

Peranan ROS dari Mitokondria pada Resistensi Silang antara Radiasi dan Docetaxel
Amalia Dewi

**PERANAN REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) DARI MITOKONDRIA PADA
RESISTENSI SILANG (CROSS-RESISTANCE)
ANTARA RADIASI DAN DOCETAXEL**

Amalia Dewi

Program Studi Magister IKM, Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Abstrak

Radiokemoterapi merupakan salah satu dari beberapa metode potensial untuk pengobatan kanker. Namun demikian, resistensi atau kekebalan sel kanker terhadap radiasi dan obat-obatan kimia anti kanker menjadi hambatan besar dalam memperoleh terapi yang efektif. Untuk mengetahui mekanisme resistensi terhadap radiasi, kami telah membuat *Clinically Relevant Radioresistant (CRR)* cells atau sel yang secara klinis sesuai dengan sel yang resisten terhadap radiasi, yang dinamai sel SAS-R, berasal dari sel kanker mulut manusia (SAS). Sel SAS-R terus tumbuh dan berkembang dibawah penyinaran terhadap sinar-X dengan dosis 2 Gy/hari selama lebih dari 30 hari.

Diantara beberapa obat-obatan anti kanker yang telah teliti, sel SAS-R didapati resisten terhadap *Docetaxel* (DOC). Penyinaran dengan sinar-X maupun pemberian DOC telah meningkatkan *reactive oxigen species* (ROS) di mitokondria (mt) pada sel SAS, namun hal tersebut tidak terjadi pada sel SAS-R. ROS diketahui memiliki peran ganda sebagai pro oksidan anti oksidan. ROS juga diketahui memediasi dan terlibat dalam proses kematian sel.

Untuk meneliti peranan ROS yang berasal dari mitokondria pada kejadian resistensi terhadap radiasi sekaligus terhadap DOC, dibuat sel SAS yang hampir tidak memiliki DNA mitokondria (SAS-p0). Hasil penelitian yang baru- baru ini saya lakukan, baik uji *high-density survival* yang dimodifikasi maupun uji *water soluble tetrazolium salts* (WST) menunjukkan bahwa sel SAS-p0 lebih resisten terhadap sinar-X dan DOC dibandingkan dengan sel SAS. Pewarnaan *Mitox red* menunjukkan bahwa paparan terhadap sinar-X dan pemberian DOC meningkatkan ROS dari mt pada sel SAS, namun sebaliknya, SAS-R dan SAS-p0 tidak terjadi. Penemuan kami mengungkapkan bahwa ROS yang berasal dari mitokondria terlibat pada terjadinya resistensi silang terhadap sinar-X dan DOC.

Kata Kunci : *ROS, DNA mitokondria, kematian sel, resistensi silang, sinar-x, docetaxel, p0*

Pengantar

Terapi radiasi dan obat-obatan kimia merupakan modalitas potensial pada terapi kanker. Karena terapi kimoradiasi pada umumnya lebih efektif dibandingkan terapi radiasi maupun kimia secara tunggal, resistensi silang (*cross-resistance*) merupakan salah satu hambatan besar dalam terapi kanker. Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Universitas Tohoku, Jepang telah membuat sel CRR, yaitu sel yang secara klinis relevan dengan sel yang resisten terhadap radiasi yang berasal dari sel SAS dan selanjutnya disebut sel SAS-R. Sel SAS-R ini terus berkembang menjadi banyak dibawah penyinaran dosis radiasi 2 Gy/hari selama 30 hari, yang diketahui merupakan tatalaksana standar untuk radioterapi tumor.

Resistensi silang pada sel SAS-R telah dilakukan melalui screening terhadap berbagai obat-obatan anti kanker seperti *docetaxel*, *5-fluorouracil*, *cisplatin*, *bleomycin*, *vincristine* *etoposide* and *adriamycin*. Dibandingkan dengan sel SAS, sel SAS-R menunjukkan resistensi silang terhadap sebuah obat terapi kimia anti pembelahan sel (*anti-mitotic*), *docetaxel* (DOC). Hal ini mengejutkan bagi peneliti, karena penyebab utama dari kematian sel yang disebabkan karena radiasi pengion umumnya dikaitkan dengan kegagalan sel dalam memperbaiki kerusakan DNA strand ganda (*DNA double strand breaks*) (Montero A *et al.* 2005, Hall EJ *et al.* 2000). Ekspresi yang berlebihan dari gen *β -tubulin* atau *MDR1*, yang disebabkan oleh resistensi terhadap DOC tidak ditemukan pada sel SAS-R (data tidak dipublikasi).

DNA mitokondria memegang peranan penting dalam sensitifitas terapi kanker secara selular (Singh K.K *et al.*, 1999). Penelitian akhir-akhir ini menyatakan bahwa tingginya level ROS berperan dalam menyebabkan dan memelihara penuaan yang disebabkan oleh penekanan tumor, melalui aktiasi penghambat siklus sel, p16. Disisi lain, jika level ROS meningkat hingga batas tertentu yang tidak memungkinkan sel untuk bertahan hidup, ROS

menjadi memiliki efek sangat sitotoksik yang menyebabkan kematian sel kanker, sehingga menghambat pertumbuhan kanker. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa ROS mitokondria terlibat dalam resistensi kanker terhadap docetaxel (Mizumachi *et al.* 2008).

Dilatar belakangi prinsip tersebut, maka peran ganda dari efek ROS terhadap sel kanker banyak dimanfaatkan untuk menciptakan obat-obatan anti tumor baru yang peningkatan oksidatif stres yang mematikan sel tumor (Miguel M *et al.*,2012).

Berdasarkan beberapa hasil penelitian tersebut tampak bahwa terdapat satu penyebab yang sama pada kejadian resistensi silang antara radiasi sinar-x dan docetaxel, yaitu ROS dari mitokondria. Artikel ini mengulas pentingnya peranan ROS dalam kematian sel kanker pada resistensi terhadap radiasi dan DOC.

Reactive oxygen species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) merupakan molekul yang reaktif secara kimia yang mengandung oksigen, seperti Superoxide anion(O₂⁻), Hydrogen peroxide(H₂O₂) dan hydrogen radical(OH⁻). ROS memiliki peranan yang sangat penting, bukan hanya dalam transduksi sinyal fisiologi, tapi juga dalam petogenesis termasuk kanker, penuaan dan penyakit degeneratif lainnya.

DNA mitokondria mengkode protein yang merupakan komponen penting dari pathway pembentukan energi dalam mitokondria, yaitu *oxidative phosphorylation* (OXPHOS) yang menghasilkan ROS sebagai *by-product*, produksi Adenosine-5'-triphosphate (ATP) melalui rantai pernafasan mitokondria dan juga menginisiasi kematian sel. Karena peran tersebut, mitokondria disebut sebagai “*power house*” bagi sel.

Disamping dihasilkan secara tetap pada makhluk hidup sebagai produk sampingan dari metabolisme sel, ROS juga dihasilkan sebagai konsekuensi dari iradiasi, obat-obatan kemoterapi dan paparan lingkungan terhadap oksidan kimia dan logam transisi. Pada kadar

normal, ROS bekerja sebagai *redox messenger* yang terlibat dalam beberapa regulasi dan pathway sinyal transduksi intra sel. Peningkatan ROS pada level sedang masih memungkinkan terjadinya proliferasi sel. Pada Konsentrasi yang tinggi atau jumlah yang berlebihan, ROS bertindak sebagai stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lemak, protein dan DNA, memicu transformasi onkogenik, meningkatkan aktifitas metabolik dan disfungsi mitokondria (Haghdoust S, 2005).

Mitokondria Sebagai Produsen dan Target dari ROS

Rantai pernafasan mitokondria atau *mitochondria respiratory chain* (MRC) merupakan sumber utama dari ROS, khususnya pada kompleks I dan III, dimana elektron yang berasal dari NADH dan ubiquinone dapat secara langsung bereaksi dengan oksigen dan penerima elektron lainnya dan membentuk radikal bebas (Jezek *et al*, 2005 & Muller *et al*, 2004).

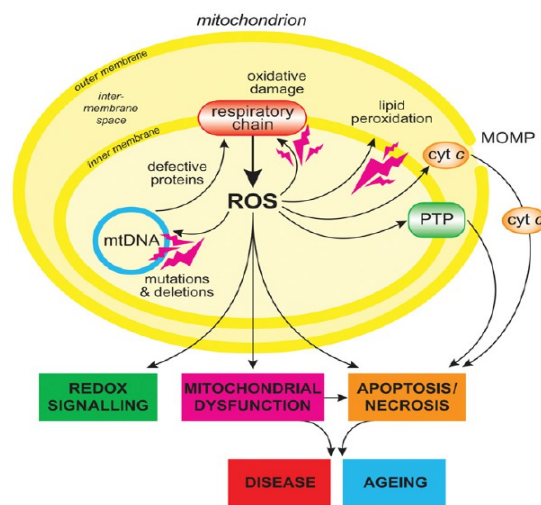
Mitokondria memainkan peranan kunci dari sel manusia karena sel menerima 95% energi yang dihasilkan dari OXPHOS yang terjadi di mitokondria melalui konversi ATP. Mitokondria adalah konsumen utama molekul oksigen di dalam sel. Selama metabolisme oksidasi di mitokondria termasuk MRC, sebagian besar oksigen dirubah menjadi air, tetapi 1-5% dari seluruh oksigen yang dikonsumsi dirubah dalam bentuk superoxyd anions ($O_2^{\cdot-}$). Reduksi oksigen oleh satu elektron menghasilkan ROS ($O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH \rightarrow H_2O$).

Disamping itu, karena letaknya maka mitokondria juga merupakan target terbesar dari efek merusak dari ROS tersebut.

ROS Memediasi kematian Sel

Beberapa kondisi termasuk berkurangnya ATP, peningkatan level stres oksidatif dan pembentukan ROS yang berlebihan yang pada akhirnya memicu terjadinya kematian sel melalui peningkatan pathway apoptotic internal, yaitu didahului dengan *mitochondrial permeability transition*(MPT) yang menyebabkan hilangnya potensial membran mitokondria.

Kebocoran ini menyebabkan depolarisasi membran mitokondria dan lepasnya toksik matrik mitokondria seperti *apoptosis inducing factor* (AIF) yang mengaktifkan *apoptotic effector caspase* dan *cytochrome c* ke cytoplasma. Cytochrome c berinteraksi dengan kofaktor protein Apaf-1 dan caspase-9 untuk mengaktifkan caspase-3. Kemudian, dengan menggunakan energi dari ATP, ikatan toksik matrik membentuk apoptosome yang menghasilkan apoptosis. (Larsson N G. et al, 1995).



Gambar 1. Overview Produksi ROS Mitokondria. Produksi ROS oleh mitokondria dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap protein, membran dan DNA dari mitokondria itu sendiri, gangguan kemampuan sintesa ATP dan fungsi metabolik lainnya. Kerusakan oksidatif mitokondria juga dapat meningkatkan kecenderungan mitokondria untuk melepaskan protein dari intermembrane space seperti cytochrome c ke cytosol oleh *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dan kemudian mengaktifkan fungsi apoptosis sel. (M.P.Murphy, 2009).

Sebuah penelitian menyebutkan bahwa variasi konten DNA pada mitokondria berpengaruh terhadap perilaku sel kanker, seperti sensitifitas terhadap obat anti kanker, ketergantungan hormon, potensi invasi dan metastase sel kanker, pertumbuhan sel kanker dan juga kematian sel secara terprogram (*apoptosis*) (Yu *et al.* 2011). Hal ini didukung dengan laporan bahwa radiasi pengion dan obat-obatan anti kanker mengakibatkan apoptosis dan nekrosis pada sel dengan DNA mitokondria yang utuh (Jella *et al.* 2013). Sebaliknya, sel

yang kekurangan DNA pada mitokondria ($\rho 0$) cenderung sedikit mengalami apoptosis (Tang *et al.* 1999).

Oleh karena itu, mekanisme peningkatan produksi ROS digunakan pada seluruh pendekatan terapi kanker non pembedahan, termasuk kemoterapi, radioterapi, dan photodynamic terapi karena efeknya dalam memicu kematian sel. Peningkatan ROS pada sel dapat lebih membunuh sel kanker secara efektif. Disamping itu, baik *death receptor* maupun apoptosis yang dimediasi oleh mitokondria sangat tergantung pada ROS (Ozben T, 2007 & Neumann CA *et al.*, 2007). Methoxyestradiol(2-ME), sebuah obat anti kanker baru, akhir2 ini sedang diuji coba, menunjukkan penghambatan pada superoxyde dismutase (SOD) dan menyebabkan apoptosis pada sel leukimia melalui mekanisme yang dimediasi oleh ROS (Pelicano H *et al.*, 2004).

ROS dan Glycolysis

DNA mitokondria pada mamalia mengkodekan 13 polipeptida termasuk subunit katalitik untuk kompleks I-IV dan ATP sintesa. Oleh karenanya sel yang tidak memiliki DNA mitokondria($\rho 0$), yang seringkali ditemukan pada sel kanker, tidak mampu untuk menjalankan fungsi sintesa ATP atau transport elektron yang normal dan cenderung memperoleh ATP dari *glycolysis* untuk bertahan hidup dan berkembang.

Penguatan *glycolysis* juga terlibat dalam mencegah sel dari stres oksidatif, dengan cara pemeliharaan kemampuan pemberantasan anti oksidan, sebagai hasil dari berkurangnya stres oksidatif (Kondoh *et al.* 2007). Sel yang mengalami gangguan fungsi pernafasan dan mengalami penurunan mitokondria DNA menunjukkan ketergantungan pada *glycolysis*, peningkatan NADH dan pengaktifan Akt, yang menyebabkan resisten terhadap obat-obatan dan hal ini menguntungkan sel untuk bertahan hidup pada kondisi kekurangan oksigen (*hypoxia*) (Pelicano *et al.*, 2006). Sel yang sangat *glycolitic* memperkuat pertahanan antioksidan melalui *glutathione*, dan *pyruvate* dapat di dekarboxilatkan secara non enzim

dengan pengurangan *hydrogen peroxide* (Sattler UG *et al*, 2009). Perlindungan metabolisme ini dapat membantu dalam menjaga integritas genome sel dan memungkinkan sel tersebut untuk memelihara pembaruan sel sendiri.

ROS dan Sensitifitas Sel Kanker Terhadap Terapi Radiasi dan Kimia

Untuk menimbulkan efek toksik pada tumor, efektifitas prinsip antioksidan yg seringkali disertakan dalam radio atau kemoterapi sangat tergantung pada ROS (Seifried HE,2003 & Conklin KA,2000)

Beberapa laporan menyebutkan keterlibatan ROS dari mt pada sensitifitas radio dan kemoterapi. Kawamura *et al.* melaporkan keterlibatan ROS dari mt pada sensitifitas terhadap radiasi melalui pembentukan sel $\rho 0$ dari sel HeLa (Kawamura *et al.* 2005). Disebutkan bahwa sel $\rho 0$ yang kekurangan DNA pada mitokondrianya sangat resisten terhadap adriamycin dan terapi photodynamic untuk mengakibatkan kematian sel, sementara itu sel yang memiliki DNA mitokondria sangat sensitif (Singh *et al.* 1999). DOC juga dapat memicu kebocoran ROS pada sel kanker, sebagai akibatnya adalah kerusakan DNA, protein dan membran sel (Rabi *et al.* 2009).

Sensitifitas sel terhadap beberapa agen anti kanker dikaitkan dengan produksi ROS. Sensitifitas bahan organometalik berbasis Osmium (Os) dikaitkan dengan kemampuannya untuk menghasilkan ROS. Sel $\rho 0$ yang gagal meningkatkan ROS akan resisten terhadap kematian sel yang diakibatkan oleh aktifitas Os. Pada kanker kolon ini, kemampuan OS dalam memicu *apoptosis* tergantung pada ROS (Maillet *et al.* 2013). Olivia *et al.* menyatakan bahwa kemo resistensi yang diperoleh pada kanker glioma berhubungan dengan kekurangan produksi ROS pada mitokondria. Pengobatan dengan Temozolomide (TMZ) tidak menunjukkan produksi ROS mitokondria pada sel U251 yang tidak memiliki DNA mitokondria , tetapi produksi ROS tersebut meningkat pada sel U251 yang memiliki DNA mitokondria (Olivia *et al.*, 2011).

Simpulan

Sel yang mengalami kekurangan DNA mitokondria tidak dapat menjalankan fungsi pernafasan dan pembentukan ATP sehingga menimbulkan gangguan pembentukan ROS sebagai *by-product* yang merupakan materi penting untuk memediasi apoptosis sebagai target dari terapi kanker. Disamping itu, oleh karena ketidak mampuan memproduksi ATP dalam jumlah yang cukup maka sel kanker menggunakan energi untuk pertumbuhan yang berasal dari glycolisis. Tingginya glycolisis pada sel kanker memperkuat pertahanan antioksidan.

Dari review diatas dapat ditarik benang merah bahwa rendahnya atau tidak diproduksinya ROS pada sel kanker yang tidak memiliki DNA mitokondria menghambat proses kematian sel dan memungkinkan sel tetap bertahan hidup. Hal ini mengurangi sensitifitas sel kanker terhadap radiasi dan DOC dalam membunuh sel kanker, sehingga menurunkan efektifitas terapi radiasi dan DOC dikarenakan sel kanker mengalami *cross-resistant* terhadap jenis terapi tersebut.

Daftar Pustaka

- Chandel N.S., Schumaker P.T (1999), Cell depleted of mitochondrial DNA (r0) yield insight into physiological mechanisms, *FEBS Letters*, **454**:173-176
- Conklin KA. (2000), Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: Impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer*; **37**:1-18
- Hall, E., J., Phill, D. (2000) *Radiobiology for The Radiologist*, fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Jella, K., K., Gracia, A., McClean, B., Byrne, H., J., Lyng, F., M., (2013) Cell Death Pathway in Directly Irradiated Cells and Cells Expose to Medium From Irradiated Cells, *International Journal of Radiation Biology*, **89**(3), 182-190.

- Jezel P and Hlavata L.(2005), Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism, *International Journal of Biochemistry Cell Biology*,vol.37;**12**:2478-2503.
- Kawamura, S., Takai, D., Watanabe, K., Hayashi, J., Hayakawa, K., Akashi, M. (2005) Role of Mitochondrial DNA in Cells Exposed to Irradiation: Generation of ROS is Required for G2 Checkpoint upon Irradiation, *Oncology Report* **19**,1545-1549.
- Kondoh, H., Leonart, M., E., Bernard, D., Gil, J. (2007) Protection from Oxidative Stress by Enhanced Glycolysis, a Possible Mechanism of Cellular Immortalization, *Histol, Histopathol*, **22**, 85-90.
- Kuwahara, Y., Li L., Baba, T., Nakagawa, H., Shimura, T., Yamamoto, Y., Ohkubo, Y., Fukumoto, M. (2009) Clinically Relevant Radioresistant Cell Efficiently Repair DNA Double-Strand Breaks Induced by X-ray. *Cancer Sci*, **100**, 747-752.
- Michael P. Murphy, (2009), How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species, Review Article, *Biochem.J*; **417**: 1-13
- Maillet, A., Yadav, S. Loo, Y. L., Sachaphibulkij, K., Pervaiz, S. (2013) A Novel Osmium-Based Compound Targets The Mitochondria And Triggers ROS-Dependent Apoptosis In Colon Carcinoma, *Cell Death and Disease*, **4**, e653; doi:10.1038/cddis.2013.185.
- Manuel de Miguel and Mario D. Cordero, Edited by Dr. Volodymyr Lushchak, (2012) *Oxydative stress and diseases, Oxidative Therapy Against Cancer*, text book, Publisher In Tech.
- Mizumachi, T., Suzuki, S., Naito, A., Carcel-Trullols, J., Evans, T. T., Spring, P. M., Oridate, N., Furuta, Y., Fukuda, S., Higuchi, M. (2008) Increased Mitochondrial DNA Induces Acquired Docetaxel Resistance in Head and Neck Cancer cells, *NIH Public Access, Oncogene* **31**;27(6):831-838.

- Montero, A., Fasella, F., Hortobagyi, G., Varelo, V. (2005) Docetaxel for Treatment of Solid Tumours : a Systematic Review of Clinical Data, *Lancet Oncol*, **6**, 229-239.
- Muller E.L, Liu Y., Remmen van H. (2004), Complex III Releases Superoxide to both sides of the Inner Mtochondrial Membrane, *Journal of Biology Chemistry*, vol.279;**47**:49064-49073.
- Neumann CA, Fang Q.(2007) Are peroxiredoxins tumor supressors? *Curr Opin Pharmacol* ; **7**:375-80.
- Nils-Goran Larsson, David A Clayton,(1995), All Rights Reserved Molecular Genetic Aspects Of Human Mitochondrial Disorders, Annual Review, Department Of Developmental Biology, Beckam Center For Molecular and Genetic Medicine, Stanford University School of Medicine, California, *Amu.Rev.Gen*;**29**:151-178.
- Olivia, C. R., Moellering, D. R., Gillespie, G. Y, Griguer, C. E. (2011) Acquisition of Chemoresistance in Glioma Is Associated with Increase Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production, *PloS ONE*, **6**, issue 9, e24665.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis, (2007), Impact on cancer Therapy. *J Pharm Sci*;**96**:2181-96.
- Pelicano H, Carney D,Huang P.(2004), ROS strass in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* ;**7**:97-110
- Pelicano, H., Hua Xu, R., Du, M. et al. (2006) Mitochondrial Respiration Detects in Cancer Cells Cause Activation of Akt Survival Pathway Through a Redox-Mediated Mechanism, *The Journal of Cell Biology*, **175 (6)**, 913-923.
- Rabi, T., Bishayee, A., (2009) d-Limonene Sensitivity Docetaxel-Induced Cytotoxicity in Human Prostate Cancer Cells : Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of Apoptosis, *J.Carcinog*,**8**:9.

- Sattler, U., G.,Klieser., M., W. (2009) The Anti-Oxidant Capacity of Tumour Glycolysis, *Int.J. Radiat. Biol*, **85(11)**,963-971.
- Seifried HE,McDonald SS, Anderson DE,Greenwald P, Milner JA, (2003), The antioxidant conundrum in cancer, *Cancer Res*;**63**:4295-8
- Siamak Haghdoost,(2005), Biomarkers of oxidative stress and their application for assessment of individual radiosensitivity, Department of genetics, microbiology and toxicology, Stockholm.
- Singh, K., K., Russell, J., Sigala, B., Zhang, Y., W, J., Keshav, F., K. (1999) Mitochondrial DNA Determines The Cellular Response To Cancer Therapeutic Agents, *Oncogene*, **18**, 6641-6646.
- Tang, J. T., Yamazaki, H., Inoue, T., Koimuzi, M. O. (1999) Mitochondrial DNA influence radiation sensitivity and induction of apoptosis in Human Fibroblast, *Anticancer Res.*, **19**, 4959-4964.
- Yu, M. (2011) Generation, Function and Diagnostic Value of Mitochondrial DNA Copy Number Alteration in Human Cancer, *Life Science*, **89**, 65-71.