

Perancangan Hewan Coba Model untuk Karsinoma Payudara HER-2 Positif Menggunakan Agen Imunosupresan

Basuki Hidayat,¹ Stepanus Massora,¹ Martalena Ramli,² Veronika Yulianti Susilo,² Agus Arianto,²
Johan S. Masjhur¹

¹Departemen Ilmu Kedokteran Nuklir dan Pencitraan Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/
Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, ²Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka Batan Serpong
Tangerang

Abstrak

Pengembangan obat terapi keganasan di Indonesia sering kali terkendala karena ketidakmampuan menyediakan hewan model untuk uji preklinis. Hewan model tersebut adalah hewan model dengan massa keganasan yang mempunyai karakteristik khusus, bukan sekedar dengan massa tumor. Pada umumnya untuk tujuan tersebut digunakan hewan model yang tidak mempunyai daya tahan tubuh dan dipelihara dalam lingkungan yang steril. Fasilitas sistem perkandangan yang steril ini yang belum ada di Indonesia. Tujuan penelitian ini mengembangkan metode penyediaan hewan model mencit pengganti *nude mice* dengan daya tahan tubuh yang rendah, tetapi mampu hidup dalam lingkungan fasilitas pemeliharaan yang tidak steril. Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan dan Laboratorium Sitogenetik Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka, Batan, Serpong sejak bulan Juli sampai November 2014. Galur sel SKBR-3 diinokulasi pada 2 kelompok mencit sehat (*Mus musculus*) strain Balb/c, yaitu kelompok perlakuan dan kontrol, masing-masing 8 ekor. Cyclosporine A, agen penurun daya tahan tubuh hanya diberikan pada kelompok perlakuan sebelum dan setelah inokulasi. Pada kedua kelompok, pertumbuhan tumor secara makroskopik tidak terlihat di tempat inokulasi, tetapi tampak perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol pada kadar leukosit ($p:0,01$), limfosit ($p:0,01$), monosit ($p:0,01$), dan segmen neutrofil ($p:0,01$). Pada 2 mencit kelompok perlakuan didapatkan gambaran sel degenerasi bengkak keruh di hati. Metode ini terbukti dapat menurunkan daya tahan tubuh hewan coba mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, walaupun belum mampu menumbuhkan keganasan. [MKB. 2016;48(1):39-44]

Kata kunci: Ca payudara HER2 positif, hewan coba model onkologi

Designing Animal Models for HER2 Positive Breast Cancer Using Immunosuppressive Agent

Abstract

The development of therapeutic drug for malignancy in Indonesia is often constrained because of the inability to provide animal models for preclinical study. These animal models are an animal model with a malignancy mass which have special characteristics, not just the tumor mass. Animal models that are usually used for this purpose is immunodeficient animals. This animal must be kept in sterile animal care, but the facility is not readily available in Indonesia. The purpose of this study was to develop a method for providing an animal model of nude mice replacement that has fairly low immunity but are still able to live in non-sterile animal care facilities. The study was conducted at the Laboratory Animal and Cytogenetics, Center for Radioisotope and Radiopharmaceuticals Technology, Batan, Serpong in the period of July to November 2014. SKBR-3 cell lines were inoculated on two groups of immunocompetent mice (*Mus musculus*) strain Balb/c, namely the treatment group ($n=8$) and controls ($n=8$). Cyclosporine A as an immunosuppressant agent was given only to the treatment group before and after SKBR 3 inoculation. No macroscopically visible tumor growth at the site of inoculation in both of groups. There was a significant difference between the treatment group and the control group in leukocyte levels ($p=0.01$), lymphocytes ($p=0.01$), monocytes ($p=0.01$), and neutrophil segments ($p=0.01$). Two treatment groups of mice obtained cloudy degeneration in the liver. This method has significantly reduced the immunity of mice (*Mus musculus*) strain Balb/c but still cannot grow malignancies in experimental animals. [MKB. 2016;48(1):39-44]

Key words: HER2 positive breast cancer; oncology animal models

Korespondensi: Dr. Basuki Hidayat, dr., Sp.KN, Departemen Ilmu Kedokteran Nuklir dan Pencitraan Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, Jalan Pasteur No. 38 Bandung. *mobile* 08122025078, *e-mail* basukinuclmed@gmail.com

Pendahuluan

Pengetahuan yang mengenai dasar-dasar proses molekuler yang mendasari timbulnya kanker telah berkembang sangat pesat dalam dekade ini. Perkembangan ini diharapkan juga mampu memberikan dampak yang positif dalam hal mencegah, mendiagnosis, dan mengobati kanker terutama untuk kanker yang pengobatannya belum diketahui secara pasti. Dalam beberapa tahun belakangan ini para peneliti juga telah mengidentifikasi gen dan jalur yang berpengaruh pada pertumbuhan kanker. Hal ini yang menjadi dasar terapi kanker dengan target molekuler.¹

Dalam usaha untuk mengetahui dasar-dasar molekuler kanker, termasuk bagaimana kanker tumbuh, bermetastasis, dan untuk menemukan metode diagnostik serta pengobatan terbaru, sangat dibutuhkan penelitian yang dilakukan terlebih dahulu pada hewan model yang lebih dari 95% mempergunakan mencit atau tikus. Penelitian ini dilakukan setelah beberapa kali melakukan penelitian laboratorium terhadap sel kanker.^{1,2}

Pemilihan hewan model untuk penelitian onkologi sangatlah dipengaruhi oleh suatu tujuan penelitian. Contohnya, pada penelitian yang membutuhkan interaksi seluler dengan respons imun membutuhkan hewan model yang imunokompeten, sedangkan yang bertujuan menumbuhkan sel tumor yang biasanya timbul pada manusia (*xenogeneic*) dibutuhkan hewan coba defisiensi imun, misalnya *nude mice* atau *severe combine immunodeficient* untuk dapat menghindari penolakan atau penghambatan terhadap sel kanker yang ditumbuhkan.^{1,3,4}

Pemilihan hewan model dengan defisiensi imun untuk penanaman sel-sel tumor mulai dipopulerkan pada tahun 1978 oleh Giovanella dkk. dalam studi "*the nude mouse in experimental and clinical research*". Penelitian mengenai *nude mice* sendiri pertama kali dilakukan oleh Grist pada tahun 1962 di laboratorium virus RS Ruchill, Glasgow. Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa mencit tanpa timus tersebut tidak dapat membunuh virus atau sel ganas, tidak dapat membentuk antibodi, dan tidak mempunyai reaksi penolakan terhadap transplantasi jaringan atau reaksi hipersensitivitas. Keadaan tersebut diakibatkan karena mencit tidak mempunyai sel limfosit T. Walaupun temuan ini sangat menjanjikan, tetapi kemudian diketahui terdapat kekurangan *nude mice*. Hewan coba model ini sangat rentan terhadap infeksi sehingga sering kali mati sebelum penelitian selesai. John Stehlin dan Beppino Giovanella menggunakan metode

steril dalam pemeliharaan *nude mice* dalam upayanya memperkecil kekurangan tersebut. Pemanfaatan metode ini mengakibatkan *nude mice* dapat bertahan hidup selama dua tahun sehingga cukup waktu untuk menumbuhkan dan meneliti kanker.⁵⁻⁸

Perkembangan dan penelitian kanker dengan hewan cobamodel di Indonesiasaat ini sudah mulai berkembang pesat, namun masih mengalami banyak kendala. Salah satunya adalah ketiadaan laboratorium penelitian hewan yang steril untuk memelihara serta mengembangbiakkan *nude mice*. Perlu dipertimbangkan metode lain yang dapat menyediakan hewan model lain sebagai pengganti *nude mice*.

Mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c saat ini sering dipakai juga dalam penelitian onkologi, namun karena telah mempunyai karakteristik imunokompeten maka itu akan mengganggu pertumbuhan sel kanker yang diinokulasikan. Pada saat ini *cyclosporine A* sering kali digunakan pada manusia dengan tujuan dapat menekan daya tahan tubuh. Berdasarkan hal tersebut perlu dipertimbangkan kemungkinan penggunaan mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c yang ditekan daya tahan tubuhnya sebagai pengganti *nude mice*.^{9,10}

Metode

Etika penelitian didapatkan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FK Universitas Padjadjaran Bandung. Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan dan Laboratorium Sitogenetik Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka, Batan, Serpong sejak bulan Juli sampai November 2014. Penelitian eksperimental dilakukan pada 16 ekor mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c betina sehat yang memenuhi syarat dan dibagi dalam 2 kelompok, yaitu perlakuan dan kontrol 8 ekor masing-masing. Pada kelompok perlakuan diberikan *cyclosporine A* 100 mg/kgBB per oral 2 hari sebelum inokulasi galur sel SKBR3 dan sesudahnya selama 15 hari pengamatan. Pada kelompok kontrol inokulasi galur sel SKBR3 langsung dilakukan tanpa pemberian *cyclosporine A*.

Inokulasi satu juta galur sel SKBR-3 dilakukan pada aspek posterior salah satu pangkal paha bawah tiap mencit agar bila terjadi pertumbuhan massa tumor tidak mengganggu pergerakan hewan itu. Pada kelompok perlakuan, injeksi seftriakson intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB juga diberikan untuk pencegahan infeksi.

Pengamatan dihentikan bila massa tumor

Tabel 1 Hasil Pemeriksaan Darah Rutin 15 Hari Pascapemberian *Cyclosporine* pada Perlakuan dan Kontrol

Parameter	Perlakuan							Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	7	
Hb (12,2–16,2 g/dL)	14,9	13,6	12,9	14,2	14,5	13,9	12,1	13,73
Leukosit (6–15x10 ⁹ /L)	15,4	5,51	8,52	6,23	1,05	5,4	6,01	6,87
Trombosit (200–450x10 ⁹ L)	1053	592	676	932	673	549	629	729,14
Hitung Jenis								
a. Limfosit (57–93%)	33,4	24,9	24,5	24,5	41	70	92	45,24
b. Monosit (0–7%)	5,1	11,8	10,8	10,8	6	11	1	8,09
c. Segmen neutrofil (8–48%)	61,5	63,3	64,7	64,7	53	19	7	46,67

Parameter	Kontrol							Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	7	
Hb (12,2–16,2 g/dL)	14	13,4	15,4	15,7	15,4	15,8	13,5	14,49
Leukosit (6–15x10 ⁹ /L)	6,4	8,01	7,68	8,1	6,59	9,99	6,78	7,77
Trombosit (200–450x10 ⁹ L)	706	796	727	693	416	440	348	581,88
Hitung Jenis								
a. Limfosit (57–93%)	66	67,2	72,3	66,3	75	72	95	74,69
b. Monosit (0–7%)	1,9	0,6	1,7	6,5	2	9	5	3,59
c. Segmen neutrofil (8–48%)	32	32,2	26	27,5	23	19	0	21,73

Keterangan: nilai p untuk Hb (0,062); leukosit (0,018); trombosit (0,144); limfosit (0,011); monosit (0,011); dan segmen neutrofil (0,019)

tumbuh dengan diameter terpanjang minimal 10 mm atau 15 hari bila tidak didapatkan pertumbuhan massa tumor. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan pada tempat inokulasi serta organ yang umumnya menjadi target penyebaran sel tumor. Pengamatan terhadap bobot mencit dan juga kadar leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil juga dilakukan untuk menilai pengaruh pemberian *cyclosporine A* pada daya tahan tubuh.

Uji statistik menggunakan uji beda *t-student* berpasangan terhadap kadar leukosit, kadar trombosit, hitung jenis limfosit, monosit, dan segmen neutrofil antara kedua kelompok. Perbedaan dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$.

Hasil

Pada kelompok perlakuan hanya 7 ekor mencit yang tetap hidup dan dapat diamati hingga akhir

masa pemantauan selama 15 hari, sedangkan semua mencit pada kelompok kontrol ($n=8$) tetap hidup. Pada kedua kelompok mencit, pertumbuhan massa tumor secara makroskopik tidak terjadi hingga 15 hari masa pemantauan. Dilakukan eutanasia dan diseksi organ secara teori sering kali menjadi tempat penyebaran sel keganasan, yaitu hati, paru-paru, dan paha bagian bawah yang menjadi lokasi inokulasi pada galur sel SKBR3. Pemeriksaan histopatologi terhadap jaringan ketiga organ tersebut juga tidak memperlihatkan tanda-tanda keganasan. Didapatkan gambaran histopatologi bengkak keruh dari 2 sampel jaringan hati dari 2 mencit kelompok perlakuan.

Pemeriksaan darah yang dilakukan meliputi darah rutin dan hitung jenis leukosit. Tampak perbedaan yang bermakna kelompok mencit perlakuan dengan kontrol pada kadar leukosit ($p=0,01$) serta pada hitung jenis limfosit, monosit, dan segmen neutrofil ($p=0,01$; $p=0,01$; $p=0,01$). Tidak tampak perbedaan yang bermakna pada

Tabel 2 Bobot Badan Mencit Kelompok Perlakuan Selama Masa Pemantauan

No	Kelompok dengan Perlakuan				
	Pengamatan Bobot Badan Hari ke- (dalam Gram)				
	1	5	8	12	15
1	41,94	40,16	41,8	40,13	40,12
2	41,42	37,26	31,96	31,96	31,38
3	36,14	31,36	31,94	31,94	32,05
4	39,14	38,50	39,44	39,44	40,09
5	39,72	36,82	35,56	35,56	38,27
6	39,42	37,42	33,32	33,32	32,63
7	39,14	37,45	38,76	38,76	39,54
8	39,56	35,65	37,7	37,88	40,26
Rata-rata	39,65				36,80

pemeriksaan kadar Hb ($p=0,06$) dan trombosit ($p=0,14$). Dari nilai rata-rata tampak jumlah leukosit dan limfosit kelompok perlakuan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan nilai monosit dan segmen neutrofil rata-rata lebih cenderung tinggi pada kelompok mencit perlakuan. Tampak juga nilai trombosit yang cenderung lebih tinggi pada kelompok perlakuan (Tabel 1).

Selama pemantauan, bobot badan hewan coba dicatat dalam tabel. Pada akhir masa pemantauan bobot badan mencit rata-rata pada kelompok perlakuan cenderung menurun bila dibanding dengan sebelum penelitian, sedangkan bobot badan rata-rata mencit pada kelompok kontrol sedikit meningkat dibanding dengan awal. Pada akhir penelitian, bobot badan mencit rata-rata kelompok perlakuan lebih rendah bila dibanding

dengan bobot mencit rata-rata kelompok kontrol (Tabel 2 dan Tabel 3).

Pembahasan

Hewan coba model yang ditujukan untuk menumbuhkan sel kanker yang biasanya timbul pada manusia (*xenogeneic*) saat ini telah banyak dikembangkan.^{11,12} Hewan yang dipergunakan tersebut tidak/memiliki daya tahan tubuh yang rendah (defisiensi imun), misalnya *nude mice* atau *severe combine immuno-deficient*. Pemilihan hewan coba dengan defisiensi imun dimaksudkan untuk menghindari penolakan atau penghambatan terhadap sel kanker yang ditumbuhkan.¹³ Kebutuhan untuk pengembangan hewan coba model onkologi di Indonesia saat ini

Tabel 3 Bobot Badan Mencit Kelompok Kontrol Selama Masa Pemantauan

No	Kelompok dengan Perlakuan				
	Pengamatan Bobot Badan Hari ke- (dalam Gram)				
	1	5	8	12	15
1	37,62	38,11	39,2	38,9	40,71
2	34,52	34,35	33,0	31,96	33,78
3	36,18	35,17	34,0	33,42	32,76
4	38,92	38,23	43,1	40,96	43,14
5	34,83	34,63	34,2	34,43	34,97
6	39,23	42,11	39,5	39,27	42,24
7	44,69	45,35	39,0	39,08	42,36
8	30,12	30,84	32,4	33,71	35,08
Rata-rata	37,01				38,13

sangat diperlukan, namun masih terhambat oleh ketiadaan fasilitas laboratorium hewan yang memenuhi syarat. Perlu dilakukan modifikasi terhadap hewan untuk mendapatkan hewan coba dengan defisiensi imun, tetapi tetap dapat hidup di lingkungan laboratorium hewan yang tidak steril.

Cyclosporine A telah lama digunakan sebagai agen imunosupresan. Hasil penelitian ini telah menunjukkan bahwa penggunaan *cyclosporine A* mampu menurunkan daya tahan tubuh mencit model. Jumlah leukosit dan limfosit mencit pada kelompok perlakuan lebih rendah secara bermakna dibanding dengan kelompok kontrol ($p=0,01$). Hal ini sesuai dengan beberapa literatur sebelumnya mengenai efek supresi *cyclosporine* terutama pada limfosit.^{14,15} Keberadaan limfosit terutama limfosit T sangatlah memengaruhi pertumbuhan tumor yang diinokulasi ke dalam tubuh mencit.^{6,13} Penggunaan *cyclosporine* juga diketahui dapat menurunkan jumlah leukosit.¹⁶ Efek penurunan daya tahan tubuh juga terlihat pada bobot badan mencit tersebut selama masa pengamatan. Bobot badan mencit kelompok perlakuan mengalami penurunan ($\chi=2,76$ g), sedangkan bobot badan mencit pada kelompok kontrol akan mengalami peningkatan ($\chi=1,12$ g). Penurunan berat badan merupakan salah satu efek samping yang dapat terjadi pada pasien yang mendapatkan terapi *cyclosporine*.¹⁷⁻¹⁹

Pemeriksaan patologi anatomi pada organ tubuh mencit tidak memperlihatkan keganasan payudara, baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh 2 hal, yaitu pertama, imun mencit walaupun telah tertekan, namun belum cukup rendah untuk menghindari respons penolakan terhadap galur sel SKBR3 yang disuntikkan. Kedua, galur sel SKBR3 yang disuntikkan masih dalam jumlah yang terlalu kecil.

Gambaran bengkak keruh pada 2 sampel hati kelompok perlakuan tidak kuat mengindikasikan pertumbuhan atau dampak dari galur sel SKBR-3 di hati. Perubahan sel yang memperlihatkan gambaran bengkak keruh merupakan gambaran perubahan sitoplasma akibat jejas pada sel normal. Gambaran awal perubahan ke arah keganasan pada suatu sel adalah gambaran displasia yang terjadi karena kerusakan DNA yang tidak mematenkan.²⁰

Simpulan, metode yang dilaksanakan belum mampu menumbuhkan keganasan payudara, namun pemberian *cyclosporine A* terbukti dapat menurunkan daya tahan tubuh mencit Balb/c. Pemberian antibiotik profilaksis dapat mencegah mencit terkena infeksi selama pemeliharaan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran atas dana hibah Penyelesaian Pendidikan tahun 2014. Terima kasih juga disampaikan kepada Siti Darwati, dra., M.Sc, sebagai Kepala Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR) BATAN, Dr. Betty S. Hernowo, dr., Sp.PA(K) Dep. Patologi Anatomi FK Unpad/RSHS, Dr. Rohadi Awaluddin sebagai Kepala Bidang Radiofarmaka PTRR BATAN, Sri Setyowati sebagai laboran di Lab. Sitologi PTRR BATAN, Karyadi dan Sri Aguswarini L sebagai laboran di Lab. Hewan PTRR BATAN, dan Mumuh Muhidin sebagai laboran di Lab. Hewan Departemen Farmakologi FK Unpad.

Daftar Pustaka

1. Workman P, Aboagye EO, Balkwil F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, dkk. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*. 2010;102:1555-77.
2. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans?. *Philos Ethics Humanit Med*. 2009;4(2):1-20.
3. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, dkk. Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res*. 2005;32(1-3):231-45.
4. O'Brien CA, Pollet A, Gallinger S, Dick JE. A Human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;(445):1-5.
5. Fogh J, Giovanella BC. Use of nude mice for studies on the tumorigenicity of animal cells. Dalam: the nude mouse in experimental and clinical research. New York: Academic Press; 1978.
6. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine model to evaluate novel and conventional therapeutic for cancer. *Am J Pathol*. 2007;170(3):793-804.
7. Belizario JE. Immunodeficient mouse model: an overview. *Open Immunol J*. 2009;2:79-85.
8. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunol*. 2005;6(4):353-9.
9. Gopinathan A, Tuveson DA. The use of gem models for experimental cancer therapeutics. *Disease Models Mechanism*. 2008;1(2-3):83-6.
10. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ

- transplantation: mechanism of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(1):23-46.
11. Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*. 2006;8(4):1-11.
 12. Richmond A, Su Y. Mouse xenograft model vs gem models for human cancer therapeutics. *Disease Models Mechanism*. 2008;1:78-82.
 13. Scriber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1564-70.
 14. Jivrajani M, Shaikh MV, Shrivastana N, Nivsarkar M. An improved and versatile immunosuppression protocol for the development of tumour xenograft in mice. *Anticancer Res*. 2014;34(12):7177-83.
 15. Masaru K, Hiroaki K, Chantal M, Mark W, Jacques P. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine a on the development of regulatory t cells in vivo. *Transplantation*. 2005;79(9):1073-7.
 16. Lekenopenia in Cyclosporine [internet] 13 April 2015 [diunduh 30 April 2015]. Tersedia dari: <http://www.ehealthme.com/print/ds15646676>
 17. Neoral [brosur]. East Hanover, NJ: Novartis Pharmaceutical Corp; 2015.
 18. Sandimmune [brosur]. East Hanover, NJ: Novartis Pharmaceutical Corp; 2015.
 19. Cyclosporine Sandoz [brosur]. Pyrmont, NSW: Sandoz Pty Ltd; 2012.
 20. Mehendale HM. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol*. 2005;33:41-51.