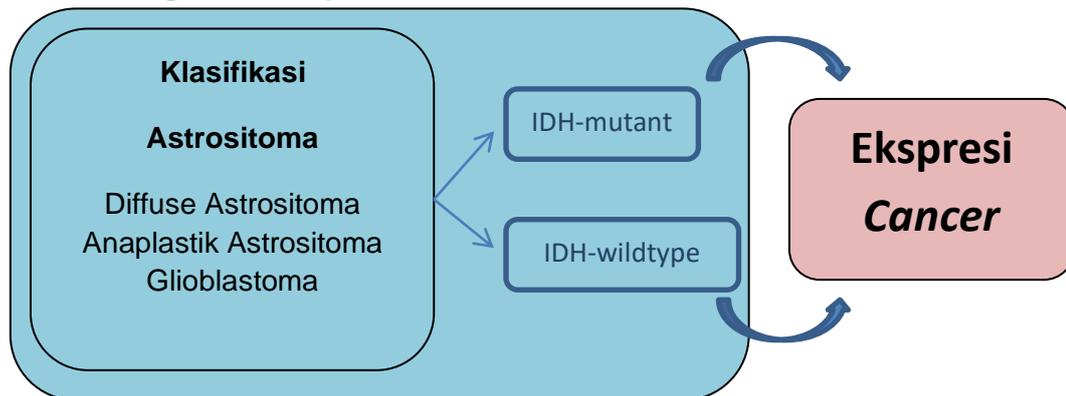
BAB III

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

III.1 Kerangka Teori



III.2 Kerangka Konsep



Keterangan:



: Variabel Bebas



: Variabel Tergantung

III.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Berdasarkan fungsi:

1. Variabel bebas : Klasifikasi Astrositoma
2. Variabel tergantung : Ekspresi CD133

Berdasarkan jenis:

1. Variabel kategorik : Ekspresi IDH1 dan Ekspresi CD133
2. Variabel ordinal : Diffuse Astrositoma *IDH-mutant* dan *IDH-wildtype*, Anaplastik Astrositoma *IDH-mutant* dan *IDH-wildtype*, Glioblastoma yang *IDH-mutant* dan *IDH-wildtype*.