

Evaluasi efek samping viroterapi dengan virus ND pada dua spesies hewan model fibrosarkoma

^{1*} Anak Agung Ayu Mirah Adi, ¹ Ida Bagus Okawinaya, ² I Nyoman Mantik Astawa

¹Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Denpasar

²Laboratorium Virologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

* Penulis koresponden: aaa_mirahadi@unud.ac.id

Abstrak. Viroterapi kanker merupakan salah satu bentuk moda terapi kanker menggunakan virus yang memiliki sifat onkolitik. Ada beberapa jenis virus yang dinyatakan memiliki sifat onkolitik yang saat ini sedang dalam tahap penelitian dan pengembangan. Salah satunya adalah virus Newcastle disease (ND) yang sangat erat keterkaitannya dengan dunia kedokteran hewan. Dilaporkan bahwa pemanfaatan virus ND untuk viroterapi aman karena tidak menimbulkan gejala sisa jika dibandingkan dengan menggunakan virus onkolitik lainnya. Meskipun dinyatakan menjanjikan untuk pengobatan namun viroterapi dengan menggunakan virus ND perlu diteliti secara terus menerus sebelum bisa diaplikasikan pada hewan dan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek samping viroterapi dengan virus ND melalui pengamatan gambaran histopatologi berbagai organ tubuh pada hewan model fibrosarkoma mencit (*Mus musculus*) dan tikus (*Rattus norvegicus*). Sampel organ diambil dan diproses menjadi jaringan berparafin. Selanjutnya jaringan berparafin diproses dan diwarnai dengan pewarnaan HE. Semua preparat organ diamati pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran lemah diikuti dengan pembesaran kuat. Lesi yang ditemukan disajikan secara deskriptif. Secara mikroskopik ditemukan lesi berupa inflamasi sel radang yang sangat ringan pada sampel organ paru dan ginjal baik pada tikus maupun mencit model fibrosarcoma yang mana lesi ini ditemukan juga pada preparat organ tikus dan mencit kontrol. Lesi ini kemungkinan besar akibat hewan model yang dipakai bukan merupakan hewan *specific pathogen free* sehingga dapat diabaikan. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa viroterapi secara intratumoral pada fibrosarcoma tidak berdampak secara sistemik sehingga tidak menimbulkan lesi pada organ yang diamati. Penting untuk dicatat bahwa walaupun hewan model memainkan peran penting dalam penelitian kanker namun pemanfaatan hewan model juga memiliki keterbatasan yang perlu dipertimbangkan.

Kata Kunci: benzo(a)piren, fibrosarkoma, ND, onkolitik, viroterapi

I. PENDAHULUAN

Viroterapi kanker adalah salah satu moda pengobatan kanker menggunakan virus yang ditargetkan untuk menghancurkan atau melisis sel kanker. Virus yang digunakan bisa berupa virus alami yang memang sudah memiliki sifat onkolitik ataupun virus hasil rekayasa genetik yang dirancang untuk menginfeksi dan bereplikasi secara selektif di dalam sel kanker, yang akhirnya akan melisis sel kanker tersebut. Beberapa virus yang telah dilaporkan mempunyai kemampuan onkolitik adalah : Virus mump, measles, rabies, herpes simplex, Newcastle disease (ND) dan Sendai [6,11,12,16]. Virus ND telah diteliti dan terus dikembangkan sebagai agen viroterapi yang potensial untuk pengobatan kanker karena sifat onkolitiknya yang secara selektif bereplikasi dan membunuh sel tumor tetapi tidak pada sel normal [7]. Virus ND virulen merupakan virus infeksius bagi ayam juga dinyatakan sebagai agent onkolitik yang paling menjanjikan dibandingkan virus yang lainnya yang infeksius bagi manusia serta dapat meninggalkan gejala sisa (sequelae) pasca infeksi [17]. Penelitian moda terapi kanker memakai hewan model memungkinkan dilakukan jika tersedia hewan model yang merupakan hewan penderita yang dibuat secara khusus. Salah satu cara untuk menyiapkan hewan model fibrosarcoma adalah dengan cara menginduksi zat karsinogenik. Zat karsinogenik yang umum digunakan adalah benzo(a)piren yang merupakan senyawa kimia termasuk dalam polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH). Efek karsinogenik benzo(a)piren telah diteliti dalam berbagai studi, termasuk pada hewan model. Benzo(a)piren diketahui memiliki kemampuan untuk menginduksi pembentukan tumor, termasuk fibrosarcoma, melalui mekanisme yang kompleks. Salah satu mekanismenya adalah melalui aktivasi enzim sitokrom P450 dalam metabolisme benzo(a)piren menjadi metabolit yang lebih reaktif, seperti epoksid benzo(a)piren [16].

Virus ND merupakan salah satu virus yang bersifat onkolitik [5]. Virus ND virulen menyebabkan penyakit ND pada unggas. Saat ini penyakit ND masih merupakan problem di industri perunggasan, diseluruh dunia, khusus untuk pulau Bali, penyakit ND masih endemis dimana kasus penyakit ND masih ditemukan sepanjang tahun [1,2]. Virus ND virulen sangat mematikan pada hampir semua spesies unggas. Meskipun sifatnya ganas pada unggas, virus ini bersifat non-patogen pada mamalia sehingga dinyatakan aman jika digunakan sebagai agen terapi kanker [13]. Virus ND tumbuh dengan baik pada sel kanker mamalia dan menginduksi onkolisis akibat interferon (IFN) mengalami

penyimpangan [13,18]. Efektivitas virus ND virulen isolat Bali telah diujicobakan untuk viroterapi pada hewan model fibrosarcoma mencit [10] dan tikus [14] dari hasil kedua penelitian tersebut virus ND virulen asal Bali yang termasuk kedalam genotype VII ([1,2] dinyatakan mampu menekan pertumbuhan masa fibrosarkoma. Pengamatan mikroskopik pada jaringan fibrosarkoma pasca viroterapi menunjukkan jumlah pembuluh darah berkurang jika dibandingkan dengan tikus yang tidak diviroterapi [14]. Dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi P53 didapatkan bahwa ekspresi imunopositif sel pada hewan model tikus yang diviroterapi lebih rendah dibandingkan dengan yang tidak diviroterapi [9]. Lebih rendahnya ekspresi P53 pada hewan model yang diviroterapi bisa menjadi suatu penanda bahwa virus ND yang diinjeksikan secara intratumoral mampu mencegah pertumbuhan sel fibrosarkoma mengingat protein P53 adalah sejenis protein supresor tumor yang berperan penting dalam menjaga keseimbangan pertumbuhan sel normal dan mencegah pertumbuhan sel kanker [15].

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan sebelumnya dilaporkan bahwa viroterapi dengan virus ND virulen isolat Bali mampu menghambat pertumbuhan fibrosarkoma [10,14,9]. Mengingat efektifitas terapi kanker tidak hanya dilihat dari kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan sel tetapi juga perlu mempertimbangkan keamanannya terhadap organ lain, maka dalam penelitian ini dievaluasi efek samping viroterapi terhadap beberapa organ dengan cara mengamati gambaran histopatologinya. Gambaran histopatologi organ dari kedua spesies hewan model tersebut dievaluasi dengan melakukan pengamatan terhadap variabel berupa lesi inflamasi, hemoragi dan nekrosis serta terhadap kemungkinan adanya metastasis.

II. METODE DAN PROSEDUR

Metode. Penelitian ini menggunakan sampel organ tikus dan mencit yang berasal dari penelitian tentang efektifitas viroterapi dengan isolat virus ND virulen, pada tikus yang dilakukan oleh Sewoyo et al [14]. dan pada mencit oleh Rahmawati et al [10]. Adapun proses penginduksian dan pelaksanaan viroterapi yang telah dilakukan pada penelitian tersebut menggunakan rancangan *posttest-only control group design* terdiri dari dua tahap yakni tahap I untuk menginduksi fibrosarkoma. Pada tahap ini semua hewan model diinjeksi dengan benzo(a)piren untuk menginduksi fibrosarkoma. Pemberian benzo(a)piren 0,3 mg/0,1 ml dalam oleum olivarum dilakukan secara injeksi melalui subkutan pada daerah interskapuler (tengkuik) sebanyak sepuluh kali yang diberikan secara bertahap dengan interval dua hari sekali. Setelah fibrosarkoma muncul diseleksi hewan 6 hewan model yang ukuran tumornya hampir seragam, hewan model diberikan perlakuan sebagai berikut. Perlakuan 0 (P0) diinjeksi dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) dan perlakuan 1 (P1) diinjeksi dengan virus Newcastle disease. Mengingat tikus dan mencit yang digunakan untuk hewan model bukan merupakan hewan yang SPF (specific pathogen free), maka sebagai kontrol negatif (Pn) digunakan tikus dan mencit sehat yang tidak diinduksi dengan Benzo(a)piren dan juga tidak diviroterapi. Masing masing perlakuan menggunakan 3 ekor hewan sebagai ulangan. Pelaksanaan viroterapi dilakukan dengan cara menyuntikan virus secara intratumoral. Injeksi intratumoral diberikan satu kali sehari selama 4 hari dengan dosis 0,5 ml/2¹¹ HA Unit. Hewan model dinekropsi dua minggu pasca viroterapi. Sampel organ diambil untuk diproses menjadi jaringan berparafin. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk kontrol negatif.

Prosedur pemeriksaan sampel organ. Sampel organ dari tikus dan mencit setelah menjadi jaringan berparafin diproses lebih lanjut dan diwarnai dengan pewarnaan haematoxylin dan eosin (HE). Preparat histopatologi diperiksa dibawah mikroskop dimulai dari pembesaran kecil dan untuk melihat derajat keparahan lesi pengamatan dilakukan pada seluruh lapang pandang. Pengambilan gambar histopatologi dilakukan pada area yang menunjukkan lesi pada pembesaran 400 kali. Semua lesi yang ditemukan disajikan secara deskriptif. Lesi pada organ paru, hati, limpa dan ginjal yang ditemukan pada hewan model fibrosarcoma dibandingkan dengan hewan model yang tidak diviroterapi dan hewan kontrol. Variabel yang diamati adalah lesi perdarahan, radang, nekrosis dan lesi karena proses metastasis.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

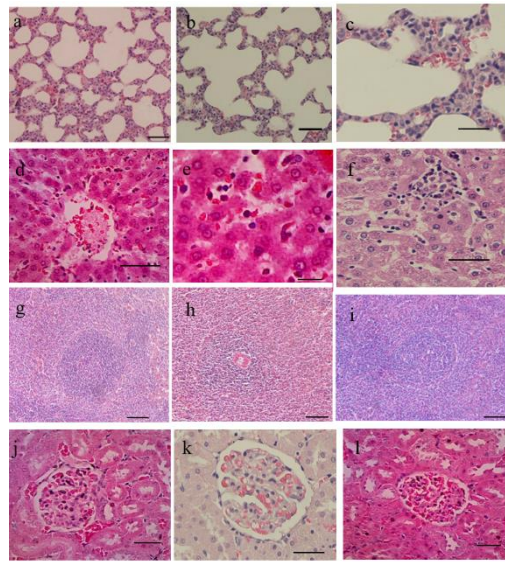
Secara mikroskopik dari hasil pengamatan semua sampel tidak ada ditemukan lesi yang menandakan ada proses metastasis. Lesi yang ditemukan berupa lesi perdarahan, peradangan dan nekrosis pada parenkim paru dan ginjal (Tabel 1). yang bersifat fokal dan ringan pada perlakuan P0 (yang tidak divitoterapi) Sementara itu lesi perdarahan, nekrosis dan radang juga ditemukan pada tikus dan mencit yang digunakan sebagai kontrol negatif (Pn) dan yang diviroterapi (P1) dengan intensitas yang sangat ringan.

Tabel 1. Lesi yang ditemukan dari ketiga perlakuan

Jenis hewan	Perlakuan	Lesi pada organ:															
		Paru				Hati				Limpa				Ginjal			
		Hem	Rad	Nek	Met	Hem	Rad	Nek	Met	Hem	Rad	Nek	Met	Hem	Rad	Nek	Met
Tikus	Pn	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	P0	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	P1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Mencit	Pn	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	P0	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	P1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: Pn hewan yang tidak diinduksi benzo(a)piren dan juga tidak di viroterapi, P0 hewan model fibrosarcoma yang diinjeksi PBS, P1 hewan model yang diviroterapi. Hem=perdarahan; Rad=peradangan; Nek= Nekrosis; Met=metastasis. Lesi: + ringan, ++ sedang, +++ berat.

Lesi perdarahan dan radang ditemukan dengan derajat ringan pada mencit model fibrosarcoma yang tidak diviroterapi (Gambar 1a dan b), dan pada tikus yang tidak diterapi (Gambar c), Lesi berupa nekrosis hepatosit dan perdarahan yang bersifat fokal dan ringan ditemukan pada mencit kontrol (1 d) (Pn) dan yang tidak diviroterapi (P0). Tidak ditemukan lesi baik pada limpa hewan kontrol maupun perlakuan. Sedangkan pada ginjal mencit ditemukan lesi ringan berupa perdarahan dan nekrosis tubulus pada mencit yang tidak diviroterapi (Gambar 1.d).



Gambar 1 a-c. Lesi ringan dan bersifat fokal pada paru berupa perdarahan dan infiltrasi sel radang yang ditemukan pada satu hewan model tikus (1a) dan mencit (1c) dan gambaran mikroskopik paru mencit kontrol(1b). Lesi ringan berupa perdarahan(1d) dan nekrosis(1f) ditemukan pada satu hewan model(1f). Pada limpa(1g-h) tidak ditemukan lesi. Untuk ginjal ditemukan lesi perdarahan ringan pada satu hewan model fibrosarcoma yang tidak diviroterapi(1j). Ginjal tikus yg diviroterapi(1k) dan mencit yang diviroterapi (1l). Tidak ditemukan ciri2 metastasis pada semua organ yang diamati.

Beberapa laporan pemanfaatan virus untuk viroterapi sama halnya dengan terapi lainnya, memiliki potensi efek samping tergantung dari jenis virus yang digunakan, metode aplikasi, dosis, dan respons individual pasien. Pemanfaatan viroterapi dengan virus ND dinyatakan aman namun, namun penelitian ini dievaluasi kemungkinan adanya efek samping pada organ. Hasil pengamatan gambaran histopatologi organ tikus yang dari ketiga perlakuan tersebut ditemukan lesi ringan berupa perdarahan dan infiltrasi sel radang yg sangat ringan, Mengingat tikus dan mencit yang digunakan untuk hewan model bukan merupakan hewan yang SPF (specific pathogen free), kemungkinan besar lesi ini bukan akibat dari induksi benzo(a)piren maupun akibat dari viroterapi karena mencit dan tikus kontrol

negatif pun menunjukkan lesi tersebut. Lesi berupa perdarahan dan radang ringan kemungkinan bisa diakibatkan oleh infeksi virus dari lingkungan, mengingat tempat pemeliharaan hewan coba ini pun bukan ruangan yang steril.

Untuk menyatakan bahwa telah terjadi metastasis dari fibrosarcoma kesuatu organ, maka dalam pengamatan histopatologi harus ditemukan ciri ciri sebagai berikut: a. *Fitur Seluler Atipikal*. Pemeriksaan mikroskopis dapat mengungkapkan fitur atipikal pada sel fibrosarcoma metastatik, seperti sel memanjang dan berbentuk gelendong dengan inti hiperkromatik dan peningkatan aktivitas mitosis. b. *Produksi Kolagen*: Sel fibrosarkoma memiliki kemampuan untuk menghasilkan kolagen, yang dapat diamati di bawah mikroskop sebagai stroma kolagen antar sel yang melimpah [4,3]. Dari hasil pengamatan pada seluruh organ tidak ditemukan adanya tanda tanda proses metastasis.

Penelitian ini memiliki keterbatasan dari jumlah sampel, lamanya terapi dan pengambilan sampel hanya pada satu bagian dari masa tumor namun gambaran yang diberikan setidaknya dapat menunjukkan bahwa lesi yang ditemukan hampir mirip dengan gambaran organ tikus dan mencit normal dan tidak ditemukan lesi yang lebih parah jika dibandingkan dengan hewan model yang tidak diviroterapi.

IV. KESIMPULAN

Hasil evaluasi terhadap gambaran histopatologi tidak ditemukan tanda-tanda adanya proses metastasis dan pada organ paru,hati dan ginjal walaupun ditemukan lesi namun masih tergolong sangat ringan dan bisa diabaikan mengingat hewan kontrol pun memiliki lesi seperti itu. Di limpa sama sekali tidak ditemukan lesi dan tidak berdampak secara sistemik pada kedua hewan model. Mengingat hewan model mencit dan tikus memiliki perbedaan biologis dengan mamalia lainnya, maka hasil penelitian pada kedua hewan model ini akan mempengaruhi relevansi dan penerapan hasil untuk terapi kanker pada mamalia lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Unud yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah group riset udayana (PGRU) dengan no kontrak -13/UN14.4.A/PT.01.05/ 2021. Sampel organ yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari penelitian mahasiswa bimbingan penulis oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada Inna Rakhmawati dan Palagan Senopati Sewoyo.

DAFTAR PUSTAKA

- [12] Adi, AAAM, Astawa, NM, Putra, KSA, Hayashi, Y, Matsumoto, Y. 2010. Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 313-319.
- [13] Adi, AAAM, Astawa, NM, Wandia, IN, Putra, IGAA, Winaya, IBO, Krisnandika, AAK, Wijaya, AAGO. 2019. Karakteristik Molekuler Virus Avian Orthoavulavirus 1 Genotipe VII yang Diisolasi dari Tabanan Bali. *J. Vet.* 20, 593-602.
- [14] Angelini A, Biz C, Cerchiaro M, Longhi V, Ruggieri P. Malignant Bone and Soft Tissue Lesions of the Foot. 2023. *J Clin Med*;12(8):3038.
- [15] Fletcher, CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. 2013. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. IARC Scientific Publications Press
- [16] Fountzilias, C, Patel, S, Mahalingam, D. 2017. Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget* 8(6):102617-102639
- [17] Kinoh, H, Inoue M, Washizawa K, Yamamoto T, Fujikawa S, Tokusami Y, Iida A, Nagai Y and Hasegawa M. 2004. Generation of a Recombinant Sendai Virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. *Gene therapy*. 11:1137-1145.
- [18] Lorence RM, Pecora AL, & Major P P. 2004. Overview of Newcastle disease virus as a promising oncolytic agent for the treatment of cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 6(3), 314-321.
- [19] Muller PA, & Vousden, KH. 2013. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* 15(1), 2-8.
- [20] Pradnyandika IPK, Astawa INM, Adi AAAM. 2023. Newcastle Disease Virus as Virotherapy Agent Targeting p53 in Rat Fibrosarcoma Models. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 13(1), 65-69
- [21] Rakhmawati, I, Adi AAAM, Winaya, IBO, Sewoyo, PS. 2022. In vivo oncolytic potency of Newcastle disease virus Gianyar-1/ak/2014 virulent strain against mice fibrosarcoma models. *Revista electrónica de Veterinaria* 23, 56-63.
- [22] Ring, CJA. 2002. Cytolytic Viruses as Potential Anti-Cancer Agents. *J. Gen. Virol.* 83, 491-502.
- [23] Schirrmacher, V. 2005. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection : improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. *Cancer Immunol Immunother.* 54:587-598.
- [24] Schwaiger T, Knittler MR, Grund C, Oberdoefer, RA, Kapp, JF, Lerch, MM, Mettenleiter, TC, Mayerle, J, Blohm, U. 2017. Newcastle disease virus mediates pancreatic tumor rejection via NK cell activation and prevents cancer relapse by prompting adaptive immunity. *Int. J. Cancer* 141:2505-2516.

- [25] Sewoyo,PS, Adi,AAAM, Winaya,IBO, Sampurna,IP, Bramardipa, AAB. 2021. The potency of virulent Newcastle disease virus Tabanan-1/arp/2017 as virotherapy agents in rat fibrosarcoma models. *Journal of Advanced Veterinary Research* 11, 64-68.
- [26] Springfield CV, von Messling M, Frenzke G, Ungerechts CJ, Buchholz and Cattaneo R. 2006. Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. *Cancer Res.*66(15):7694-7700.
- [27] Topinka J, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Chvatalova I, Smerhovsky Z, & Vondracek J. 2010. Benzo[a]pyrene and DNA damage: A biological and human risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(1), 1-12.
- [28] Wei D, Sun N, Nan G, Wang Y, Liu HQ, Peeters B, Chen ZN, Bian H.2012. Construction of recombinant Newcastle disease virus Italian strain for oncolytic virotherapy of tumors. *Human Gen Ther.*23:700-710.
- [29] Yurchenko KS, Zhou P, Kovner AV, Zavjalov EL, Shestopalova LV, Shestopalov AM. 2018. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. *PLoS ONE*. 13(4): e0195425.