

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI mRNA
SIGNAL REGULATORY PROTEIN ALPHA DENGAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI RISIKO TINGGI
PADA PASIEN RETINOBLASTOMA**

TESIS

Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Studi Ilmu Kesehatan Mata



Diajukan oleh:

dr. Datu Respatika

NIM. 18/435907/PKU/17679

Pembimbing:

Prof. Dr. dr. Agus Supartoto, Sp.M(K)

dr. Supanji, M.Kes., Ph.D., Sp.M(K)

dr. Didik Setyo Heriyanto, Ph.D., Sp.PA(K)

**DEPARTEMEN ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT, DAN
KEPERAWAATAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI mRNA SIGNAL REGULATORY PROTEIN ALPHA DENGAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI RISIKO TINGGI PADA PASIEN RETINOBLASTOMA

TESIS

Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Studi Ilmu Kesehatan Mata

Diajukan oleh:

dr. Datu Respatika

NIM. 18/435907/PKU/17679

Tesis ini telah dikoreksi, disetujui dan dipertahankan di depan Sidang Dewan Penguji Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Ilmu Kesehatan Mata dan dinyatakan:


LULUS

Sehingga diterima sebagai Karya Tulis Ilmiah Akhir untuk memperoleh gelar
Dokter Spesialis Mata pada tanggal 16 Juni 2022

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Pembimbing 3



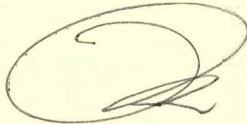
Prof. Dr. dr. Agus Supartoto,
Sp.M(K)

NIP. 195508081984031001



dr. Supanji, M.Kes., Ph.D.,
Sp.M(K)

NIP. 197705182008011012



dr. Didik Setyo Heriyanto,
Ph.D., Sp.PA(K)

NIP. 198008042014041002



Mengetahui,

Ketua Program Studi
PPDS Ilmu Kesehatan Mata

Kepala Departemen
Ilmu Kesehatan Mata



dr. Supanji, M.Kes., Ph.D., Sp.M(K)
NIP. 197705182008011012



dr. M. Bayu Sasongko, M.Epi., Ph.D., Sp.M(K)
NIP. 198101182008121002

LEMBAR PENGESAHAN

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI mRNA SIGNAL REGULATORY PROTEIN ALPHA DENGAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI RISIKO TINGGI PADA PASIEN RETINOBLASTOMA

TESIS

Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Studi Ilmu Kesehatan Mata

Diajukan oleh:

dr. Datu Respatika

NIM. 18/435907/PKU/17679

Tesis ini telah dikoreksi, disetujui dan dipertahankan di depan Sidang Dewan Penguji Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Ilmu Kesehatan Mata dan dinyatakan:

LULUS

Sehingga diterima sebagai Karya Tulis Ilmiah Akhir untuk memperoleh gelar
Dokter Spesialis Mata pada tanggal 16 Juni 2022

Dewan Penguji:

1. Prof. Dr. dr. Agus Supartoto, Sp.M(K)

2. dr. Supanji, M.Kes., Ph.D., Sp.M(K)

3. dr. Didik Setyo Heriyanto, Ph.D., Sp.PA(K)

4. dr. Angela Nurini Agni, M.Kes., Sp.M(K)

5. dr. Purjanto Tepo Utomo, Sp.M(K)

PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Datu Respatika

NIM : 18/435907/PKU/17679

Tahun Terdaftar : 2018

Program Studi : PPDS Ilmu Kesehatan Mata

Fakultas/Sekolah : Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan

Menyatakan bahwa dalam dokumen ilmiah Tesis ini tidak terdapat bagian karya ilmiah lain yang telah diajukan untuk memperoleh gelar akademik di suatu lembaga Pendidikan Tinggi, dan juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang/lembaga lain, kecuali yang secara lengkap dalam daftar pustaka.

Dengan demikian saya menyatakan bahwa dokumen ilmiah ini bebas dari unsur-unsur plagiasi dan apabila dokumen ilmiah Tesis ini di kemudian hari terbukti merupakan plagiasi dari hasil karya penulis lain dan/atau dengan sengaja mengajukan karya atau pendapat yang merupakan hasil karya penulis lain, maka penulis bersedia menerima sanksi akademik dan/atau sanksi hukum yang berlaku

Yogyakarta, 16 Juni 2022



Datu Respatika
18/435907/PKU/17679

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap syukur pada Tuhan Yang Maha Esa, penelitian dengan judul “Hubungan antara Ekspresi mRNA *Signal Regulatory Protein Alpha* dengan Gambaran Histopatologi Risiko Tinggi Pada Pasien Retinoblastoma” dapat diselesaikan dengan baik dan lancar. Penelitian ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik dengan minat utama PPDS Ilmu Kesehatan Mata. Penulis berterima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini:

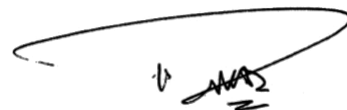
1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Sudibyo Martono dan Ibu Setyalastuti yang selalu memberikan perhatian, cinta, dukungan, dan kesabaran dalam menunggu studi hingga selesai, juga adik, Dito Anggoro yang memberikan berbagai dukungan dan keceriaan selama masa studi.
2. Dekan Fakultas Kedokteran, Ilmu Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada atas pemberian kesempatan pada penulis melakukan penelitian.
3. Direktur Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito yang memberikan izin dan fasilitas sehingga penelitian dapat berjalan lancar.
4. Prof. Dr. dr. Agus Supartoto, Sp.M(K), dr. Supanji, M.Kes., Ph.D., Sp.M(K), dan dr. Didik Setyo Heriyanto, Ph.D., Sp.PA(K) sebagai pembimbing yang telah memberikan banyak waktu, ilmu, dan semangat selama penelitian berlangsung sejak awal hingga selesainya penelitian dengan lancar.
5. dr. Angela Nurini Agni, M.Kes., Sp.M(K) dan dr. Purjanto Tepo Utomo, Sp.M(K) sebagai penguji yang memberikan banyak masukan yang membangun hingga penulis menyelesaikan penelitian ini.

6. Seluruh guru saya, Alm. Prof. dr. Wasisdi Gunawan, Sp.M(K), Prof. dr. Suhardjo, SU., Sp.M(K), dr. Hartono, Sp.M(K), dr. Tri Wahyu Widayanti, M.Kes., Sp.M(K), Dr. dr. Retno Ekantini, M.Kes., Sp.M(K), dr. R. Haryo Yudono, M.Sc., Sp.M(K), dr. Tatang Talka Gani, Sp.M(K), dr. Sagung Gede Indrawati, Sp.M(K), dr. Firman Setya Wardhana, M.Kes., Sp.M(K), dr. Eva Revana, Sp.M, dr. Muhammad Eko Prayogo, M.Med.Ed., Sp.M(K), dr. Widyandana, MHPE, Ph.D, Sp.M(K), dr. Agung Nugroho, Sp.M, dr. Tri Winarti Sp.M, dr. Dhimas Hari Sakti, Sp.M, dr. Banu Aji Dibyasakti, Sp.M, dr. Reny Setyowati, Sp.M, dr. Syam Suharyono, Sp.M, dr. Indra Tri Mahayana, Ph.D, Sp.M, dr. Krisna Dwi Purnomo Jati, Sp.M, dr. Irene Titin Darajati, Sp.M, dr. Albaaza Nuady, Sp.M, dr. Amanda Nur Shinta Pertiwi, Sp.M, dr. Christina Dewi Ratnaningsih, Sp.M, dr. Francisca Endang Sulistyawati, Sp.M, dr. Ahmad Prasetyanto Utomo, Sp.M, dr. Erin Arsianti, M.Sc., MPH., Sp.M(K), dr. Rinanto Prabowo, M.Sc., Sp.M(K), dr. Sriharto, MARS., Sp.M, Alm. dr. Elisa S. Manueke, Sp.M, dr. Sukirman, Sp.M, dr. Santi Widya Sp.M, dan dr. Wiwik Widowati, Sp.M, atas segala ilmu yang telah diberikan selama masa pendidikan.
7. Sahabat yang mendampingi dalam segala suasana, dr. Widya Rmania Sp.M, dr. Gina Rahmah, dr. Karisma Muhammad Sutomo, dr. Nurmalia Mabruroh, dr. Dimas Nugroho Kurniawan, Sp.M, dr. Aprilia Rahmawati, dr. Muhamad Dwi Nugroho, Sp.M, dr. Pramudya Budi Kusumawardana, dr. Nisa El Zahra, dr. Aloysius Angga Wibawa, dr. Gandhi Anandika Febriyanto, M.Sc, dr. Endah Prasetyowati, MPH, dr. Sarah Rizqia Indrayanti, dr. Meta Rahma An Nazilla, dr. Reza Aulia, dr Andi Ashady Fitrah Pallawangi, dr. Aufaa Shafira Widowati, dan dr Felicia Widyaputri, Ph.D.

8. Tim penelitian dr. Aloysius Angga Wibawa, dr. Endah Prasetyowati, MPH, dr. Sarah Rizqia Indrayanti, dr. Meta Rahma An Nazilla, dan dr. Adimas Endro Wibisono yang memastikan penelitian berjalan lancar.
9. Seluruh rekan residen yang tidak dapat disebutkan satu persatu, tenaga kependidikan Mbak Thiwuk, Mbak Yayang, Mbak Patra, Mbak Nove, Mas Putro, Pak Sugeng, Pak Agus, Pak Gunawan, tata usaha, dan perawat, serta seluruh pegawai Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran, Ilmu Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada – RSUP dr. Sardjito, RSM. dr. Yap, yang namanya tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga seluruh doa dan dukungan Bapak, Ibu, dan Saudara sekalian mendapatkan imbalan dari Tuhan Yang Maha Esa, dan ilmu yang didapatkan selama masa studi ini dapat memberikan manfaat bagi sesama.

Yogyakarta, 16 Juni 2022



Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR BAGAN	x
ABSTRACT	xi
INTISARI	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. PERUMUSAN MASALAH	3
C. TUJUAN PENELITIAN	3
D. MANFAAT PENELITIAN	4
E. KEASLIAN PENELITIAN	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. RETINOBLASTOMA DAN EPIDEMIOLOGI	5
B. PATOFIOLOGI DAN TUMORIGENESIS DARI RETINOBLASTOMA	6
C. SISTEM PENGAWASAN IMUN	6
D. SISTEM SINYAL SIRP α -CD47	9
E. SIRP α -CD47 IMMUNE-CHECKPOINT PADA TUMOR	11
F. IMUNOTERAPI MELALUI ANTIBODI ANTI CD47	12
G. EKSPRESI SIRP α PADA RETINOBLASTOMA	14
H. IMMUNE CHECKPOINT, TUMORIGENESIS, DAN RETINOBLASTOMA	15
I. TEORI DOGMA SENTRAL	16
J. LANDASAN TEORI	17
K. KERANGKA TEORI	18
L. KERANGKA KONSEP	19
M. HIPOTESIS	19
BAB III. METODE PENELITIAN	20
A. RANCANGAN PENELITIAN	20
B. PENGUMPULAN DATA	20
C. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI	20
D. TEKNIK PENGAMBILAN DAN BESAR SAMPEL	21
E. VARIABEL PENELITIAN	21
F. PROSEDUR PEMERIKSAAN SIRPA	22
G. DEFINISI OPERASIONAL	27
H. SARANA PENELITIAN	28
I. JALANNYA PENELITIAN	29
J. KERANGKA PENELITIAN	29
K. ANALISIS STATISTIK	30
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
A. DATA DEMOGRAFIS PADA PASIEN RETINOBLASTOMA	31
B. EKSPRESI SIRP α PADA RETINOBLASTOMA	32
C. HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI SIRP α DENGAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI RISIKO TINGGI JARINGAN RETINOBLASTOMA	33
D. PERBANDINGAN EKSPRESI SIRP α PADA PASIEN DENGAN DAN TANPA RIWAYAT KEMOTERAPI ATAU NEOADJUVAN	35
E. HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI SIRP α DENGAN GAMBARAN KLINIS PASIEN RETINOBLASTOMA	38
F. BATASAN PENELITIAN	40
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	42
A. KESIMPULAN	42
B. SARAN	42
DAFTAR PUSTAKA	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Perkembangan dari retinoblastoma.....	7
Gambar 2.	Regulasi ekspresi permukaan PD-1 dan PD-L1.	9
Gambar 3.	Regulasi negatif fagositosis dengan ligasi CD47-SIRP α	10
Gambar 4.	Kemungkinan peran SIRP α dalam diferensiasi sel CD4 ⁺ T.....	11
Gambar 5.	Destruksi tumor dengan memblokir interaksi SIRP α -CD47.....	12
Gambar 6.	Ekspresi SIRP α pada Retina Manusia	14
Gambar 7.	Evolusi Dogma Sentral.	16
Gambar 8.	Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma.....	33
Gambar 9.	Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma dengan Gambaran Klinis Risiko Tinggi vs Gambaran Klinis Risiko Rendah.	34
Gambar 10.	Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma Dengan Kemoterapi vs Pasien Retinoblastoma Tanpa Kemoterapi.	36
Gambar 11.	Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma Dengan Kemoterapi Neoadjuvan vs Pasien Retinoblastoma Tanpa Kemoterapi Neoadjuvan.	36
Gambar 12.	Stadium IIRC (kiri) dan IRSS (kanan) pada Pasien Retinoblastoma.....	38
Gambar 13.	Data Metastasis Pasien Retinoblastoma Berdasarkan IIRC (kiri) dan IRSS (kanan). .	40
Gambar 14.	Data Metastasis (kiri) dan Lokasi Metastasis (kanan) Pasien Retinoblastoma.	40

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian Mengenai SIRP α Pada Tumor.....	4
Tabel 2. Karakteristik Dasar Pasien Retinoblastoma	31
Tabel 3. Karakteristik Ekspresi SIRP α dan Derajat Histopatologi Pasien Retinoblastoma.....	34
Tabel 4. Hubungan antara Ekspresi SIRP α dengan Gambaran Klinis Pasien Retinoblastoma.....	39

DAFTAR BAGAN

Bagan 1. Kerangka Teori.....	18
Bagan 2. Kerangka Konsep	19
Bagan 3. Kerangka Penelitian	29

ABSTRACT

Relationship between Signal Regulatory Protein Alpha with High Risk Histopathology Degree in Patients with Retinoblastoma

Datu Respatika¹, Supanji¹, Didik Setyo Heriyanto², Angela Nurini Agni¹, Purjanto Tepo Utomo¹, Agus Supartoto¹

¹Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Public Health and Nursing, Universitas Gadjah Mada-Dr. Sardjito General Hospital

²Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, Public Health and Nursing, Universitas Gadjah Mada-Dr. Sardjito General Hospital

Purpose

To determine the expression of Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) and its relationship with high-risk histopathology degree in retinoblastoma patients.

Methods

This was an analytic observational study with cross-sectional design. Total 47 patients were enrolled in this study. The mRNA of SIRP α were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and quantified with quantitative PCR method.

Results

All samples showed an increase of SIRP α expression (12.38 ± 5.69 fold change) when compared to normal retina. We then grouped the patient based on SIRP α expression and histopathological degree. There was association between high expression of SIRP α and high-risk histopathological degree in patient with retinoblastoma ($p=0.003$).

Conclusion

There was an increased expression of SIRP α in patient with retinoblastoma. Furthermore, the high expression of SIRP α were associated with high-risk histopathological degree of retinoblastoma.

Keywords

SIRP α , Retinoblastoma, mRNA, Immunotherapy, Histopathology

INTISARI

Hubungan Antara Ekspresi mRNA *Signal Rergulatory Protein Alpha* dengan Gambaran Histopatologi Risiko Tinggi pada Pasien Retinoblastoma

Datu Respatika¹, Supanji¹, Didik Setyo Heriyanto², Angela Nurini Agni¹, Purjanto Tepo Utomo¹, Agus Supartoto¹

¹Departmen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada-RSUP. Dr. Sardjito

²Departmen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada-RSUP. Dr. Sardjito

Latar Belakang

Untuk mengetahui ekspresi *Signal Regulatory Protein Alpha* (SIRP α) dan hubungannya dengan derajat histopatologi risiko tinggi pada pasien retinoblastoma.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain potong lintang. Total 47 pasien yang terdaftar dalam penelitian ini. mRNA SIRP α diekstraksi dari bagian jaringan yang difiksasi dengan formalin, parafin dan dikuantifikasi dengan metode PCR kuantitatif.

Hasil

Semua sampel menunjukkan peningkatan ekspresi SIRP α (perubahan $12,38 \pm 5,69$ kali lipat) jika dibandingkan dengan retina normal. Kami kemudian mengelompokkan pasien berdasarkan ekspresi SIRP α dan derajat histopatologi. Terdapat hubungan antara ekspresi SIRP α yang tinggi dengan derajat histopatologis risiko tinggi pada pasien retinoblastoma ($p=0,003$).

Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan adanya peningkatan ekspresi SIRP α pada pasien dengan retinoblastoma. Lebih lanjut, ekspresi SIRP α yang tinggi dikaitkan dengan derajat histopatologis retinoblastoma yang berisiko tinggi.

Kata Kunci

SIRP α , Retinoblastoma, mRNA, Imunoterapi, Histopatologi

BAB I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Retinoblastoma adalah keganasan intraokular paling umum pada anak-anak, yang timbul dari sel-sel retinoblas yang belum matang dalam perkembangan retina. Keganasan ini adalah keganasan intraokular yang paling umum pada semua kelompok ras. Keganasan ini dapat menyebar ke otak melalui saraf optik dan metastasis jauh. Insidensi retinoblastoma dilaporkan sebanyak 1: 15.000 hingga 1: 20.000 kelahiran. Laporan menunjukkan bahwa insidensi retinoblastoma pada pria dan wanita memiliki frekuensi yang sama dan tidak memiliki kecenderungan ras (Yanoff & Sassani, 2014; Areán *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2015). Hanya 6% pasien retinoblastoma yang memiliki riwayat keluarga positif untuk retinoblastoma. Sampai sekarang, pasien dengan mutasi germinal, dengan riwayat tumor dalam keluarga, secara klinis masih sulit dibedakan dari pasien dengan mutasi somatik retinoblastoma (Abramson & Scheffler, 2004).

Enukleasi, kemoreduksi intravena, dan kemoterapi intra-arteri adalah modalitas utama terapi retinoblastoma (Shields & Shields, 2010). Sebuah studi retrospektif dari 107 mata melaporkan bahwa kemoterapi intra-arteri dapat mempertahankan bola mata pada 78,5% pasien dengan retinoblastoma (Chen *et al.*, 2017). Namun demikian dengan semua modalitas di atas, penelitian di Taiwan menunjukkan fakta bahwa tingkat kematian pasien retinoblastoma tetap tinggi (Chang *et al.*, 2006). Tingkat kekambuhan yang tinggi dan tingkat kelangsungan hidup yang rendah juga ditemukan pada pasien retinoblastoma yang dirawat di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Sardjito (Utomo, data tidak dipublikasikan).

Untuk menjawab tantangan di atas, beberapa strategi telah dikembangkan untuk terapi kanker. Kelompok pertama adalah inhibitor kuat untuk proliferasi sel tumor, seperti penghambat jalur sinyal Raf-MEK dan PI3K-mTOR (Caunt *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2018). Kelompok kedua adalah antibodi monoklonal yang ditargetkan pada sel tumor dan dengan demikian menginduksi destruksi sel tumor dengan *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis* (ADCP) yang dimediasi oleh makrofag dan *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) yang dimediasi oleh sel *Natural Killer* (NK) (Murata *et al.*, 2018a). Baik ADCP maupun ADCC memerlukan interaksi antara reseptor Fc pada sel efektor (makrofag / NK) dengan domain Fc dari antibodi monoklonal (Braster *et al.*, 2014). Sel-sel tumor solid diperkirakan dapat menghindari pengawasan sistem kekebalan tubuh melalui interaksi dengan sel-sel kekebalan tubuh yang disebut *immune checkpoint system* atau Sistem Pengawasan Imun (Alsaab *et al.*, 2017). *Signal Regulatory Protein Alpha* (SIRP α) dan CD47 merupakan salah satu dari sistem pengawasan imun yang berperan pada beberapa keganasan (Murata *et al.*, 2014; Murata *et al.*, 2018a; Lian *et al.*, 2019).

SIRP α sendiri adalah protein superfamili Ig yang menghambat fagositosis pada makrofag saat berinteraksi dengan ligan CD47 yang diekspresikan pada permukaan sel target (Matozaki *et al.*, 2009). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa interaksi CD47 pada sel tumor dengan SIRP α pada makrofag berfungsi untuk menghambat fagositosis sel tumor oleh makrofag (Matlung *et al.*, 2017; Jaiswal *et al.*, 2009; Majeti *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2012). Pada penelitian lain di tempat penulis melakukan studi S3, blokade SIRP α dengan antibodi monoklonal anti SIRP α dapat meningkatkan eliminasi sel tumor melalui ADCP yang dimediasi oleh makrofag

(Yanagita *et al.*, 2017; Murata *et al.*, 2018a). Hal ini mengakibatkan penekanan pertumbuhan tumor dan pencegahan metastasis tumor (Yanagita *et al.*, 2017).

Fakta menarik ditemukan pada beberapa studi lain, dimana SIRP α telah dibuktikan diekspresikan pada beberapa sel termasuk pada sel retina (Murata *et al.*, 2014; Respatika *et al.*, 2017; Hamada *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini, penulis ingin mengetahui apakah sel retinoblastoma, yang berasal dari retina, juga mengekspresikan SIRP α . Peneliti juga ingin mengetahui apakah SIRP α berhubungan dengan derajat keganasan retinoblastoma yang digambarkan dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pada pemeriksaan patologi anatomi.

B. PERUMUSAN MASALAH

1. Apakah sel tumor Retinoblastoma mengekspresikan protein trans-membran SIRP α ?
2. Apakah ekspresi SIRP α berkaitan dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pada pasien Retinoblastoma?

C. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui ekspresi protein trans-membran SIRP α pada sel tumor Retinoblastoma.
2. Mengetahui hubungan antara ekspresi SIRP α dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pasien Retinoblastoma

D. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini membantu kita untuk memahami peran SIRP α dalam retinoblastoma. Hal ini menyebabkan pemahaman yang lebih baik tentang proses molekuler yang melibatkan SIRP α yang mungkin memainkan peran dalam pengembangan retinoblastoma. Dengan demikian, temuan penelitian ini dapat berkontribusi pada patogenesis retinoblastoma. Selain itu, hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan tambahan tentang kemungkinan imunoterapi untuk menyembuhkan retinoblastoma.

E. KEASLIAN PENELITIAN

Temuan dari studi sebelumnya menunjukkan SIRP α diekspresikan oleh melanoma dan karsinoma sel ginjal. Ekspresi SIRP α dalam jaringan retinoblastoma belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini akan fokus pada penelusuran ekspresi SIRP α yang dianggap memainkan peran penting dalam patogenesis retinoblastoma, yang belum pernah diteliti sebelumnya.

Tabel 1. Penelitian Mengenai SIRP α Pada Tumor

Peneliti/Desain	Variabel	Hasil
Yanagita et al., 2017(Yanagita et al., 2017) Observasional Analitik	Ekspresi SIRP α	<i>Human renal cell carcinoma</i> dan <i>Melanoma</i> menunjukkan ekspresi SIRP α
Chen et al., 2004(Chen et al., 2004) - Wu et al., 2000(Wu et al., 2000) Observasional Analitik	Ekspresi SIRP α	SIRP α diekspresikan oleh 8 dari 9 <i>astrocytoma cell lines</i> dan 7 dari 10 tumor otak primer
Tao et al., 2022(Tao et al., 2022) Observasional Analitik	Ekspresi SIRP α	Pada karsinoma esofagus, fungsi dan jalur biologis yang terkait dengan aktivitas kanker terlihat meningkat pada kelompok dengan ekspresi SIRP α yang tinggi

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. RETINOBLASTOMA DAN EPIDEMIOLOGI

Retinoblastoma berkembang setelah sel retina dengan RB1^{-/-} mengalami proliferasi dan membentuk retinoma jinak (Dimaras *et al.*, 2015). Retinoblastoma diperkirakan berasal dari sel prekursor fotoreseptor, yang berkembang di masa kanak-kanak, dapat diwariskan atau tidak diwariskan, dan melibatkan satu atau kedua mata (Chintagumpala *et al.*, 2007; Vasalaki *et al.*, 2017). Tumor ini adalah keganasan intraokular paling sering pada anak-anak di seluruh dunia, dengan 50-60 kasus baru per tahun di Inggris Raya dan 300-400 di Amerika Serikat (Vasalaki *et al.*, 2017). Sebuah penelitian melaporkan bahwa 95% kasus terjadi pada anak di bawah usia 5 tahun. Sedangkan retinoblastoma bilateral dapat terjadi pada 20-30% kasus retinoblastoma (Kodrat & Gondhowiardjo, 2013). Kejadian kanker atau tumor mata di Indonesia belum tercatat secara baik. Adapun laporan spesifik mengenai retinoblastoma di RS Adam Malik, Medan dari tahun 1995-1999, menunjukkan ada 19 kasus dengan jumlah laki-laki sebanyak 9 orang dan perempuan sebanyak 10 orang (Lubis, 2001). Pada tahun 2011-2016, RS Adam Malik, Medan, kembali melaporkan 129 kasus baru retinoblastoma dengan rasio yang sama antara laki-laki dan perempuan (Simanjuntak & Miranda, 2018). Laporan dari RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, ditemukan sebanyak 44 penderita retinoblastoma sejak tahun 2010 – 2012 (Soebagjo *et al.*, 2013). Berdasarkan data dari *Yogyakarta Paediatric Cancer Registry*, sejak tahun 2000 hingga 2009, setidaknya didapatkan sebanyak 74 kasus retinoblastoma (Ali *et al.*, 2010). Departemen Ilmu Kesehatan Mata RSUP Dr. Sardjito mencatat terdapat 51 kejadian retinoblastoma sejak tahun 2012 hingga 2017 (Supartoto *et al.*, 2016).

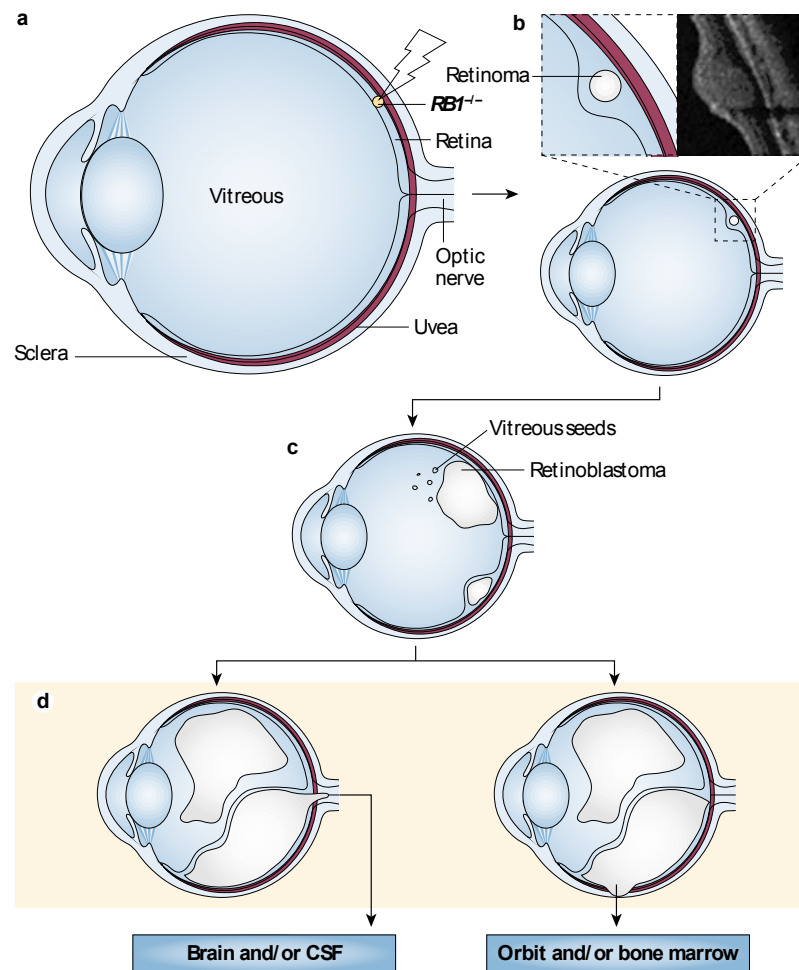
B. PATOFIOLOGI DAN TUMORIGENESIS DARI RETINOBLASTOMA

pRB adalah protein yang dikenal sebagai produk gen RB1 yang memiliki fungsi anti-proliferasi penting dalam pengaturan sel prekursor fotoreseptor kerucut. Dalam perkembangan sel retina, mutasi RB1 menyebabkan hilangnya fungsi pRB. Gangguan fungsional ini diikuti oleh proliferasi sel retina (RB1^{-/-}) yang muncul sebagai retinoma. Akhirnya, retinoma dapat berlanjut dan berkembang menjadi retinoblastoma (hanya 5% pasien memiliki retinoma yang tidak berkembang menjadi retinoblastoma) (**Error! Reference source not found.**) (Dimaras *et al.*, 2008). Proliferasi sel retina yang tidak terkontrol terjadi setelah perubahan genetik atau epigenetik yang mendorong perkembangan tumor intraretina. Ketidakmampuan untuk mengikuti stimulasi cahaya dan leukokoria (tumor putih yang terlihat melalui pupil) adalah tanda yang paling umum ditemukan pada pasien retinoblastoma (Dimaras *et al.*, 2012). Dalam banyak kasus, penglihatan dan mata pasien dapat diselamatkan dan kanker dapat disembuhkan, ketika deteksi dini retinoblastoma dan terapi yang tepat dilakukan. Namun, diagnosis yang tertunda dapat menyebabkan invasi tumor pada saraf optik dan otak yang mengakibatkan penyakit fatal, atau metastasis di bagian lain tubuh..

C. SISTEM PENGAWASAN IMUN

Lingkungan mikro tumor diinfiltrasi oleh beberapa jenis sel imun bawaan dan adaptif. Namun fungsi pengawasan dari sistem imun sering kali ditekan oleh berbagai mekanisme (Thorsson *et al.*, 2018; Binnewies *et al.*, 2018). Penekanan pada sistem sinyal dan sistem metabolik mewakili dua penyebab utama penekanan fungsi pengawasan dari sistem imun. Penekanan sinyal ditunjukkan oleh cara sel tumor

menurunkan regulasi aktivitas imuno-reseptor stimulator sambil meningkatkan aktivitas imuno-reseptor penghambat.



Gambar 1. Perkembangan dari retinoblastoma.

A. Gambaran anatomi mata yang sehat. B. Ketidakstabilan genom akan menyebabkan pembentukan retinoma; Inset menunjukkan retinoma kecil yang tidak terdeteksi kecuali dengan OCT. C. Retinoblastoma intranetina yang timbul dari perubahan gen yang menyebabkan proliferasi tidak terkontrol; Tumor berkembang dan menyebar ke jaringan independen, menempel di bawah retina dan memasuki vitreous. D. Retinoblastoma dapat menyerang jaringan di sekitarnya (Dimaras *et al.*, 2015).

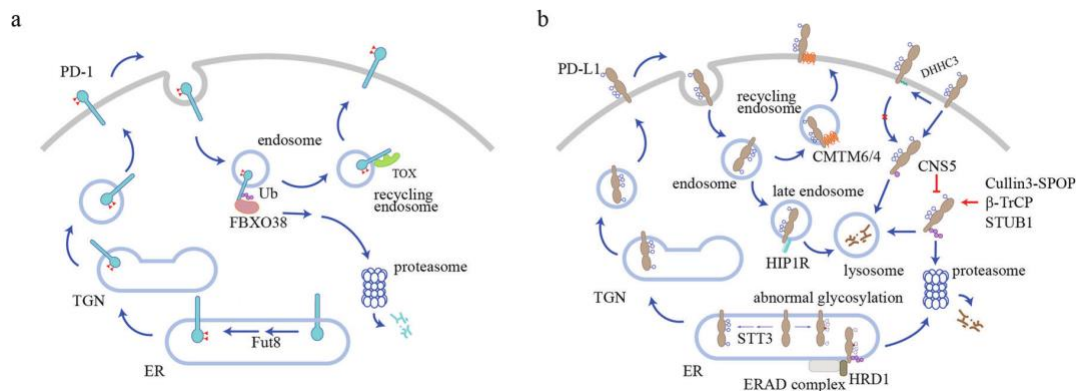
Fakta menunjukkan bahwa sel tumor dapat menurunkan sinyal stimulasi yang dimediasi reseptor sel T dengan menurunkan regulasi level MHC-I di permukaan sel (McGranahan *et al.*, 2017). Di sisi lain, sel tumor dapat menyesuaikan sinyal penghambatan fungsi pengawasan dari sistem imun yang dimediasi oleh *Programmed Cell Death Protein – 1* (PD-1) dengan meningkatkan ekspresi imuno-reseptor

penghambat (*Programmed Death Ligand – 1* atau PD-L1) pada permukaan sel (Iwai *et al.*, 2002). Oleh karenanya, banyak penelitian mengenai konsep penanganan tumor/keganasan yang dicapai dengan menghalangi interaksi PD-1 dan PD-L1, untuk aktivasi fungsi anti tumor dari sistem imun (Borghaei *et al.*, 2015; Ribas & Wolchok, 2018).

Ekspresi imuno-reseptor penghambat yang tinggi di permukaan sel sangat bergantung pada lingkungan mikro tumor, namun mekanisme yang mendasarinya belum sepenuhnya dipahami. Sebagai protein membran, reseptor sistem pengawasan imun diekspresikan dalam retikulum endoplasma dan kemudian dikirim ke permukaan sel untuk menjalankan fungsi penghambatannya. Proses ini melibatkan transportasi berurutan melalui aparatus golgi dan vesikel sekretori oleh sistem penyortiran protein. Selama pengiriman ke permukaan sel, glikosilasi berfungsi sebagai kontrol kualitas untuk memastikan hanya reseptor sistem pengawasan imun yang matang dan fungsional yang dikirim ke permukaan sel (Mellman & Nelson, 2008; Xu & Ng, 2015). Setelah mencapai permukaan sel, reseptor sistem pengawasan imun akan mengalami internalisasi dan daur ulang, yang menawarkan jalur pengaturan cepat untuk memodulasi level permukaan dari reseptor sistem pengawasan imun (Katzmann *et al.*, 2002; Grant & Donaldson, 2009).

Degradasi protein yang dimediasi *ubiquitination* adalah mekanisme penting lainnya yang berperan mengontrol level protein. Selain itu reseptor sistem pengawasan imun dapat mengalami proses *ubiquitination* dan diteruskan ke *proteasome* atau lisosom untuk degradasi. Proses seluler di atas, secara bersama-sama akan menentukan tingkat ekspresi reseptor sistem pengawasan imun yang berperan

penting dalam pembentukan proses transfer sinyal antar sel (Gambar 2) (He & Xu, 2020).



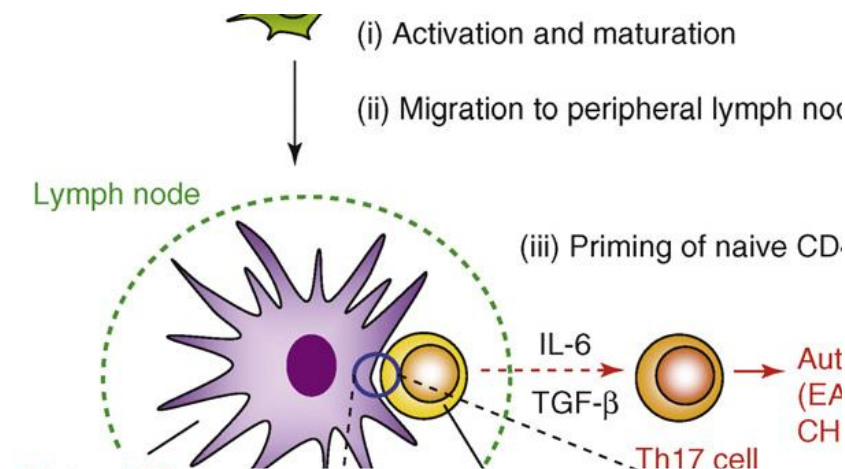
Gambar 2. Regulasi ekspresi permukaan PD-1 dan PD-L1.

A. jalur fukosilasi inti yang dimediasi Fut8 diperlukan untuk ekspresi permukaan PD-1. PD-1 yang diinternalisasi di mana-mana oleh FBXO38 untuk degradasi proteasomal dan juga dapat didaur ulang ke permukaan dengan bantuan TOX di lingkungan mikro kanker hati. B. N-glikosilasi yang dikatalisis STT3 menstabilkan ekspresi permukaan PD-L1. Glikosilasi PD-L1 yang diinduksi P-S195 menyebabkan ERAD. PD-L1 yang diinternalisasi disortir ke lisosom oleh HIP1R untuk degradasi atau didaur ulang ke permukaan sel dengan bantuan CMTM6/4. PD-L1 di mana-mana oleh ligase E3 yang berbeda (HRD1, Cullin3-SPOP, -TrCP dan STUB1) di bawah konteks yang berbeda, dan dihilangkan oleh CNS5. Palmitoylation PD-L1 oleh DHHC3 menekan mono-ubiquitination dan degradasi lisosomnya (He & Xu, 2020).

D. SISTEM SINYAL SIRPα -CD47

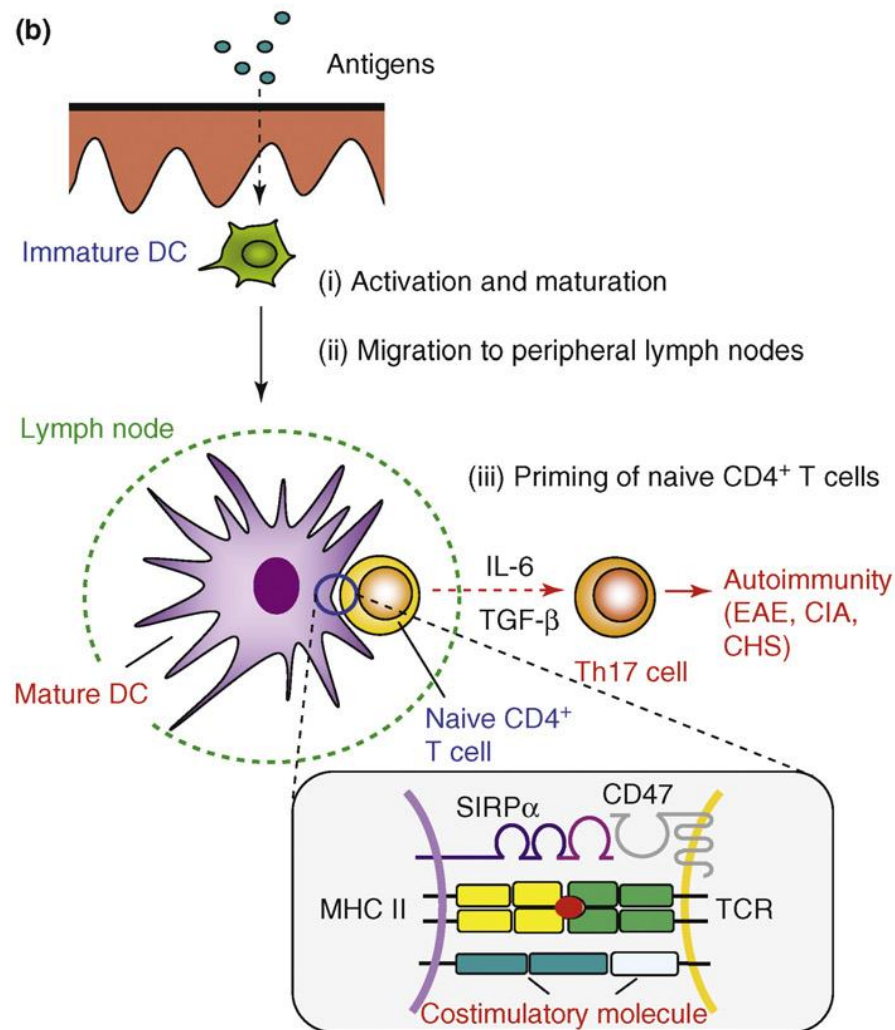
Signal regulatory protein alpha (SIRPα), juga dikenal sebagai SHPS-1 / BIT / CD172a, adalah protein imunoglobulin yang mengikat protein tirosin fosfatase SHP-1 dan SHP-2 melalui daerah sitoplasmiknya (Matozaki *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2014). CD47, merupakan sebuah protein imunoglobulin lain, protein trans-membran yang diekspresikan secara luas dalam tubuh manusia, yang berinteraksi dengan imuno-reseptor penghambat myeloid SIRPα. Kedua protein ini membentuk sistem komunikasi sel ke sel (sistem sinyal SIRPα-CD47) (Barclay & Van den Berg, 2014; Barclay, 2009). Ligasi SIRPα (pada makrofag) oleh CD47 (pada sel darah merah) meningkatkan fosforilasi tirosin dari SIRPα dan hubungannya selanjutnya dengan fosfatase SHP-1, menghasilkan penghambatan fagositosis (beroperasi sebagai "sinyal

jangan-makan-aku") dari sel darah merah oleh makrofag (Gambar 3) (Matozaki *et al.*, 2009).



Gambar 3. Regulasi negatif fagositosis dengan ligasi CD47-SIRPα (Matozaki *et al.*, 2009).

Dilain pihak, fagositosis patogen oleh sel dendritik yang imatur mengaktifkan sel dendritik itu sendiri. Sel dendritik kemudian bermigrasi ke kelenjar getah bening perifer dan menstimulasi sel CD4⁺ T naif, hingga berdiferensiasi menjadi sel Th17 dengan adanya IL-6 dan TGF-β (Gambar 4). SIRPα, melalui interaksinya dengan CD47, berpotensi untuk memiliki banyak peran dalam proses ini. Misalnya, kemungkinan SIRPα untuk mempromosikan sel T kepada sel dendritik yang berakibat pada aktivasi sel T. Hal ini diperkirakan terjadi melalui interaksi dengan CD47 pada sel T, dengan cara yang secara fungsional mirip dengan yang terlihat pada molekul ko-stimulatori lainnya pada sel dendritik. Sehingga dapat disimpulkan bahwa, jalur SIRPα-CD47 juga terlibat dalam pengembangan sel dendritik (Matozaki *et al.*, 2009).

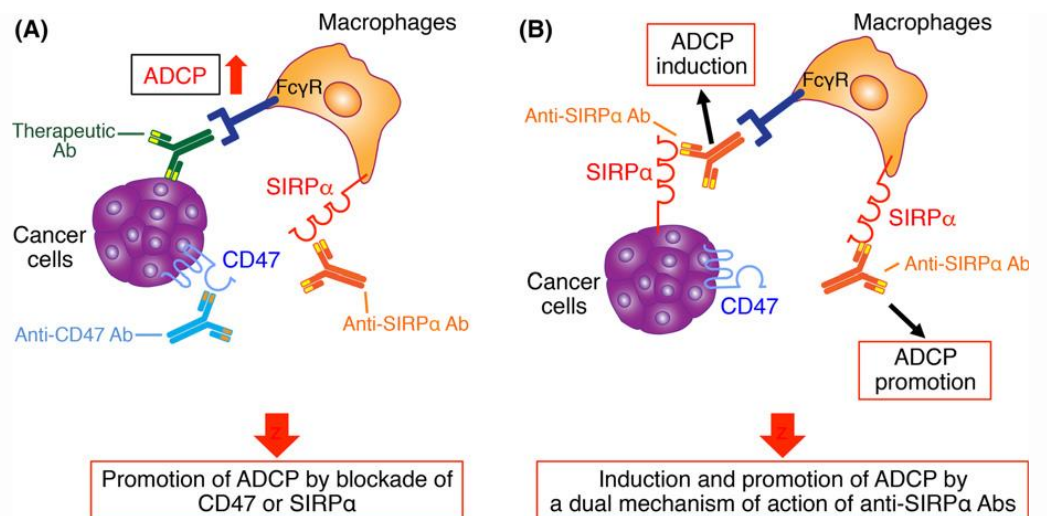


Gambar 4. Kemungkinan peran SIRPα dalam diferensiasi sel $CD4^+$ T (Matozaki et al., 2009).

E. SIRPα -CD47 IMMUNE-CHECKPOINT PADA TUMOR

Sel tumor diperkirakan dapat menghindari pengawasan sistem imun melalui interaksi dengan sel sistem imun itu sendiri. Oleh karenanya, banyak perhatian baru-baru ini difokuskan pada modifikasi respon dari sistem imun sebagai dasar pengobatan tumor. Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan ekspresi CD47 pada berbagai keganasan termasuk leukemia, limfoma, *multiple myeloma* dan tumor padat seperti payudara, usus besar, karsinoma hepatoseluler, serta melanoma (Majeti

et al., 2009; Chao *et al.*, 2011a; Chao *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Steinert *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013).



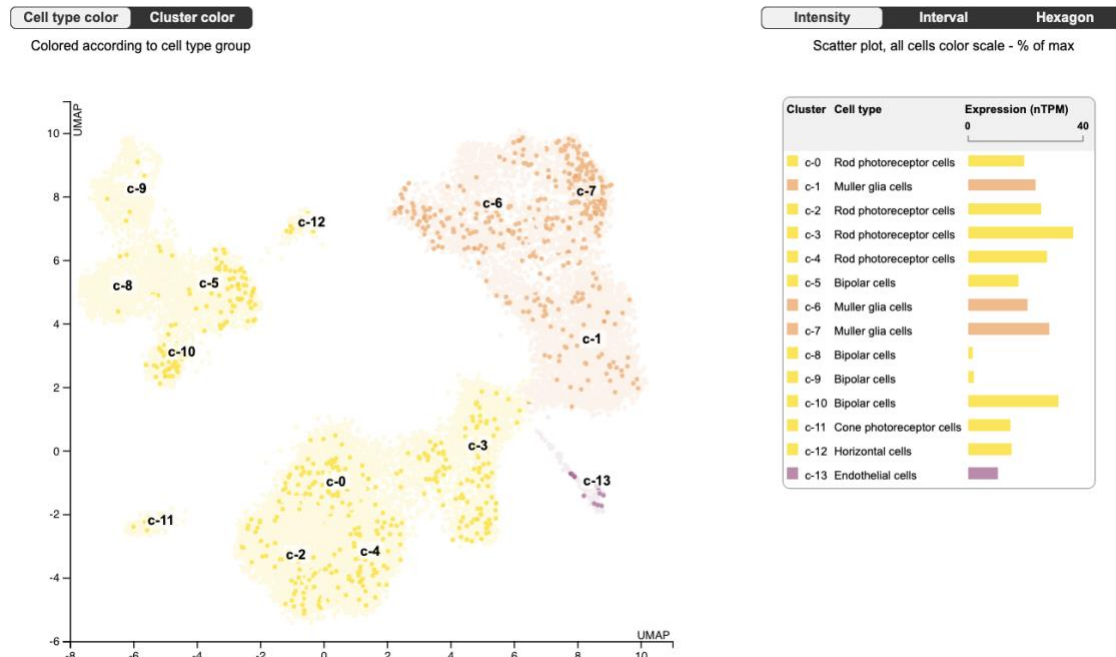
Gambar 5. Destruksi tumor dengan memblokir interaksi SIRPα-CD47
(Murata *et al.*, 2018a).

Sebuah studi dari laboratorium kami sebelumnya menunjukkan bahwa SIRPα diekspresikan dalam karsinoma sel ginjal manusia dan melanoma. Selain itu, antibodi anti-SIRPα yang memblokir interaksi SIRPα dengan CD47, secara nyata menekan perkembangan tumor pada karsinoma sel ginjal atau sel melanoma pada tikus *syngeneic* yang imunokompeten (Yanagita *et al.*, 2017). Efek penghambatan antibodi ini tampaknya dimediasi oleh mekanisme ganda (Gambar 5): induksi langsung fagositosis seluler sel tumor oleh makrofag yang bergantung pada antibodi dan blokade sinyal CD47-SIRPα yang secara negatif mengatur fagositosis tersebut (Murata *et al.*, 2018a).

F. IMUNOTERAPI MELALUI ANTIBODI ANTI CD47

Ekspresi CD47 pada sel digunakan oleh makrofag untuk membedakan antara “self” atau “non-self” (Matozaki *et al.*, 2009). CD47 diekspresikan pada permukaan sel non-

ganas serta beberapa jenis sel kanker dan dapat mengikat protein transmembran SIRP α pada sel myeloid (terutama makrofag) untuk membentuk kompleks CD47-SIRP α (Wu *et al.*, 2018). Sel kanker mengeksploitasi fungsi CD47, yang sering disebut “*do not eat me*”, dengan cara mengekspresikan CD47 dengan tingkat yang lebih tinggi pada permukaannya. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa CD47 diekspresikan secara berlebihan pada berbagai jenis tumor, termasuk pada myeloma (Kim *et al.*, 2012), leiomyosarcoma (Edris *et al.*, 2012), leukemia limfositik akut (Chao *et al.*, 2011a), limfoma non-Hodgkin (Chao *et al.*, 2011b), kanker payudara (Willingham *et al.*, 2012), osteosarcoma (Mohanty *et al.*, 2019), dan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher (Wu *et al.*, 2018). Mengingat bahwa CD47 diekspresikan di semua sel tubuh, kemungkinan akan muncul masalah potensial dengan menggunakan antibodi anti-CD47 sebagai pengobatan anti kanker (Liu *et al.*, 2015). Sebagai contoh, CD47 diekspresikan oleh sel-sel non-ganas dari sistem hematopoietik (Ishikawa-Sekigami *et al.*, 2006), termasuk sel darah merah normal, sel darah merah tua, dan trombosit (Oldenborg, 2004; Catani *et al.*, 2011). Hal tersebut dapat menimbulkan efek di luar target seperti anemia. Buatois dkk. menunjukkan bahwa antibodi anti CD47 (sendiri atau dalam kombinasi dengan antibodi lain), dapat menyebabkan destruksi sel darah merah normal yang berpotensi mengakibatkan anemia (Buatois *et al.*, 2018). Ekspresi CD47 di mana-mana juga berarti bahwa dosis inisiasi yang besar dan/atau pemberian yang sering mungkin diperlukan obat untuk mencapai blokade terapeutik CD47 yang efektif (Zhang *et al.*, 2020). Berdasarkan fakta di atas, SIRP α kemungkinan memiliki keunggulan sebagai target terapi, jika dibandingkan dengan CD47.



Gambar 6. Ekspresi SIRPα pada Retina Manusia (The Human Protein Atlas, 2021).

G. EKSPRESI SIRPα PADA RETINOBLASTOMA

Sejauh pengetahuan kami, belum ada penelitian di dunia yang menunjukkan adanya ekspresi SIRPα pada retinoblastoma. Namun beberapa studi telah menyebutkan adanya ekspresi SIRPα pada beberapa tumor lain seperti melanoma, karsinoma sel renal, astrositoma, dan tumor primer otak lainnya (Yanagita *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2000). Dalam referensi lain, beberapa ekspresi protein yang ada dalam tubuh manusia telah dipetakan oleh Human Protein Atlas (HPA) (www.proteinatlas.org). Tujuan dari HPA ini adalah untuk memanfaatkan pendekatan pencitraan biologis guna memetakan ekspresi semua gen yang bertanggungjawab pada ekspresi protein manusia di semua sel, jaringan, dan organ utama (Karlsson *et al.*, 2021). Pada Gambar 6 ditunjukkan bahwa SIRPα diekspresikan pada hampir seluruh lapisan sel pembentuk retina (The Human Protein Atlas, 2021).

Dengan demikian, kemungkinan besar, SIRP α juga diekspresikan pada jaringan retinoblastoma yang berasal dari retina. Fakta di atas merupakan informasi yang sangat penting bagi peneliti dalam menentukan kemungkinan viabilitas ekspresi SIRP α di jaringan retinoblastoma. Hal tersebut diperlukan karena, sejauh pengetahuan peneliti, studi ini adalah studi pertama di dunia yang memeriksa ekspresi SIRP α pada jaringan retinoblastoma.

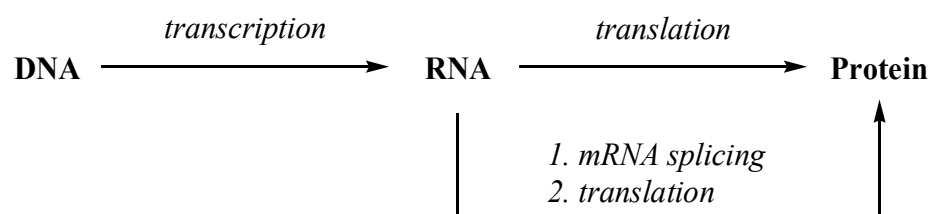
H. IMMUNE CHECKPOINT, TUMORIGENESIS, DAN RETINOBLASTOMA

Immune checkpoint mengacu pada sejumlah besar jalur penghambatan yang ada dalam sistem kekebalan tubuh yang sangat penting untuk mempertahankan toleransi terhadap *self-antigen* dan memodulasi durasi dan amplitudo respons imun fisiologis di jaringan perifer untuk meminimalkan kerusakan jaringan kolateral (Pardoll, 2012). Beberapa studi sebelumnya telah menjelaskan bahwa tumor bekerja dengan menghindari sistem *immune chcekpoint* tertentu sebagai mekanisme utama yang bertanggung jawab pada perkembangan tumor padat (Yanagita *et al.*, 2017; Kono *et al.*, 2020; He & Xu, 2020). Salah satu tumor padat yang perlu mendapat perhatian pada oftalmologi adalah retinoblastoma. Sebuah studi pada retinoblastoma telah menunjukkan adanya ekspresi sistem *immune checkpoint* PD-1 dan *ligand*-nya PD-L1 serta CTLA-4 (Singh *et al.*, 2020). Akan tetapi, sistem *immue checkpoint* tersebut tidak spesifik muncul pada jaringan retina saja, yang merupakan jaringan asal retinoblastoma. Sistem *immune checkpoint* lain yang terbukti juga berperan dalam proses pertumbuhan tumor padat adalah SIRP α (Murata *et al.*, 2014; Murata *et al.*, 2018a; Murata *et al.*, 2018b). Seperti yang telah ditunjukkan pada Gambar 6, SIRP α diekspresikan pada hampir seluruh lapisan sel pembentuk retina (The Human Protein

Atlas, 2021). Mekanisme kerja sebagian besar sistem *immune checkpoint* diawali oleh interaksi reseptor ligan, dengan demikian mereka dapat dengan mudah diblokir oleh antibodi atau dimodulasi oleh bentuk rekombinan ligan atau reseptor (Pardoll, 2012). Fakta bahwa SIRP α diekspresikan di retina dan semua mekanisme yang disebutkan di atas, antibodi anti-SIRP α mungkin dapat menjadi terapi baru yang potensial untuk berbagai jenis kanker termasuk retinoblastoma. Oleh karenanya, pada penelitian ini, kami bermaksud untuk memeriksa ekspresi SIRP α pada retinoblastoma.

I. TEORI DOGMA SENTRAL

Dogma sentral, pertama kali dikemukakan oleh Francis Crick pada tahun 1958, telah menjadi karakteristik dari transmisi genetik dan biologi molekuler (Crick, 1958; Crick, 1970). Proses mendasar perubahan DNA menjadi RNA (dengan proses transkripsi) dan akhirnya menjadi protein (dengan proses translasi) sangat berperan dalam patofisiologi semua penyakit (Gambar 7). Selama dua dekade terakhir, beberapa penemuan kunci telah dibuat yang telah membantu untuk membantu mengungkap mekanisme jalur genetik yang paling penting ini (Westover *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010; L Garner & D Janda, 2011).



Gambar 7. Evolusi Dogma Sentral.

Dogma sentral biologi molekuler (atas), dan yang telah diperbarui (bawah) (L Garner & D Janda, 2011).

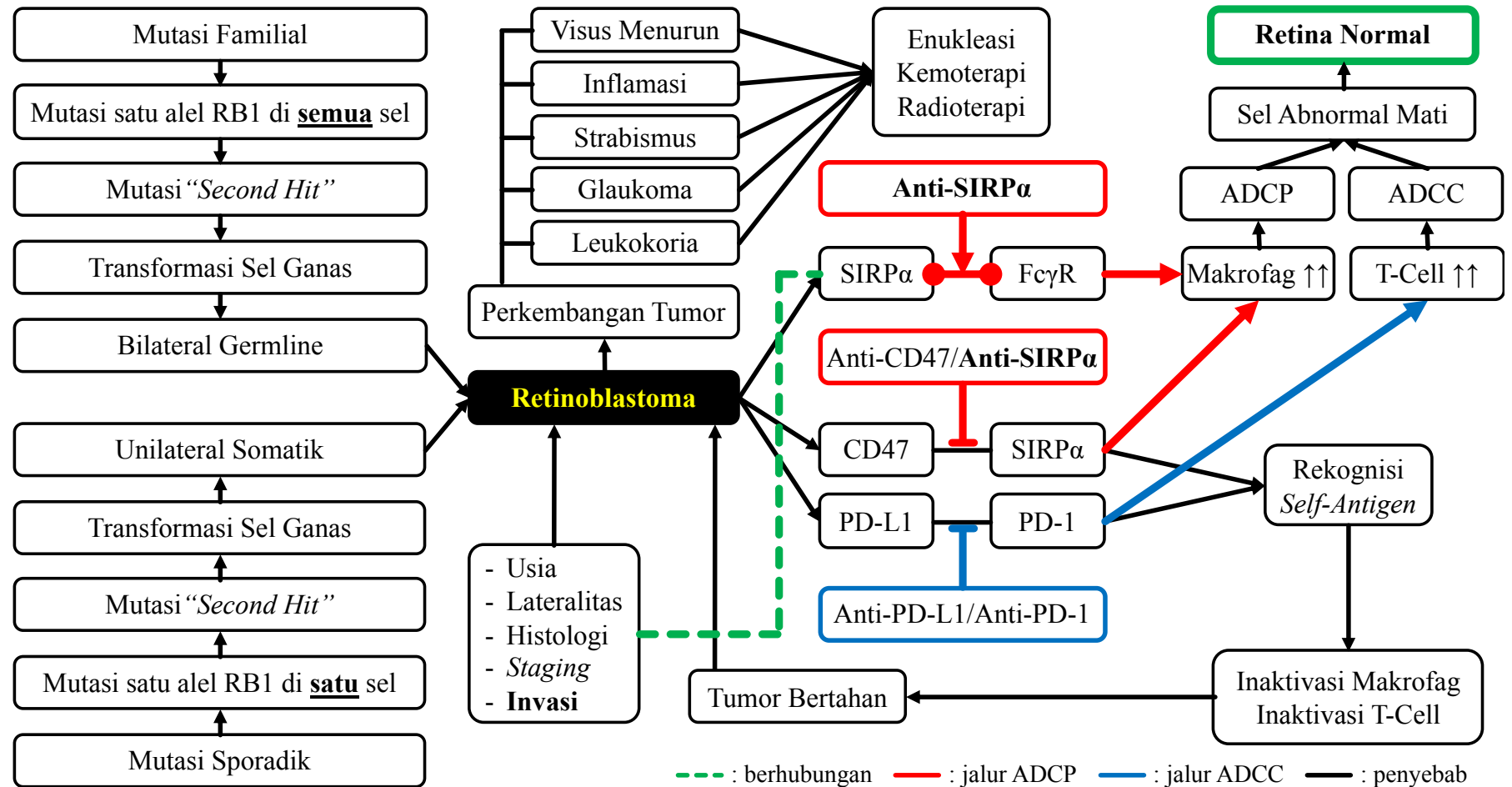
Sementara temuan penting di atas menunjukkan awal dari pemahaman kita tentang cara kerja rumit dari komponen yang terlibat dalam dogma sentral, penemuan

fundamental tersebut juga telah membuka jalan menuju kemampuan peneliti untuk memodulasi aktivitas seluler yang penting untuk transmisi genetik dan vitalitas sel. Pencarian molekul yang relevan pada setiap penyakit tetap menjadi tugas kita untuk dapat menemukan metode terapi yang terbaik. Dalam penelitian ini, pemahaman di atas kita dapat membantu kita memahami bahwa dengan memeriksa ekspresi RNA, kita dapat memperkirakan ekspresi protein pada sebuah jaringan manusia.

J. LANDASAN TEORI

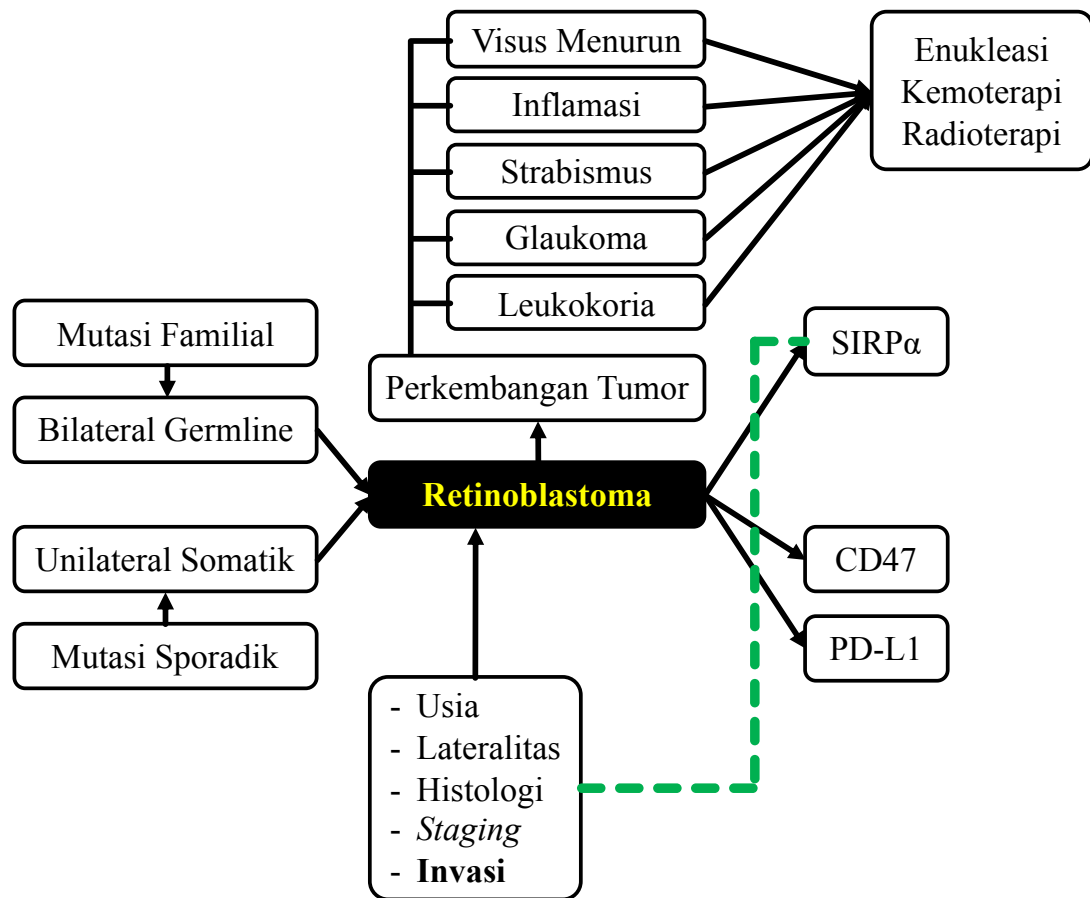
Keterlibatan sistem *immune checkpoint* memberikan kesempatan penemuan modalitas baru dalam pengobatan tumor. Pada penelitian sebelumnya, telah disebutkan bahwa retina mengekspresikan salah satu molekul *immune checkpoint*, yakni SIRP α . Hal ini memberikan petunjuk bahwa retinoblastoma yang berasal dari sel retina, kemungkinan mengekspresikan SIRP α (salah satu molekul *immune checkpoint* yang berperan pada proses tumor). Dengan demikian melalui mekanisme induksi langsung fagositosis seluler sel tumor oleh makrofag serta blokade sinyal CD47-SIRP α , efek anti-tumor dari antibodi anti-SIRP α mungkin menjadi terapi baru yang potensial untuk retinoblastoma.

K. KERANGKA TEORI



Bagan 1. Kerangka Teori

L. KERANGKA KONSEP



Bagan 2. Kerangka Konsep

M. HIPOTESIS

1. Jaringan tumor retinoblastoma mengekspresikan SIRPα
2. Ekspresi SIRPα berkorelasi positif dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pasien retinoblastoma

BAB III. METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan penelitian potong lintang yang mencari hubungan antara ekspresi mRNA SIRP α dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pada pasien retinoblastoma

B. PENGUMPULAN DATA

1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Poliklinik Mata dan Instalasi Catatan Medis RSUP dr. Sardjito dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Sardjito / FKMK UGM, mulai Januari 2021 hingga Juni 2021, atau hingga data sampel terpenuhi.

2. Populasi Penelitian

Populasi target pada penelitian ini adalah semua pasien tumor intraokular yang datang ke Poliklinik Mata RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta yang telah didiagnosis secara histopatologis dengan Retinoblastoma.

C. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI

1. Kriteria Inklusi

- a. Pasien dengan diagnosis secara histopatologis dengan Retinoblastoma.
- b. Preparat blok parafin tumor retinoblastoma dengan jaringan tumor >70% dan tanpa daerah nekrosis
- c. Pasien dengan CT scan kepala memperlihatkan adanya gambaran Retinoblastoma.
- d. Pasien dengan usia 1 bulan hingga 10 tahun.

e. Pasien datang di RSUP dr. Sardjito Sejak Januari 2013 hingga Desember 2020.

2. Kriteria Eksklusi

- a. Jaringan tumor pada pemeriksaan patologi anatomi menunjukkan tumor yang bukan berasal dari jaringan retina.
- b. Preparat blok parafin tumor retinoblastoma <70% dan dengan daerah nekrosis.
- c. Pasien dengan diagnosis secara histopatologis dengan Retinoblastoma dengan spesimen patologi anatomi yang rusak atau hilang.
- d. Pasien dengan diagnosis secara histopatologis dengan Retinoblastoma yang disertai oleh tumor jenis lainnya.

D. TEKNIK PENGAMBILAN DAN BESAR SAMPEL

Melihat jumlah kasus Retinoblastoma yang sedikit, maka pada penelitian ini sampel diambil secara *nonprobability sampling* tipe konsekutif. Seluruh subyek yang memenuhi kriteria inklusi dimasukkan dalam penelitian sampai jumlah sampel terpenuhi.

E. VARIABEL PENELITIAN

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas adalah variabel yang apabila terjadi perubahan akan mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekspresi mRNA SIRP α .
2. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi risiko tinggi.

3. Variabel perancu dalam penelitian ini adalah usia, lateralitas, onset retinoblastoma, dan *staging* retinoblastoma.

F. PROSEDUR PEMERIKSAAN SIRPA

1. Pemeriksaan qPCR

Pemeriksaan SIRP α dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan UGM. Sampel diambil dari spesimen tumor orbita dengan diagnosis Retinoblastoma. Spesimen tumor diambil pada saat operasi untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi SIRP α NF2 dengan metode Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).

2. Persiapan Sampel Blok Parafin

Sebelum melakukan ekstraksi RNA dari blok parafin, lakukanlah langkah–langkah di bawah ini:

- Siapkan *xylene* dan etanol absolut
- *Xylene* adalah bahan yang mengiritasi dan tindakan pencegahan yang tepat harus dilakukan dalam penggunaannya. Misalnya, kenakan sarung tangan, kacamata pengaman, dan jas laboratorium, hindari kontak dengan kulit, mata, dan pakaian, serta bekerjalah dengan menggunakan fasilitas lemari asam.
- Siapkan waterbath hingga suhu mencapai 56 °C
- Siapkan tabung *microcentrifuge* 1,5 ml
- Seimbangkan suhu buffer AE dengan suhu kamar
- Semua sentrifugasi harus dilakukan pada suhu kamar
- Buffer CL dan BL dapat mengendap pada suhu ruangan. Jika demikian, larutkan dalam 56 °C waterbath.

Persiapan dimulai dengan meletakkan sebagian kecil jaringan yang di fiksasi dengan parafin (sampai 25 mg) ke dalam tabung *microcentrifuge* 2 ml. Jaringan yang potong kecil-kecil (cacah) bisa menjadi de-parafinisasi dengan lebih efisien. Tambahkan 1200 μ L xilena lalu vortex secara menyeluruh sampai parafin benar-benar meleleh. *Centrifuge* dengan kecepatan penuh (> 13.000 xg) selama 5 menit. Buang supernatan secara perlahan-lahan dengan pipet. Hati-hati jangan sampai kehilangan peletnya. Kemudian 1200 μ L etanol absolut ditambahkan ke pelet untuk menghilangkan residu xylene dan campurkan bahan-bahan di atas dengan vorteks. *Centrifuge* dengan kecepatan penuh selama 5 menit. Buang etanol secara perlahan dengan pipet. Hati-hati jangan sampai kehilangan peletnya. Ulangi langkah di atas (dari mulai penambahan 1200 μ L) sebanyak satu atau dua kali. Selanjutnya residu etanol dibiarkan menguap dengan menginkubasi tabung *microcentrifuge* pada suhu kamar selama 10 ~ 15 menit dengan tutup terbuka.

Sampel dari parafin blok retinoblastoma diekstraksi dan di sentrifugasi sebanyak 3000 g selama 5 menit, kemudian 200 μ L sampel dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 60 μ L Lysis solution BF kemudian di-vortex selama 5 detik, kemudian ditambahkan 20 μ L Protein Precipitation Solution BF lalu vortex 5 detik dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit, di sentrifugasi selama 3 menit, kemudian pindahkan supernatan bening ke dalam tabung koleksi baru (2ml dengan tutup) lalu tambahkan 270 μ L isopropanolol dan vortex selama 5 detik, kemudian pasangkan microRNA Mini Spin Column BF pada tabung koleksi dan masukkan sampel sebanyak 300 μ L ke dalam kolom lalu inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifugasi 11.000 g selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi kemudian pasang kembali tabung koleksi.

Masukkan sisa sampel ke dalam kolom dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, kemudian di sentrifugasi 11.000 g selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi lalu tambahkan 700 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom kemudian sentrifugasi 11.000 g selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi kemudian pasang kembali tabung koleksi lalu tambahkan 250 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom lalu sentrifugasi 11.000 g selama 2 menit. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi kemudian pasang kembali tabung koleksi lalu tambahkan 50 μ L rDNase langsung ke dalam membran kolom dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit lalu tambahkan 100 μ L Wash Solution 1 BF ke dalam kolom dan sentrifugasi 11.000 g selama 30 detik.

Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi kemudian pasang kembali tabung koleksi lalu tambahkan 700 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom dan sentrifugasi 11.000 g selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi kemudian pasang kembali tabung koleksi lalu tambahkan 250 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom dan sentrifugasi 11.000 g selama 2 menit. Buang tabung koleksi, ganti dengan tabung 1,5 mL untuk menampung RNA lalu tambahkan 25 μ L RNase free water dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian sentrifugasi 11.000 g selama 1 menit lalu tambahkan kembali 25 μ L RNase free water dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian sentrifugasi 11.000 g selama 1 menit. RNA terlarut dalam RNase free water di dalam tabung koleksi 1,5mL; buang kolom kemudian tutup tabung koleksi, kemudian simpan RNA dalam lemari pendingin -20°C untuk penyimpanan

beberapa hari, akan tetapi bila akan disimpan dalam jangka waktu lama RNA disimpan di lemari pendingin -70°C .

3. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial (Universal cDNA Synthesis Kit II, 8–64 rxns, Cat. no#203301, Geneaid, Taiwan). Pengerjaannya dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- RNA yang telah diisolasi dari lemari pendingin -20°C dikeluarkan kemudian diletakkan pada wadah tabung yang telah dialasi ice pack dan dibiarkan mencair secara perlahan lalu homogenisasi dengan vortex kemudian spin down.
- Kemudian lakukan persiapan reagen sebagai berikut: 5x reaction buffer, nuclease free water, dan spike in (sp6) diambil dari lemari pendingin -20°C lalu cairkan 5x reaction buffer, nuclease free water, dan sp6 dalam suhu ruang kemudian homogenisasi dengan vortex kemudian spin down.
- Simpan dalam wadah tabung yang telah dilapisi ice pack. Enzyme mix diambil dari lemari pendingin -20°C lalu homogenisasi dengan mengetuk tabung secara pelan kemudian spin down.
- Kemudian 5x reaction buffer $4\mu\text{L}$, Nucelase free water $9\mu\text{L}$, Enzyme mix $2\mu\text{L}$ dan sp6 $1\mu\text{L}$ dicampurkan lalu homogenisasi dengan vortex kemudian spin down dan bagi ke dalam masing–masing tabung sebanyak $16\mu\text{L}$ per reaksi.
- Lalu $4\mu\text{L}$ sampel RNA dimasukkan ke dalam tabung dan untuk tabung kontrol air, sampel diganti dengan RNase free water.
- Kemudian program alat thermal cycler dengan urutan sebagai berikut: 42°C selama 60 menit, 95°C selama 5 menit dan 4°C .

- Lakukan penyimpanan di lemari pendingin -20°C untuk penyimpanan beberapa hari, akan tetapi bila akan disimpan dalam jangka waktu lama disimpan di lemari pendingin -70°C .

4. Metode qPCR

Amplifikasi dan kuantifikasi cDNA dilakukan dengan kit komersial DTlite4, DNA-Technology (Rusia) untuk SIRP α . Adapun primer set yang dipakai adalah sebagai berikut :

- SIRP α Forward = 5'-TACAAGGTTGCATGAGCCCG-3',
- SIRP α Reverse = 5'-TGGCATACTCCGTGTGGTTG-3',
- GAPDH Forward = 5'-AAGGCTGGGGCTCATTTGCAG-3'
- GAPDH Reverse = 5'-GCAGGAGGCATTGCTGATGATC-3'

Pada pemeriksaan SIRP α dilakukan amplifikasi 40 siklus dengan temperatur leleh 60° – 90°C . RNA yang telah diisolasi dikeluarkan dari lemari pendingin -20°C kemudian diletakkan pada wadah tabung yang telah dialasi dengan ice pack dan dibiarkan mencair secara perlahan, lalu homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. cDNA diencerkan dengan RNase free water dengan perbandingan 1:80, yaitu 5 μL cDNA dengan 395 μL RNase free water lalu homogenisasi dengan vortex kemudian spin down dan simpan dalam wadah tabung yang telah dialasi ice pack. Lakukan persiapan reagen dan kontrol sebagai berikut : KAPPA SYBR FAST Universal One-step qRT-PCR Kit dan master PR, ER, NF2, HER2, dan VEGF diambil dari lemari pendingin -20°C kemudian dicairkan dalam suhu ruang lalu homogenisasi SYBR Green Master Mix dengan mengetuk tabung perlahan kemudian vortex dan spin down serta homogenisasi primer dengan vortex kemudian spin down. Lakukan pembuatan dan pembagian master mix sebagai

berikut: membuat campuran master mix sebanyak 3 buah yaitu spike in u6, kontrol u6 snRNA, dan RNA SIRP α yang menjadi target. Kemudian campurkan 5 μ L KAPPA SYBR FAST Universal One-step qRT-PCR Kit dan 1 μ L PCR primer mix (untuk masing-masing campuran dibedakan, lalu homogenisasi dengan vortex kemudian spin down dan bagi ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 6 μ L master mix, kemudian masukkan 4 μ L sampel cDNA yang telah diencerkan sebelumnya. Set program qPCR pada mesin Biorad CFX 96 dengan urutan sebagai berikut: denaturasi 95°C 10 menit, amplifikasi 40 siklus, 95°C 10 detik, 60°C 1 menit ramp-rate 1,6°C/ detik optical read dan dianalisis kurva leleh pilih. Kemudian dilakukan analisis kurva dengan Biorad CFX ManagerTM Software untuk memperoleh nilai quantification cycle (Cq), quantification curve dan melting curve.

G. DEFINISI OPERASIONAL

1. Retinoblastoma didefinisikan sebagai sel tumor yang berasal dari jaringan retina dengan lokasi tumor terletak di intraokular maupun yang meluas ke ekstraokular. Penegakan diagnosisnya didasarkan pada hasil pemeriksaan patologi anatomi dan gambaran tumor pada CT scan kepala.
2. Bukan Retinoblastoma adalah semua jaringan tumor intraokular maupun ekstraokular yang setelah diperiksa patologi anatomi tidak berasal dari jaringan retina.
3. Ekspresi mRNA SIRP α adalah pengukuran jumlah mRNA SIRP α yang terdapat pada preparat histopatologis pasien retinoblastoma yang telah dioperasi dan disimpan di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta.

4. Gambaran histopatologi risiko tinggi adalah temuan adanya invasi tumor retinoblastoma pada lapisan koroid maupun nervus optikus.
5. Jenis kelamin pasien adalah jenis kelamin pasien saat dilakukan pemeriksaan.
6. Usia pasien adalah usia pasien saat dilakukan pemeriksaan (dalam tahun).
7. Lateralitas adalah dominasi salah satu sisi mata yang terlibat dalam proses retinoblastoma (unilateral / bilateral)
8. Onset retinoblastoma adalah usia pasien saat mengalami gejala awal yang kemudian di diagnosis sebagai retinoblastoma (dalam tahun).
9. *Staging* retinoblastoma adalah proses menentukan sejauh mana retinoblastoma telah berkembang dengan tumbuh dan menyebar. Terdapat dua tipe *staging*, yaitu: *International Intraocular Retinoblastoma Classification* (IIRC) dan *International Retinoblastoma Staging System* (IRSS).
10. Kemoreduksi adalah pemberian agen kemoterapi sebelum dilakukannya enukleasi (regimen sesuai TS Ilmu Kesehatan Anak).
11. Neoadjuvan adalah pemberian agen kemoterapi setelah dilakukannya enukleasi (regimen sesuai TS Ilmu Kesehatan Anak).

H. SARANA PENELITIAN

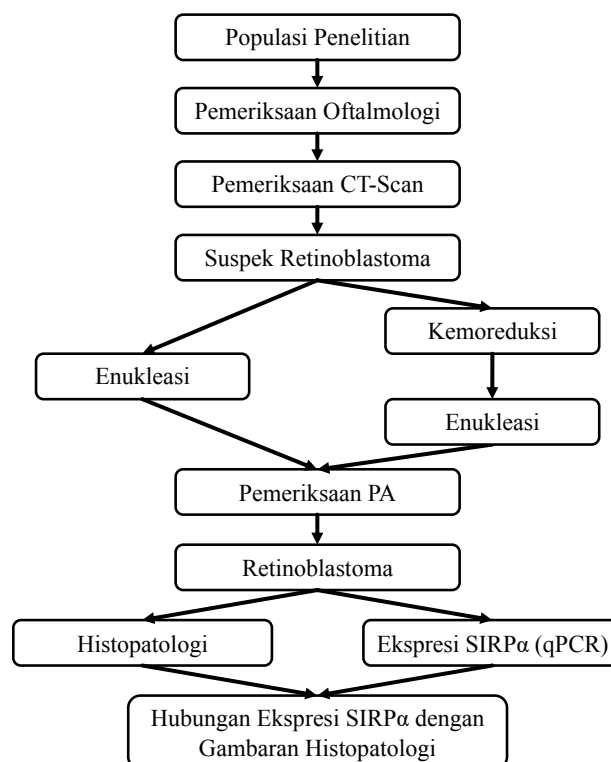
Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini:

- Rekam medis pasien
- Foto CT scan kepala sentrasi orbita tanpa kontras
- Preparat jaringan tumor intraokular yang didapat dari operasi dan telah dianalisis di laboratorium Patologi Anatomi FKMK UGM, sebagai Retinoblastoma.
- Pemeriksaan qPCR.

I. JALANNYA PENELITIAN

1. Peneliti telah mengajukan surat permohonan izin penelitian dan *ethical clearance* kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada.
2. Pasien yang menjadi populasi penelitian dilakukan seleksi sesuai dengan kriteria inklusi penelitian. Pelacakan terhadap populasi kasus dimulai dari hasil patologi anatomi jaringan Retinoblastoma untuk kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi SIRP α jaringan. Selanjutnya, dilakukan pelacakan rekam medis pasien tersebut. Dari rekam medis peneliti mendapatkan data dasar penelitian yang meliputi usia, jenis kelamin, dan riwayat penyakit.
3. Analisis statistik dilakukan setelah pengumpulan data selesai.

J. KERANGKA PENELITIAN



Bagan 3. Kerangka Penelitian

K. ANALISIS STATISTIK

Data yang didapat dianalisis dengan program statistik komputer SPSS versi 22.0.

Data nominal karakteristik subyek dan gambaran histopatologi risiko tinggi dianalisis dengan uji Chi Square. Data numerik diuji dengan t -test berpasangan, sedangkan data ordinal diuji dengan uji Chi Square. Perbedaan rerata ini disebut signifikan bila $p < 0,05$. Untuk menunjukkan hubungan antara usia dan kejadian Retinoblastoma dilakukan dengan uji regresi logistik. Untuk mencari hubungan gambaran histopatologi risiko tinggi dengan ekspresi SIRP α , analisa data dilakukan dengan uji Chi Square. Rerata ekspresi SIRP α jaringan dianalisis dengan t -test tidak berpasangan.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. DATA DEMOGRAFIS PADA PASIEN RETINOBLASTOMA

Pada awal penelitian kali ini, sebanyak 63 pasien dengan diagnosis retinoblastoma telah dilibatkan. Dari 63 pasien, hanya 47 spesimen patologi dalam parafin blok yang layak untuk diperiksa. Data mengenai karakteristik dasar dari subyek penelitian ini dapat dilihat di Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik Dasar Pasien Retinoblastoma

Karakteristik	Nilai
Usia (Bulan)	29.08 ± 18.23
Berat (Kg)	10.86 ± 4.56
Panjang (cm)	85.88 ± 18.11
Jenis Kelamin (N, %)	
Laki-Laki	24 (51.1)
Perempuan	23 (48.9)
Lateralitas (N, %)	
Unilateral	37 (78.7)
Bilateral	10 (21.3)
Riwayat Retinoblastoma pada Keluarga (N, %)	
Ya	01 (2.1)
Tidak	46 (97.9)
Kemoterapi (N, %)	
Ya	40 (85.1)
Tidak	07 (14.9)
Neo-adjuvan (N, %)	
Ya	12 (25.5)
Tidak	35 (74.5)

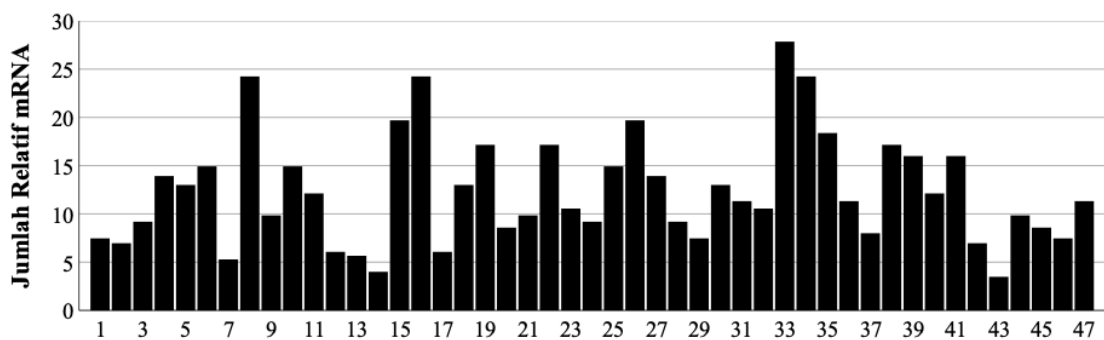
Rata-rata usia pasien retinoblastoma pada penelitian ini adalah 29.08 (±18.23) bulan. Temuan ini serupa dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan usia pasien retinoblastoma berkisar 24 – 30 bulan (Navo *et al.*, 2012; Garza & Gombos, 2013; Padma *et al.*, 2020). Sebuah studi lain juga menunjukkan hal serupa dimana usia pasien retinoblastoma pada negara dengan pendapatan menengah ke bawah

adalah 24.4 (± 6.27) bulan (Fabian *et al.*, 2020). Lebih jauh, studi tersebut melaporkan bahwa usia pasien saat datang ke rumah sakit bertambah sesuai dengan tingkat pendapatan pada negara tersebut, dimana negara pendapatan rendah 30.5 (± 6.9) bulan, negara pendapatan menengah ke bawah 24.4 (± 6.27) bulan, negara pendapatan menengah ke atas 20.7 (± 5.9) bulan, dan negara pendapatan tinggi 14.0 (± 5.1) bulan (Fabian *et al.*, 2020). Pada penelitian ini kami juga mendapatkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada distribusi jenis kelamin pasien retinoblastoma. Hal ini sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya (Andreoli *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2019). Data lateralitas pasien retinoblastoma yang ada dalam penelitian ini juga serupa dengan penelitian-penelitian sebelumnya, dimana kasus unilateral lebih banyak dari bilateral (Saiju *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015; Singh & Daniels, 2016). Sedangkan data mengenai riwayat keluarga, juga tidak berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya dimana hanya $\pm 10\%$ pasien retinoblastoma yang memiliki riwayat keluarga dengan retinoblastoma (Melamud *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2011). Data-data di atas menunjukkan bahwa karakteristik dasar pasien retinoblastoma di RSUP Dr. Sardjito tidak berbeda dengan karakteristik pasien retinoblastoma dari belahan dunia lain. Namun fakta bahwa tingkat kematian pasien retinoblastoma yang masih tinggi, membuat penulis mencari faktor-faktor lain yang mungkin berpengaruh pada tingkat kematian pasien retinoblastoma.

B. EKSPRESI SIRP α PADA RETINOBLASTOMA

Tujuan utama dari penelitian ini adalah melihat apakah sistem pengawasan imun yang melibatkan molekul SIRP α dan CD47 berperan pada retinoblastoma. Hasil pemeriksaan ekspresi mRNA SIRP α pasien retinoblastoma, menunjukkan adanya

peningkatan ekspresi SIRP α pada pasien retinoblastoma sebanyak 12.38 (± 5.69) kali lipat jika dibandingkan dengan retina normal (Gambar 8). Sejauh pengetahuan penulis, ini merupakan penelitian pertama di dunia yang menunjukkan adanya ekspresi SIRP α pada pasien retinoblastoma. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan adanya ekspresi SIRP α pada beberapa tumor padat seperti melanoma, karsinoma sel renal, dan astrositoma (Yanagita *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2004). Fakta di atas memberikan informasi baru mengenai peran sistem pengawasan imun (yang melibatkan SIRP α) pada retinoblastoma. Lebih jauh lagi, pendekatan imunoterapi (dengan target SIRP α) pada pasien retinoblastoma menjadi sangat logis dengan temuan di atas.

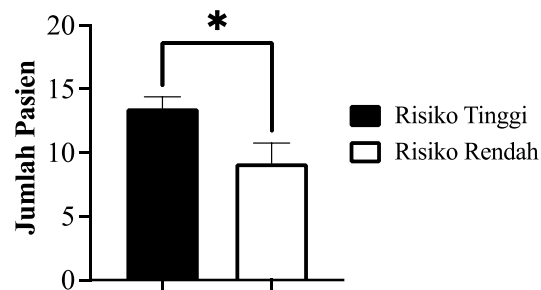


Gambar 8. Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma.

C. HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI SIRP α DENGAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI RISIKO TINGGI JARINGAN RETINOBLASTOMA

Pada penelitian ini kami juga memeriksa hubungan antara ekspresi SIRP α dengan gambaran histopatologi jaringan retinoblastoma. Klasifikasi gambaran histopatologi retinoblastoma sebelumnya telah disebutkan dalam studi lain (Kaliki *et al.*, 2015). Secara singkat, adanya 1 atau lebih dari gambaran berikut pada jaringan histopatologi retinoblastoma, maka spesimen dapat dikategorikan sebagai retinoblastoma risiko tinggi: infiltrasi bilik anterior atau iris, infiltrasi badan siliaris, invasi koroid, infiltrasi saraf optik, atau infiltrasi sklera. Selanjutnya penulis membagi pasien retinoblastoma

berdasarkan ekspresi SIRP α . Sejauh ini belum ditemukan titik potong untuk mendeskripsikan ekspresi SIRP α pada retinoblastoma. Oleh karena itu, penulis membagi ekspresi SIRP α berdasarkan nilai median dari ekspresi SIRP α , yakni 11.31. Dengan demikian, pasien dengan ekspresi SIRP α > 11.00 kali lipat akan masuk dalam kategori SIRP α ekspresi tinggi, sedangkan pasien dengan ekspresi SIRP α < 11.00 kali lipat akan masuk dalam kategori SIRP α ekspresi rendah. Dari analisis, kami dapatkan adanya hubungan yang signifikan ($p=0.003$) antara ekspresi SIRP α dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pada retinoblastoma (Gambar 9).



Gambar 9. Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma dengan Gambaran Klinis Risiko Tinggi vs Gambaran Klinis Risiko Rendah.

Analisis lanjutan kami tujukan pada kemungkinan peningkatan kemungkinan munculnya fenotip derajat histopatologi risiko tinggi dengan adanya peningkatan ekspresi SIRP α pada retinoblastoma (Tabel 3). Risiko terjadinya gambaran histopatologi risiko tinggi meningkat pada pasien retinoblastoma dengan ekspresi SIRP α derajat tinggi (OR: 9.58; 95% CI: 1.802 – 50.956; $p=0.003$).

Tabel 3. Karakteristik Ekspresi SIRP α dan Derajat Histopatologi Pasien Retinoblastoma

Karakteristik	Ekspresi SIRP α Tinggi	Ekspresi SIRP α Rendah	Total
Histopatologi Risiko Tinggi	23	12	35
Histopatologi Risiko Rendah	2	10	12
Total	25	22	47

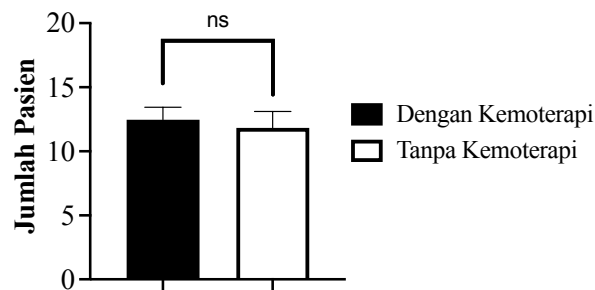
Penelitian terdahulu mengenai SIRP α melaporkan bahwa SIRP α berperan pada aktivitas sebuah kanker. Pada karsinoma esofagus, fungsi dan jalur biologis yang terkait dengan aktivitas kanker terlihat meningkat pada kelompok dengan ekspresi SIRP α yang tinggi (Tao *et al.*, 2022). Ekspresi SIRP α juga disebutkan meningkat pada melanoma dan karsinoma sel renal (Yanagita *et al.*, 2017). Dalam penelitian ini pula, penggunaan imunoterapi dengan antibodi anti-SIRP α memberikan hasil yang menjanjikan, dimana ukuran massa tumor mengecil secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol (Yanagita *et al.*, 2017).

Efek imunoterapi dengan antibodi anti-SIRP α tampaknya dimediasi oleh mekanisme ganda (Gambar 5). Pertama, adanya induksi langsung fagositosis seluler sel tumor oleh makrofag yang bergantung pada antibodi. Kedua, adanya blokade sinyal CD47-SIRP α yang secara negatif mengatur fagositosis sel tumor (Murata *et al.*, 2018a). Fakta-fakta di atas semakin menunjukkan adanya peran SIRP α dalam patogenesis retinoblastoma. Penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengetahui mekanisme molekuler dari SIRP α pada patogenesis retinoblastoma.

D. PERBANDINGAN EKSPRESI SIRP α PADA PASIEN DENGAN DAN TANPA RIWAYAT KEMOTERAPI ATAU NEOADJUVAN

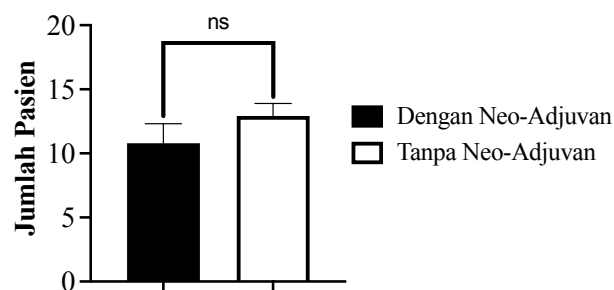
Beberapa penelitian pendahuluan melaporkan bahwa terjadi perubahan ekspresi gen secara global selama proses kemoterapi pada tumor padat (Buchholz *et al.*, 2002; Modlich *et al.*, 2004; Foukakis *et al.*, 2018). Seperti diketahui, perubahan genetik dapat berdampak pada perubahan ekspresi protein, termasuk protein transmembran. Beberapa pasien dalam penelitian ini telah menjalani proses kemoterapi yang ditujukan untuk mengurangi ukuran massa tumor atau kemoreduksi. Oleh karena itu,

kami mencoba membandingkan ekspresi SIRP α pada kelompok dengan atau tanpa kemoterapi (Gambar 10). Pada penelitian ini kami menemukan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara ekspresi SIRP α pada grup kemoterapi (12.48 ± 6.03) dengan ekspresi SIRP α pada grup tanpa kemoterapi (11.84 ± 3.37 , $p=0.79$).



Gambar 10. Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma Dengan Kemoterapi vs Pasien Retinoblastoma Tanpa Kemoterapi.

Selanjutnya, sebagian kecil dari pasien dalam penelitian ini juga menjalani pemberian kemoterapi neoadjuvan (Gambar 11). Oleh karena itu, kami juga membandingkan ekspresi SIRP α pada kelompok dengan atau tanpa kemoterapi neoadjuvan. Serupa dengan hasil sebelumnya, kami tidak mendapatkan adanya perbedaan yang signifikan dalam hal ekspresi SIRP α pada grup kemoterapi neoadjuvan (10.70 ± 5.29) dengan ekspresi SIRP α pada grup tanpa kemoterapi neoadjuvan (12.92 ± 5.79 , $p=0.27$).

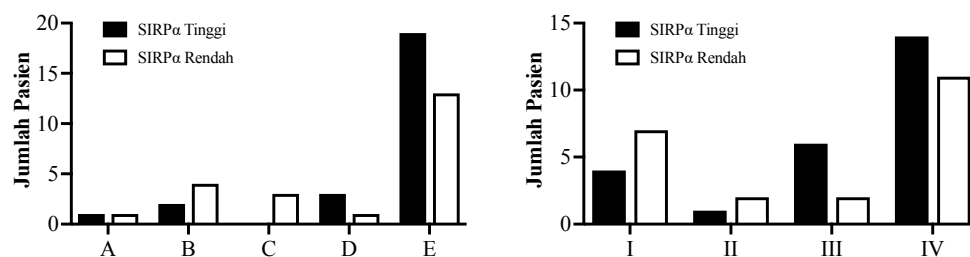


Gambar 11. Ekspresi SIRP α pada Pasien Retinoblastoma Dengan Kemoterapi Neoadjuvan vs Pasien Retinoblastoma Tanpa Kemoterapi Neoadjuvan.

Temuan kami di atas menunjukkan bahwa kemoterapi tidak berhubungan dengan ekspresi SIRP α pada retinoblastoma. Akan tetapi beberapa penelitian lain justru mengungkapkan fakta sebaliknya, dimana terdapat perubahan ekspresi beberapa gen pada pasien yang menjalani kemoterapi (Lee *et al.*, 2009; Koussounadis *et al.*, 2014; Horbach *et al.*, 2018). Sebuah studi lain menunjukkan adanya penurunan ekspresi mRNA PD-L1 dan peningkatan ekspresi mRNA PD-1 pada pasien retinoblastoma yang menjalani kemoreduksi, dimana pola terbalik ditemukan pada retinoblastoma primer (Singh *et al.*, 2020). Belum ada penjelasan yang mendetail mengenai penyebab dari perubahan ekspresi gen yang terjadi setelah prosedur kemoterapi. Namun, sebuah studi sebelumnya memberikan tiga proses yang mungkin terjadi dalam perubahan ekspresi gen pasca kemoterapi (Kovalchuk *et al.*, 2016). Pertama, terjadinya akumulasi kerusakan DNA akibat proses oksidatif. Kedua, munculnya gangguan pada metilasi dan hidroksimetilasi dari DNA. Ketiga, terjadinya ekspresi abnormal dari gen akibat dari dua proses sebelumnya yang mengubah metabolisme oksidatif dari gen target. Sebaliknya, hasil penelitian ini didukung oleh studi sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekspresi sebagian besar protein transmembran tidak dipengaruhi oleh agen kemoterapi (Lee *et al.*, 2007). Penjelasan mengenai hal ini masih menjadi perdebatan. Salah satu teori yang berkembang adalah beberapa jenis sel kanker dapat menginduksi proses inaktivasi dari agen kemoterapi melalui mekanisme pada jalur *glutathione* dan downregulasi dari gen *MSH2* yang bertanggungjawab pada perbaikan DNA (Koussounadis *et al.*, 2014).

E. HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI SIRP α DENGAN GAMBARAN KLINIS PASIEN RETINOBLASTOMA

Beberapa gambaran klinis juga diamati pada penelitian ini. Berdasarkan kriteria ekspresi SIRP α di atas, data klasifikasi stadium retinoblastoma berdasarkan IIRC dan IRSS menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan, dimana sebagian besar pasien masuk dalam stadium lanjut (stadium-E IIRC dan stadium-IV IRSS) dari kedua klasifikasi tersebut (Gambar 12).



Gambar 12. Stadium IIRC (kiri) dan IRSS (kanan) pada Pasien Retinoblastoma.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang serupa dengan penelitian ini, dimana sebagian besar pasien retinoblastoma masuk dalam stadium lanjut saat diagnosis retinoblastoma ditegakkan (Ramírez-Ortiz *et al.*, 2014; Soliman *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2019). Analisis lebih jauh menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara ekspresi SIRP α dengan stadium retinoblastoma pada kedua klasifikasi tersebut (IIRC, $p=0.229$; IRSS, $p=0.343$).

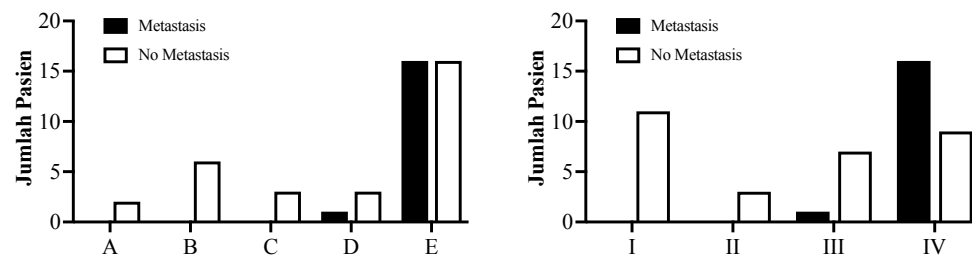
Selanjutnya kami menilai hubungan antara perbedaan ekspresi SIRP α (tinggi vs rendah) dengan lateralitas, metastasis, dan kelangsungan hidup secara umum. Data menunjukkan bahwa baik lateralitas ($p=0.346$), kondisi metastasis ($p=0.214$), dan kelangsungan hidup secara umum ($p=0.525$), tidak berhubungan dengan tingkat ekspresi SIRP α pada retinoblastoma (Tabel 4). Serupa dengan hasil pada stadium retinoblastoma, hal ini mengindikasikan bahwa ekspresi SIRP α tidak secara langsung

berperan pada kejadian lateralitas, metastasis, atau kelangsungan hidup pasien retinoblastoma. Fakta di atas mungkin dapat dijelaskan dengan teori dimana lateralitas, metastasis, dan kelangsungan hidup pasien dengan tumor bersifat multifaktorial. Faktor-faktor potensial tersebut terdiri dari: pendidikan orang tua yang lebih rendah, usia orang tua yang lebih tua (terutama ibu), kurangnya kesadaran penyakit, dan sulitnya akses ke penyedia layanan kesehatan (Xiao *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2015; Faranoush *et al.*, 2014; Chawla *et al.*, 2016).

Tabel 4. Hubungan antara Ekspresi SIRPa dengan Gambaran Klinis Pasien Retinoblastoma

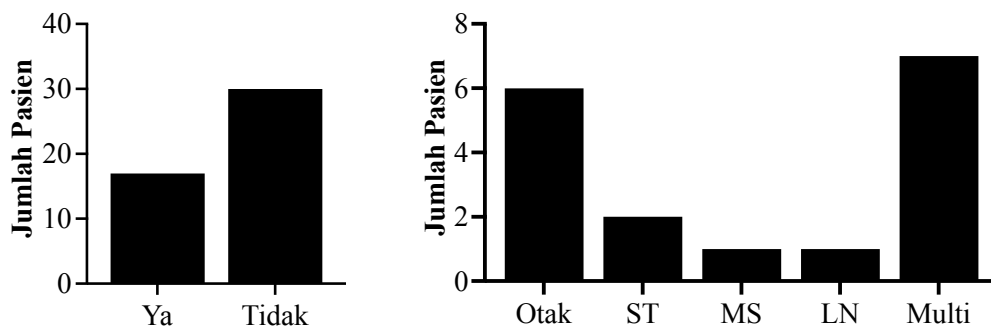
Gambaran Klinis	Ekspresi SIRPa		P-value
	Tinggi	Rendah	
Lateralitas, n (%)			
Unilateral	21 (84.0)	16 (72.7)	0.346
Bilateral	04 (16.0)	06 (27.3)	
Metastasis, n (%)			
Ya	07 (28.0)	10 (45.5)	0.214
Tidak	18 (72.0)	22 (54.5)	
Kelangsungan Hidup, n (%)			
Ya	17 (68.0)	13 (59.1)	0.525
Tidak	08 (32.0)	09 (40.9)	

Selain data di atas, kami juga menemukan sebagian kecil (36.2%) pasien retinoblastoma mengalami metastasis (Gambar 14). Pada penelusuran lebih lanjut, dari total 17 pasien yang mengalami metastasis, 12.8% mengalami metastasis ke otak, 4.3% mengalami metastasis ke sumsum tulang, 2.1% mengalami metastasis ke medula spinalis, 2.1% mengalami metastasis ke limfonodi, dan 14.9 % mengalami metastasis ke lebih dari satu organ atau multipel.



Gambar 13. Data Metastasis Pasien Retinoblastoma Berdasarkan IIRC (kiri) dan IRSS (kanan).

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa retinoblastoma adalah tumor ganas yang sangat invasif yang sering menyerang otak dan bermetastasis ke organ distal (tulang, sumsum tulang, dan medula spinalis) melalui aliran darah atau pembuluh limfatik (ke limfonodi) (Geng-Yi & Faisal, 2017; Ting *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). Walaupun pada penelitian ini, pasien retinoblastoma yang mengalami metastasis masuk ke dalam stadium lanjut IIRC dan IRSS (Gambar 13), invasi dan metastasis retinoblastoma dapat terjadi pada tahap awal perkembangan tumor (Dimaras *et al.*, 2012).



Gambar 14. Data Metastasis (kiri) dan Lokasi Metastasis (kanan) Pasien Retinoblastoma. ST: Sumsum Tulang; MS: Medula Spinalis; LN: Limfonodi; Multi: Beberapa Tempat..

F. BATASAN PENELITIAN

Pada penelitian kali ini sebagian besar pasien adalah pasien retinoblastoma dengan bentuk sporadis, sehingga gambaran ekspresi SIRP α pada retinoblastoma dengan

bentuk familial belum dapat diketahui. Selain itu, ekspresi SIRP α hanya diperiksa melalui pemeriksaan tingkat gen yakni mRNA. Pemeriksaan tingkat protein dapat dilakukan untuk memperkuat bukti adanya ekspresi SIRP α pada retinoblastoma. Hal lain yang dapat ditingkatkan adalah dengan menggunakan kontrol yang berupa retina normal dari pasien tanpa tumor. Selain itu, penelitian ini belum mampu menunjukkan mekanisme molekuler dari SIRP α pada patogenesis Retinoblastoma. Oleh karena itu, penelitian in vitro dan in vivo perlu dilakukan guna menentukan proses molekuler SIRP α pada patogenesis Retinoblastoma.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Pada penelitian ini kami menebukan bahwa, jaringan retinoblastoma terbukti menunjukkan ekspresi SIRP α yang lebih tinggi dari jaringan retina normal. Selain itu, ekspresi SIRP α yang tinggi pada jaringan retinoblastoma berhubungan dengan gambaran histopatologi risiko tinggi pasien Retinoblastoma. Lebih jauh lagi, pasien retinoblastoma yang memiliki ekspresi SIRP α derajat tinggi, memiliki risiko 9 kali lebih besar untuk memiliki gambaran histopatologi risiko tinggi. Di lain pihak, tidak ditemukan adanya perbedaan ekspresi SIRP α pada pasien dengan atau tanpa kemoterapi.

B. SARAN

Penelitian lebih lanjut pada level *in vitro* dan *in vivo* sangat diperlukan untuk memahami mekanisme molekuler dari peran SIRP α pada patogenesis retinoblastoma. Setelah itu, uji coba klinik imunoterapi dengan target SIRP α dapat dilakukan untuk memberikan informasi mengenai kemungkinan terapi yang lebih baik bagi pasien retinoblastoma.

DAFTAR PUSTAKA

- Abramson, D. H. & Scheffler, A. C. 2004. Update on retinoblastoma. *Retina*, 24, 828-848.
- Ali, K., Sutaryo, S., Purwanto, I., Mulatsih, S., Supriyadi, E., Widjajanto, P. H., Sumadiono, S. & Nurse, J. 2010. Yogyakarta pediatric cancer registry: an international collaborative project of university gadjah mada, university of saskatchewan, and the saskatchewan cancer agency. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 11, 131-6.
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K. & Iyer, A. K. 2017. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front. Pharmacol.*, 8, 561.
- Andreoli, M. T., Chau, F. Y., Shapiro, M. J. & Leiderman, Y. I. 2017. Epidemiological trends in 1452 cases of retinoblastoma from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry. *Can. J. Ophthalmol.*, 52, 592-598.
- Areán, C., Orellana, M. E., Abourbih, D., Abreu, C., Pifano, I. & Burnier, M. N. 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.*, 128, 223-229.
- Barclay, A. N. 2009. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr. Opin. Immunol.*, 21, 47-52.
- Barclay, A. N. & Van Den Berg, T. K. 2014. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.*, 32, 25-50.
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gaborilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Hedrick, C. C. 2018. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.*, 24, 541-550.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E. & Holgado, E. 2015. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 373, 1627-1639.
- Braster, R., O'toole, T. & Van Egmond, M. 2014. Myeloid cells as effector cells for monoclonal antibody therapy of cancer. *Methods*, 65, 28-37.
- Brown, B. J., Adeleye, A. O. & Ibeh, J. N. 2015. A prospective study on the causes of delayed diagnosis of childhood cancer in Ibadan, Nigeria. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 32, 365-373.
- Buatois, V., Johnson, Z., Salgado-Pires, S., Papaioannou, A., Hatterer, E., Chauchet, X., Richard, F., Barba, L., Daubeuf, B. & Cons, L. 2018. Preclinical development of a bispecific antibody that safely and effectively targets CD19 and CD47 for the treatment of B-cell lymphoma and leukemia. *Mol. Cancer Ther.*, 17, 1739-1751.
- Buchholz, T. A., Stivers, D. N., Stec, J., Ayers, M., Clark, E., Bolt, A., Sahin, A. A., Symmans, W. F., Hess, K. R. & Kuerer, H. M. 2002. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *The Cancer Journal*, 8, 461-468.
- Catani, L., Sollazzo, D., Ricci, F., Polverelli, N., Palandri, F., Baccarani, M., Vianelli, N. & Lemoli, R. M. 2011. The CD47 pathway is deregulated in human immune thrombocytopenia. *Exp. Hematol.*, 39, 486-494.
- Caunt, C. J., Sale, M. J., Smith, P. D. & Cook, S. J. 2015. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat. Rev. Cancer*, 15, 577-592.
- Chang, C.-Y., Chiou, T.-J., Hwang, B., Bai, L.-Y., Hsu, W.-M. & Hsieh, Y.-L. 2006. Retinoblastoma in Taiwan: survival rate and prognostic factors. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 50, 242-249.
- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Jan, M., Weissman-Tsukamoto, R., Zhao, F., Park, C. Y., Weissman, I. L. & Majeti, R. 2011a. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 71, 1374-1384.
- Chao, M. P., Tang, C., Pachynski, R. K., Chin, R., Majeti, R. & Weissman, I. L. 2011b. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood*, 118, 4890-901.
- Chao, M. P., Weissman, I. L. & Majeti, R. 2012. The CD47-SIRPα pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr. Opin. Immunol.*, 24, 225-232.
- Chawla, B., Hasan, F., Azad, R., Seth, R., Upadhyay, A. D., Pathy, S. & Pandey, R. 2016. Clinical presentation and survival of retinoblastoma in Indian children. *Br. J. Ophthalmol.*, 100, 172-178.
- Chen, M., Jiang, H., Zhang, J., Shen, G., Jiang, Y., Li, H. & Liu, Z. 2017. Outcome of intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma and its influencing factors: a retrospective study. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*, 95, 613-618.
- Chen, T. T., Brown, E. J., Huang, E. J. & Seaman, W. E. 2004. Expression and activation of signal regulatory protein α on astrocytomas. *Cancer Res.*, 64, 117-127.

- Chintagumpala, M., Chevez-Barrios, P., Paysse, E. A., Plon, S. E. & Hurwitz, R. 2007. Retinoblastoma: review of current management. *The Oncologist*, 12, 1237-1246.
- Crick, F. 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227, 561-563.
- Crick, F. H. On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol., 1958. 8.
- Dhar, S. U., Chintagumpala, M., Noll, C., Chévez-Barrios, P., Paysse, E. A. & Plon, S. E. 2011. Outcomes of integrating genetics in management of patients with retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.*, 129, 1428-1434.
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L. & Njuguna, F. 2015. Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15021.
- Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N. L., Piovesan, B., Marrano, P., Corson, T. W., Eagle Jr, R. C. & Squire, J. A. 2008. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1363-1372.
- Dimaras, H., Kimani, K., Dimba, E. A., Gronsdahl, P., White, A., Chan, H. S. & Gallie, B. L. 2012. Retinoblastoma. *The Lancet*, 379, 1436-1446.
- Edris, B., Weiskopf, K., Volkmer, A. K., Volkmer, J.-P., Willingham, S. B., Contreras-Trujillo, H., Liu, J., Majeti, R., West, R. B. & Fletcher, J. A. 2012. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6656-6661.
- Fabian, I. D., Abdallah, E., Abdullahi, S. U., Abdulqader, R. A., Boubacar, S. A., Ademola-Popoola, D. S., Adio, A., Afshar, A. R., Aggarwal, P. & Aghaji, A. E. 2020. Global retinoblastoma presentation and analysis by national income level. *JAMA oncology*, 6, 685-695.
- Faranoush, M., Asl, A. a. H., Mehrvar, A., Mehrvar, N., Zangoeei, R., Abadi, E., Alebouyeh, M. & Tashvighi, M. 2014. Consequences of delayed diagnosis in treatment of retinoblastoma. *Iranian journal of pediatrics*, 24, 381.
- Foukakis, T., Lötvrot, J., Matikas, A., Zerdes, I., Lorent, J., Tobin, N., Suzuki, C., Brage, S. E., Carlsson, L. & Einbeigi, Z. 2018. Immune gene expression and response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, 118, 480-488.
- Garza, R. & Gombos, D. S. 2013. Incidence, prevalence and epidemiology. *Retinoblastoma: Clinical Advances and Emerging Treatment Strategies*, 18-23.
- Geng-Yi, Y. & Faisal, H. 2017. Unilateral Trilateral Retinoblastoma with Spinal Metastases. *Int J Ophthalmol Clin Res*, 4, 076.
- Grant, B. D. & Donaldson, J. G. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 597-608.
- Hamada, J., Okumura, N., Inagaki, M., Taniguchi, H., Nakahata, Y., Sano, S.-I. & Nagai, K. 2004. Tyrosine phosphorylation of BIT on photic stimulation in the rat retina. *FEBS Lett.*, 557, 204-208.
- He, X. & Xu, C. 2020. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res.*, 30, 660-669.
- Horbach, L., Sinigaglia, M., Da Silva, C. A., Olguins, D. B., Gregianin, L. J., Brunetto, A. L., Brunetto, A. T., Roesler, R. & De Farias, C. B. 2018. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Molecular and Clinical Oncology*, 8, 719-724.
- Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Saito, Y., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Oldenborg, P.-A., Nojima, Y. & Matozaki, T. 2006. Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343, 1197-1200.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T. & Minato, N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12293-12297.
- Jain, M., Rojanaporn, D., Chawla, B., Sundar, G., Gopal, L. & Khetan, V. 2019. Retinoblastoma in Asia. *Eye*, 33, 87-96.
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Traver, D., Van Rooijen, N. & Weissman, I. L. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 138, 271-285.
- Kaliki, S., Srinivasan, V., Gupta, A., Mishra, D. K. & Naik, M. N. 2015. Clinical features predictive of high-risk retinoblastoma in 403 Asian Indian patients: a case-control study. *Ophthalmology*, 122, 1165-1172.
- Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjöstedt, E., Butler, L., Odeberg, J. & Dusart, P. 2021. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Science Advances*, 7, eabh2169.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 893-905.

- Kim, D., Wang, J., Willingham, S., Martin, R., Wernig, G. & Weissman, I. 2012. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia*, 26, 2538.
- Kodrat, H. & Gondhowiardjo, S. A. 2013. Radioterapi pada Retinoblastoma. *Radioterapi & Onkologi Indonesia*, 4.
- Kono, K., Nakajima, S. & Mimura, K. 2020. Current status of immune checkpoint inhibitors for gastric cancer. *Gastric Cancer*, 23, 565-578.
- Koussounadis, A., Langdon, S., Harrison, D. & Smith, V. A. 2014. Chemotherapy-induced dynamic gene expression changes in vivo are prognostic in ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 110, 2975-2984.
- Kovalchuk, A., Rodriguez-Juarez, R., Illynskyy, Y., Byeon, B., Shpileva, S., Melnyk, S., Pogribny, I., Kolb, B. & Kovalchuk, O. 2016. Sex-specific effects of cytotoxic chemotherapy agents cyclophosphamide and mitomycin C on gene expression, oxidative DNA damage, and epigenetic alterations in the prefrontal cortex and hippocampus—an aging connection. *Aging (Albany N. Y.)*, 8, 697.
- L Garner, A. & D Janda, K. 2011. Protein-protein interactions and cancer: targeting the central dogma. *Curr. Top. Med. Chem.*, 11, 258-280.
- Lee, H.-C., Lee, J. & Park, I. A. 2007. Changes in protein expression in breast cancer after anthracycline-based chemotherapy. *Korean J Pathol*, 41, 165-170.
- Lee, S.-C., Xu, X., Lim, Y.-W., Iau, P., Sukri, N., Lim, S.-E., Yap, H. L., Yeo, W.-L., Tan, P. & Tan, S.-H. 2009. Chemotherapy-induced tumor gene expression changes in human breast cancers. *Pharmacogenetics and genomics*, 19, 181-192.
- Lee, T. K. W., Cheung, V. C. H., Lu, P., Lau, E. Y. T., Ma, S., Tang, K. H., Tong, M., Lo, J. & Ng, I. O. L. 2014. Blockade of CD47-mediated cathepsin S/protease-activated receptor 2 signaling provides a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 60, 179-191.
- Li, N., Wang, Y.-Z., Huang, D.-S., Zhang, Y., Zhang, W.-L., Ma, J.-M., Zhou, Y. & Liu, T.-T. 2022. Clinical Analysis of 16 Distant Metastatic Retinoblastoma Cases with Event-Free Survival. *Cancer Manag. Res.*, 14, 367.
- Lian, S., Xie, X., Lu, Y. & Jia, L. 2019. Checkpoint CD47 function on tumor metastasis and immune therapy. *Onco Targets Ther.*, 12, 9105.
- Liu, X., Bushnell, D. A., Wang, D., Calero, G. & Kornberg, R. D. 2010. Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. *Science*, 327, 206-209.
- Liu, X., Pu, Y., Cron, K., Deng, L., Kline, J., Frazier, W. A., Xu, H., Peng, H., Fu, Y.-X. & Xu, M. M. 2015. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat. Med.*, 21, 1209-1215.
- Lubis, B. 2001. Clinical features of children with retinoblastoma in Adam Malik Hospital, Medan, Indonesia. *Paediatr. Indones.*, 41, 234-6.
- Luo, X., Ye, H., Ding, Y.-G., Du, Y. & Yang, H. 2015. Clinical characteristics and prognosis of patients with retinoblastoma: 8-year follow-up. *Turkish journal of medical sciences*, 45, 1256-1262.
- Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs Jr, K. D., Van Rooijen, N. & Weissman, I. L. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 138, 286-299.
- Matlung, H. L., Szilagyi, K., Barclay, N. A. & Van Den Berg, T. K. 2017. The CD47-SIRPα signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol. Rev.*, 276, 145-164.
- Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. & Ohnishi, H. 2009. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPα signalling pathway. *Trends Cell Biol.*, 19, 72-80.
- Mcgranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C. T., Rowan, A. J., Watkins, T. B., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Veeriah, S., Van Loo, P. & Herrero, J. 2017. Allele-specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution. *Cell*, 171, 1259-1271. e11.
- Melamud, A., Palakar, R. & Singh, A. 2006. Retinoblastoma. *Am. Fam. Physician*, 73, 1039-1044.
- Mellman, I. & Nelson, W. J. 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 833-845.
- Modlich, O., Prisack, H.-B., Munnes, M., Audretsch, W. & Bojar, H. 2004. Immediate gene expression changes after the first course of neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer disease. *Clin. Cancer Res.*, 10, 6418-6431.
- Mohanty, S., Yermeni, K., Theruvath, J. L., Graef, C. M., Nejadnik, H., Lenkov, O., Pisani, L., Rosenberg, J., Mitra, S. & Cordero, A. S. 2019. Nanoparticle enhanced MRI can monitor macrophage response to CD47 mAb immunotherapy in osteosarcoma. *Cell Death Dis.*, 10, 1-14.
- Murata, Y., Kotani, T., Ohnishi, H. & Matozaki, T. 2014. The CD47-SIRPα signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *The Journal of Biochemistry*, 155, 335-344.

- Murata, Y., Saito, Y., Kotani, T. & Matozaki, T. 2018a. CD 47-signal regulatory protein α signaling system and its application to cancer immunotherapy. *Cancer Sci.*, 109, 2349-2357.
- Murata, Y., Tanaka, D., Hazama, D., Yanagita, T., Saito, Y., Kotani, T., Oldenborg, P. A. & Matozaki, T. 2018b. Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy. *Cancer Sci.*, 109, 1300-1308.
- Navo, E., Teplisky, D., Albero, R., Fandino, A. C., Demirdjian, G. & Chantada, G. L. 2012. Clinical presentation of retinoblastoma in a middle-income country. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 34, e97-e101.
- O'donnell, J. S., Massi, D., Teng, M. W. & Mandala, M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. *Semin. Cancer Biol.*, 2018. Elsevier, 91-103.
- Oldenborg, P.-A. 2004. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk. Lymphoma*, 45, 1319-1327.
- Padma, M., Kumar, N., Nesargi, P. S., Kumari, B. A., Appaji, L. & Viswanathan, A. 2020. Epidemiology and clinical features of retinoblastoma. *South Asian Journal of Cancer*, 9, 56-58.
- Pardoll, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 252-264.
- Ramírez-Ortiz, M. A., Ponce-Castañeda, M. V., Cabrera-Muñoz, M. L., Medina-Sansón, A., Liu, X. & Orjuela, M. A. 2014. Diagnostic delay and sociodemographic predictors of stage at diagnosis and mortality in unilateral and bilateral retinoblastoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23, 784-792.
- Respatika, D., Saito, Y., Washio, K., Komori, S., Kotani, T., Okazawa, H., Murata, Y. & Matozaki, T. 2017. Role of SIRP α in Homeostatic Regulation of T Cells and Fibroblastic Reticular Cells in the Spleen. *Kobe J. Med. Sci.*, 63, E22.
- Ribas, A. & Wolchok, J. D. 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359, 1350-1355.
- Saiju, R., Moore, G., Shrestha, U., Shrestha, M. & Ruit, S. 2013. Retinoblastoma: geographic distribution and presentation at a tertiary eye care centre in Kathmandu, Nepal. *Nepalese Journal of Ophthalmology*, 5, 169-176.
- Shields, C. L. & Shields, J. A. 2010. Retinoblastoma management: advances in enucleation, intravenous chemoreduction, and intra-arterial chemotherapy. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, 21, 203-212.
- Simanjuntak, G. W. & Miranda, G. A. 2018. Clinical Findings and Demography of Retinoblastoma in a Tertiary Hospital in a Remote Area in a Developing Country. *Asia Pacific Journal of Cancer Care*, 3, 17-21.
- Singh, G. & Daniels, A. B. Disparities in retinoblastoma presentation, treatment, and outcomes in developed and less-developed countries. *Semin. Ophthalmol.*, 2016. Taylor & Francis, 310-316.
- Singh, L., Pushker, N., Sen, S., Singh, M. K., Bakhshi, S., Chawla, B. & Kashyap, S. 2015. Expression of CDC25A and CDC25B phosphatase proteins in human retinoblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Br. J. Ophthalmol.*, 99, 457-463.
- Singh, L., Singh, M. K., Rizvi, M. A., Bakhshi, S., Meel, R., Lomi, N., Sen, S. & Kashyap, S. 2020. Clinical relevance of the comparative expression of immune checkpoint markers with the clinicopathological findings in patients with primary and chemoreduced retinoblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 69, 1087-1099.
- Soebagio, H. D., Prastyani, R., Sujuti, H., Lyrawati, D. & Sumitro, S. B. 2013. Profile of Retinoblastoma in East Java, Indonesia. *International Journal of Epidemiology & Infection*, 1, 51-56.
- Soliman, S., Dimaras, H., Souka, A., Ashry, M. & Gallie, B. 2015. Socioeconomic and psychological impact of treatment for unilateral intraocular retinoblastoma. *J. Fr. Ophtalmol.*, 38, 550-558.
- Steinert, G., Schölch, S., Niemietz, T., Iwata, N., García, S. A., Behrens, B., Voigt, A., Kloor, M., Benner, A. & Bork, U. 2014. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 74, 1694-1704.
- Supartoto, A., Mahayana, I., Christine, R. & Suhardjo, A. 2016. Exposure to exogenous female sex hormones is associated with increased risk of orbito-cranial meningioma in females: a case-control study. *Int J Ophthalmic Pathol* 5, 3, 2.
- Tao, K., Wei, Z., Xia, Y., Zhao, R. & Xu, H. 2022. High SIRPA Expression Predicts Poor Prognosis and Correlates with Immune Infiltrates in Patients with Esophageal Carcinoma. *J. Healthc. Eng.*, 2022.
- The Human Protein Atlas. 2021. *SIRPA Single Cell Expression in the Eye* [Online]. Available: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198053-SIRPA/single+cell+type+eye> [Accessed].
- Thompson, S., Chinnery, H., Noroozi, S., Dyer, B. T. & Barratt, K. 2015. Retinoblastoma: identifying the diagnostic signs for early treatment. *International Journal of Neurorehabilitation*, 2, 1-11.

- Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Yang, T.-H. O., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L. & Eddy, J. A. 2018. The immune landscape of cancer. *Immunity*, 48, 812-830. e14.
- Ting, S. C., Kiefer, T., Ehlert, K., Goericke, S. L., Hinze, R., Ketteler, P., Bechrakis, N. E. & Schildhaus, H.-U. 2020. Bone metastasis of retinoblastoma five years after primary treatment. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, 19, 100834.
- Vasalaki, M., Fabian, I. D., Reddy, M. A., Cohen, V. M. & Sagoo, M. S. 2017. Ocular oncology: advances in retinoblastoma, uveal melanoma and conjunctival melanoma. *Br. Med. Bull.*, 121, 107-119.
- Wang, Y., Xu, Z., Guo, S., Zhang, L., Sharma, A., Robertson, G. P. & Huang, L. 2013. Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis. *Mol. Ther.*, 21, 1919-1929.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A. & Kornberg, R. D. 2004. Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, 119, 481-489.
- Willingham, S. B., Volkmer, J.-P., Gentles, A. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S. S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R. & Cohen, J. D. 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6662-6667.
- Wu, C.-J., Chen, Z., Ullrich, A., Greene, M. I. & O'Rourke, D. M. 2000. Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins (SIRPs). *Oncogene*, 19, 3999-4010.
- Wu, L., Yu, G.-T., Deng, W.-W., Mao, L., Yang, L.-L., Ma, S.-R., Bu, L.-L., Kulkarni, A. B., Zhang, W.-F. & Zhang, L. 2018. Anti-CD47 treatment enhances anti-tumor T-cell immunity and improves immunosuppressive environment in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*, 7, e1397248.
- Xiao, W., Ye, H., Zeng, H., Tang, L., Chen, R., Gao, Y., Mao, Y. & Yang, H. 2019. Associations among socioeconomic factors, lag time, and high-risk histopathologic features in eyes primarily enucleated for retinoblastoma. *Curr. Eye Res.*, 44, 1144-1149.
- Xu, C. & Ng, D. T. 2015. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, 742-752.
- Yanagita, T., Murata, Y., Tanaka, D., Motegi, S.-I., Arai, E., Daniwijaya, E. W., Hazama, D., Washio, K., Saito, Y. & Kotani, T. 2017. Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI insight*, 2.
- Yanoff, M. & Sassani, J. W. 2014. *Ocular Pathology E-Book: Expert Consult*, Elsevier Health Sciences.
- Zhang, H., Lu, H., Xiang, L., Bullen, J. W., Zhang, C., Samanta, D., Gilkes, D. M., He, J. & Semenza, G. L. 2015. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E6215-E6223.
- Zhang, W., Huang, Q., Xiao, W., Zhao, Y., Pi, J., Xu, H., Zhao, H., Xu, J., Evans, C. E. & Jin, H. 2020. Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRPα axis. *Front. Immunol.*, 18.