

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/266591034>

Ekspresi BIM Dan MDM2 pada Kanker Servik yang diberi Pengobatan Kemoradioterapi Pengobatan Kemoradiote....

Conference Paper · April 2014

DOI: 10.13140/2.1.1547.6482

CITATIONS

0

READS

360

26 authors, including:



Iin Kurnia

National Nuclear Energy Agency, Jakarta, Ind...

19 PUBLICATIONS 12 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Teja Kisnanto

Badan Tenaga Nuklir Nasional

15 PUBLICATIONS 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Micronucleus Frequencies and DNA Repair Genes Polymorphisms in High Background Radiation Area Inhabitants [View project](#)



Detection Biomarker Gamma H2AX, 53BP1 in Medical Radiation Worker [View project](#)

Ekspresi BIM dan MDM2 pada Kanker Servik yang diberi Pengobatan Kemoradioterapi

Iin Kurnia¹, Septika Ningsih², Budiningsih Siregar³, Mellova Amir², Setiawan Soetopo⁴, Irwan Ramli³, Tjahya Kurjana⁴, Andrijono³, Bethy S Hernowo⁴, Maringan DL Tobing⁴, Devita Tetriana¹, Teja Kisnanto¹

¹ Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta

² Program Studi Farmasi, Institut Sains Dan Teknologi Nasional, Jakarta

³ Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

⁴ Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung

korespondensi: kurnia@batan.go.id

Abstrak—Keberhasilan kemoradioterapi ditentukan oleh faktor biologi dan faktor fisika. Bim dan MDM2 merupakan biomarker yang terkait dengan pertumbuhan dan kematian sel kanker. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui korelasi antara Bim dan MDM2 sebelum kemoradioterapi dan ekspresinya di respon kemoradioterapi yang berbeda dari kanker servik. Penelitian dilakukan dengan cara mengamati ekspresi protein Bim dan MDM2 dengan teknik immunohistokimia pada sediaan mikroskopik jaringan kanker servik dari 25 pasien sebelum menerima pengobatan. Respon kemoradioterapi diamati setelah pasien selesai menerima pengobatan. Tingkat ekspresi Bim dan MDM2 diamati dengan teknik IRS (Immuno Reactive Score) dan respon radioterapi pada organ servik dengan metode pelvic control. Diperoleh data tidak adanya korelasi antara ekspresi Bim dan MDM2 ($p=0,32$) sebelum radioterapi, tidak ditemukan perbedaan ekspresi MDM2 ($p=1,00$) dan kecenderungan perbedaan ekspresi Bim pada respon terhadap kemoradioterapi yang berbeda ($p=0,20$). Dapat disimpulkan bahwa ekspresi Bim yang tinggi cenderung memberikan respon sel kanker yang lebih baik terhadap kemoradioterapi.

Kata Kunci: Bim, MDM2, kanker servik, radioterapi

Abstract – The success of chemoradiotherapy is determined by biological and physical factors. Bim and MDM2 are biomarkers that related to growth and death of cancer cell. The purpose of this study was to determine the correlation between Bim and MDM2 before treatment and its expression in different chemoradiotherapy response of cervical cancer. The study was conducted by observing Bim and MDM2 protein expression by immunohistochemistry on microscopic slide of cancer tissue of 25 patients before receiving treatment of chemoradiotherapy. Chemoradiotherapy response observed after completion of treatment by pelvic control method. Bim and MDM2 level expression was observed with the IRS (Immuno Reactive Score) technique and the response to radiotherapy in cervical organs pelvic control method. The results show that no correlation was found between Bim and MDM2 expression ($p= 0.32$) prior to radiotherapy and there was a tendency of positive association between Bim expression in response to chemoradiotherapy ($p =0.20$). In conclusion that high expression of Bim tend give the better response of cancer cells to chemoradiotherapy.

Key words: Bim, MDM2, Cervical Cancer, Radiotherap

I. PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan penyakit yang sering ditemukan di negara berkembang. Di Indonesia berdasarkan kasus yang tercatat berdasarkan registrasi Pusat Patologi Anatomi di Sejumlah Rumah Sakit di Indonesia, kanker servik menempati urutan kedua setelah kanker payudara. Penderita biasanya datang ke rumah sakit dalam stadium lanjut lokal. Salah satu pengobatan kanker servik stadium lanjut lokal adalah radioterapi, pengobatan radioterapi juga dapat dilakukan dalam bentuk *concurrent* kemoradioterapi [1-3].

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram, bentuk kematian aktif sel ini sangat penting secara fungsional dan biologis [4,5]. Tingkat apoptosis dikaitkan dengan respons radiasi pada jaringan kanker dan berperan dalam pengobatan kanker dengan 2 alasan Pertama, apoptosis terkait dengan radiosensitivitas, (salah satu bentuk kematian sel akibat radiasi), kedua bahwa apoptosis juga memengaruhi proliferasi sel [6,7].

Bim adalah protein yang termasuk dalam BH3 (*Bcl-2 homologi 3 domain*) yang merupakan keluarga dari Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), memiliki peran penting terhadap apoptosis [8]. Ekspresi dari Bim dapat menyebabkan apoptosis dan menghambat pertumbuhan sel kanker [9].

MDM2 (*Murine Double Minute*) merupakan protein yang dapat menginaktivasi protein P53. Fungsi P53 adalah pengaturan siklus sel dan apoptosis. Dari penelitian oleh Hae *et al.* [10] pada sel fibroblast paru-paru manusia yang diradiasi *in vitro* ditemukan adanya peningkatan apoptosis akibat radiasi dengan cara peningkatan aktivasi P53 dan penurunan fungsi MDM2.

Sejumlah publikasi telah menjelaskan adanya hubungan antara apoptosis sebelum radioterapi dengan respon positif jaringan kanker terhadap radioterapi [10,12,13]. Masih sedikit publikasi yang membahas hubungan antara biomarker yang terkait dengan dan respon radioterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara Bim dan MDM2 serta

hubungannya dengan respon kanker servik terhadap kemoradioterapi.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Sediaan Mikroskopik

Sediaan mikroskopik berasal dari 25 sampel jaringan biopsi yang diambil 3 - 5 hari sebelum pemberian kemoradioterapi. Jaringan biopsi diambil dari penderita karsinoma sel skuamosa servik uteri (KSS) stadium lanjut lokal yang dirujuk oleh Departemen Obstetri Ginekologi ke Departemen Radioterapi di RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo, Jakarta) atau RSHS (Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung) tahun 2010-2012 untuk memperoleh tindakan kemoradioterapi. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PT 02.FK/Etik/2010) dan RSHS (LB 04.01/A05/EC/061/VI/2012). Sebelum dipulas dengan teknik immunohistokimia, jenis sel tumor diverifikasi oleh ahli patologi (BS, BSW).

2.2 Pulasan Immunohistokimia Bim dan MDM2

Jaringan mikroskopis dilakukan deparafinasi dengan xilol, rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun. inkubasi dalam *Buffer Antigen Retrieval* suhu 94 °C 20 menit dan pendinginan 20 menit, inkubasi pada Blok Peroksidase dan diinkubasi *over night* dengan anti bodi Bim atau MDM2 suhu 4 °C, diikuti dengan larutan *post primary* dan *post protein* 15 - 30 menit dan dengan antibodi ke 2 60 menit pada suhu ruang, counter stain, dehidrasi penjemuran dengan xilol, dan *mounting* [13].

2.3 Pengamatan Ekspresi BIM dan MDM2

Ekspresi BIM dan MDM2 diamati dengan menggunakan mikroskop dan tingkat ekspresinya dikelompokkan berdasarkan IRS (*Immuno Reactive Score*) seperti yang dilakukan oleh Ramelle and Ramelle [14], pada Tabel 1.

IRS protein Bim dan MDM2 sebelum tindakan kemoradioterapi dilakukan dengan cara menghitung persentase sel kanker yang positif dan tingkatan intensitas warna dari sel kanker tersebut. Persentase sel yang positif dapat dinilai dari inti sel dan sitoplasma yang terwarnai oleh Bim atau MDM2.

2.4 Respon kemoradioterapi.

Respon kemoradioterapi diamati oleh dokter ahli radioterapi secara langsung melalui pengamatan *pelvic control* yang dilakukan oleh dokter radioonkologi (IR,TK,SS) dengan metode *pelvic control*, respons sebagian di mana pengurangan ukuran jaringan kanker terlihat lebih dari 50% (*partial response*) dan respon keseluruhan, jaringan kanker relatif tidak terlihat lagi (*complete respons*) [15].

Tabel. 1. Pengamatan Ekspresi Bim dan MDM2

Persentase Sel Positif	X Intensitas Pewarnaan	= IRS (0 – 12)
0 = tidak ada sel positif	0 = tidak ada reaksi warna	0 -1 negatif
1 =< 10% sel positif	1 = reaksi warna lemah	2- 3 lemah
2 = 10 – 50% sel positif	2 = reaksi warna moderat	4 – 8 ringan
3 = 51-80% sel positif	3 = reaksi warna kuat	9 -12 positif kuat
4 =>80% sel positif		
Nilai IRS		Klasifikasi IRS
0 - 1		0 = negatif
2 - 3		1 = positif, lemah
4 - 8		2 = positif, ringan
9 - 12		3 = positif, kuat

2.5 Analisis Statistik

Hubungan antara IRS Bim dan IRS MDM2 dianalisis dengan uji Korelasi Spearman, hubungan antara IRS Bim dengan respon terhadap kemoradioterapi dianalisis dengan uji ANOVA (*One Way Analysis of Variance*)

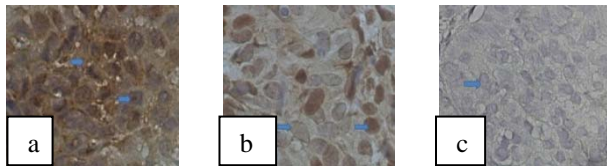
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pelaksanaan penelitian didapatkan IRS, Bim, MDM2 dan respon kemoradioterapi dengan umur rerata 49,6 tahun, terdiri dari stadium klinik IIB, IIIA dan IIIB masing- masing 9, 1 dan 15 orang.

3.1 Sebelum Kemoradioterapi

Pengamatan pada pulasan Immunohistokimia Bim, MDM2 dapat dilihat pada Gambar 1 a,b,c, dan korelasi antara Bim dengan MDM2 dapat dilihat pada Gambar 2.

Ekspresi protein Bim dijumpai dalam sitoplasma sel kanker berwarna coklat dengan IRS nya 3–10 atau dari lemah sampai kuat, yakni 12 (48%) lemah, 10 ringan (40%) dan 3 kuat (12%) (1a). Ekspresi MDM2 dalam inti sel (1b), terdiri dari 3 lemah, 13 ringan dan 9 kuat. Frank *et al.* [16] ekspresi Bim pada kanker kolon juga ditemui pada sitoplasma sel kanker dan 82% dan 18% sel kanker tidak ditemukan ekspresi protein Bim. Variasi ekspresi Bim disebabkan oleh perbedaan proliferasi atau pertumbuhan sel antara sel kanker kolon dan kanker servik. Troncone *et al.* [17] ekspresi MDM2 pada inti sel jaringan servik normal 4% dan 10%, pada jaringan kanker servik, MDM2 juga diamati pada inti sel kanker. Beskow *et al.* [18] adanya variasi ekspresi MDM2 yang pada kanker servik, dan 6 dari 109 sediaan, tidak menunjukkan ekspresi MDM2, dengan persentase area positif 10-100% mediannya 68%, 59% terlihat pada inti sel dan 41% pada bagian sitoplasma. Intensitas pewarnaan lemah atau menengah 40 dan 36 kasus, dan 24 kasus memperlihatkan ekspresi yang kuat dan tidak ada korelasinya dengan respon awal radioterapi yang diamati secara patologis.



Gambar 1. Ekspresi Bim berwarna coklat pada sitoplasma sel, (a), ekspresi MDM 2 pada inti sel kanker (b), dan kontrol negatif dengan pewarnaan Hemoatoksilin (c) (perbesaran 10 x 40).

Walaupun tidak dijumpai perbedaan bermakna secara statistik antara nilai IRS Bim dan MDM2 ($P=0,32$, $r=-0,20$), terlihat adanya kecenderungan korelasi negatif antara IRS Bim dan MDM2 seperti pada Gambar 2. Sejauh ini belum ditemukan publikasi yang menjelaskan hubungan langsung antara ekspresi Bim dan MDM2 pada jaringan kanker baik ataupun secara *in vitro*, diduga kecenderungan korelasi negatif ini mungkin disebabkan oleh penekanan fungsi P53 oleh MDM2, selanjutnya P53 tidak dapat mengaktifasi Bim sebagai salah satu protein fungsinya terkait dengan apoptosis.

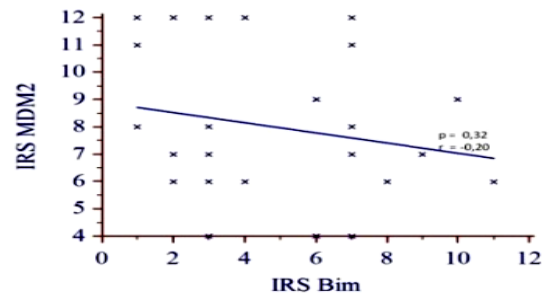
MDM2 berikatan dengan protein penekan tumor P53 dan menghambat transaktivasi P53. Pada waktu yang sama amplifikasi gen MDM2 dijumpai pada sejumlah sarcoma dan P53 nya masih bersifat normal [19,20]. Ekspresi yang berlebihan MDM2 dapat menginaktivasi P53 dalam proses transformasi kanker. Secara biokimia fungsi MDM2 melalui ubiquitin E3 berperan dalam ubiquinasi dan degradasi P53 [21]. Proses ini berlangsung dengan melibatkan protein E1, E2 dan E3 [22].

3.2 Setelah kemoradioterapi

Pada Gambar 3 walaupun tidak ada capaian yang bermakna, ekspresi Bim pada jaringan kanker respon komplet (baik) lebih besar dibanding dengan respon parsial (buruk) ($p=0,26$). Ekspresi Bim yang tinggi cenderung memberikan respon sel kanker yang lebih baik terhadap kemoradioterapi dibanding ekspresi yang rendah. Diduga aktifitas protein Bim akan memacu apoptosis. Sebaliknya Bim yang mengalami penguraian tidak terjadi apoptosis. Pada kanker ovari pengaturan ekspresi Bim melalui sejumlah mekanisme baik melalui jalur transkripsi atau paska translasi pada sintesis protein. Akibat fosforilasi terjadinya penurunan stabilitas Bim dan mengurangi interaksinya dengan protein lain dalam pengaturan apoptosis [23,24]. Bim juga menekan aktifitas protein anti apoptosis lain Bcl-2 [25].

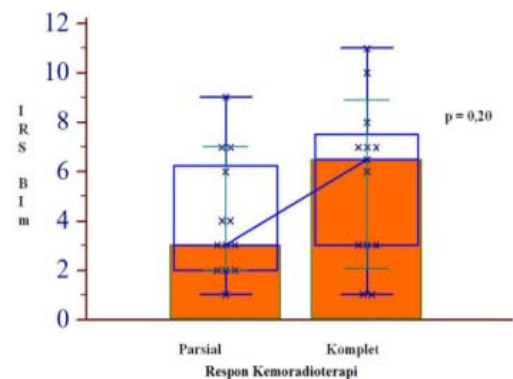
Dari Gambar 4 terlihat tidak ada perbedaan antara ekspresi MDM2 pada respon kanker komplet dan parsial ($p=1,00$). Tingkat ekspresi MDM2 pada sebelum kemoradioterapi diduga tidak menentukan respon kanker terhadap pengobatan. MDM2 mengatur ekspresi protein P53 (protein yang mengatur respon sel terhadap *stress*) dengan cara degradasi protein p53 pada sitoplasma sel [26]. MDM2 tidak dapat menguraikan P53 mutan, pada sejumlah kanker termasuk kanker servik P53 termutasi, walau dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis mutasi P53 nya. Sejumlah mutan P53 dan MDM2 tidak ditemukan adanya beberapa domain spesifik yang dibutuhkan dalam dalam menguraikan P53. Tidak adanya

domain tersebut pada P53 mutan menyebabkan MDM2 tidak dapat menguraikan p53 [27,28].

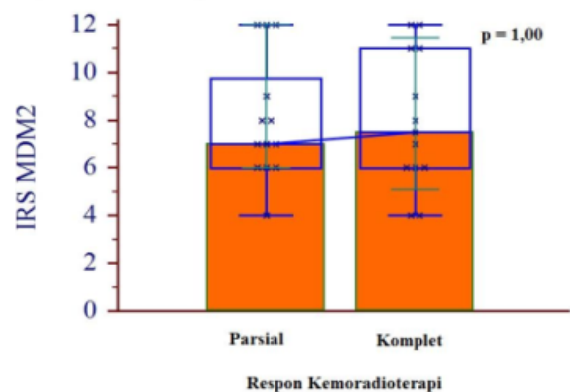


Gambar 2. Korelasi antara Bim dan MDM2 pada sel kanker servik sebelum radioterapi.

Bim yang tinggi dapat menjadi salah satu faktor prediksi respon sel kanker terhadap pengobatan kemoradioterapi. erbukti peningkatan aktifitas Bim juga berpotensi dijadikan sebagai salah satu metode pengobatan kanker melalui target terapi seperti yang dijumpai pada publikasi Akiyama *et al.*[8] dan Wang *et al.*[29]. Ekspresi MDM2 tidak memengaruhi respon kemoradioterapi walau diperlukan penelitian pada pasien yang sama untuk memastikan status P53 baik mutan ataupun normal



Gambar 3. Ekspresi Bim pada respon kemoradioterapi berbeda.



Gambar 4. Ekspresi MDM2 pada respon kemoradioterapi berbeda.

IV. KESIMPULAN

Ekspresi Bim yang kuat akan memberikan respon radioterapi lebih baik dibandingkan ekspresi Bim yang lemah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Dana Penelitian DIPA PTKMR-BATAN Tahun Anggaran 2012.

PUSTAKA

- [1] Anonymous. *Kanker di Indonesia Tahun 2009*, Data Histopatologik, Direktorat Jenderal Pelayanan Medik, Departemen Kesehatan RI, Badan Registrasi Kanker, Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia, Yayasan Kanker Indonesia, Jakarta, 2013.
- [2] Mufyala S, and Wofson AH. 2008. *Cervical cancer*. In: Lu JJ, and Brady LW(eds). *Radiation Oncology. An Evidence Base Approach*. Berlin: Springer Verlag. p 357-369.
- [3] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 2005;104: 1129-1137.
- [4] Brown JM, and Attardi L The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005;5:231-238
- [5] Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, and Budach W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:542-554.
- [6] Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Long H, Chaudhary P, and Li H. Effects of propranolol in combination with radiation on apoptosis and survival of gastric cancer cells in vitro. *Radiat Oncol* 2010, 5:98.
- [7] Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, and Budach W. Apoptosis modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:542-554.
- [8] Akiyama T, Crispin Rd, Peter FMC. Bim-targeted cancer therapy: A link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(12):3173-3180.
- [9] Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005;5:189-200.
- [10] Joo Hm, Kim J, Jae BJ, Ki MS, Seon YN, Kwang HY, Cha SK, Hee SK, Meeseon J, Sungkwan A, and Young WJ. Ret finger protein 2 enhances ionizing radiation-induced apoptosis via degradation of AKT and MDM2. *European Journal of Cell Biology* 2011;90:420-431.
- [11] Bhosley SM, Huilgol NG and Mishra KP. Apoptotic index as predictive marker for radiosensitivity of cervical carcinoma: evaluation of membrane fluidity, biochemical parameters and apoptosis after the first dose of fractionated radiotherapy to patients. *Cancer Detection and Prevention* 2005;29: 369-75.
- [12] Suzuki Y, Nakano T, Ohno T, Kato S, Niibe Y, and Morita S. Oxygenated and reoxygenated tumors show netter local control in radiation therapy for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16: 306-11.
- [13] Kurnia I, Budiningsih S, Setiawan S, Irwan R, Tjahya K, Andriano, Maringan DLT, Bethy S, and Devita T. Korelasi antara MIB-1, AgNOR dan apoptosis caspase-3 dengan respons kemoradioterapi pada kanker servik. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia* 2013 ;Vol. 14, No 1; 51-64.
- [14] Remmele W, and Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8 : 138-140.
- [15] Wong LC, Ngan ANY, Cheung DKL, Ng TY, and Choy DTK. Chemoradiation and Adjuvant Chemotherapy in Cervical Cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2055-2060.
- [16] Frank AS, Rafaela RL, Kenji O, Nathan RF, Michael JO, Daniel JS, and Harold EW. Prognostic impact of Bim, Puma, and Noxa expression in human colon carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2008;14(18):5810-5818.
- [17] Troncone G, Martinez Jc, Palombini L, Rosa Gd, Mugica C, Rodriguez JA, Zeppa P, Visio DD, Lucariello A, and Piris MA. Immunohistochemical expression of mdm2 and p21,WAF1 in invasive cervical cancer: correlation with p53 protein and high risk HPV infection. *J Clin Pathol*, 1998;51:754-760.
- [18] Beskow C, Kanter L, Holgersson A, Nilsson B, Frankendal B, Lundqvist EAV, and Lewensohn R. Expression of DNA damage response proteins and complete remission after radiotherapy of stage IB-IIA of cervical cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 94,1683 – 1689.
- [19] Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The MDM-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992 ;69:1237 – 1245
- [20] OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80 – 83.
- [21] Nakamura S, Roth JA, and Mukhopadhyay, T. Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2000;20:9391 – 9398.
- [22] WADE M, YUN YV, WANG, GEOFFREY MW. Article series: Thirty years of p53; The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in Cell Biology* 2010; 1;5:299-309.
- [23] Ley R, Ewings KE, Hadfield K, and Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 2005; 12:1008-1014
- [24] LEI, K., AND DAVIS, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100, 2432-2437.
- [25] Ewings KE, Hadfield MK, Wiggins CM, Wickenden JA, Balmanno K, Gilley, R, Degenhardt K, White E, and Cook SJ. ERK1/2-dependent phosphorylation of Bim EL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J* 2007; 26:2856-2867.
- [26] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, and Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998;281: 1677-1679.
- [27] Dumaz N, Meek DW. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* 1999.18:7002 – 7010.
- [28] Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91:325 – 334, 1997.
- [29] Wang J, Zhou JY, and Wu GS. Bim degradation contributes to cisplatin resistance. *The Journal Of Biological Chemistry* 2011,286,25:22384-22392