

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kanker kolorektal (KKR) sampai saat ini masih memiliki morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Kasus KKR berada di urutan ketiga kasus terbanyak yang diderita pria dengan persentase 10,0% dan yang kedua terbanyak pada wanita dengan persentase 9,2% dari seluruh penderita kanker di seluruh dunia. Hampir 55 % kasus KKR terjadi di negara maju dengan budaya barat (Rawla et al., 2019). Ada variasi geografis dalam insidensi kanker kolorektal di seluruh dunia dimana insidensi tertinggi diperkirakan berada di Australia dan Selandia Baru dengan *Age Standardized Rate* (ASR) 44,8 pada pria dan 32,2 pada wanita per 100.000. Tingkat kematian pasien KKR tertinggi diperkirakan di Eropa Tengah dan Timur dengan ASR 20,3 per 100.000 untuk laki-laki dan 11,7 per 100.000 untuk perempuan. Tingkat kematian terendah terdapat di Afrika Barat dengan ASR 3,5 per 100.000 untuk laki-laki dan 3,0 per 100.000 untuk perempuan (Bray et al., 2018).

Menurut Data Globocan 2020, insidensi kanker kolorektal di Indonesia menduduki posisi keempat terbanyak (8,6%) setelah kanker payudara, serviks, dan paru. Pada tahun 2020, terdapat 396.914 kasus baru kanker kolorektal dengan jumlah total kematian mencapai 234.411 kasus (WHO, 2020). Di Rumah Sakit Wahidin Sudirohudodo Makassar, tercatat 293 pasien dengan kanker kolorektal yang melakukan pengobatan di Divisi Bedah Digestif. Sebagian besar (57,3%) pasien (168/293) berusia 50 tahun atau lebih dan mayoritas dalam stadium lanjut IV (34,8%; 102 pasien) (Labeda et al., 2022). Tingkat kelangsungan hidup 5 tahun keseluruhan untuk CRC hanya 36,5% (Arsyad et al., 2022).

Kemajuan signifikan di bidang kedokteran telah dicapai dalam beberapa dekade terakhir dalam pemahaman mengenai progresivitas karsinogenesis kanker kolorektal. Di antara seluruh mekanisme karsinogenesis, proses transisi epitel-mesenkim (EMT) banyak mendapat perhatian (Tan et al., 2022). Proses EMT berkaitan dengan invasi dan metastasis kanker kolorektal, kanker hati, kanker pankreas, kanker payudara, dan kanker lambung (Nieto, 2011). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa EMT memainkan peran penting dalam resistensi kemoterapi, bahkan ditemukan sedini mungkin pada tahap adenoma (Tiwari et al., 2012).

Dalam kondisi normal, EMT diregulasi oleh program morfogenik terkontrol yang berperan dalam proses embriologi (Ni *et al.*, 2022). Dalam kondisi patologis, sinyaling dan faktor transkripsi mengalami kekacauan sehingga menyebabkan proses EMT tidak teratur, memicu inflamasi, fibrosis, dan karsinogenesis (Duffield, 2010). Fenotipe sel yang dihasilkan juga akan berubah karena sel mengalami perubahan bentuk, susunan, dan polaritasnya. Ditambah dengan sel akibat EMT yang masih memiliki karakteristik sel inang, dalam kondisi karsinogenesis, sel akan sulit dikenali sel inang (Nisticò *et al.*, 2012). Pada kanker kolorektal, EMT dikaitkan dengan fenotip invasif atau metastasis. Proses ini ditandai dengan hilangnya sel epitel, hilangnya polaritas, dan perolehan sifat mesenkim, seperti perubahan sitoskeleton aktin, peningkatan motilitas, dan mendorong migrasi sel (Lu *et al.*, 2023).

Progresivitas kanker kolorektal saat ini juga dikaitkan dengan kondisi trombositosis. *Cancer-associated thrombosis* dapat menjadi pemicu progresivitas kanker yang lanjut dan menimbulkan luaran yang buruk (Liao *et al.*, 2023). Sel kanker dan trombosit memiliki komunikasi dua arah yang kompleks. Hubungan antara trombosis dan kanker menunjukkan bahwa sel kanker dapat memicu produksi, aktivasi, dan perubahan fungsi trombosit melalui berbagai jalur (Franco *et al.*, 2015). Di sisi lain, trombosit dapat memainkan peran penting dalam pertumbuhan, metastasis, dan pertahanan sel kanker (Dajani *et al.*, 2009). Pemahaman mengenai peran trombosit dalam karsinogenesis meliputi lima tahap utama yakni *tumor cell-induced platelet aggregation* (TCIPA), interaksi sel tumor dengan endotel, penghindaran sel tumor dari sistem imun, angiogenesis, dan transisi epitel-mesenkim (EMT) (Xu *et al.*, 2018b, Braun *et al.*, 2021).

Trombosit dapat memicu karsinogenesis setelah teraktivasi, yang dikenal sebagai trombosit teraktivasi. Trombositosis dan trombosit teraktivasi adalah dua hal yang berbeda. Trombosit yang bersirkulasi dalam keadaan istirahat berbentuk diskoid dan tidak berinteraksi dengan dinding pembuluh darah. Trombositosis dinilai dalam hitung trombosit yang dapat dilihat dari nilai hematologi rutin (Sang *et al.*, 2021). Pada kondisi istirahat dan tidak terstimulasi, hanya sedikit P-selektin yang terlihat pada permukaan trombosit. Namun, setelah aktivasi trombosit (atau sel endotel) melakukan fusi membran granula dengan membran sel menghasilkan kadar P-selektin yang banyak pada permukaan sel. Dalam studi *in vivo*, meskipun jumlah trombosit tampak normal, aktivasi trombosit dapat menyebabkan kegagalan organ selama pembentukan mikrotrombus dari agregasi

trombosit (Vardon Bounes *et al.*, 2018). Sampai saat ini belum ada penelitian yang membandingkan secara langsung trombositosis dengan trombosit teraktivasi dan apakah trombositosis dapat representatif menggambarkan tingkat aktivasi trombosit.

Trombosit teraktivasi (*activated platelet*) memicu peningkatan adhesi antar sesama trombosit, trombosit dengan sel, dan membentuk *platelet cloacking* (Zhou *et al.*, 2023). Trombosit teraktivasi beragregasi mengelilingi sel tumor yang bersirkulasi, membentuk suatu *barrier* yang dapat memproteksi kompleks sel tumor dari *shear stress* dan sel imun (Wang *et al.*, 2022a). Sel tumor dapat memicu aktivasi dan agregasi trombosit, baik secara langsung melalui interaksi reseptor-ligan maupun secara tidak langsung melalui pelepasan granula dari trombosit yang teraktivasi (Asghar *et al.*, 2019). Lebih lanjut, trombosit teraktivasi ditemukan dapat memicu berbagai sinyal seperti TGF β , PDGF, LPA, $\alpha 2\beta 1$, TBK1, $\alpha v\beta 3$, yang dapat memicu faktor transkripsi Snail/Slug, Twist, ZEB dalam mempromosikan EMT (Lamouille *et al.*, 2014).

Kebanyakan penelitian saat ini hanya menilai hubungan trombositosis terhadap proses EMT dan tidak meneliti mengenai trombosit teraktivasi secara langsung. Padahal, trombositosis tidak dapat memicu EMT karena harus teraktivasi terlebih dahulu (Yun *et al.*, 2016). Pengambilan sampel darah oleh Steller *et al.* (2013) menunjukkan bahwa dari seluruh trombosit, 5-10% teraktivasi, dan hanya itu yang mengadakan reaksi dengan sel tumor. Lebih lanjut, penelitian tersebut menunjukkan bahwa trombosit teraktivasi secara signifikan memicu EMT melalui penurunan kadar E-cadherin dan peningkatan vimentin (Steller *et al.*, 2013). Jia *et al.* (2015) dengan trombosit teraktivasi yang distimulasi *protease-activated receptor-1* (PAR1) secara langsung menunjukkan peningkatan trombosit teraktivasi memicu peningkatan vimentin dan penurunan E-cadherin secara signifikan, yang menandakan EMT telah terjadi (Jia *et al.*, 2015). Contursi *et al.* (2023) meneliti trombosit teraktivasi melalui *platelet-derived extracellular vesicles* menunjukkan promosi EMT dengan penurunan E-cadherin, dan peningkatan Vimentin. Hasil penelitian ini ditemukan konsisten pada 4 lini sel kanker yang digunakan (Contursi *et al.*, 2023).

Selain itu, secara spesifik dalam kanker kolorektal, belum semua sinyal dan faktor transkripsi yang dapat memicu EMT ditemukan dalam penelitian klinis. Meta analisis Ahmadiankia *et al.* (2020) pada kanker kolorektal, menemukan korelasi yang signifikan antara ekspresi Twist (OR, 1.46; 95%CI 1.03–2.09), Snail1

(OR, 3.43; 95%CI, 1.98–5.93) dan ZEB2 (OR, 2.42; 95%CI, 1.09–5.40) dengan metastasis dan rendahnya survival. Namun, penelitian ini tidak membahas mengenai hubungannya dengan trombosit maupun trombosit teraktivasi (Ahmadiankia and Khosravi, 2020).

Snail1 adalah represor transkripsional berbasis *zinc-finger* yang mengendalikan EMT baik dalam proses fisiologis maupun patologis. Melalui domain SNAG N-terminalnya, Snail1 berinteraksi dengan DNA E-box pada promotor CDH1, mengikat *polycomb repressive complex* yang menyebabkan metilasi atau deasetilase histon untuk mensilens transkripsi gen E-cadherin (Hwang *et al.*, 2011). Snail1 juga merupakan faktor penting dalam hubungan antara karakteristik sel induk EMT dan kanker kolorektal karena dapat secara langsung berikatan dengan E-box E3/E4 IL-8 untuk mengaktifkan produksi IL-8, yang pada gilirannya menyebabkan aktivitas sel induk kanker dan tumorigenitas pada sel. Jalur pensinyalan yang terintegrasi dan kompleks, termasuk jalur RTK, TGF- β , Notch, Wnt, TNF- α , dan BMP, mengaktifkan Snail1, sehingga menginduksi EMT. Ekspresi snail berkorelasi dengan tingkat tumor, metastasis nodal dari berbagai jenis tumor dan memprediksi hasil yang buruk pada pasien dengan kanker metastatik (Wang *et al.*, 2013).

Keterlibatan Snail1 pada kanker kolorektal masih kontroversial dan belum ada penelitian secara spesifik mengenai hubungan Snail1 dan kanker kolorektal dengan trombosit teraktivasi. Terdapat bukti bahwa sel-sel dari kompartemen tumor yang berbeda berinteraksi memengaruhi ekspresi onkoprotein yang berbeda. Penelitian tentang Snail1 pada kanker kolorektal masih terbatas. Franci *et al.* (2006) menunjukkan bahwa injeksi intratumoral dengan antibodi monoklonal spesifik Snail1 menghambat pertumbuhan tumor dan metastasis diikuti oleh peningkatan jumlah limfosit infiltrasi tumor stroma. Imunoreaktivitas Snail1 pada stroma tumor berhubungan dengan metastasis jauh ($p = 0,006$) dan kelangsungan hidup spesifik pasien yang lebih rendah ($p = 0,011$) (Franci *et al.*, 2006). Di sisi lain, Kroepil *et al.* tidak menemukan korelasi yang signifikan antara ekspresi Snail1 dan hilangnya E-cadherin pada jaringan kanker serta dengan parameter klinis seperti stadium TNM, usia atau jenis kelamin (Kroepil *et al.*, 2013).

Herrera *et al.* (2018) secara menemukan hubungan antara PDGF dengan Snail1 pada sampel tumor dari kanker kolorektal. Ekspresi reseptor Snail1 dan PDGF yang tinggi dikaitkan dengan prognosis yang buruk pada kanker kolorektal. Fibroblas yang teraktivasi PDGF merangsang remodeling dan deposisi serat

matriks ekstraseluler. Lebih lanjut, mereka menjelaskan bagaimana Snail1 bekerja melalui jalur FAK, yang merupakan faktor penting untuk organisasi matriks ekstraseluler. Kemudian, pada sel yang diberikan PDGF, kebanyakan menunjukkan level Snail1 yang tinggi, diikuti dengan peningkatan translokasi Snail1 ke nukleus. Jalur yang paling sensitif adalah melalui sinyaling FAK (Herrera *et al.*, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menggali lebih dalam peran trombositosis dan trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim (EMT) pada kanker kolorektal, serta untuk mengidentifikasi mekanisme yang terlibat dalam proses tersebut melalui faktor transkripsi Snail1. Penelitian sebelumnya telah banyak menyoroti hubungan antara trombositosis dan perkembangan kanker, namun sedikit yang membahas peran trombosit teraktivasi dalam konteks ini. Lebih lanjut, jalur molekuler bagaimana trombosit teraktivasi dapat memicu proses EMT pada kanker kolorektal masih belum terungkap dengan jelas. Peran trombosit teraktivasi dalam memicu EMT melalui Snail1 dan pengaruhnya terhadap ekspresi E-cadherin dan vimentin merupakan topik yang belum banyak dieksplorasi dalam penelitian kanker kolorektal.

Pada penelitian ini, peneliti akan menggunakan sampel darah dan jaringan dari pasien kanker kolorektal untuk mengevaluasi peran trombosit teraktivasi dalam memicu EMT. P-selektin, yang diekspresikan oleh trombosit teraktivasi, akan digunakan sebagai indikator untuk mengukur tingkat aktivasi trombosit dalam sampel darah pasien. Selain itu, ekspresi faktor transkripsi Snail1, E-cadherin, dan vimentin dalam jaringan tumor akan dianalisis untuk menilai hubungan antara trombosit teraktivasi dan proses EMT. Melalui pendekatan ini, diharapkan dapat diungkap bagaimana trombosit teraktivasi berkontribusi terhadap transisi epitel-mesenkim dan peran SNAIL1 dalam proses tersebut.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini melibatkan analisis data dengan menggunakan teknik kausalitas canggih, seperti *directed acyclic graph* (DAG) dan *Granger causality test*. DAG adalah model grafis yang digunakan untuk menggambarkan hubungan sebab-akibat antara variabel-variabel yang terlibat, sementara *Granger causality test* digunakan untuk menguji apakah perubahan dalam satu variabel dapat memprediksi perubahan dalam variabel lainnya. Pendekatan ini memungkinkan peneliti untuk menyelidiki hubungan dinamis antara trombosit teraktivasi, Snail1, E-cadherin, vimentin, dan proses EMT secara lebih mendalam. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengembangkan

model prediksi berbasis pohon keputusan (*decision tree*) yang dapat memprediksi probabilitas terjadinya EMT pada pasien kanker kolorektal berdasarkan data yang ada. Dengan menggunakan teknik-teknik analisis yang canggih dan data yang akurat, penelitian ini berpotensi memberikan wawasan baru tentang bagaimana trombosit teraktivasi berperan dalam memicu EMT dan metastasis pada kanker kolorektal.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana peran trombositosis dan trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim melalui faktor transkripsi Snail1 pada kanker kolorektal?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui peran trombositosis dan trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim melalui faktor transkripsi Snail1 pada kanker kolorektal.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui hubungan antara trombositosis dan trombosit teraktivasi pada kanker kolorektal.
2. Untuk mengetahui peran trombositosis dalam memicu transisi epitel-mesenkim pada kanker kolorektal.
3. Untuk mengetahui peran trombositosis terhadap kadar E-cadherin pada kanker kolorektal.
4. Untuk mengetahui peran trombositosis terhadap kadar vimentin pada kanker kolorektal.
5. Untuk mengetahui peran trombositosis dalam memicu ekspresi Snail1 pada kanker kolorektal.
6. Untuk mengetahui peran trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim pada kanker kolorektal.
7. Untuk mengetahui peran trombosit teraktivasi terhadap kadar E-cadherin pada kanker kolorektal.
8. Untuk mengetahui peran trombosit teraktivasi terhadap kadar vimentin pada kanker kolorektal.
9. Untuk mengetahui peran trombosit teraktivasi dalam memicu ekspresi Snail1 pada kanker kolorektal.

10. Untuk mengetahui peran Snail1 dalam memicu transisi epitel-mesenkim pada kanker kolorektal.
11. Untuk mengetahui peran Snail1 terhadap kadar E-cadherin pada kanker kolorektal.
12. Untuk mengetahui peran Snail1 terhadap kadar vimentin pada kanker kolorektal.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Untuk memperkuat pemahaman tentang peran trombositosis dan trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim melalui faktor transkripsi Snail1 pada kanker kolorektal. Penelitian ini akan memberikan wawasan yang lebih jelas tentang bagaimana proses transisi epitel-mesenkim (EMT) berperan dalam perkembangan kanker kolorektal. Meskipun EMT telah banyak diteliti pada berbagai jenis kanker, pemahaman tentang proses ini dalam konteks kanker kolorektal, khususnya yang melibatkan trombosit teraktivasi dan faktor transkripsi SNAIL1, masih sangat terbatas. Dengan menggali hubungan antara trombosit teraktivasi, EMT, dan faktor-faktor molekuler seperti SNAIL1, E-cadherin, dan vimentin, penelitian ini diharapkan dapat mengungkap mekanisme-mekanisme kunci yang mengatur transisi tersebut, yang sebelumnya belum sepenuhnya dipahami.

Salah satu manfaat penting lainnya adalah pengembangan model prediksi berbasis pohon keputusan (*decision tree*) yang dapat memprediksi probabilitas terjadinya EMT pada pasien kanker kolorektal. Dengan menggunakan data trombosit teraktivasi dan biomarker lainnya, model ini diharapkan dapat digunakan sebagai alat diagnostik untuk menilai risiko metastasis pada pasien. Hal ini akan membantu dokter dalam merencanakan terapi yang lebih individual dan lebih tepat sasaran, serta memungkinkan deteksi dini dan pengelolaan yang lebih efektif terhadap kanker kolorektal.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini berpotensi untuk mengidentifikasi biomarker baru yang dapat digunakan untuk diagnosis dini kanker kolorektal dan memprediksi risiko metastasis. Dengan mengukur tingkat aktivasi trombosit melalui P-selektin dan mengevaluasi ekspresi faktor-faktor terkait EMT seperti SNAIL1, E-cadherin, dan vimentin, penelitian ini dapat memberikan alat diagnostik baru yang lebih sensitif

dan spesifik. Biomarker tersebut dapat digunakan untuk memantau perkembangan penyakit, membantu dalam menentukan prognosis, serta memberikan informasi berharga dalam merancang terapi yang lebih tepat dan personal. Bila terbukti trombositosis berhubungan dengan *trombosit teraktivasi*, dan kemudian terbukti memiliki memicu transisi epitel-mesenkim melalui faktor transkripsi Snail1, maka trombositosis dan trombosit teraktivasi dapat menjadi nilai prediktif terhadap progresivitas kanker kolorektal. Bila tidak terbukti, harus dilakukan pemeriksaan trombosit teraktivasi untuk menentukan prognosis kanker kolorektal.

1.4.3 Manfaat Aplikasi

Peran trombosit teraktivasi dan Snail1 bila terbukti dapat menjadi sasaran terapi target selanjutnya dalam menghentikan transisi epitel-mesenkim pada pasien kanker kolorektal. Salah satu manfaat utama dari penelitian ini adalah potensinya untuk mengarah pada pengembangan terapi yang lebih efektif dalam mengatasi kanker kolorektal, terutama untuk mencegah atau menghambat proses metastasis. Jika trombosit teraktivasi terbukti berperan dalam memicu EMT dan metastasis, maka terapi yang menargetkan trombosit atau jalur terkait dapat digunakan untuk menghambat transisi epitel-mesenkim dan mengurangi kemungkinan terjadinya metastasis. Ini akan memberikan alternatif terapi yang lebih spesifik dan efektif, yang berpotensi memperbaiki prognosis pasien kanker kolorektal, mengurangi tingkat kekambuhan, dan meningkatkan kualitas hidup mereka.

Dengan meningkatkan pemahaman tentang mekanisme yang terlibat dalam perkembangan metastasis dan mengembangkan terapi yang lebih efektif, penelitian ini dapat berkontribusi pada peningkatan kualitas hidup pasien kanker kolorektal. Terapi yang lebih terarah dan personal dapat membantu mengurangi efek samping yang terkait dengan pengobatan kanker yang konvensional, memperpanjang harapan hidup, dan memberikan pasien peluang yang lebih baik untuk hidup bebas dari penyakit.

1.4.4 Penelitian selanjutnya

Meskipun fokus utama penelitian ini adalah kanker kolorektal, temuan-temuan dari penelitian ini dapat memperluas pemahaman kita tentang proses EMT dan metastasis pada berbagai jenis kanker lainnya. Proses EMT berperan dalam patogenesis banyak jenis kanker, termasuk kanker payudara, paru-paru, dan pankreas. Oleh karena itu, hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan yang

berguna dalam penelitian kanker secara umum, yang dapat membuka jalan bagi pengembangan terapi baru yang lebih efektif untuk berbagai jenis kanker.

Penelitian ini menggunakan pendekatan kausalitas yang canggih, seperti Directed Acyclic Graph (DAG) dan *Granger Causality Test*, untuk mengeksplorasi hubungan sebab-akibat antara trombosit teraktivasi, EMT, dan ekspresi biomarker. Pendekatan ini akan memperkenalkan cara-cara baru dalam menganalisis hubungan dinamis antara variabel-variabel molekuler dalam kanker kolorektal. Dengan menggunakan teknik ini, penelitian ini akan memberikan kontribusi dalam pengembangan metodologi analisis yang lebih akurat dan mendalam, yang dapat diterapkan dalam penelitian kanker lainnya, serta membantu memahami lebih baik faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan dan progresi kanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Trombositosis

Trombosit bersirkulasi dalam darah dalam keadaan istirahat dan diam (*resting*), dengan tingkat sirkulasi dipertahankan secara konstan dalam kisaran normal $150-400 \times 10^9$ per liter darah pada orang sehat. Trombosit istirahat berbentuk cakram kecil dengan ukuran $1,5-3 \mu\text{m}$ dan cenderung berada di pinggir pembuluh darah (*marginalisasi*) (Tokarev *et al.*, 2011). Trombosit tidak mengandung nukleus (karena tidak memiliki DNA) tetapi memiliki mengandung RNA, ribosom, mitokondria, dan sejumlah organel dan granul tersimpan, yang teregulasi secara dinamis selama fungsi trombosit normal. Trombosit manusia bersirkulasi selama 7 dan 10 hari dan secara selektif dikeluarkan oleh sel-sel hati atau limpa untuk klirens kecuali dalam kondisi di mana terdapat respon hemostatik yang mempertahankan trombosit (van Holten *et al.*, 2014).

Secara umum, sitoskeleton trombosit terutama terdiri dari aktin, tubulin, spektrin, dan filamin. Spektrin memiliki struktur seperti jaring dua dimensi, melapisi sisi sitoplasma membran plasma, dan kedua ujungnya terhubung ke filamen aktin. Aktin tersusun dalam bentuk polimer di mana filamin dan α -aktinin bertindak sebagai pengikat silang dengan rasio sekitar 1:10. Pada trombosit yang beristirahat, kumparan mikrotubulus, polimer $\alpha\beta$ -tubulin terletak di bawah membran plasma untuk mempertahankan bentuk diskoid trombosit (Shin *et al.*, 2017).

Trombosit berasal dari megakariosit dan proses produksi trombosit sebagian besar terjadi di sumsum tulang. Selama pembentukan trombosit, megakariosit yang memanjang yang disebut proplatelet tumbuh ke dalam pembuluh darah dan dipecah oleh kekuatan darah (Machlus and Italiano, 2013). Membran trombosit terdiri dari fosfolipid yang dilapisi dengan glikoprotein dan integrin, yang penting untuk adhesi, agregasi, dan aktivasi, yang merupakan langkah penting dalam hemostasis yang dimediasi trombosit. Membran trombosit tersusun oleh banyak molekul adhesi seperti integrin ($\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \text{L}\beta 2$, $\alpha \text{v}\beta 3$), GPIb-IX-V, GPVI, CLEC-2, dan selektin (P dan C-selektin). (Xu *et al.*, 2016).

Trombosit matur mengandung ribuan transkripsi RNA unik, mengeluarkan 3 jenis granul, yang berperan penting dalam hemostasis, imunitas, dan terkait

dengan karsinogenesis. Ketiga granul yang dimaksud adalah: (i) granul padat mengandung agonis trombosit seperti serotonin dan ADP yang berfungsi untuk memperkuat aktivasi trombosit, (ii) granul α mengandung protein yang meningkatkan aktivitas koagulasi; dan (iii) granul lisosom mengandung glikosidase dan protease. Komponen granul meningkatkan adhesi, aktivasi, dan agregasi sel sehingga meningkatkan pertumbuhan sel dan inflamasi melalui interaksi dengan jenis sel lain (Iba and Levy, 2018).

Fungsi utama trombosit adalah membentuk respons hemostatik normal apabila terjadi cedera vaskular yang diakibatkan oleh kebocoran spontan darah melalui pembuluh halus. Fungsi trombosit yang lain adalah proses hemostatis atau koagulasi dengan menghasilkan zat kimia tertentu yang menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah, mempertahankan integritas pembuluh darah (kontraksi kapiler), sebagai fagositosis (pertahanan non spesifik), sebagai alat transport di substansi tertentu, melindungi dinding pembuluh darah bagian dalam, sebagai sumber pembentukan protombin, pembekuan dan retraksi bekuan (Meikle *et al.*, 2016).

Trombositosis adalah kondisi di mana hitung trombosit lebih dari nilai normal trombosit. Adapun penelitian yang ada menggunakan *cut off* trombositosis yang bervariasi dari $300-450 \times 10^9/L$. Penelitian yang menilai trombositosis pada pasien dengan kanker solid telah dilakukan lebih dari 100 tahun lalu. Hampir 40% pasien dengan keganasan pada gastrointestinal, paru, payudara dan ovarium, dan prostat dijumpai jumlah trombosit lebih dari $400 \times 10^9/L$ (Karagöz *et al.*, 2010).

Interaksi antara hitung trombosit dan kanker jelas bersifat timbal balik. Trombosit mempunyai efek stimulasi terhadap perkembangan kanker, sementara pada saat yang sama, adanya karsinogenesis memengaruhi berbagai karakteristik dan fungsi trombosit. Hubungan antara trombositosis dan kanker menunjukkan bahwa sel kanker dapat memicu produksi, aktivasi, dan perubahan fungsi trombosit melalui berbagai jalur (Franco *et al.*, 2015). Di sisi lain, trombosit dapat memainkan peran penting dalam pertumbuhan, metastasis, dan pertahanan sel kanker (Dajani *et al.*, 2009). Dalam kondisi di mana terjadi aktivasi koagulasi, infeksi, inflamasi, dan karsinogenesis, dapat terjadi peningkatan kadar trombosit (lebih dari 400.000 mm^3). Trombosit yang diukur biasanya adalah jumlah trombosit, padahal yang berperan langsung dalam memicu karsinogenesis adalah trombosit teraktivasi (Yun *et al.*, 2016). Walaupun begitu, berbagai penelitian telah menunjukkan adanya peningkatan kadar trombosit seiring dengan progresivitas

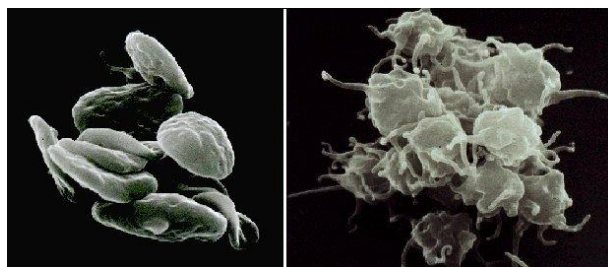
kanker (Harrison *et al.*, 2010).

Tumor ganas telah terbukti meningkatkan jumlah dan fungsi trombosit untuk memicu perkembangan kanker (Lin *et al.*, 2014a). Hubungan hitung trombosit dengan stadium kanker kolorektal masih kontroversial. Beberapa penelitian menunjukkan trombositosis dapat membedakan kanker stadium lanjut (III/IV) dan stadium awal (I/II), namun tidak bermakna dalam stratifikasi kanker stadium awal (Rao *et al.*, 2018, Guo *et al.*, 2014). Meta-analisis Rao *et al.* (2018) mencakup 9 studi kohort retrospektif yang melibatkan 3413 pasien dengan kanker kolorektal menunjukkan bahwa subjek dengan trombositosis memiliki *overall survival* dan lebih pendek dibandingkan pasien dengan jumlah trombosit normal (Rao *et al.*, 2018).

2.2 Trombosit teraktivasi

2.2.1 Struktur trombosit teraktivasi

Trombosit teraktivasi adalah trombositosis yang mengalami perubahan morfologi dan biokimia membran trombosit, termasuk perubahan konformasi reseptor adhesi, pengikatan protein adhesi, mobilisasi isi granul intraseluler, interaksi dengan sitoskeleton, inisiasi signaling proliferasi, dan interaksi trombosit-trombosit. Dalam kondisi diam, trombosit *resting* yang berbentuk diskoid bikonveks, bila teraktivasi akan mengalami perubahan struktur mikrotubulus atau kompleks aktin dengan penonjolan dari membran yang meningkatkan mobilitasi trombosit serta granul yang tersimpan akan tersekresi dari sistem kanalikuli oleh stimulus dari mediator kemotaksis, yang disebut dengan trombosit teraktivasi (Heemskerk *et al.*, 2002) (**Gambar 2.1**). Aktivasi trombosit melibatkan perubahan morfologi dan biokimia membran trombosit, termasuk perubahan konformasi reseptor adhesi, pengikatan protein adhesi, mobilisasi isi granul intraseluler, interaksi dengan sitoskeleton, inisiasi sinyal proliferasi, dan interaksi trombosit-trombosit (Heemskerk *et al.*, 2002).



Gambar 2.1 Struktur *resting* trombosit dan *trombosit teraktivasi* (Rozman *et al.*, 2011)

2.2.2 Mekanisme aktivasi trombosit

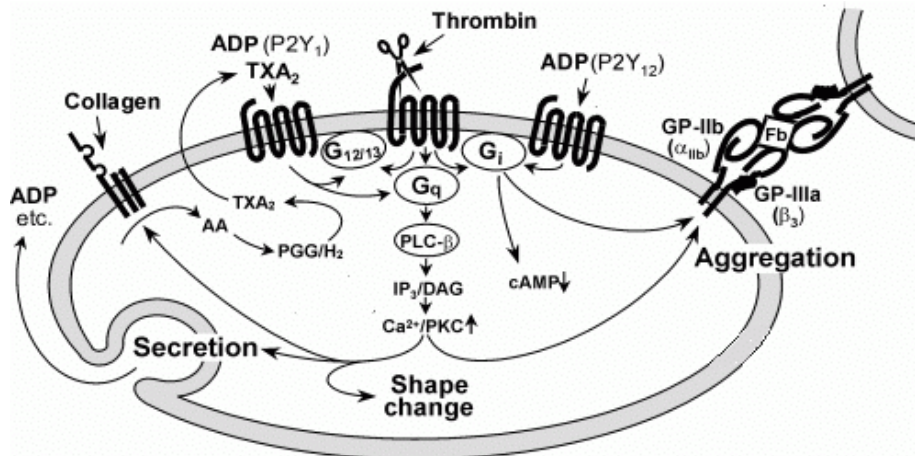
Aktivasi trombosit dimulai dengan inisiasi kaskade koagulasi. Adhesi trombosit ke matriks ekstraseluler adalah langkah pertama dalam hemostasis primer. Dalam kondisi *shear stress*, faktor von Willebrand (vWF) membentuk jembatan antara kolagen yang terpapar dan kompleks reseptor glikoprotein trombosit (GP) Ib-IX-V pada membran trombosit. Kolagen yang terpapar juga berikatan langsung dengan reseptor trombosit GP Ia/IIa dan GP VI. Setelah itu, trombosit berubah bentuk dan melepaskan isi butirannya. Reseptor aktif GP IIb/IIIa mempunyai peran sentral dalam memediasi agregasi trombosit. Fibrinogen atau vWF yang terikat pada platelet GP IIb/IIIa berikatan silang dan berkontribusi pada stabilisasi trombus (Clemetson, 2012).

Terdapat beberapa jalur yang dapat memicu aktivasi trombosit, diantaranya, trombin dan ADP (P2Y₁ dan P2Y₁₂) dengan tromboksan (TXA₂). ADP dilepaskan dari sel endotel yang rusak dan trombosit teraktivasi bekerja pada GPCR trombosit P2Y₁ dan P2Y₁₂, yang menyebabkan aktivasi trombosit lebih lanjut dan pelepasan ADP. Reseptor P2Y₁₂ mempertahankan aktivasi trombosit sebagai respons terhadap ADP dan oleh karena itu memiliki peran sentral dalam proses ini. TxA₂ yang diproduksi dan dilepaskan oleh trombosit yang terstimulasi juga mengaktifkan trombosit lebih lanjut melalui GPCR, sehingga mendorong pembentukan *plug* (Ghoshal and Bhattacharyya, 2014).

Kondisi aktivasi kedua kompleks reseptor-ligan dapat memicu Gq, PLC-beta, influks kalsium, peningkatan protein kinase C, dan perubahan bentuk trombosit, yang mengarah pada aktivasi trombosit. Kondisi agregasi trombosit juga dipicu oleh kompleks GP-IIb/GP-IIIa dengan fibrinogen atau von Willebrand Factor. Kedua fungsi ini akan mengaktifkan trombosit *resting* menjadi trombosit teraktivasi (**Gambar 2.2**) (Rozman *et al.*, 2011). Selain itu, aktivasi trombosit oleh GP VI dan CLECL-2 dilakukan melalui reseptor yang mengandung rangkaian motif aktivasi berbasis imunoreseptor tirosin (ITAM) memicu agregasi trombosit dan angiogenesis (Lee and Bergmeier, 2016).

Trombin yang teraktivasi bertanggung jawab untuk mengubah fibrinogen menjadi fibrin untuk menstabilkan sumbatan trombosit. Trombin mengaktifkan trombosit melalui reseptor teraktivasi protease (PAR) pada permukaan trombosit melalui reseptor GPCR. PAR1 memediasi aktivasi trombosit manusia pada konsentrasi trombin yang rendah, sedangkan PAR4 memerlukan konsentrasi trombin yang lebih tinggi untuk aktivasi trombosit. Pemberian sinyal melalui PAR4

tersedia untuk mekanisme perlindungan dalam situasi seperti trauma yang berkontribusi terhadap penghentian pendarahan. Agonis lain seperti epinefrin, prostaglandin E2, dan serotonin juga dapat memanfaatkan GPCR untuk mempotensiasi respons trombosit (Stegner and Nieswandt, 2011).



Gambar 2.2 Mekanisme aktivasi trombosit (Rozman *et al.*, 2011)

2.2.3 Fungsi trombosit teraktivasi

Dalam beberapa tahun terakhir, trombosit telah muncul sebagai penanda penting berbagai jenis penyakit. Mereka adalah partikel darah multifungsi dan sekarang dianggap sebagai target klinis yang sangat penting bagi banyak patofisiologi penyakit. Selain berperan penting dalam hemostasis dan trombosis normal, trombosit juga memberikan kontribusi penting dalam respon inflamasi dan imun terhadap infeksi atau cedera. Dalam kondisi patologis yang tidak terkontrol, trombosit mempunyai peran penting dalam proses patogenik yang mendasari aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular, inflamasi yang tidak terkontrol, metastasis tumor, dan penyakit neurodegeneratif termasuk penyakit Alzheimer (Gowert *et al.*, 2014).

Pada kondisi hemostatik, trombosit umumnya tidak berikatan dengan leukosit. Namun, ketika diaktifkan, trombosit menempel pada neutrofil dan monosit, mempromosikan inflamasi, trombosis, dan aterogenesis. Selain itu, setelah aktivasi, trombosit mengekspresikan sejumlah besar P-selectin yang dengan cepat dimobilisasi dari granula α ke permukaan trombosit, begitu juga dengan sekresi CD40L, PF4, dan GP IIb/III. P-selektin berikatan dengan ligannya, P-selektin glikoprotein ligan-1 (PSGL-1), memicu interaksi antara trombosit, leukosit, dan sel endotel, yang memicu pembentukan agregat trombosit-leukosit

dan mempromosikan inflamasi. Hubungan antara trombosit dan leukosit menyebabkan memberikan peluang baru untuk pengembangan uji diagnostik dan indikator prognostik pada kondisi inflamasi atau septik (Chen *et al.*, 2020).

Trombosit yang teraktivasi juga mengekspresikan CD40L (juga dikenal sebagai CD154). Ekspresi trombosit CD40L telah terbukti memengaruhi sel dendritik serta limfosit B dan T. Trombosit juga berinteraksi dengan CD40 pada sel endotel untuk meningkatkan sekresi kemokin dan ekspresi molekul adhesi. Selain itu, trombosit dikenal sebagai sumber utama CD40L terlarut (sCD40L), dapat memicu sel pembuluh darah untuk mengekspresikan E-selektin, P-selektin, dan IL-6 (Golebiewska and Poole, 2015).

Faktor trombosit 4 (PF4) atau dikenal juga dengan nama CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) merupakan salah satu protein terbanyak yang terkandung dalam granula α trombosit. Selain berperan dalam trombosis dan hemostasis, PF4 memiliki berbagai aktivitas terkait imunitas bawaan. PF4 mendorong pelepasan granula neutrofil dan adhesi ke sel endotel yang dimediasi oleh L-selektin dan antigen-1 terkait fungsi leukosit (LFA-1). PF4 juga mencegah apoptosis monosit, mendorong diferensiasi monosit menjadi makrofag, dan menginduksi fagositosis dan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). PF4 dan RANTES membentuk heterodimer, yang mendorong rekrutmen monosit ke endotelium. RANTES juga dikenal sebagai chemokine ligand 5 (CCL5) merupakan kemokin yang berperan dalam aterosklerosis dan ditemukan dalam jumlah besar pada granula α trombosit (Lam *et al.*, 2015).

NET terdiri dari DNA berfilamen (kromatin) yang tersusun dengan protein histon dan beberapa komponen antibakteri yang diekstrusi dari neutrofil teraktivasi selama respons inflamasi. Setelah dilepaskan ke sirkulasi, NET seharusnya berfungsi untuk menjebak, menahan, dan menetralkan mikroba yang menyerang. Trombosit yang teraktivasi dapat menginduksi pembentukan NET, membentuk agregat trombosit-neutrofil dan trombosit-trombosit, dan terperangkap oleh NET. Hubungan antara trombosit dan leukosit yang menyebabkan pelepasan NET intravaskular memberikan peluang baru untuk pengembangan uji diagnostik pada inflamasi berat. Keterlibatan kolaboratif trombosit dan neutrofil dalam inflamasi dan penyakit kardiovaskular memberikan hubungan baru antara inflamasi dan trombosis (Yun *et al.*, 2016).

2.2.4 Biomarker trombosit teraktivasi

1. Granul Trombosit

Trombosit mengandung setidaknya tiga jenis granul yang berbeda: granul α , granul padat, dan granul lisosom. Mediator yang disimpan dalam granul trombosit ini meliputi faktor koagulasi dan angiogenik, molekul adhesi, sitokin, dan kemokin. Meskipun mediator yang telah terbentuk sebelumnya memungkinkan pelepasan cepat setelah aktivasi trombosit, trombosit juga memiliki kemampuan untuk mensintesis mediator tambahan. Granul trombosit ini memiliki fungsi sebagai mediator yang berperan dalam berbagai proses fisiologis dan patologis. Granul terbanyak yang adalah granul α dengan jumlah 50-80 granul α per trombosit. Kandungannya terdiri dari glikoprotein perekat seperti P-selectin, fibrinogen, dan vWF, faktor koagulasi, faktor mitogenik, faktor angiogenetik, inhibitor fibrinolitik, imunoglobulin, protein spesifik membran granul seperti P-selectin dan CD63, dan berbagai kemokin termasuk PF4 (CXCL4) dan RANTES. Banyak mediator turunan granul α mempunyai peranan penting dalam hemostasis, namun mereka juga mempunyai peranan penting dalam imunitas bawaan, baik dengan memodulasi ekspresi reseptor adhesi trombosit yang berinteraksi dengan leukosit atau dengan melepaskan sitokin yang memengaruhi fungsi leukosit (Offermanns, 2006).

2. Sitokin Trombosit dan Molekul Adhesi

Trombosit yang teraktivasi melepaskan berbagai kemokin seperti CXCL1, PF4 (CXCL4), CXCL5, CXCL7, IL-8 (juga dikenal sebagai CXCL8), CXCL12, protein inflamasi makrofag- (MIP-) 1α (juga dikenal sebagai CCL3), dan RANTES (CCL5). Efek utama dari sitokin ini adalah mengatur pergerakan leukosit, migrasi dari pembuluh darah ke jaringan, dan fungsi proinflamasi lainnya seperti fagositosis dan pembentukan ROS. Sitokin proinflamasi IL- 1β yang dilepaskan oleh trombosit yang teraktivasi juga diduga memiliki peran utama dalam inflamasi (Thomas and Storey, 2015).

3. Agregat Trombosit-Leukosit

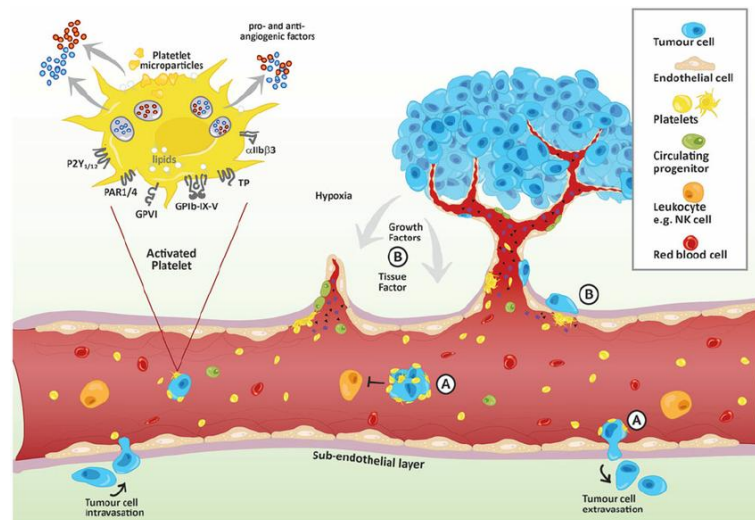
Interaksi antara trombosit, leukosit, dan endotel dapat terjadi melalui berbagai cara. Trombosit yang teraktivasi berikatan dengan leukosit melalui P-selectin, GP IIb/IIIa, dan CD40L. Selain berfungsi sebagai platform tempat leukosit dapat melekat, trombosit juga memiliki kapasitas untuk memodulasi ekspresi dan aktivasi molekul adhesi pada tipe sel lain seperti neutrofil, monosit, limfosit, dan endotelium. Agregat trombosit-neutrofil dan trombosit-monosit telah terdeteksi

dalam darah manusia dengan berbagai penyakit dan kini dianggap sebagai salah satu penanda paling sensitif terkait aktivasi trombosit (Jennings, 2009).

2.2.5 Mekanisme aktivasi trombosit oleh sel tumor

Setelah sel tumor masuk sirkulasi darah, tumor akan bereaksi dengan trombosit yang berada di pinggir pembuluh darah (marginalisasi) (Schlesinger, 2018). Sel tumor memanfaatkan berbagai mekanisme untuk menginduksi aktivasi trombosit. Sel tumor melepaskan agonis trombosit terlarut seperti ADP, tromboksan A2 (TXA2), atau trombin, yang masing-masing berikatan dengan reseptor trombosit P2Y1 dan P2Y12, tromboksan-prostanoid (TP), dan reseptor teraktivasi proteinase (PAR). Interaksi ini mengaktifkan jalur pensinyalan protein G dan akhirnya menyebabkan perubahan konformasi integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ membran dari afinitas rendah menjadi afinitas tinggi. Integrin dengan afinitas tinggi pada trombosit yang teraktivasi dapat membentuk adhesi yang kuat dengan sel tumor, memicu *platelet cloaking*, yang diyakini memfasilitasi kelangsungan hidup (melindungi dari *shear stress* dan pengenalan tumor dari sel inang), serta metastasis sel tumor dalam sirkulasi (Mitchell and King, 2013).

Sel tumor juga dapat mengekspresikan protein pengikat (seperti podoplanin, PDPN) yang dapat berikatan dengan protein adhesi permukaan trombosit (reseptor mirip lektin tipe C 2, CLEC-2) untuk mendorong aktivasi trombosit. Setelah aktivasi trombosit, granulanya dengan cepat berfusi dengan membran plasma. Protein yang terikat membran dari granula α terpapar ke permukaan trombosit, dan dilepaskan ke lingkungan mikro ekstraseluler. Agonis trombosit dalam partikel padat, seperti ADP dan TXA2, akan bertindak sebagai mediator umpan balik positif untuk selanjutnya menginduksi aktivasi trombosit (Yun *et al.*, 2016). Kombinasi sel tumor dan trombosit teraktivasi membentuk *niche* metastasis awal, dan memediasi terjadinya EMT. Kondisi *platelet cloaking* akan membentuk lingkungan mikro lokal yang mempertahankan konsentrasi signaling yang mempromosikan EMT pada tingkat yang tinggi (Wang *et al.*, 2022b) (**Gambar 2.3**). Kondisi kemudian akan memicu berbagai jenis sinyaling dan faktor transkripsi utama Snail1 dalam memicu EMT.



Gambar 2.3. Platelet cloaking (Walsh *et al.*, 2015)

2.3 Kanker kolorektal

Kanker kolorektal adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, terdiri dari kolon (bagian terpanjang dari usus besar) dan atau rektum (bagian kecil terakhir dari usus besar sebelum anus). Kejadian kanker kolorektal merupakan 8,9 % dari seluruh kanker. kanker kolorektal merupakan kanker terbanyak ketiga pada laki-laki dan perempuan setelah kanker payudara dan kanker paru-paru pada perempuan dan setelah kanker paru-paru dan prostat pada laki-laki dengan prevalensi lebih banyak pada kanker rektum daripada kanker kolon dengan rasio 33% pada rektum dan 19% pada kolon (Shaukat *et al.*, 2021).

Secara global, kejadian regional kanker kolorektal bervariasi lebih dari 10 kali lipat. Pada tahun 2020, perkiraan tingkat kejadian kanker kolorektal di dunia mencapai 19,5% (World Health Organization (WHO), 2020). Hampir 55 % kasus kanker kolorektal terjadi di negara maju dengan budaya barat. Tingkat kejadian tertinggi berada di Australia dan Selandia Baru, Eropa, dan Amerika Utara, dan tingkat terendah ditemukan di Afrika dan Asia Selatan-Tengah (Fitzmaurice *et al.*, 2019). Perbedaan geografis ini tampaknya disebabkan oleh perbedaan paparan makanan dan lingkungan, status sosial ekonomi yang rendah, dan tingkat skrining kanker kolorektal yang lebih rendah yang dikenakan pada latar belakang kerentanan yang ditentukan secara genetik (Doubeni *et al.*, 2012).

Mortalitas pasien kanker kolorektal lebih banyak terjadi di daerah yang kurang berkembang dengan persentase 52% dari jumlah kematian pasien kanker kolorektal di dunia. Tingkat kematian pasien kanker kolorektal tertinggi diperkirakan di Eropa Tengah dan Timur dengan *age-standardized rate* (ASR) 20,3

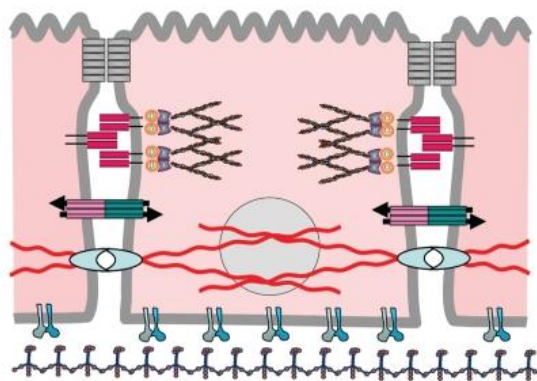
per 100.000 untuk laki-laki dan 11,7 per 100.000 untuk perempuan. Tingkat kematian terendah terdapat di Afrika Barat dengan ASR 3,5 per 100.000 untuk laki-laki dan 3,0 per 100.000 untuk perempuan (Cancer, 2020).

Menurut Data Globocan 2020, insidensi kanker kolorektal di Indonesia menduduki posisi keempat terbanyak (8,6%) setelah kanker payudara, serviks, dan paru. Pada tahun 2020, terdapat 396.914 kasus baru kanker kolorektal dengan jumlah total kematian mencapai 234.411 kasus (WHO, 2020). Di Rumah Sakit Wahidin Sudirohudodo Makassar, tercatat 293 pasien dengan kanker kolorektal yang berkunjung ke Divisi Bedah Digestif. Sebagian besar (57,3%) pasien (168/293) berusia 50 tahun atau lebih dan mayoritas dalam stadium lanjut IV (34,8%; 102 pasien) (Labeda *et al.*, 2022). Tingkat kelangsungan hidup 5 tahun keseluruhan untuk kanker kolorektal adalah 36,5% (Arsyad *et al.*, 2022).

2.4 Transisi epitel-mesenkim

Transisi epitel-mesenkim (EMT) adalah proses biologis yang memungkinkan sel epitel mengambil fenotipe sel mesenkim, yang mencakup peningkatan kapasitas migrasi, sifat invasif, peningkatan resistensi terhadap apoptosis, dan peningkatan produksi komponen matriks ekstraseluler secara signifikan (Kalluri and Neilson, 2003). Sejumlah proses molekuler berbeda terlibat untuk memicu EMT, seperti aktivasi faktor transkripsi, ekspresi protein permukaan sel tertentu, reorganisasi dan peningkatan ekspresi protein sitoskeletal, produksi enzim pendegradasi matriks ekstraseluler, dan perubahan ekspresi microRNA spesifik. Selama EMT, mekanisme ini menyebabkan hilangnya karakteristik epitel dan perolehan karakteristik mesenkim (Kalluri and Weinberg, 2009).

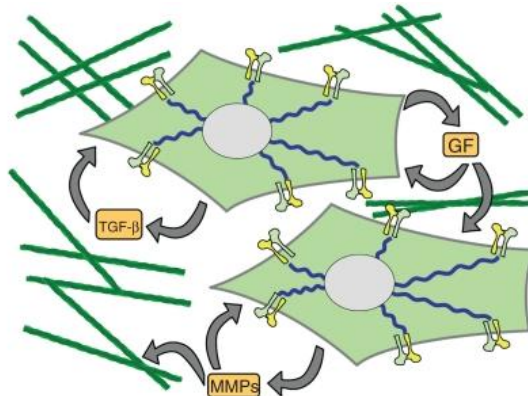
Sel-sel epitel terhubung satu sama lain melalui *adherens junction*, desmosom, *gap junction*, dan *tight junction*. *Adherens junction* berhubungan dengan berkas aktin kortikal, sedangkan desmosom dihubungkan dengan filamen sitokeratin intermediat. *Tight junction* berada pada bagian apeks lateral untuk mempertahankan polaritas epitel. Polaritas ini memandu pengorganisasian yang tepat dari *tight junction*, *adherens junction*, dan desmosom. Kompleks polaritas, termasuk kompleks *Par*, *Crumbs*, dan *Scribble*, menentukan domain apikal versus basolateral sel epitel. Sel epitel melekat pada membran basal di bawahnya melalui hemidesmosom, yang mengandung integrin untuk memungkinkan pengikatan pada membran basal dan juga dihubungkan dengan sitokeratin di dalam sel (**Gambar 2.4**) (Chanson *et al.*, 2011).



Gambar 2.4 Karakteristik sel epitel

Sel-sel epitel saling berhubungan melalui persimpangan ketat (abu-abu), persimpangan berbasis E-cadherin (merah), yang terhubung ke sitoskeleton aktin, persimpangan celah (merah/biru), dan hemidesmosom (cyan), yang terhubung ke sitokeratin- berdasarkan sitoskeleton filamen menengah. Sel epitel juga memiliki interaksi sel-matriks ekstraseluler khusus untuk adhesi pada membran basal yang kaya laminin (Chanson *et al.*, 2011).

Sebaliknya, sel mesenkim tidak mengandung sambungan epitel fungsional dan memiliki polaritas belakang-depan pada serat tegangan aktinnya. Sel mesenkim mengandung filamen perantara berbasis vimentin dan memanfaatkan adhesi fintegrin untuk menempel pada matriks ekstraseluler (**Gambar 2.5**).

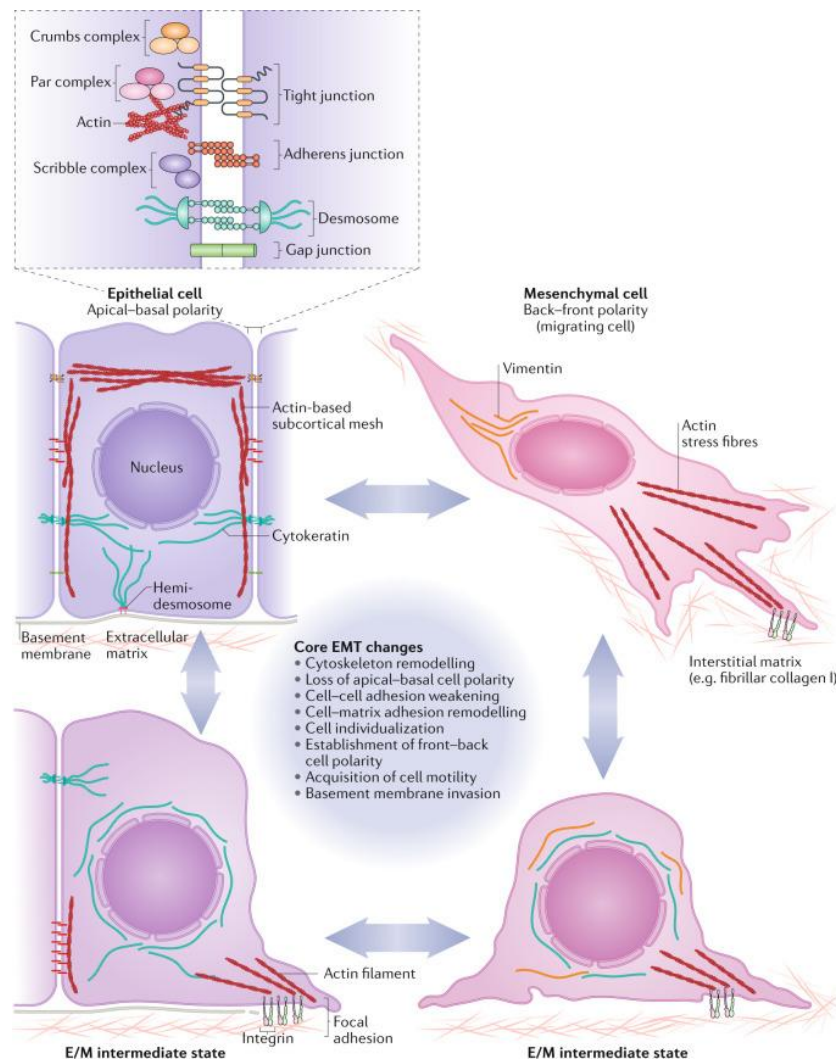


Gambar 2.5 Karakteristik sel mesenkim. Sel mesenkim dipisahkan satu sama lain oleh matriks ekstraseluler, tidak mempunyai lamina basal yang memisahkannya dari jaringan di dekatnya, dan tidak mempunyai polaritas apikal-basolateral yang khas seperti sel epitel. Sel mesenkim memiliki sitoskeleton filamen perantara berbasis vimentin dan mengubah komposisi interaksi sel-matriks ekstraseluler yang dioptimalkan untuk adhesi pada matriks usus kaya kolagen. Mereka dapat menghasilkan beta TGF yang melimpah, faktor pertumbuhan, matriks metaloproteinase (Chanson *et al.*, 2011).

2.4.1 Definisi transisi epitel-mesenkim

Transisi epitel-mesenkim (EMT) adalah proses transdiferensiasi dimana sel epitel memperoleh karakteristik sel mesenkim (Manfioletti and Fedele, 2022). EMT terlibat dalam banyak proses fisiologis (perkembangan embrio, penyembuhan luka) dan patologis (fibrosis, kanker), dan umumnya diklasifikasikan menurut

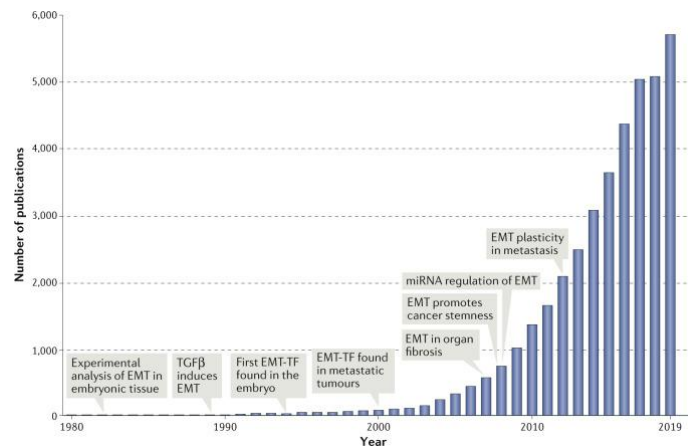
konteks ekstraseluler daripada mekanisme molekuler. EMT ditandai dengan degradasi membran basal di bawahnya dan pembentukan sel mesenkim yang dapat bermigrasi menjauh dari lapisan epitel tempat sel tersebut berasal (Lachat *et al.*, 2021) (**Gambar 2.6**).



Gambar 2.6 Proses EMT (Yang *et al.*, 2020)

Penelitian EMT berkembang pesat selama 20 tahun terakhir. Analisis eksperimental pertama yang menilai transisi epitel-mesenkimal (EMT) dalam pengembangan diterbitkan pada tahun 1979. Hubungan EMT dengan faktor pertumbuhan ditemukan pada tahun 1989. Regulasi transkripsional EMT diidentifikasi pada tahun 1994. Pertumbuhan selanjutnya dari penelitian tersebut dirangsang oleh keterkaitan antara EMT dalam memicu metastasis, fibrosis organ dan sel induk. Pertumbuhan di bidang ini bersifat logaritmik sejak pertemuan pertama pada tahun 2003. Grafik menunjukkan makalah utama yang diterbitkan

setiap tahun, diidentifikasi melalui penelusuran database Web of Science. Jumlah publikasi pada tahun 2018 dan 2019 masing-masing melebihi 5.000 dan 5.700 artikel (Yang *et al.*, 2020) (**Gambar 2.7**).



Gambar 2.7 Perkembangan penelitian EMT (Yang *et al.*, 2020)

2.4.2 Sejarah transisi epitel-mesenkim

1. Penelitian observasi pertama pada embrio

Elizabeth Dexter Betty Hay (1927–2007, Harvard Medical School) adalah peneliti pertama yang mendeskripsikan EMT dan kemudian menggunakan istilah ini. Ahli biologi seluler Amerika ini pertama kali bekerja pada regenerasi anggota tubuh amfibi pada tahun 1958. Hay secara khusus menjelaskan dedifferensiasi sel tulang rawan pada anggota tubuh embrio salamander dalam pembentukan anggota tubuh baru dengan melakukan diferensiasi ulang berbasis proses EMT. Hay kemudian mulai mempelajari peran matriks ekstraseluler dalam diferensiasi sel epitel, menunjukkan bahwa komposisi matriks ekstraseluler (misalnya, konsentrasi kolagen) berdampak pada diferensiasi sel epitel kornea dan sekresi protein matriks ekstraseluler, seperti kolagen dan glikosaminoglikan. Hay kemudian mengerjakan perkembangan embrio, menggunakan model embrio ayam, mengidentifikasi, dan membuat daftar fenotipe seluler yang berbeda selama perkembangannya. Pada tahun 1968, Hay menghadiri simposium Hahnemann ke-18 di Baltimore tentang interaksi epitel-mesenkim. Dalam pidatonya, Hay menjelaskan bagaimana jaringan mesenkim dikeluarkan dari sel epitel selama migrasi sel puncak saraf dalam pembentukan tabung saraf. Hal ini menandakan simposium Hahnemann ke-18 sebagai tempat lahirnya penelitian EMT (Hay, 1958).

2. Penelitian observasi EMT pertama pada kanker

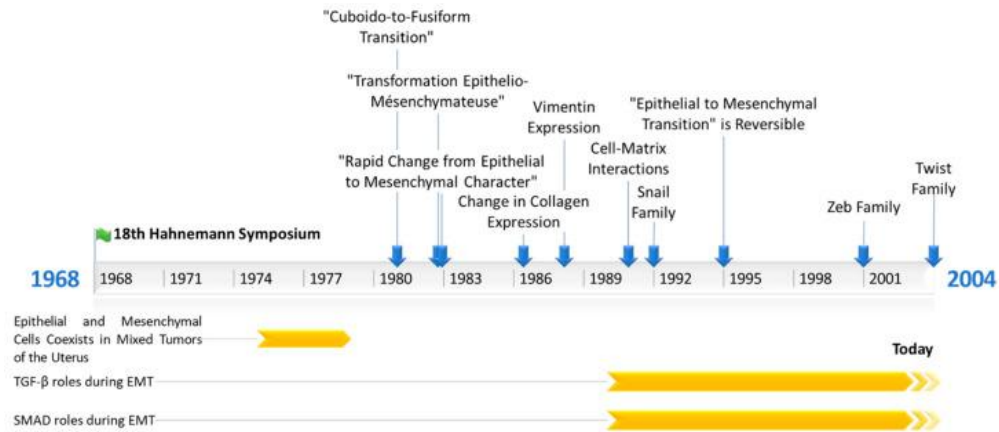
Pada tahun 1970-an, tim Prof. Dr. HE Stegner, Universitas Hamburg, Jerman, dan tim Masao Sekiya, Departemen Patologi, Rumah Sakit Palang Merah Nagaoka, Jepang juga melaporkan bahwa sel epitel dan mesenkim hidup berdampingan dalam sel di kanker uterus. Kemudian, terdapat perdebatan untuk menentukan apakah sel-sel ini berasal dari sel induk kanker yang sama atau apakah sel mesenkim dapat diturunkan langsung dari sel epitel. Pada saat ini, dua tim menyimpulkan asal usul sel induk kanker yang sama dan berpikir bahwa sel epitel tidak mungkin memperoleh bentuk mesenkim atau sebaliknya. Selain itu, mereka menemukan kesamaan antara sel kanker dan sel stroma endometrium, menurut mereka sel kedua berasal dari sel pertama, yang mencetuskan proses EMT pada sel kanker (Hay, 1958).

3. Publikasi terminologi EMT pertama

Hay dan timnya menggunakan istilah “transformasi epitel ke mesenkim” untuk pertama kalinya pada tahun 1982, dalam sebuah publikasi yang menjelaskan untuk pertama kalinya sel dewasa menjalani EMT. Mereka menunjukkan bahwa kultur sel epitel lensa anak ayam (dewasa atau embrio) yang tersuspensi dalam gel kolagen dapat menyebabkan ekspansi sitosol, seperti pada pseudopoda. Sel-sel ini kemudian dapat bergerak secara individual dalam matriks kolagen, dan terlihat seperti sel mesenkim (Greenburg and Hay, 1982).

4. Deskripsi molekular EMT

Sejak tahun 1990, beberapa tim telah menunjukkan pentingnya protein keluarga TGF (transforming growth factor) (TGF- α ; TGF- β 1–3) selama EMT. Ekspresi TGF- α dilaporkan menyebabkan transisi fenotip epitel ke mesenkim pada sel kanker prostat tikus (Gavrilović *et al.*, 1990). Pada tahun 1999, laboratorium Peter Ten Dijke (Institut Penelitian Kanker Ludwig, Uppsala, Swedia) untuk pertama kalinya menunjukkan keterlibatan protein SMAD dalam induksi EMT setelah aktivasi reseptor TGF- β (Piek *et al.*, 1999). Sejak itu, penelitian tentang EMT menjadi lebih populer sejak tahun 2000. Hasil pencarian “transisi epitel ke mesenkim” di database PubMed meningkat dari 30 pada tahun 2000 menjadi 182 pada tahun 2005, dan kemudian menjadi 942 pada tahun 2010 dan 4975 pada tahun 2020 (Lachat *et al.*, 2021) (**Gambar 2.8**).

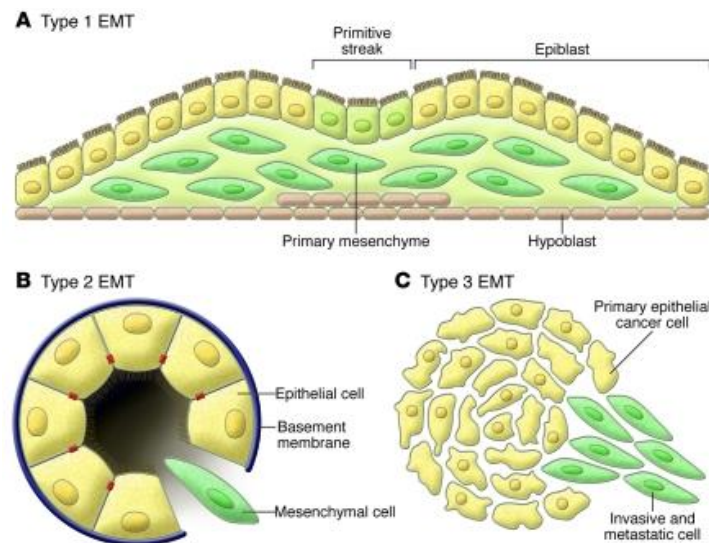


Gambar 2.8 Sejarah penemuan EMT (Lachat *et al.*, 2021)

2.4.3 Klasifikasi transisi epitel-mesenkim

Transisi epitel-mesenkim (EMT) pertama kali dijelaskan oleh para peneliti yang mempelajari embriogenesis awal sebagai program dengan fitur seluler yang terdefinisi dengan baik. Saat ini telah diterima secara luas bahwa EMT terjadi secara normal selama perkembangan embrio awal dalam peran morfogenetik dan penyembuhan luka pada orang dewasa. Proses sebaliknya, yang dikenal sebagai transisi mesenkim-epitel (MET), juga sering terjadi selama perkembangan (Lachat *et al.*, 2021).

Terdapat 3 jenis EMT. EMT tipe 1 berhubungan dengan implantasi dan gastrulasi embrio serta menimbulkan mesoderm dan endoderm serta sel kista saraf. Epitel primitif, khususnya epiblas, membentuk mesenkim primer melalui EMT. Mesenkim primer ini dapat diinduksi kembali untuk membentuk epitel sekunder melalui MET. Diperkirakan bahwa epitel sekunder tersebut selanjutnya dapat berdiferensiasi untuk membentuk jenis jaringan epitel lain dan menjalani EMT berikutnya untuk menghasilkan sel-sel jaringan ikat, termasuk astrosit, adiposit, kondrosit, osteoblas, dan sel otot. EMT tipe 2 muncul dalam jangka waktu yang lama dan pada akhirnya dapat menghancurkan organ yang terkena jika penyebab inflamasi primer tidak dihilangkan atau dilemahkan. Terakhir, epitel sekunder yang berhubungan dengan banyak organ dapat berubah menjadi sel kanker yang kemudian menjalani EMT yang memungkinkan invasi dan metastasis, yang disebut dengan EMT tipe 3 (Yang *et al.*, 2020) (**Gambar 2.9**).



Gambar 2.9 Klasifikasi EMT (Yang *et al.*, 2020)

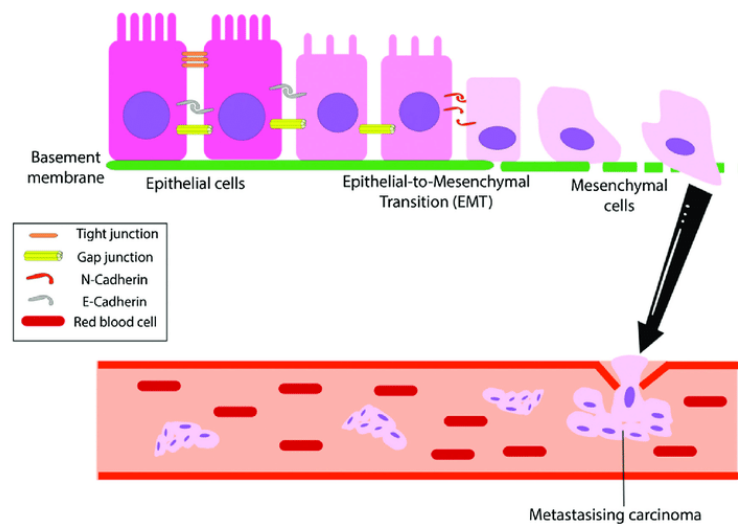
2.4.4 Perubahan struktur sel pada transisi epitel-mesenkim

Selama proses EMT, banyak struktur dan fungsi sel utama yang terpengaruh. Sel-sel epitel kehilangan ciri-ciri khas seperti persimpangan dan polaritas baso-apikal sambil memperoleh polaritas dari belakang ke depan seiring dengan kemampuan untuk bermigrasi dan menyerang jaringan di sekitarnya. Renovasi matriks ekstraseluler dan perubahan interaksi sel dengan matriks ekstraseluler sangat penting dalam inisiasi dan perkembangan EMT. Remodeling matriks ekstraseluler menyebabkan hilangnya adhesi sel-sel, penurunan regulasi E-cadherin dan gen epitel lainnya, yang merupakan komponen dari sambungan ketat. Perubahan ini dapat terjadi bersamaan dengan peningkatan regulasi faktor transkripsi utama dan ekspresi gen mesenkim terkait, seperti vimentin dan fibronektin. Peristiwa penting dalam EMT adalah hilangnya *cell junction*, hilangnya polaritas apikal-basal, perubahan struktur membrana basalis dan kontriksi sel apial, serta dan perubahan arsitektur sitoskeletal yang ditandai dengan penurunan regulasi tanda ekspresi gen epitel dan aktivasi gen yang membantu menentukan fenotip mesenkim, peningkatan proyeksi dan motilitas sel; serta kemampuan untuk mendegradasi protein matriks ekstraseluler sehingga memungkinkan terjadinya perilaku invasif (Manfioletti and Fedele, 2022).

1. Hilangnya *cell junction*

Langkah pertama transisi epitel-mesenkim (EMT) adalah hilangnya atau pembongkaran sambungan ketat, sambungan melekat, desmosom, dan sambungan celah. Hilangnya sambungan sel memperkuat destabilisasi

sambungan patuh dan hilangnya fungsi epitel. Persimpangan ketat larut seiring dengan penurunan ekspresi claudin dan occludin dari kontak sel-sel. Kemudian, terjadi destabilisasi sambungan patuh, di mana E-cadherin dibelah dan terdegradasi pada membran plasma. Dengan demikian, beta-catenin tidak dapat lagi berinteraksi dengan E-cadherin, sehingga dapat melanjutkan melakukan transkripsi (Huang *et al.*, 2012). Penurunan regulasi E-cadherin dikarakterisasi dengan menginhibisi beta4 pada integrin $\alpha 6 \beta 4$ epitel tetapi peningkatan regulasi integrin $\alpha 3 \beta 1$ epitel, yang mengikat laminin yang diperlukan untuk perkembangan melalui EMT dan mengintegrasikan β -catenin dan mentransformasikan faktor pertumbuhan- β (TGF β) – pensinyalan SMAD. Kemudian, terjadi juga gangguan pada desmosom dan integritas gap gap terganggu karena menurunnya tingkat koneksi (Yilmaz and Christofori, 2009) (**Gambar 2.10**).

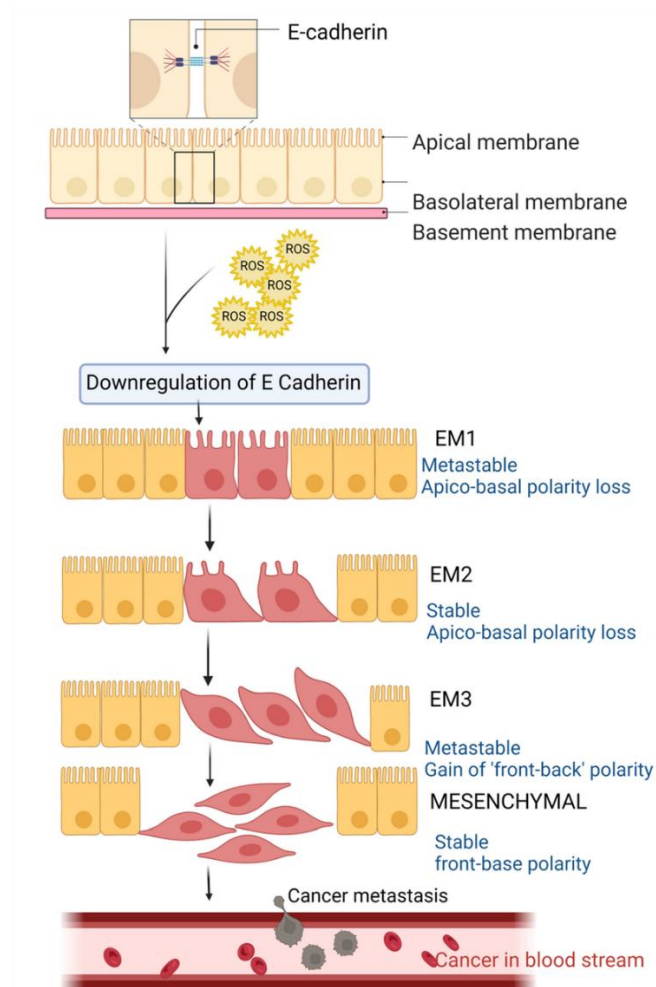


Gambar 2.10 Hilangnya *cell junction* (Law et al., 2021)

2. Hilangnya polaritas normal sel

Biasanya, polaritas apikal-basal epitel-mesenkim diatur oleh kompleks polaritas seperti kompleks kerusakan partisi (PAR) (terdiri dari PAR6, PAR3 dan protein kinase C atipikal (aPKC)) dan kompleks Crumbs (terdiri dari Crumbs (CRB), protein yang berasosiasi dengan Lin-7 1 (PALS1) dan protein sambungan ketat (PATJ) yang terkait dengan PALS1) terlokalisasi secara apikal dalam hubungannya dengan sambungan rapat dan menentukan kompartemen apikal; Kompleks coretan (terdiri dari *Scribble (SCRIB)*, *Discs large (DLG)*, dan *lethal giant larvae (LGL)*). Seiring kemajuan EMT, ekspresi gen epitel ditekan, bersamaan dengan aktivasi ekspresi gen mesenkim, dengan perubahan polaritas sel ke depan

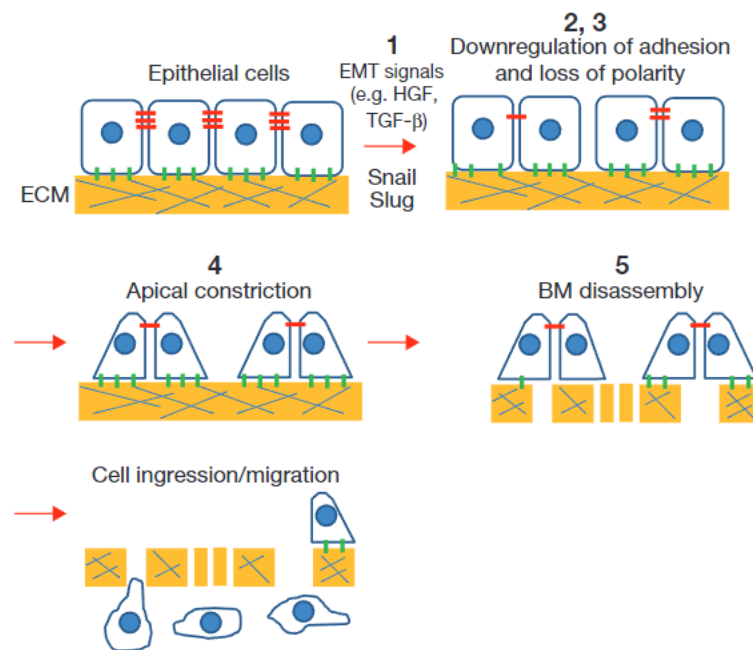
belakang (St Johnston and Ahringer, 2010, Moreno-Bueno *et al.*, 2008) (**Gambar 2.11**).



Gambar 2.11. Hilangnya polaritas sel apikal-basal (ArulJothi *et al.*, 2022)

3. Perubahan struktur membran basal dan konstriksi apikal

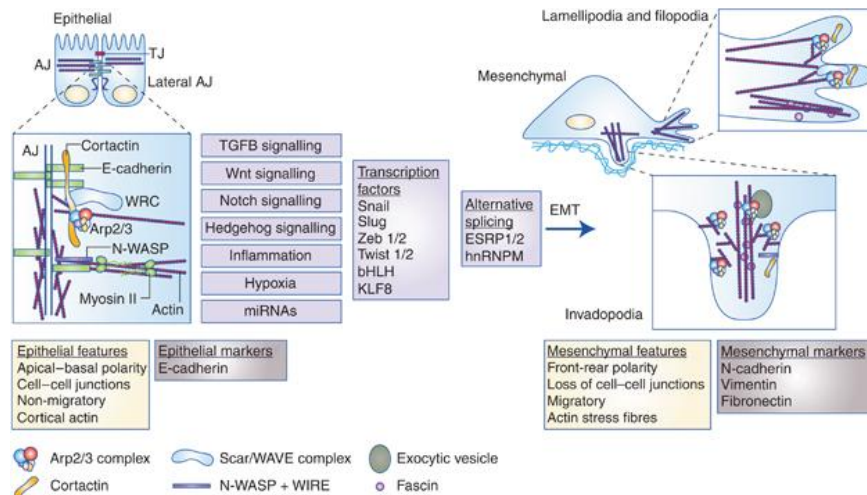
Pada permulaan EMT, membran basal hilang di bawah sel epiblas pada garis tengah garis (sel medial epiblas). Hilangnya ini dikaitkan dengan penurunan regulasi protein CLASP yang menyebabkan destabilisasi mikrotubulus dan hilangnya lokalisasi distroglikan pada sel membrana basalis, kontriksi sel apikal, ditandai dengan penyusutan sisi apikal sel epitel (umumnya sisi luar atau sisi sel yang menghadap lumen), sering kali menyebabkan sel kolumnar atau kuboid menjadi trapesium, berbentuk baji, atau berbentuk botol (Levayer and Lecuit, 2008) (**Gambar 2.12**).



Gambar 2.12 Perubahan struktur membrana basalis dan konstiksi sel apikal

4. Perubahan struktur sitoskeleton aktin

Sel yang menjalani EMT memiliki perubahan g sitoskeleton aktin kortikalnya menjadi satu yang memungkinkan pemanjangan sel dan motilitas terarah. Diinduksi oleh Rho GTPASE, proyeksi membran baru yang kaya aktin mencakup tonjolan membran seperti lembaran yang disebut lamellipodia dan ekstensi seperti paku yang disebut filopodia di tepi lamellipodia. Invadopodia yang kaya aktin mengarahkan fungsi proteolitikm mendegradasi matriks ekstraseluler, sehingga memfasilitasi invasi sel (Stuelten *et al.*, 2018). Komposisi filamen perantara berubah dengan represi sitokeratin dan aktivasi kadar vimentin (Lee *et al.*, 2006). Selain itu, kompleks PAR dan Scribble bersama dengan PATJ dari kompleks Crumbs berpindah lokasi ke tepi depan sel, di mana RAC1 dan CDC42 mengaktifkan polimerisasi aktin dan pembentukan tonjolan membran. Sebaliknya, RHOA terlokalisasi di bagian belakang sel dan mendorong pembongkaran kompleks adhesi dan retraksi sel. Hal ini menandai terjadinya konversi polaritas apikal-basal menjadi polaritas depan-belakang (Nelson, 2009) (**Gambar 13**).



Gambar 13. Perubahan arsitektur aktin dalam EMT (Morris and Machesky, 2015)

2.4.5 Transisi epitel-mesenkim dalam kondisi fisiologis

1. Gastrulasi

Pada awal minggu ketiga perkembangan embriologi, embrio terdiri dari cakram embrionik yang terdiri dari dua lapisan: hipoblas (endoderm primitif) dan epiblas (ektoderm primitif). EMT berperan dalam bentuk lapisan ketiga, yaitu mesoderm, yang disebut dengan proses gastrulasi. Lapisan ini dibentuk diantara hipoblas dan epiblas, kecuali pada membran kloaka dan membran faring, yang merupakan cikal bakal pertama dari ekstremitas dan bagian kranial dari saluran pencernaan (Takahashi *et al.*, 2005).

2. Pembentukan *neural tube*

Pada akhir minggu ketiga perkembangan embriologi, embrio telah terdiri dari tiga lapisan embrionik, seperti yang telah dijelaskan sebelumnya: ektoderm, mesoderm, dan endoderm. Pelat saraf berhubungan dengan area tebal endoderm tempat sel membelah dengan cepat. Tepi lempeng ini tumbuh membentuk alur saraf. Puncak saraf terletak di kedua sisi alur saraf. Sel krista saraf kemudian berpindah ke tepi medial, yang memungkinkan terjadinya fusi puncak saraf. Selama fusi ini, sel-sel puncak saraf mengalami EMT, tersebar di mesoderm, kemudian tabung saraf kemudian terpisah dari ektoderm (Nakaya *et al.*, 2004).

3. Fusi palatum embrionik

Selama minggu kesembilan perkembangan embriologi, *embryonic palatal shelves* akan bergerak dan mencari satu sama lain untuk fusi di bagian medial. Masing-masing tepi epitel *embryonic palatal shelves* akan hilang dan menyatu akibat proses EMT. Beberapa peneliti menemukan bahwa sel epitel mengalami

apoptosis dan sel dari lapisan basal dapat menyatu untuk menjalani EMT (Lachat *et al.*, 2021).

4. Fibrosis

EMT ditemukan berperan dalam beragam jenis fibrosis (termasuk di paru-paru, hati, dan ginjal). Pada jaringan fibrosis, terjadi akumulasi miofibroblas, yang mewakili populasi fibroblas khusus yang terlibat dalam sekresi kolagen dan dengan demikian dalam pengembangan dan perkembangan fibrosis interstisial, yang merupakan penyebab utama penyakit pada berbagai jaringan. Studi mendukung hipotesis bahwa miofibroblas muncul dari konversi yang dipicu oleh EMT. Penelitian yang lebih baru menunjukkan bahwa sel-sel epitel ginjal mengalami EMT parsial yang penting untuk perkembangan penyakit, namun sel-sel tersebut tidak secara langsung berkontribusi pada pembentukan populasi miofibroblas. Sebaliknya, mereka kehilangan fungsi tubular normalnya, dan sel-sel yang rusak ini melepaskan sinyal parakrin ke interstitium ginjal, sehingga membentuk kembali lingkungan mikro. Pelepasan TGF β mengubah fibroblas yang ada menjadi miofibroblas, dan sekresi sitokin dan kemokin tambahan mungkin merekrut makrofag ke stroma. Oleh karena itu, sel epitel ginjal yang rusak memicu fibrogenesis dan peradangan, yang merupakan ciri khas fibrosis ginjal. Sementara perdebatan mengenai kontribusi EMT terhadap berbagai jenis fibrosis terus berlanjut, persyaratan ekspresi EMT-TF yang ditunjukkan dengan kuat menunjukkan bahwa aktivasi EMT memang diperlukan untuk pengembangan fibrosis (Nisticò *et al.*, 2012).

2.4.6 Transisi epitel-mesenkim pada kanker

Program EMT adalah proses yang sangat dinamis. Sel kanker yang masuk pada proses EMT bisa mengalami transisi secara penuh atau parsial (Chaffer *et al.*, 2016). Sel-sel epitel yang telah memperoleh karakteristik mesenkim yang cukup dan mulai menyebar akan mulai memproduksi mediator yang memicu karsinogenesis dan pensinyalan autokrin yang memperkuat keadaan mesenkim sel. Sel-sel yang telah memperoleh ciri-ciri mesenkim meninggalkan lokasi tumor primer, menyerang aliran darah, dan tiba di lokasi metastasis di mana sel-sel tersebut melakukan epitelisasi ulang (MET). Proses EMT dan MET berusaha menciptakan plastisitas fenotipik yang diperlukan untuk keberhasilan pembentukan metastasis (Stankic *et al.*, 2013).

1. EMT and imunosurveilans

Respon imun dapat menghilangkan sel-sel prakanker dan kanker dalam proses yang disebut imunosurveilans. Gangguan imunosurveilans ditemukan dapat mendorong perkembangan sel tumor, karena aktivasi respons peradangan kronis gagal menekan karsinogenesis. Interaksi tumor dengan sistem kekebalan tubuh berkembang melalui tahap awal di mana sistem kekebalan tubuh dapat secara efektif menargetkan dan membunuh sel-sel tumor. Namun, seiring berkembangnya interaksi tumor-imun, tumor dapat memperoleh kemampuan untuk sepenuhnya menghindari penargetan kekebalan, dengan cara menjadi kurang imunogenik atau menekan kekebalan (Stankic *et al.*, 2013).

Investigasi selanjutnya mengungkapkan bahwa sel T CD8 diperlukan untuk pertumbuhan varian mesenkim neu-negatif yang menunjukkan induksi lokal EMT dan bahwa induksi EMT dikaitkan dengan jalur pensinyalan TGF- β dan TNF- α . Karakterisasi rinci sel tumor yang diisolasi dari tikus yang kambuh menunjukkan bahwa tumor ini telah mengadopsi karakteristik CSC, termasuk perubahan profil penanda permukaan sel, peningkatan pembentukan mammosfer, dan peningkatan tumorigenisitas secara substansial. Sel tumor mesenkim juga mengalami peningkatan ekspresi pengangkut obat, enzim perbaikan DNA, dan peningkatan resistensi terhadap kemoterapi dan radiasi (Gonzalez *et al.*, 2018).

2. EMT dan sel stroma tumor

Interaksi epitel-mesenkim dalam lingkungan mikro tumor mengintegrasikan beberapa molekul pemberi sinyal penting yang penting untuk pertumbuhan dan metastasis tumor, termasuk integrin, sitokin, dan faktor pertumbuhan. Kehadiran sitokin seperti HGF, EGF, faktor pertumbuhan turunan trombosit (PDGF), dan TGF- β yang diproduksi dan dilepaskan oleh stroma tumor bertindak dengan menginduksi EMT dan mendukung proses seperti metastasis, dan mereka dapat mengaktifkan sejumlah faktor transkripsi. gen yang mempromosikan EMT, seperti Snail, Slug, ZEB1, dan Twist, untuk mengirimkan sinyal promosi EMT. Aktivasi gen spesifik menginduksi EMT pada lini sel kanker payudara ketika gen tersebut dikultur bersama dengan sel induk mesenkim dan menurunkan ekspresi gen yang terkait dengan diferensiasi epitel. Banyak sinyal yang diterima dari lingkungan mikro tumor dapat memulai EMT termasuk TGF β , HIF-1 α , EGF, WNTs, dan Notch. Sinyal yang berbeda memicu ekspresi faktor transkripsi ini termasuk interaksi heterotipik dengan sel kanker di sekitarnya dan interaksi dengan sel stroma terkait tumor yang berdekatan (Lindsey and Langhans, 2014).

Fibroblas terkait kanker (CAFs) mengaktifkan program EMT sel karsinoma di dekatnya. CAF dari kanker prostat manusia menginduksi EMT dalam sel karsinoma prostat manusia PC-3 yang dikultur bersama melalui sekresi matriks metalloproteinase (MMPs). Media kultur CAF yang terkondisikan yang diisolasi dari tumor payudara invasif menginduksi perubahan mirip EMT pada beberapa lini sel kanker payudara manusia melalui TGF β yang disekresikan oleh CAF. Makrofag terkait tumor dapat berkontribusi pada aktivasi EMT dalam sel karsinoma. Menipisnya makrofag dari tikus yang mengandung allograft teratokarsinoma F9 menghasilkan diferensiasi epitel sel tumor, sehingga menunjukkan peran penting makrofag dalam mempertahankan sifat mesenkim sel tumor. Efek EMT ini sebagian dimediasi oleh sekresi TGF β oleh makrofag (Ribatti *et al.*, 2020).

3. EMT dan metastasis

Invasi sel ke dalam matriks ekstraseluler dianggap sebagai salah satu langkah pertama dalam kaskade metastasis. Sel-sel yang memperoleh kemampuan untuk bermigrasi dan menginvasi matriks telah lama dianggap sebagai ciri khas EMT dan telah digunakan sebagai pengganti untuk menggambarkan peran EMT dalam metastasis. Mekanisme berbeda terlibat termasuk reorganisasi sitoskeletal, perubahan ekspresi molekul adhesi sel, degradasi membran basal melalui aktivasi MMP-2 dan MMP-9, serta faktor pertumbuhan autokrin berkelanjutan yang memberi sinyal untuk menghindari apoptosis dan/atau anoikis. Studi yang menggunakan model kanker payudara dan kulit pada tikus telah menunjukkan bahwa aktivasi program EMT penting agar sel tumor primer dapat menyebar ke paru-paru, sedangkan sel yang disebarkan selanjutnya perlu membalikkan program EMT dan mendapatkan karakteristik epitel agar dapat membentuk makroskopis secara efisien. metastasis. Pada beberapa karsinoma, aktivasi eksperimental dari program EMT menghasilkan peningkatan yang luar biasa dalam kemampuan sel-sel ini untuk memperluas tonjolan seperti filopodium, memungkinkan sel-sel yang diaktifkan EMT ini untuk berkembang biak setelah ekstrasvasi, yang pada akhirnya memungkinkan mereka untuk menyebarkan metastasis (Son and Moon, 2010).

4. EMT dan *circulating tumor cells* (CTCs)

TC dibentuk oleh sel-sel karsinoma yang menembus ke dalam pembuluh darah dan mencapai tempat yang jauh di mana sel-sel tersebut membentuk koloni metastasis baru. CTC menunjukkan aktivasi EMT yang tidak lengkap dan

mengekspresikan penanda epitel dan mesenkim. CTC dianggap sebagai prekursor metastasis, dan atribut molekuler sel-sel ini akan memberikan alat yang berguna untuk memperjelas mekanisme yang mendasari penyebaran ganas. Jumlah CTC mitosis yang lebih tinggi ditemukan pada pasien kanker payudara metastatik stadium lanjut, dan keadaan mitosis CTC berkorelasi dengan kelangsungan hidup yang lebih pendek pada pasien ini. CTC mesenkim ditemukan lebih tinggi pada pasien yang terkena tumor progresif. Kehadiran CTC selama kanker prostat primer telah dikaitkan dengan perubahan kadar E-cadherin (Jie *et al.*, 2017).

5. EMT dan angiogenesis

EMT dan angiogenesis adalah dua faktor penting yang memengaruhi pertumbuhan tumor dan metastasis. Angiogenesis adalah peristiwa penting dalam perkembangan tumor dan pembentukan metastasis, yang memungkinkan transisi dari pertumbuhan tumor avaskular yang stabil ke fase vaskularisasi melalui apa yang disebut saklar angiogenik. Dalam promosi tumorigenesis, EMT dan angiogenesis telah terungkap sebagai proses yang tidak terpisahkan. Telah dibuktikan bahwa kadar faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dan reseptor EGF (EGFR) berhubungan dengan penghentian ekspresi Twist2 dan penurunan kadar E-cadherin. Aktivasi jalur VEGF pada tumor hipoksia merangsang transisi mesenkim endotel pada sel endotel tumor angiogenik. Pemberian VEGF pada model eksperimental xenograft sel preinvasif menginduksi ekspresi penanda EMT. Aktivasi VEGF reseptor-1 (VEGFR-1) menghasilkan EMT, motilitas sel tumor, dan invasif pada sel karsinoma pankreas manusia. Perbincangan silang antara jalur Notch dan VEGF dalam konteks tumor hipoksia mendorong transisi mesenkim endotel dalam sel endotel tumor angiogenik. Studi tentang xenograft pada sel prainvasif menunjukkan bahwa penambahan VEGF menginduksi munculnya penanda EMT (Lugano *et al.*, 2020).

5. EMT dan kemoresistensi

Dua laporan memberikan bukti yang meyakinkan yang menghubungkan EMT dengan resistensi obat kanker, khususnya mendukung fenotip resistensi multi-obat tetapi juga radioresistensi, yang mungkin disebabkan oleh peningkatan kelangsungan hidup sel kanker, transisi nasib sel, dan/atau peningkatan regulasi gen terkait resistensi obat. Selain itu, batang sel yang ditransformasikan dan status mesenkimnya bergantung pada konteks, disregulasi faktor transkripsi tertentu, serta kaskade sinyal yang relevan yang memengaruhi hambatan antitumor utama

dalam sel, yaitu penuaan dan berbagai bentuk kematian sel, mungkin terlibat. Identifikasi EMT sebagai pengatur umum fenotip CSC di berbagai tipe karsinoma telah memungkinkan kita untuk menyelidiki, pada tingkat molekuler, bagaimana CSC dan resistensi terapeutik dihubungkan melalui program EMT. Analisis respons terhadap kemoterapi pada pasien kanker payudara mengungkapkan hubungan erat antara resistensi terapeutik dan peningkatan ekspresi gen yang biasanya diekspresikan terutama oleh sel stroma; peningkatan regulasi transkripsional ini tampaknya disebabkan oleh aktivasi program EMT dalam sel karsinoma (Shibue and Weinberg, 2017).

2.4.7 Transisi epitel-mesenkim pada setiap jenis kanker

Ulasan pertama oleh Thierauf *et al.* menjelaskan temuan terbaru tentang relevansi klinis dari fenotip mirip mesenkim untuk pasien kanker kepala dan leher, termasuk kasus melanoma mukosa dan karsinoma kistik adenoid yang lebih jarang. Di antara faktor EMT klasik, ekspresi abnormal pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dari faktor transkripsi terkait pluripotensi SOX2 (wilayah penentu jenis kelamin Y-box 2) dan peptidase 6 terkait Kallikrein (KLK6) dibahas (Thierauf *et al.*, 2017). Hal ini diikuti oleh review oleh Fedele dkk. yang merekapitulasi sinyal molekuler endogen utama yang terlibat dalam perolehan fenotip mesenkim pada kanker payudara metastatik, terutama subtype mirip basal dan rendah claudin yang termasuk dalam kelompok kanker payudara triple-negatif (TNBC), dan interaksi silangnya dengan faktor parakrin (Fedele *et al.*, 2017).

Klymenko *et al.* jelaskan EMT dan cara kanker ovarium epitel (EOC) bermetastasis. Tinjauan ini diikuti dengan penjelasan EMT pada kanker paru-paru non-sel kecil (NSCLC) di negara-negara maju. Para penulis melaporkan peran faktor transkripsi TWIST1 dalam EMT dalam sel dengan mutasi reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) dan hubungannya dengan rendahnya kelangsungan hidup bebas penyakit pada pasien adenokarsinoma paru yang bermutasi EGFR (Klymenko *et al.*, 2017). Selanjutnya, EMT dijelaskan oleh Gaianigo *et al.* pada kanker pankreas yang memiliki prognosis buruk karena penyebaran metastasis pada tahap pertama perkembangan tumor, terutama disebabkan oleh EMT. Fokus dari tinjauan ini adalah keterlibatan EMT dalam resistensi pengobatan. Peran peradangan, mikrobiota, dan resistensi pengobatan terkait EMT juga dibahas (Gaianigo *et al.*, 2017). Ulasan oleh Vu dkk. merangkum EMT pada kanker kolorektal. Selain faktor transkripsi klasik, penulis menjelaskan

faktor transkripsi homeobox dan forkhead box (FOX) PROX1 yang lebih dalam, jalur pensinyalannya, beberapa penginduksi EMT baru pada kanker kolorektal termasuk neuropilin-2 (NRP2, reseptor untuk molekul pemandu sel dan faktor pertumbuhan), dan downregulasi beberapa microRNA (Vu and Datta, 2017). Selain itu, peran EMT dalam sirkulasi sel tumor (CTC) juga dibahas dengan kemungkinan penggunaan penanda mesenkim sebagai biomarker potensial untuk prediksi metastasis.

2.5 Faktor transkripsi Snail1

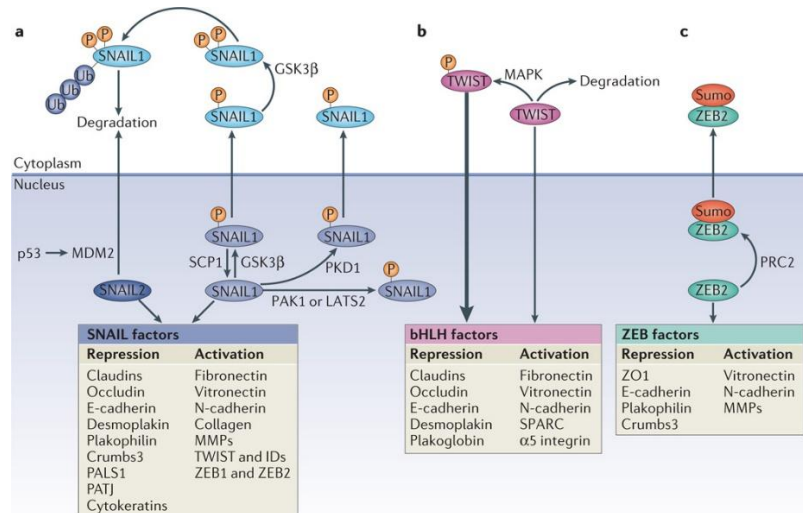
Transisi epitel-mesenkim (EMT) didorong oleh regulator utama, Snail, zinc-finger E-box-binding (ZEB) dan faktor transkripsi TWIST yang menekan gen penanda epitel dan mengaktifkan gen yang terkait dengan fenotip mesenkim. Ketiga regulator ini telah dibuktikan dalam berbagai penelitian seperti yang tertera pada tabel di bawah (**Tabel 2.1**).

Tabel 2.1 Penelitian mengenai tiga faktor transkripsi mayor dalam EMT

Transcription factor	Type	Development	Cancer	Fibrosis
Snai1 (Snail)	Zinc finger	Boulay et al., 1987 (ref. ⁸⁴); Nieto et al., 1992 (ref. ⁸⁵)	Batlle et al., 2000 (ref. ²⁵); Cano et al., 2000 (ref. ²⁶)	Boutet et al., 2006 (ref. ⁸⁶)
Snai2 (Slug)	Zinc finger	Nieto et al., 1994 (ref. ²³)	Savagner et al., 1997 (ref. ²⁴)	—
Zeb1	Zinc finger	Funahashi et al., 1993 (ref. ⁸⁷)	Grooteclaes and Frisch, 2000 (ref. ⁸⁸)	Oba et al., 2010 (ref. ⁸⁹)
Zeb2 (SIP1)	Zinc finger	Verschueren et al., 1999 (ref. ⁹⁰)	Comijn et al., 2001 (ref. ³¹)	Oba et al., 2010 (ref. ⁸⁹)
Twist1	bHLH	Thisse et al., 1988 (ref. ⁹¹)	Yang et al., 2004 (ref. ³⁰)	Kida et al., 2007 (ref. ⁹²); Lovisa et al., 2015 (ref. ⁷⁰)

Snail adalah keluarga faktor transkripsi berbasis *zinc finger* yang terdiri dari Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), dan Snail3 (Smuc). Seluruh subfamili Snail memiliki domain SNAG yang berfungsi sebagai domain represor transkripsi. Snail1 berperan paling penting karena memiliki dua tambahan domain fungsional, yaitu domain regulatori yang tersusun dari domain *nuclear export signal* dan domain *serine-rich*. Seluruh domain Snail1 berperan dalam downregulasi ekspresi berbagai target protein yang memicu EMT, seperti E-cadherin (Tang *et al.*, 2021). Snail1 yang terfosforilasi di nukleus akan terdefosforilasi oleh SCP1-GSK3 β , mempertahankan Snail1 di nukleus untuk melakukan represi pada gen epitel dan aktivasi gen mesenkim. Di sisi lain, Twist difosforilasi oleh MAPK, JUN N-terminal

kinase (JNK) dan ERK, melindunginya dari degradasi, dengan demikian memicu EMT. Selanjutnya, kompleks Sumo-ZEB2 dapat separasi di nukleus dan kemudian memicu EMT (Lamouille *et al.*, 2014) (**Gambar 2.14**).



Gambar 2.14 Peran faktor transkripsi dalam memicu EMT (Vermeulen *et al.*, 2010)

Ketiga faktor transkripsi tersebut dipicu oleh berbagai sinyal yang bekerja sama untuk memicu EMT. Tiga jalur sinyal akan dibahas di bawah yaitu TGF- β , faktor pertumbuhan, dan Wnt β catenin.

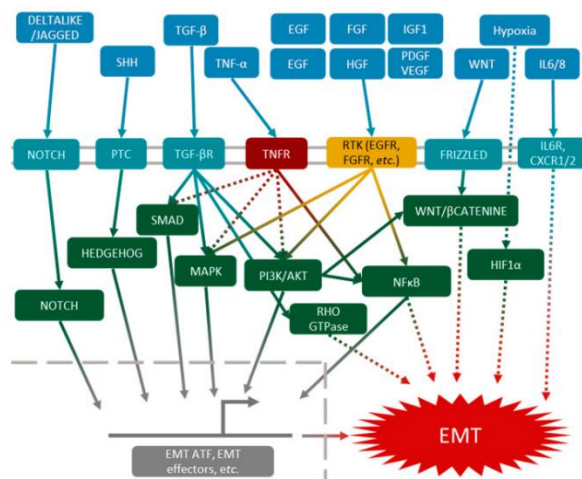
1. TGF- β

Jalur TGF- β adalah yang pertama dijelaskan dalam induksi EMT. Reseptor TGF- β dapat mengaktifkan beberapa jalur intraseluler, seperti jalur SMAD kanonik, yang mengarah ke ekspresi EMT-ATFs. Jalur lain, seperti Rho-GTPase, PI3K/AKT, dan Trombosit teraktivasi, diaktifkan oleh reseptor TGF- β , dan juga dapat menginduksi EMT. Semua jalur ini berlebihan dan dapat bertindak bersama-sama atau terpisah, yang menjelaskan pluralitas fenotip EMT (Hao *et al.*, 2019).

Dalam organogenesis, TGF- β terlibat dalam proses EMT di ginjal, endokardial, dan pembentukan katup atrioventrikular selanjutnya. Hampir semua tipe sel responsif terhadap TGF- β dan diproduksi oleh banyak sel imun dan nonimun. TGF- β juga mengatur proliferasi, migrasi, diferensiasi, dan proses kelangsungan hidup, dan pada kanker, dapat bertindak baik untuk menekan pertumbuhan tumor atau mengaktifkan perkembangan tumor, tergantung pada konteks seluler (Acloque *et al.*, 2009).

Induksi EMT oleh TGF- β melibatkan kombinasi Smad-dependent dan Smad-independent pada *adherens junction*. Aktivasi Smad secara transkripsi

mengatur faktor-faktor utama yang terkait dengan EMT, termasuk Snail, Snail2 (Slug), Twist, dan HMGA2 (grup mobilitas tinggi A2). Aktivitas TGF- β yang sangat independen menyebabkan fosforilasi Par6 yang diikuti dengan disorganisasi kompleks Par, yang menyebabkan hilangnya polaritas. Selain mempromosikan EMT melalui protein SMAD, transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF β) dapat mengaktifkan jalur PI3K – AKT, ERK Trombosit teraktivasi, p38 Trombosit teraktivasi dan JUN N-terminal kinase (JNK). T β RI memfosforilasi protein adaptor SRC homology 2 domain-containing-transforming A (SHCA), yang menciptakan situs docking untuk protein 2 yang terikat reseptor faktor pertumbuhan (GRB2) dan son of sevenless (SOS) dan memulai RAS-RAF-MEK. Aktivasi p38 Trombosit teraktivasi dan JNK yang diinduksi TGF β dihasilkan dari hubungan faktor terkait reseptor TNF 6 (TRAF6) dengan kompleks reseptor TGF β , yang sebagai hasilnya mengaktifkan kinase teraktivasi TGF β 1 (TAK1) dan p38 Trombosit teraktivasi dan JNK (Fuxe *et al.*, 2010) (**Gambar 2.15**).



Gambar 2.15 Peran TGF β dalam memicu EMT (Lachat *et al.*, 2021)

2. Faktor pertumbuhan

Beberapa faktor pertumbuhan yang bekerja melalui reseptor tirosin kinase (RTK), termasuk faktor pertumbuhan epidermal (EGF), faktor pertumbuhan fibroblast (FGF), faktor pertumbuhan fibroblast (FGF), dan faktor pertumbuhan seperti insulin (IGF), dapat menginduksi EMT. FGF terlibat dalam EMT dalam berbagai cara. FGF-4 dan FGF-8 berperan dalam mengendalikan pembentukan mesenkim untuk memediasi pola lapisan mesodermal selama gastrulasi. FGF-2 dapat menginduksi EMT dalam sel epitel tubulus dengan meningkatkan ekspresi gen yang mengkode vimentin dan FSP-1 dan menginduksi aktivitas MMP-2 untuk

meningkatkan motilitas sel. Hasil ini konsisten dengan pengamatan bahwa kelimpahan FGF-2 meningkat pada jaringan ginjal fibrotik. FGF-2 juga mampu menginduksi perubahan sitoskeleton aktin melalui crosstalk antara Rho GTPase dan PI3K, yang mendorong fenotip mesenkim memanjang yang terkait dengan motilitas sel. Motilitas sel juga distimulasi oleh EGF dengan cara yang bergantung pada integrin $\alpha 2$ dalam sel epitel. Pengamatan tambahan bahwa EGF mendefosforilasi dan menonaktifkan FAK menunjukkan bahwa penghambatan FAK yang dimediasi EGF memfasilitasi pelepasan sel dari matriks ekstraseluler untuk mengaktifkan motilitas sel (Strutz *et al.*, 2002).

Overekspresi IGF-1 dalam sel epitel menyebabkan EMT, peningkatan migrasi, dan penurunan kelimpahan E-cadherin melalui aktivasi β -catenin. IGF-1 mengaktifkan NF- κ B untuk meningkatkan ekspresi SNAI1 di epitel mammae dan meningkatkan ekspresi ZEB1 melalui aktivasi ERK. Menariknya, faktor pertumbuhan hepatosit (HGF) juga terlibat dalam EMT melalui induksi Snail1 atau Snail2 dengan cara yang bergantung pada tipe sel. Destabilisasi desmosom juga dilakukan oleh HGF, yang menunjukkan kemampuan RTK untuk menginduksi perubahan dalam berbagai cara sebagai respons terhadap pengikatan ligan (Kim *et al.*, 2007).

PDGF mengontrol ekspresi CDH2 (pengkodean N-cadherin) di mesoderm dengan mengaktifkan jalur PI3K, memberikan informasi terarah untuk pembentukan coretan primitif. Penghambatan N-cadherin terjadi terutama melalui hilangnya Akt terfosforilasi. Selain itu, PDGF menginduksi fosforilasi RNA helicase p68, yang mempromosikan EMT melalui translokasi nuklir β -catenin dengan cara yang tidak bergantung pada Wnt di berbagai lini sel kanker epitel. Penurunan aktivitas MMP-2 dan penghambatan migrasi sel mesenkim diamati setelah ablasi reseptor PDGF, mengakibatkan malformasi kraniofasial dan katup jantung (Yang *et al.*, 2008).

EGF mampu menginduksi EMT melalui represi E-cadherin dalam beberapa cara. Setelah mengikat EGF ke reseptornya, E-cadherin diinternalisasi dari membran sel, mengurangi kontak sel-sel dan melemahkan lapisan epitel. Selain itu, EGF juga menginduksi ekspresi SNAI1 dan TWIST, yang menyebabkan represi terhadap promotor CDH1. Selama perkembangan, ekspresi gen yang mengkode glikoprotein Cripto1 dikaitkan dengan pembentukan garis primitif dan spesifikasi terhadap garis keturunan mesodermal dan endodermal. Konsisten dengan pengamatan ini adalah data yang menunjukkan peningkatan penanda

mesenkim N-cadherin dan vimentin ketika Cripto1 diekspresikan dalam epitel mammae. Cripto1 dianggap tidak bertindak seperti ligan, melainkan mengandalkan kemampuannya untuk berinteraksi dengan Nodal dan berkontribusi pada pensinyalan Wnt (Lo *et al.*, 2007).

3. Wnt β -catenin

Sinyal Wnt ditransduksi melintasi membran plasma oleh reseptor Frizzled dan low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Dengan tidak adanya sinyal, β -catenin difosforilasi oleh kompleks GSK-3 β , Axin, dan penekan tumor adenomatous polyposis coli (trombosit teraktivasiC), yang mengasingkan β -catenin dalam sitoplasma dan menandainya untuk degradasi proteasomal. Aktivasi ligan Frizzled oleh Wnt menghasilkan fosforilasi LRP6 oleh GSK-3 β dan rekrutmen Disheveled (Dvl) dan Axin ke membran plasma. Karena tidak dapat membentuk kompleks dengan Axin, GSK-3 β kemudian tidak dapat memfosforilasi β -catenin, sehingga memungkinkannya melakukan translokasi ke nukleus (Fodde and Brabletz, 2007).

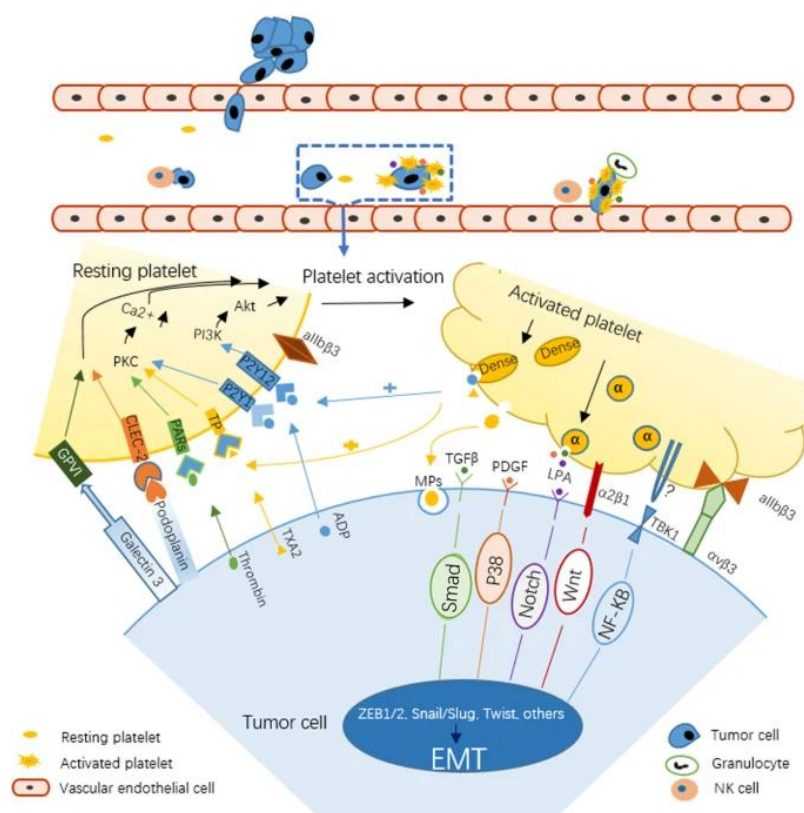
β -catenin nukleus berikatan dengan anggota keluarga faktor transkripsi TCF/LEF untuk memicu EMT. Selama gastrulasi, β -catenin membentuk kompleks dengan LEF-1 untuk mengikat dan menghambat transkripsi CDH1 (Gambar 5) dan menginduksi EMT. Pensinyalan Wnt sangat penting untuk pembentukan sumbu primer selama embriogenesis vertebrata: embrio tikus yang kekurangan Wnt3 tidak membentuk dan mengembangkan pola saraf anterior-posterior. Pada banyak jenis kanker, pensinyalan Wnt tidak aktif secara tepat dan secara langsung menginduksi ekspresi Snail1 dan Snail2, menurunkan E-cadherin, dan meningkatkan fibronectin. Mutasi pada trombosit teraktivasiC dan komponen lain dari jalur pensinyalan β -catenin telah diidentifikasi pada kanker kolorektal metastatik, menyoroti pentingnya jalur Wnt pada EMT selama perkembangan kanker (Vermeulen *et al.*, 2010).

2.6 Peran trombosit teraktivasi dalam memicu transisi epitel-mesenkim pada kanker kolorektal

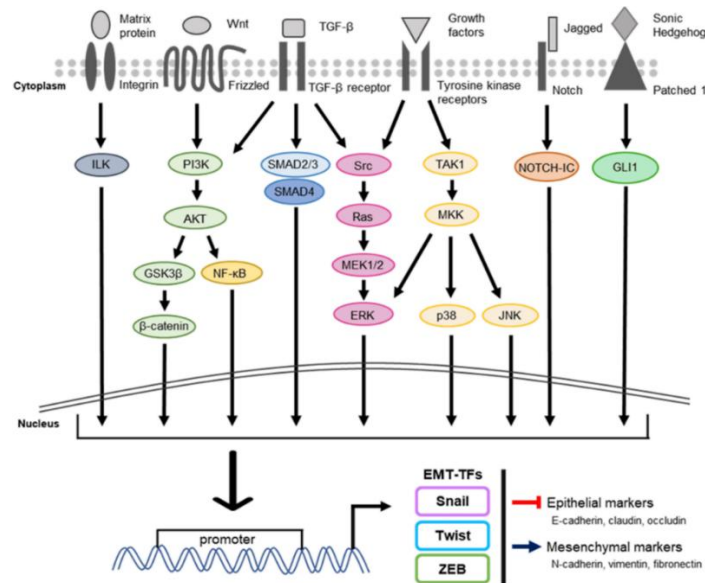
Hubungan antara trombosis dan kanker menunjukkan hubungan dua arah di mana sel tumor dapat memicu trombosit teraktivasi (dan setelahnya trombosit teraktivasi dapat memicu progresivitas kanker yang ditandai dengan progresi EMT. Sel tumor memicu pengeluaran ADP, TXA₂, trombin yang dapat berikatan dengan reseptor trombosit P2Y₁ dan P2Y₁₂, tromboksan-prostanoid (TP), dan reseptor teraktivasi

proteinase (PAR). Interaksi mengaktifkan jalur pensinyalan reseptor berpasangan protein G dan akhirnya menyebabkan perubahan konformasi membran integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ dari afinitas rendah menjadi afinitas tinggi. Hal ini memicu aktivasi trombosit. Integrin dengan afinitas tinggi pada trombosit teraktivasi mulai melekat pada sel tumor, menjubahi sel tumor dan memicu perlekatan trombosit lain (*platelet cloaking*). Sel tumor juga dapat mengekspresikan protein pengikat (podoplanin, PDPN) yang dapat berikatan dengan protein adhesi permukaan trombosit (seperti reseptor mirip lektin tipe C 2, CLEC-2) untuk mendorong aktivasi trombosit (Wang *et al.*, 2022b) (**Gambar 2.16**).

Kombinasi sel tumor dan trombosit teraktivasi membentuk *platelet cloaking*, membentuk lingkungan mikro tumor yang mempertahankan konsentrasi mediator yang relatif tinggi untuk mengaktifkan jalur signalling EMT. Berbagai aktivasi jalur sinyaling proliferasi seperti Wnt, $\text{TGF}\beta$, faktor pertumbuhan, *Jagged*, protein matriks, dan *Sonic Hedgehog* memicu EMT. Keseluruhan jalur ini dapat mengaktifkan faktor transkripsi utama Snail, Twist, dan ZEB yang nantinya mempromosikan EMT di dalam nukleus (Kang *et al.*, 2021) (**Gambar 2.17**).



Gambar 2.16 Peran trombosit teraktivasi dalam EMT (Wang *et al.*, 2022b)

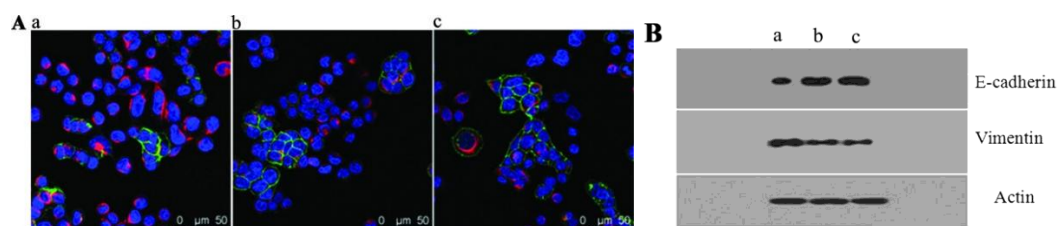


Gambar 2.17 Mekanisme EMT (Kang *et al.*, 2021)

Kebanyakan penelitian saat ini hanya menilai hubungan hitung trombosit yang tinggi terhadap proses EMT dan tidak meneliti mengenai trombosit teraktivasi secara langsung. Padahal, trombositosis tidak dapat memicu EMT karena harus teraktivasi terlebih dahulu (Yun *et al.*, 2016). Beberapa penelitian berikut telah dilakukan secara invitro dan invivo dalam menemukan hubungan trombosit teraktivasi dengan EMT pada kanker kolorektal. Biomarker trombosit teraktivasi yang digunakan kebanyakan adalah PDGF, P-selektin, dan PAR. EMT dapat dinilai secara langsung atau kombinasi E-cadherin menurun dan Vimentin yang meningkat.

Steller *et al.* (2013) mempelajari hubungan antara ekspresi PDGFRB, EMT, dan metastasis pada kelompok kanker kolorektal manusia dengan analisis profil ekspresi gen. Dengan pemeriksaan flow sitometri, bahan isolat trombositosis yang didapatkan dari plasma manusia diperiksa. Hanya 5-10% sel tumor yang positif untuk selektin P yang menjadi marker trombosit teraktivasi. Ditemukan bahwa *trombositosis* tidak mengikat sel tumor, hanya 5% trombosit teraktivasi yang mengadakan reaksi dengan sel tumor. Lebih lanjut, dengan pemeriksaan bioinformatika, ekspresi PDGFRB ditemukan berhubungan erat dengan sinyaling matriks ekstraseluler, TGFβ, dan EMT. Lebih spesifik, ekspresi PDGFRB ditunjukkan berhubungan erat dengan dengan keenam marker EMT seperti vimentin dan N-cadherin. Sebaliknya, PDGFRB berkorelasi negatif dengan gen epitel, termasuk E-cadherin (CDH1), plakophilin-2, dan occludin (Steller *et al.*, 2013).

Jia *et al.* (2015) bertujuan untuk menguji peran aktivasi trombosit yang distimulasi oleh protease-activated receptor-1 (PAR1) dalam EMT kanker kolorektal dan untuk mengidentifikasi mekanisme yang mendasarinya. PAR adalah subfamili dari reseptor berpasangan G-protein transmembran tujuh jalur, yang dilepaskan dalam aktivasi trombosit. Dengan pemberian PAR, diketahui bahwa P-selektin naik secara signifikan menunjukkan dengan kuat bahwa kondisi trombosit telah teraktivasi (trombosit teraktivasi). Pemeriksaan Western Blot dan imunofluoresensi dilakukan untuk menentukan ekspresi marker EMT E-cadherin dan vimentin. Ditemukan bahwa pada supernatan sel kanker kolorektal yang diberikan PAR menunjukkan peningkatan vimentin dan penurunan E-cadherin secara signifikan, yang menandakan EMT telah terjadi. Lebih lanjut, pemeriksaan kemotaksis sel dengan migrasi Transwell menunjukkan hubungan yang positif. Penelitian ini memberikan bukti yang menunjukkan mekanisme molekuler yang berpotensi mendasari metastasis kanker kolorektal dan berkontribusi mendukung nilai potensial terapi antiplatelet ini untuk kanker kolorektal (Jia *et al.*, 2015) (**Gambar 2.18**).

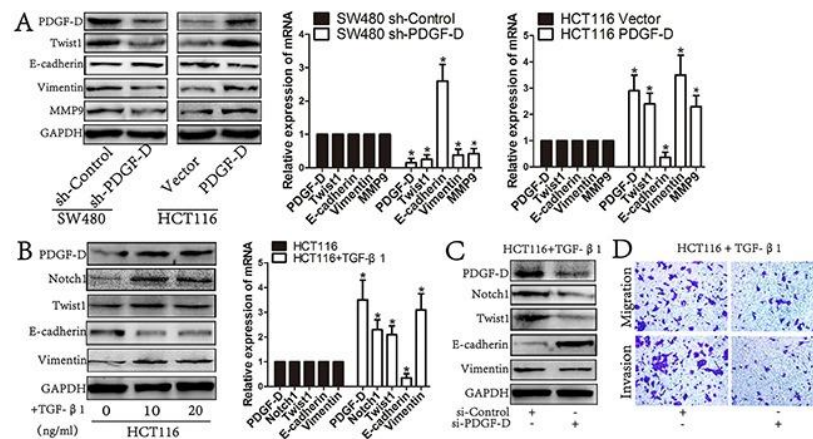


Gambar 2.18. Stimulasi PAR-1 pada sel kanker kolorektal

(A) Gambar imunofluoresensi konfokal menunjukkan kadar vimentin (merah) dan E-cadherin (hijau) dalam sel SW620 setelah 24 jam pengobatan dengan (a) supernatan trombosit yang diaktifkan PAR1, (b) supernatan trombosit yang tidak diaktifkan dan (c) kontrol. Pembesaran SP, $\times 400$. (B) Ekspresi protein E-cadherin atau vimentin dalam sel SW620 dideteksi dengan western blotting. (a) supernatan trombosit yang teraktivasi PAR1, (b) supernatan trombosit yang tidak teraktivasi dan (c) kontrol sedang. PAR1, reseptor-1 yang diaktifkan protease. (Jia *et al.*, 2015)

Chen *et al.* (2017) juga menunjukkan hal yang sama. Ekspresi PDGF-D lebih tinggi pada jaringan kanker kolorektal dan berkorelasi positif dengan stadium tumor ($p= 0,02$), stadium kelenjar getah bening ($P= 0,04$), dan diferensiasi sel tumor ($p= 0,03$). Untuk menyelidiki apakah PDGF-D dapat mempromosikan EMT dalam sel kanker kolorektal, dilakukan *knockdown* level PDGF-D pada lini sel kanker kolorektal SW480. Western blot dan RT-PCR menunjukkan penurunan regulasi ekspresi Twist1, Vimentin dan MMP9, sedangkan E-cadherin meningkat. Sebaliknya, pada sel HCTT16 dengan PDGF-D yang stabil, PDGF-D meningkatkan EMT dengan peningkatan Twist1, Vimentin, dan MMP9, serta

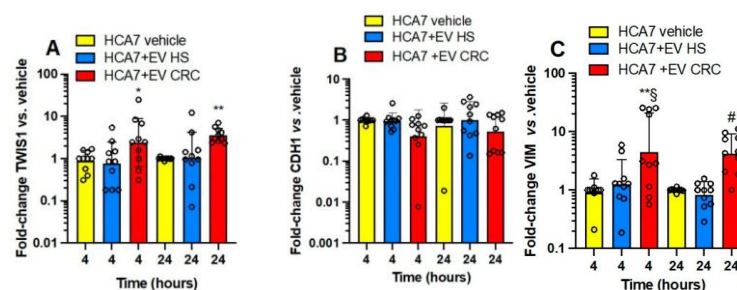
penurunan E-cadherin. Bersama-sama, data ini menunjukkan bahwa PDGF-D mendorong transformasi EMT dalam sel kanker kolorektal (**Gambar 2.19**).



Gambar 19. PDGF memicu EMT pada sel kanker kolorektal.

A. Western blot dan RT-PCR mengungkapkan bahwa ekspresi bawah PDGF-D memicu transformasi EMT dengan penurunan ekspresi Twist1, Vimentin, MMP9 dan peningkatan E-cadherin. Sebaliknya, ekspresi PDGF-D mendorong transformasi EMT dalam sel CHT116. B. Ekspresi PDGF-D meningkat secara signifikan pada sel HCT116 yang diberikan dengan TGF-β1 dengan peningkatan ekspresi Twist1, Vimentin dan penurunan E-cadherin. C. Western blot menunjukkan bahwa penghambatan PDGF-D meningkatkan kadar E-cadherin dan menurunkan kadar vimentin, MMP9, Twist1 dan Notch1 pada sel HCT116 yang diobati dengan TGF-β1. D. Inhibisi PDGF-D menyebabkan penurunan migrasi dan invasi pada sel HCT116 yang diberikan TGF-β1 (Chen *et al.*, 2017).

Contursi *et al.* (2023) meneliti trombosit teraktivasi melalui *platelet-derived extracellular vesicles* terhadap EMT sel kanker kolorektal yang ditandai dengan gen TXB2 dan COX2-PTSG2. Trombosit diisolasi dari sampel darah pasien kanker kolorektal dan diproses di laboratorium untuk mendapatkan *washed platelet released mEV*. Setelah diberikan pada lini sel kanker kolorektal, didapatkan peningkatan secara signifikan Twist1, penurunan E-cadherin, dan peningkatan Vimentin. Percobaan ini ditemukan konsisten pada 4 lini sel kanker yang digunakan (**Gambar 2.20**) (Contursi *et al.*, 2023).



Gambar 2.20 Efek mEV trombosit pada ekspresi penanda gen EMT dalam kultur garis sel adenokarsinoma kolon manusia HCA7.

Sel kanker ($0,5 \times 10^6$) diinkubasi selama 4 atau 24 jam dengan kanker kolorektal atau HS EVs (100 µg), dan ekspresi gen (A) TWIST1 ($p < 0,05$), (B) CDH1 (nama protein E-cadherin) ($p < 0,01$), (C) VIM (nama protein vimentin) ($p < 0,01$) (Contursi *et al.*, 2023)

Walaupun secara tidak langsung menilai EMT, peningkatan MMP dapat menjadi salah satu marker dalam peningkatan EMT. Radwizon-Balicka *et al.* (2014) menemukan bahwa trombosit meningkatkan fosforilasi p38Trombosit teraktivasi dan peningkatan regulasi MMP-9 pada lini sel kanker kolorektal. Di sisi lain, inhibisi buatan pada p38Trombosit teraktivasi menyebabkan penurunan regulasi MMP-9 dan invasi sel kanker usus besar secara signifikan. Eksperimen selanjutnya menunjukkan bahwa trombospodin 1 (TSP1) yang dilepaskan terutama dari trombosit sel kanker, memicu fosforilasi p38Trombosit teraktivasi, aktivasi MMP-9, dan invasi sel kanker kolorektal (Radziwon-Balicka *et al.*, 2014).

Di sisi lain, Jiang *et al.* (2018) menunjukkan ekspresi protein PDGF-D sangat tinggi pada jaringan (53.3%). Lebih lanjut, penelitian *knockdown* PDGF-D pada sel kanker kolorektal menunjukkan penurunan kapasitas invasi dan proliferasi dari sel kanker kolorektal. Peningkatan protein PDGF-D secara tidak langsung menunjukkan peningkatan EMT melalui peningkatan marker MMP-9 dan Notch (Jiang *et al.*, 2018).

Kassasir *et al.* (2023) mempelajari berbagai garis sel kanker kolorektal, termasuk HT29 yang mirip epitel dan SW480 dan SW620 yang mirip mesenkim. Pada kondisi trombosit teraktivasi yang mensekresikan mikropartikel, partikel dapat masuk ke sel epitel dan mesenkim dalam meningkatkan potensi invasifnya dengan menginduksi ekspresi dan pelepasan MMP-2 dan MMP-9 melalui jalur MAPK.

2.7 Peran trombosit teraktivasi dalam memicu faktor transkripsi Snail1 pada kanker kolorektal

Proses EMT pada kanker kolorektal pada umumnya sama dengan proses EMT umumnya, Perbedaannya adalah pada faktor transkripsi pemicu dan signaling yang diaktifkan. Faktor transkripsi yang paling berperan penting dari 3 regulator mayor adalah Snail1. Belum ada penelitian secara spesifik mengenai hubungan secara langsung trombosit teraktivasi dengan EMT karena kebanyakan penelitian hanya berfokus pada trombosit secara umum.

Mayoritas penelitian terkonsentrasi pada jalur sinyaling EMT, seperti TGF β dan β -katenin, di mana faktor transkripsi jarang diteliti. Namun, sebagai faktor terakhir sebelum EMT diaktifkan, faktor transkripsi lebih menjanjikan target terapeutik. Meta analisis Ahmadiankia *et al.* (2020) pada kanker kolorektal,

menunjukkan korelasi yang signifikan antara ekspresi Twist (OR, 1.46; 95%CI 1.03–2.09), Snail1 (OR, 3.43; 95%CI, 1.98–5.93) dan ZEB2 (OR, 2.42; 95%CI, 1.09–5.40) dengan metastasis lanjut dan rendahnya survival. Namun, penelitian ini tidak membahas mengenai hubungan dengan trombosit maupun trombosit teraktivasi (Ahmadiankia and Khosravi, 2020).

Keluarga Snail dari faktor transkripsi zinc-finger, terdiri dari Snail1, SNAIL2, dan SNAIL3 (masing-masing juga dikenal sebagai SNAIL, SLUG, dan SMUC), mengaktifkan program EMT selama perkembangan, fibrosis, dan kanker. Snail1 memiliki empat motif *zinc-finger* di wilayah terminal karboksinya, yang berikatan dengan rangkaian gen target DNA E-box. Peristiwa ini memfasilitasi perekrutan *polycomb repressive complex 2* (PRC2), yang memiliki metiltransferase dari *zeste homolog 2* (EZH2). Perekrutan PRC2 menyebabkan metilasi DNA serta modifikasi histone represif seperti H3K9me2, H3K9me3, dan H3K27me3 pada promotor gen target, yang mengakibatkan silensi epigenetik (Lin *et al.*, 2014b).

Ekspresi dan fungsi Snail1 dapat diatur pada level transkripsional, level pascatranskripsional, dan level pascatranslasi. Transkripsi Snail1 melibatkan faktor transkripsi lain, seperti NF- κ B, YY1, dan bahkan Snail1 itu sendiri. Secara khusus, beberapa faktor transkripsi yang mampu mengatur Snail1 adalah komponen jalur terkait embriogenesis, termasuk komponen jalur Hippo, Gli1 (Hedgehog), Smad (TGF β), dan banyak lainnya. Regulasi Snail1 pada tingkat pasca transkripsi dibuktikan dengan modifikasi N6-Methyladenosine (m6A) pada mRNANYa (Barberà *et al.*, 2004).

Snail1 mempromosikan EMT terutama melalui penurunan E-cadherin. Snail berikatan dengan rangkaian DNA E-box dari promotor E-cadherin dan merekrut histone deasetilase, kompleks represif Polycomb 2, demethylase spesifik Lys, G9a, dan penekan homolog 1. Kompleks ini menyebabkan modifikasi histon akibat metilasi dan asetilasi pada histone H3 Lys 4, H3K9, dan H3K27, yang mengakibatkan penekanan aktivitas promotor E-cadherin. Selain itu, Snail1 dapat menginduksi ekspresi gen yang terkait dengan fenotip mesenkim, seperti fibronektin, N-cadherin, dan kolagen. Selain mengatur gen epitel dan mesenkim, Snail1 juga meningkatkan regulasi faktor transkripsi EMT lainnya, seperti SLUG, TWIST, dan ZEB1. Lebih lanjut, Snail1 dapat berinteraksi dengan β -catenin dan mempromosikan jalur pensinyalan WNT/ β -catenin yang juga terlibat dalam EMT. Oleh karena itu, peningkatan regulasi Snail1 dianggap sebagai langkah besar dalam EMT. Jalur pensinyalan yang beragam—jalur pensinyalan NOTCH, TGF- β ,

dan WNT/ β -catenin, bekerja sama dalam inisiasi dan perkembangan EMT dengan mengaktifkan tingkat ekspresi Snail1 yang lebih tinggi. Peran penting Snail1 di kanker kolorektal telah ditentukan sebelumnya. Dalam penelitian terbaru, Snail1 dibuktikan berkontribusi terhadap penurunan regulasi E-cadherin dan reseptor vitamin D pada kanker usus besar, yang menyebabkan kegagalan pengobatan analog vitamin D. Snail1 juga merupakan pemain penting dalam hubungan antara EMT dan sifat sel induk kanker kolorektal, karena Snail1 mengaktifkan ekspresi IL-8 dengan mengikat langsung ke E-box E3/E4, yang menginduksi aktivitas sel induk kanker (Vu and Datta, 2017).

Keterlibatan Snail1 pada kanker kolorektal masih kontroversial dan belum ada penelitian mengenai hubungan Snail1 dan kanker kolorektal dengan trombositis. Penelitian yang ada hanya menilai bahwa Snail1 memicu EMT, namun baru ada satu penelitian yang menunjukkan PDGF dari sel kanker dapat memicu Snail1, yang meningkatkan matriks ekstraseluler, tanpa meneliti marker EMT.

Franci *et al.* (2009) menunjukkan bahwa injeksi antibodi monoklonal spesifik Snail1 intratumoral dapat menghambat pertumbuhan tumor dan metastasis yang diikuti oleh peningkatan jumlah limfosit yang menginfiltrasi tumor stroma. Imunoreaktivitas snail1 pada stroma tumor berhubungan dengan metastasis jauh ($p = 0,006$) dan kelangsungan hidup spesifik pasien yang lebih rendah ($p = 0,011$) (Franci *et al.*, 2009).

Fan *et al.* (2012) melakukan penelitian untuk menentukan peran Snail1 dalam memicu EMT pada sel kanker kolorektal. Snail1 diekspresikan secara berlebihan pada blok parafin jaringan kanker kolorektal manusia, dan ditemukan secara signifikan memicu EMT, meningkatkan migrasi dan invasi sel ($P < 0,002$ vs. kontrol). Ekspresi snail yang berlebihan juga menyebabkan peningkatan metastasis in vivo ($P < 0,002$ vs kontrol) (Fan *et al.*, 2012).

Brzozowa-Zasada *et al.* (2021) menunjukkan bahwa pada pasien kanker kolorektal, ekspresi Snail1 dapat bertindak sebagai faktor independen yang menyebabkan kelangsungan hidup yang lebih buruk. Tingkat kelangsungan hidup secara keseluruhan pada kelompok pasien dengan tingkat ekspresi Snail1 yang rendah secara signifikan lebih lama dibandingkan pasien dengan tingkat imunoreaktivitas Snail1 yang sedang atau kuat ($p < 0,001$; 44 vs 21 bulan). Analisis multivariat menunjukkan bahwa tingkat diferensiasi tumor (HR = 2,150; 95% CI: 1,380–3,349, $p = 0,001$) dan ekspresi Snail1 (HR = 3,901; 95% CI: 2,436–6,247,

$p < 0,001$) adalah faktor risiko independen untuk kelangsungan hidup yang lebih buruk pada kanker kolorektal (Brzozowa *et al.*, 2015).

Herrera *et al.* (2018) menemukan hubungan antara PDGF dengan Snail1 pada sampel tumor dari kanker kolorektal. Ekspresi reseptor Snail1 dan PDGF yang tinggi dikaitkan dengan prognosis yang buruk pada kanker kolorektal. Fibroblas yang teraktivasi PDGF merangsang remodeling dan deposisi serat matriks ekstraseluler. Lebih lanjut ditemukan Snail merupakan faktor penting untuk organisasi matriks ekstraseluler melalui jalur FAK. Kemudian, ditemukan pada sel yang diberikan PDGF, kebanyakan menunjukkan level Snail1 yang tinggi, diikuti dengan peningkatan translokasi Snail1 ke nukleus. Jalur yang paling sensitif adalah melalui sinyaling FAK (Herrera *et al.*, 2018).

Di sisi lain, Kroepil *et al.* (2013) tidak menemukan korelasi yang menonjol antara ekspresi Snail1 dan hilangnya E-cadherin pada jaringan kanker, mereka mengamati korelasi yang signifikan antara ekspresi Snail1 pada tumor dan ekspresi Snail1 pada metastasis kelenjar getah bening. Menariknya, mereka tidak menemukan bukti ekspresi Snail1 dengan parameter klinis seperti stadium N, usia atau jenis kelamin. Perlu dicatat bahwa juga tidak ada hubungan antara ekspresi Snail1 dan parameter klinis yang terungkap pada adenokarsinoma pada saluran pencernaan bagian atas (Kroepil *et al.*, 2013).