

Potensi *Nanocarrier Dotap:Cholesterol (DOTAP:CHOL)* Berbasis Senyawa *Allyl Sulfur* Sebagai Modalitas Utama Nanoterapi Dalam Penatalaksanaan Kanker Serviks

I Made Yoga Prabawa*, Gede Febby Pratama Kusuma*, Agus Desiartama*

*Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Email: yoga_prabawa1504@yahoo.com ; No. HP: 085737000292

Abstrak

Laporan WHO pada tahun 2008 menyebutkan bahwa kanker serviks merupakan kanker terbanyak kedua yang diderita wanita di seluruh dunia dan 80% dari data ini berasal dari negara yang berpendapatan rendah dan negara berkembang termasuk Indonesia. Menurut data Globocan, terdapat 40.000 kasus baru kanker serviks dengan sekitar 22.000 kematian pada perempuan di Asia Tenggara. Indonesia berada di peringkat pertama dengan 15.050 kasus baru dan kematian 7.566 jiwa dalam setahun. Terkait tentang permasalahan yang ada, beberapa metode pencegahan kanker serviks umumnya sudah diterapkan seperti pemberian vaksin, namun hanya berguna untuk beberapa varian HPV. Angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi mengindikasikan belum adanya terapi yang mampu mengeradikasikan sel kanker secara sempurna. Sehingga diperlukan modalitas terapi yang baru dan efektif. Nanoterapi merupakan metode penghantaran partikel berukuran nano dan umumnya digunakan sebagai transfer gen. *Nanocarrier* berbahan dasar lemak seperti *DOTAP:Chol* berbasis senyawa *allyl sulfur* memiliki efektifitas yang baik dalam eradikasi sel kanker dengan melakukan apoptosis jalur mitokondria. *Allyl sulfur* akan mencetuskan lisis pada membran mitokondria dengan mengaktifasi protein *Bax* yang memiliki fungsi ganda antara lain meningkatkan ekspresi gen TSG p53 dan pengeluaran sitokrom-C yang memicu aktivasi *caspase* Apaf-1 dan berikatan dengan beberapa *caspase* lainnya sampai terjadi degradasi apoptosom oleh makrofag.

Kata Kunci: *allyl sulfur, DOTAP:Chol, kanker serviks.*

Abstract

In 2008, WHO reported that cervical cancer is the second largest cancer which suffered by woman in the whole world, and 80% of this data came from low income countries and developing countries, included Indonesia. According to Globocan data, there are 40.000 cervical cancer new cases with 22.000 death on woman in South East Asia. Indonesia is in first place with 15.050 new cases and 7.566 death per year. Related to this existing problem, some method in preventing cervical cancer generally been applied such as vaccine, but only useful for several HPV variant. High mortality and morbidity rate indicates the absence of therapy which capable to eradicate cancer cell perfectly. So, the new and effective therapy modality is needed. Nanotherapy is a particle delivery method with nano sized and generally used as gen transfer. Lipid based nanocarrier such as *DOTAP:Chol* with *allyl sulphur* compound have a good effectivity in eradicating cancer cell with executing a mitochondrial pathway apoptotic. *Allyl sulphur* will trigger lysis on mitochondrial membrane by activating *Bax* protein which capable to increase expression of TSG p53 gen and cytochrome-C expenditure which trigger *caspase* Apaf-1 activation and binding with other several *caspase* until apoptosom degradation by macrophages occur.

Key words: *allyl sulphur, cervical cancer, DOTAP:Chol.*

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan pertumbuhan dari suatu kelompok sel yang tidak normal pada serviks (leher rahim).¹ Menurut laporan WHO, pada tahun 2008 menyebutkan bahwa kanker serviks merupakan kanker terbanyak kedua yang diderita wanita di seluruh dunia dan 80% dari data tersebut berasal dari negara yang berpenda-

patan rendah dan negara berkembang termasuk Indonesia.² Indonesia berada pada peringkat pertama di Asia Tenggara dengan 15.050 kasus baru dan jumlah kematian sebanyak 7.566 jiwa dalam setahun.³ Prevalensi kasus kanker serviks di Indonesia masih tinggi dan merupakan permasalahan yang harus segera dilakukan intervensi. Lebih dari 70% kasus kanker serviks di Indonesia ditemukan pada saat stadium lanjut atau di atas

2B.⁴ Umur penderita antara 30-60 tahun dan terbanyak pada umur 45-50 tahun. Periode laten dari fase prainvasif untuk menjadi invasif sekitar 10 tahun, namun hanya 9% dari perempuan berumur kurang dari 35 tahun yang menunjukkan keganasan serviks uteri yang invasif pada saat didiagnosis, sedangkan 53% dari karsinoma insitu terdapat pada wanita dibawah umur 35 tahun.³

Beberapa metode pencegahan kanker serviks umumnya sudah diterapkan seperti penyediaan vaksin diantaranya jenis *quadrivalent* dan *bivalent*.^{4,5} Namun, pencegahan hanya mampu melakukan intervensi sebelum kanker memasuki stadium yang tergolong parah. Penanganan pada kanker serviks umum yang telah ada saat ini ada tiga diantaranya operasi, penyinaran (radiasi), dan kemoterapi namun angka mortalitas dan morbiditas yang masih tinggi mengindikasikan terapi yang ada belum mampu mengeradikasikan sel kanker secara sempurna sehingga diperlukan modalitas terapi yang baru dan efektif.^{6,7,8} Penelitian oleh *National Nanotechnology Initiative* pada 2004 berhasil menemukan solusi yang lebih baik dengan menciptakan *nanocarrier* sebagai bahan pembawa partikel atau senyawa yang dirasa mampu bertindak sebagai *drug delivery* dengan bersifat spesifik ke sel target kanker.⁹ Namun *nanocarrier* yang saat ini beredar masih bersifat pengantar gen dalam modalitas utama nanoterapi. Terapi gen yang saat ini sudah sering digunakan adalah dengan jenis induksi *tumor suppressor gen* (TSG).¹⁰

Suatu penelitian yang baru telah menunjukkan bahwa *nanocarrier* berbahan dasar lemak, *DOTAP:cholesterol* (*DOTAP:Chol*), mampu mengantarkan plasmid DNA secara efisien secara intravena dan dapat dikatakan sebagai *drug delivery* gen pada kasus kanker paru-paru.⁹ Namun sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian ataupun pengkajian terkait penggunaan senyawa *allyl sulfur* sebagai modalitas utama nanoterapi dalam penatalaksanaan kanker serviks dengan menggunakan *nanocarrier DOTAP:Chol*. Senyawa *allyl sulfur* merupakan senyawa larut lemak yang dihasilkan oleh tanaman *Allium Sativum L.* yang mampu menginduksi

apoptosis sel, menghambat proliferasi sel, dan mampu mengeradikasi sel kanker dengan administrasi jalur sistemik.

PEMBAHASAN

Kanker Serviks

Kanker serviks adalah karsinoma yang tumbuh di daerah leher rahim (serviks), yaitu suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang terletak antara rahim (uterus) dengan liang senggama (vagina). Kanker serviks berasal dari metaplasia epitel di daerah skuamokolumnar, yaitu daerah peralihan mukosa vagina dan mukosa kanalis servikalis.¹¹ Kanker ini timbul sebagai akibat infeksi persisten dari satu atau lebih *Human Papilloma Virus* (HPV) tipe onkogenik.² Virus Papilloma merupakan genus dari keluarga *Papovaviridae*. Selama ini telah dikenal lebih dari 200 tipe HPV.¹¹ HPV yang benar-benar karsinogenik untuk manusia dan berkaitan erat dengan timbulnya kanker serviks adalah tipe 16 dan 18.¹² Infeksi HPV pada serviks terjadi akibat mikroabrasi pada jaringan epitel genital yang memberikan akses pada partikel virus ke sel target. Secara umum diketahui bahwa lesi yang ditimbulkan akan menimbulkan ekspresi pada protein virus E1 dan E2 yang mempertahankan DNA HPV sebagai episom dan memfasilitasi pemisahan genom yang benar selama fase pembelahan sel.¹³ Virus penghasil onkoprotein utama, E6 dan E7, memainkan peran penting dalam ketahanan episom virus dengan mengganggu siklus sel.^{14,15} Perkembangan kanker serviks dimulai dari adanya lesi prakanker yang disebut servikal intraepitelial neoplasia (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*, CIN).¹⁶ CIN terbagi menjadi tiga tingkatan yakni CIN 1 menandakan adanya replikasi HPV yang aktif dan jarang menjadi kanker, sebagian besar dapat sembuh spontan.¹⁷ Sebaliknya, CIN 2 dan CIN 3 merupakan prekursor kanker yang potensial.¹⁸ CIN dapat berkembang menjadi kanker serviks invasif. Ini dimulai dari stadium mikroinvasif yang biasanya asimtomatis, tidak terlihat pada pemeriksaan dengan spekulum dan harus didiagnosis secara histologis dengan menggunakan sampel jaringan. Kanker mikroinvasif kemudian menjadi kanker invasif

yang lebih besar dan dapat menyebar ke vagina, dinding pelvis, kandung kemih, rektum, dan metastasis ke organ lainnya.¹⁹ Selain itu, sel kanker serviks juga mengekspresikan timbulnya antigen SCC-Ag dan reseptor asam folat secara spesifik. Ekspresi tersebut timbul dari stadium awal sampai lanjut yang memberikan tanda spesifik pada sel yang terkena kanker serviks. Infeksi HPV terjadi dalam persentase besar pada wanita yang aktif secara seksual. Faktor resiko terjadinya kanker serviks yang telah dibuktikan antara lain melakukan hubungan seksual dibawah umur 18 tahun, karakteristik pasangan seksual, riwayat ginekologis, agen infeksius, dan merokok.^{20,21,22}

Allium Sativum L

Kandungan kimia dari *Allium sativum L.* yang memiliki aktivitas biologi dan bermanfaat dalam pengobatan adalah senyawa organosulfur. Kandungan senyawa organosulfur yang paling berperan adalah *allyl sulfur* yang larut dalam lemak, diantaranya seperti *diallyl sulfide* (DAS/C₆H₁₀S), *diallyl disulfide* (DADS/C₆H₁₀S₂), dan *diallyl trisulfide* (DATS/C₆H₁₀S₃).^{23,24}

DOTAP:Chol

Nanoterapi adalah suatu mekanisme pengobatan menggunakan suatu pembawa yang disebut *nanocarrier*. Adapun jenis-jenis *nanocarrier* yang digunakan seperti: *nanoparticles, liposome, micelles, carbon nanotubes, dendrimers, quantum dots, and nanofibers*.^{25,26} Keseluruhan mekanisme di atas memiliki potensi besar dalam terapi kanker dan mengurangi efek samping untuk efisiensi suatu terapi. Salah satu contoh *nanocarrier* adalah *DOTAP:Chol* yang merupakan suatu *nanocarrier* berbahan lemak (hidrofobik) serta bersifat kation dalam pengantaran asam nukleat secara *in vivo*. Sifat yang berbahan dasar lemak tentu mengakibatkan *DOTAP:Chol* memiliki karakteristik hidrofobik dan mampu menembus membran plasma pada dinding sel. Disamping itu ukuran yang kecil berkisaran 200-400 nm serta memiliki muatan positif sebesar 2 mV. *DOTAP* secara umum mempunyai struktur molekuler C₄₃H₈₃NO₈S dan berat molekul 774,21.⁹ Dalam proses kerjanya, *DO-*

TAP:Chol mentransmisikan partikel obat secara lokal dan sistemik.²⁷ *DOTAP:Chol* dinilai memiliki kemampuan pengantaran yang lebih baik dibandingkan *nanocarrier* berbahan lemak lainnya dikarenakan memiliki stabilitas dan mampu mereduksi interaksi yang timbul dengan protein darah dalam penelitian secara *in vivo*.²⁸ Umumnya ada dua jenis *DOTAP* yang sudah dikembangkan secara sintesis antara lain *DOTAP* (N-[1-(2,3-*dioleoyloxy*)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride): *DOPE* (*dioleoylphosphatidylethanolamine*) dan *DOTAP* [1-(2, 3-*dioleoyloxy*) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride): *Chol* (*Cholesterol*). Kedua jenis itu digunakan untuk transfer gen yang berbeda, pada *DOTAP:DOPE* digunakan untuk mentransmisikan gen p53 sedangkan *DOTAP:Chol* umumnya digunakan untuk mentransmisikan gen BiKDD, E1A, dan Fus1. Kedua jenis *DOTAP* tersebut sudah digunakan dalam percobaan klinis fase 1 pada manusia untuk mengatasi kanker pankreas, payudara, dan paru-paru dengan jalur administrasi intravena (IV). Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA menyatakan bahwa dalam percobaan klinis fase 1, *DOTAP:Chol* dapat digunakan untuk mengatasi *non small cell lung cancer* (NSCLC) pada manusia dan digunakan sebagai pembawa TSG (E1A, p53, Flit, IL-24, BiKDD) dan Fus-1 secara intravena pada kanker yang sudah mengalami metastasis.²⁹

Cara Memperoleh Senyawa Allyl Sulfur pada Allium sativum L, Konstruksi DOTAP:Chol, serta Mekanisme Enkapsulasi Allyl Sulfur dengan DOTAP:Chol.

Ekstraksi dari bawang putih menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya.³⁰

Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut air dan etanol. Peragaman dilakukan pada suhu ekstraksi (23°C, 40°C, dan 60°C) dan lama ekstraksi (0,5 jam, 1 jam, 2 jam, dan 4 jam) ekstraksi menggunakan air, pada

suhu 60° C dan lama ekstraksi 4 jam. Ekstraksi bawang putih dengan ethanol pada suhu 0° C akan menghasilkan *Alliin*. Ekstraksi dengan etanol dan air pada suhu 25° C akan menghasilkan *Allisin* dan tidak menghasilkan *Alliin*. Sedangkan ekstraksi dengan metode distilasi uap (100° C) menyebabkan seluruh kandungan *Alliin* berubah menjadi *Allil sulfida*.

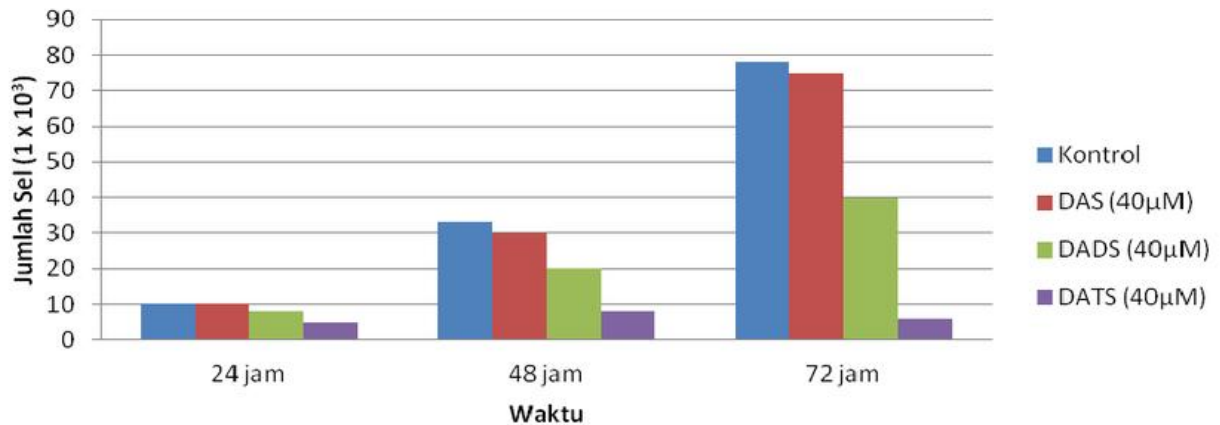
Ekstrak murni dibuat dengan memeras 800 gram bawang putih yang telah dikupas dan cairan perasan kemudian dipekatkan dengan bantuan *evaporator*. Untuk ekstrak air dan etanol, masing-masing 400 gram bawang putih yang telah dikupas dan dibersihkan, dihancurkan lalu dimaserasi dalam pelarut air atau etanol selama 3 x 24 jam. Masing-masing pelarut kemudian dipekatkan dengan bantuan *evaporator*. Masing-masing ekstrak dibuat dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dengan pelarut masing-masing kecuali pada ekstrak murni dengan dua macam pelarut yaitu masing-masing dengan air dan etanol 70%.^{30,31} Dalam satu buah *Allium sativum L* yang memiliki berat berkisar 5-7 gram terdapat unsur sulfur dengan jumlah netto 65 mg. Ini berarti dengan maserasi 400 gram akan mendapatkan 3,71 gram senyawa *allyl sulfur*. Dalam percobaan secara *in vivo* dengan menggunakan tikus seberat 200 gram, dilakukan penelitian dengan menginjeksikan 40 µM, yang apabila dikonversikan dalam gram maka akan didapatkan nilai 0,0876 gram.^{32,33,34} Dosis tersebut digunakan pada tikus, dan setelah didapatkan dosisnya tentu dengan menggunakan tabel konversi LAURENCE & BACHARACH 1964 dapat di kalkulasikan dengan perhitungan 0,0876 mg x 56,0 = 4,9 mg. Proses selanjutnya yang dilakukan sebelum enkapsulasi adalah menyiapkan *DOTAP:Chol*. Dilakukan manufaktur *DOTAP:Chol* yang memerlukan input energi untuk dispersi lemak atau senyawa fosfolipid dalam medium *aqueous*. Bahan-bahan yang digunakan antara lain reagen *DOTAP*, medium kultur, dan larutan buffer HBS (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4). Proses dimulai dengan melarutkan 876 mg NaCl didalam 90 ml air yang telah didestilasi kemudian ditambahkan 2 ml HEPES 1M dalam pH yang telah disesuaikan yakni 7,4 dan la-

kukan terus sampai mencapai volume 100 ml. Filtrasi larutan melewati filter steril dengan pori-pori 0,22 µm. Langkah selanjutnya adalah melarutkan 121 mg Tris-HCL dan 29 mg EDTA kedalam 90 ml air destilasi dengan mempertahankan pH pada 7,4 sampai mencapai 100 ml. Filtrasi kembali dengan filter steril berpori-pori 0,22 µm. Selanjutnya berikan 30 µl reagen *DOTAP* didalam tabung reaksi steril dan penuhi dengan larutan 100 µl HBS yang telah dibuat.³⁵⁻³⁹

Proses selanjutnya adalah dengan melakukan enkapsulasi senyawa *allyl sulfur* (DAS, DADS, dan DATS) ke dalam *DOTAP:Chol*. Proses bermula dengan melarutkan $4,9 \times 10^3$ µg *allyl sulfur* dalam buffer HBS (konsentrasi final 0,1 µg/µl) dan tambahkan 100 µl *DOTAP:Chol*. Inkubasikan larutan yang telah di transfeksi tersebut selama 10-15 menit pada suhu 15-25°C. Kemudian tambahkan senyawa 40 mM lemak yang berisikan 300 mM sukrosa, 30 mM EDTA, dan 20 mM asam 2-*morpholineethanesulfonic*. Setelah itu *Ionophore* kation A23187 dengan konsentrasi final 7 µM ditambahkan selanjutnya campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65° C selama 1 jam untuk membuat penyatuan dengan *DOTAP:Chol*.^{40,41} Dalam keadaan padat komponen lemak dari *DOTAP:Chol* akan terdegradasi lebih lambat sebagaimana mobilitas obat, terutama komponen obat dengan kandungan sulfur, dalam lemak padat akan lebih rendah jika dibandingkan dengan lemak cair.⁴² Senyawa *allyl sulfur* seperti DAD, DADS, dan DATS mempunyai peranan penting, dalam hal ini mampu menekan proliferasi dan induksi diferensiasi dari sel normal secara bertahap. Hal ini terjadi dengan cara menurunkan kemampuan regulasi pada beberapa komponen siklus sel.

Dalam studi yang dilakukan pada manusia, senyawa DATS mampu menghambat proliferasi sel abnormal pada kanker paru-paru sebesar 70%.⁴³ Secara garis besar, DAS, DADS, dan DADS mampu menurunkan proliferasi sel berlebihan dengan frekuensi yang berbeda dalam rentang waktu yang sama. Studi lain menunjukkan bahwa suatu pertumbuhan sel yang abnormal dalam rentang waktu 72 jam, sel kanker yang bertindak sebagai kontrol mampu

Tabel 1. Efektifitas DAS, DADS, dan DATS dalam Menekan Proliferasi Sel Kanker



berproliferasi sebanyak 75×10^3 tanpa intervensi dari senyawa *allyl sulfur*.³⁴ Namun setelah adanya intervensi pada sel kanker yang tidak bertindak sebagai kontrol, senyawa *allyl sulfur* mampu menurunkan jumlah sel yang berproliferasi menjadi 65×10^3 (DAS), 40×10^3 (DADS), dan 6×10^3 (DATS). Dalam penelitian tersebut diberikan senyawa *allyl sulfur* dalam kadar yang sama yakni sebanyak $40 \mu\text{M}$. Senyawa *allyl sulfur* DATS memiliki efektifitas yang lebih baik dikarenakan mampu menekan jumlah sel kanker hampir setara dengan sel sebelum mengalami proliferasi.³⁴

Mekanisme Administrasi dan Internalisasi nanocarrier DOTAP:Chol Berbasis Senyawa Allyl Sulfur pada Penatalaksanaan Kanker Serviks

Jenis Administrasi Nanocarrier DOTAP:Chol Berbasis Allyl Sulfur

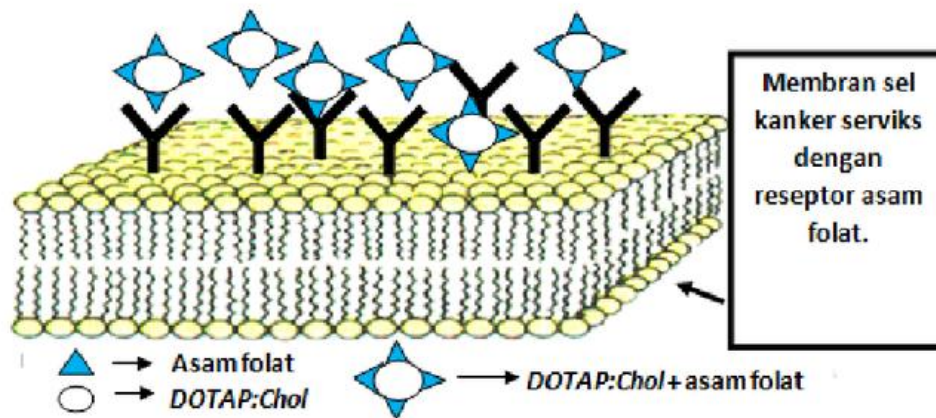
Semua jenis *nanocarrier* pada umumnya dapat di administrasikan melalui jalur sistemik yakni jalur enteral dan parenteral.⁴⁴ Namun pada *DOTAP:Chol* tentunya tidak bisa melalui jalur enteral yang mekanisme administrasinya akan diserap melalui saluran gastrointestinal seperti melalui rute oral, rute rektal, dan juga rute sublingual mengingat sifat *nanocarrier DOTAP:Chol* memiliki komposisi lipid dan akan sangat memungkinkan perjalanan obat akan terhenti ketika melewati duodenum yang akan dihancurkan oleh enzim lipase. Tidak hanya itu, pada rute oral obat akan mengalami *first*

pass effect sehingga bioavailabilitasnya akan berkurang.⁴⁵ Oleh sebab itu akan dirasa lebih baik jika administrasi dari *nanocarrier* ini melalui jalur parenteral, yaitu secara langsung melalui aliran darah. Adapun beberapa jenis administrasinya, diantaranya metode injeksi (intravaskular, intramuskular, dan subkutan) dan metode non-Injeksi

Metode injeksi dan non-injeksi tersebut merupakan jalur sistemik sehingga perlu dilakukan modifikasi pada permukaan *DOTAP:Chol* dengan menambahkan asam folat. Hal ini dikarenakan asam folat mempunyai kemampuan dalam berikatan dengan reseptor asam folat yang diekspresikan secara khusus oleh sel kanker serviks sehingga target *nanocarrier DOTAP:Chol* bisa dibatasi untuk berikatan dengan sel kanker serviks. Selain jalur sistemik administrasinya bisa dilakukan dengan jalur lokal/ topikal dengan metode pelepasan *nanocarrier DOTAP:Chol* langsung pada sel target.²⁷ Administrasi ini dirasa mungkin untuk dilakukan mengingat semua sel manusia termasuk sel kanker memiliki karakteristik yang sama dari segi membran selnya yang bersifat fosfolipid bilayer.

Proses Internalisasi Nanocarrier DOTAP:Chol Berbasis Allyl Sulfur

Sel kanker memiliki struktur membran yang mirip pada sel normal pada umumnya, yakni terdiri dari dua lipatan fosfat dan lemak yang bersatu membentuk daerah hidrofobik dan hidrofilik hanya saja terdapat perbedaan



Gambar 1. Ilustrasi Modifikasi *DOTAP:Chol* dengan Asam Folat

bahwa sel kanker serviks mengekspresikan antigen disekitar permukaannya yakni SSC-Ag dan reseptor asam folat yang memberikan sinyal letak adanya kanker serviks.⁴⁶ Terkait mekanisme internalisasinya ada dua berdasarkan ada tidaknya reseptor pada *DOTAP:Chol* yakni secara fusi apabila dilakukan secara topikal langsung ke sel target sehingga tidak memerlukan modifikasi pada membran *DOTAP:Chol* dan endositosis via reseptor yang memerlukan modifikasi membran *DOTAP:Chol* dengan asam folat melalui jalur sistemik.

Mekanisme internalisasi dengan cara endositosis berbeda dengan fusi. Dalam hal ini sel kanker serviks mampu berikatan dengan asam folat dikarenakan menurut studi terbaru dari *Winship Cancer Institute at Emory University, Atlanta, Georgia* bahwa pengambilan 143 spesimen dari 95 pasien kanker serviks dengan rincian 47 sel kanker serviks insitu dan 48 telah invasif atau mengalami metastasis, dengan metode *immunohistochemistry*, menunjukkan terekspresinya asam folat.⁴⁷ Pada sel kanker serviks insitu menunjukkan sebanyak 62% dengan tanpa pengecatan, 15% dengan pengecatan lemah +1 (< 25% sel kanker yang digunakan), dan 23% dengan pengecatan kuat +2 (> 25% yang digunakan). Sedangkan, pada sel kanker yang telah invasif menunjukkan angka 50%, 21%, dan 29%.^{46,47} Tingkat ekspresi asam folat dianggap positif ketika karakteristik immunoreaktivitas membran dan sitoplasma sel tersebut hadir.⁴⁸ Oleh sebab itu, modifikasi *DOTAP:Chol* dengan menambahkan asam folat dianggap penting untuk meningkatkan efikasi *nanocarrier* pada reseptor asam folat di sel

kanker serviks. Mekanisme yang terjadi adalah ketika *DOTAP:Chol* berikatan dengan reseptor tersebut akan terjadi internalisasi dengan endositosis.⁴⁹ Terjadinya respon pada filament aktin pada membran sel kanker serviks untuk mengalami depolimerisasi G-aktin dan kontraksi aktin serta miosin pada *coated pit* sehingga terjadi lengkungan pada membran sel, *DOTAP:Chol* masuk dan akan dibungkus oleh *clatrin* yang terdapat di permukaan bagian dalam membran sel kanker serviks.^{46,49}

Mekanisme Kerja *nanocarrier DOTAP:Chol* Berbasis Senyawa *Allyl Sulfur* dalam Penatalaksanaan Kanker Serviks

Mekanisme kerja dari *DOTAP:Chol* dilihat dari stabilitas dan interaksi dengan protein darah. Beberapa hal yang memberikan kontribusi lain dari segi keefektifitasnya adalah ketika diisikan suatu segmen DNA maka akan terbentuk bentuk unik dari *DOTAP:Chol* yaitu seperti struktur vas yang mempertahankan keutuhan DNA dari degradasi yang terjadi pada umumnya.⁹

DOTAP:Chol dapat digunakan untuk transfer gen secara lokal ataupun sistemik.²⁷ Masih belum diketahui secara jelas formulasi dari *DOTAP:Chol* sehingga dapat menghasilkan transfer gen yang sangat efisien. Jenis *DOTAP:Chol* yang dipakai haruslah mampu menembus tumor yang sifatnya solid seperti yang terjadi pada kanker serviks, oleh karena itu jenis *DOTAP:Chol* yang dipakai adalah yang mengandung DOTAP [1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium Chloride): Chol (Cholesterol).²⁸

Dalam suatu studi terbaru menjelaskan

bahwa *DOTAP:Chol* tidak hanya bisa mentransfer materi berupa segment DNA, tetapi senyawa kimia lainnya yang larut dalam lemak.⁵⁰ *DOTAP:Chol* hanya berperan sebagai *nanocarrier* untuk membawa suatu materi kedalam sel target, yaitu sel kanker. Oleh sebab itu perlu diinsersikan suatu senyawa *allyl sulfur* kedalam *DOTAP:Chol* yang nantinya akan digunakan dalam upaya eradikasi sel kanker serviks dalam mekanisme apoptosis jalur mitokondria. Sifat *allyl sulfur* seperti DAS, DADS, dan DATS yang memiliki komposisi sulfur serta bersifat larut dalam lemak memungkinkan untuk memasukkan senyawa tersebut kedalam *DOTAP:Chol*. Ketika diinjeksikan kedalam tubuh melalui suntikan intravena (IV) hal tersebut akan menuju sel target yaitu sel kanker. Mekanisme awal yang terjadi adalah *DOTAP:Chol* dengan ukuran kecil melakukan fusi atau endositosis kedalam membran sel dan terus melanjutkan perjalanan kemudian masuk ke dalam membran luar mitokondria. Hal ini memungkinkan terjadi dikarenakan adanya kandungan senyawa lemak yang terdapat pada membran luar mitokondria yaitu *phosphatidylcholine* (43%), *phosphatidylethanolamine* (32,6%), *phosphatidylinositol* (10,3%), *phosphatidylserine* (1,2%), *phosphatidic acid* (4,4%), dan *cardiolipin* atau DAG (5,9%) dengan perbandingan terhadap senyawa protein berkisar 1:1.^{51,52} Perjalanan *DOTAP:Chol* dalam membawa senyawa *allyl sulfur* terus berlangsung dan kemudian menembus membran dalam mitokondria juga, hal ini dikarenakan terdapat pula senyawa lemak dengan perbandingan terhadap protein adalah 1:3.⁵² Insersi *DOTAP:Chol* kini telah sampai pada matriks mitokondria dan senyawa *allyl sulfur* akan dilepaskan didalamnya. Mekanisme pelepasan senyawa *allyl sulfur* terjadi dikarenakan adanya enzim malat yang berfungsi untuk mensintesis lemak.⁵³ Oleh sebab itu permukaan *DOTAP:Chol* yang merupakan lemak dapat dipecah di dalam matriks mitokondria. Pelepasan *allyl sulfur* akan merangsang pembentukan *Bax*, suatu kelompok protein Bcl-2, yang merupakan protein proapoptosis.^{24,54} Di dalam mtDNA terdapat

gen pengkode *Bax* untuk menghasilkan protein *Bax* dengan promotornya memiliki segment nukleotida 5'-AGGTTTGCCT sedangkan basa nukleotida pengkode gennya adalah 5'-GATTAGGTTGGCTTGTGG.⁵⁵ Segmen basa nukleotida tersebut juga terdapat pada DNA di dalam nucleus (nDNA). Mekanisme yang terjadi adalah *allyl sulfur* seperti *diallyl sulfide*, *diallyl disulfide*, dan *diallyl trisulfide* merangsang ekspresi dari gen *Bax* untuk menghasilkan protein proapoptosis tersebut dan menghambat kerja dari protein anti apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-X_L.⁵⁵ Proses pembuatan protein *Bax* dimulai dari transkripsi yang dipicu oleh adanya senyawa *allyl sulfur* untuk menghasilkan mRNA 3'-CUAAUCCAACCGAACAAACACC. Gen yang terdapat di dalam mtDNA tidak memiliki intron melainkan daerah D-Loop, yaitu daerah tidak mengkode. Hal inilah yang menyebabkan tidak terjadi pembentukan pre-mRNA *Bax* pada mitokondria dan tidak terjadi pemotongan intron (*splicing*) oleh snRNP. Setelah proses transkripsi terjadi, proses selanjutnya adalah tahapan translasi yang melibatkan mRNA mitokondria dengan ribosom bebas (sub unit rRNA 12S dan 16S) didalam matriks mitokondria. Prosesnya dimulai ketika mRNA berikatan dengan subunit kecil ribosom kemudian terjadi penempelan subunit besar ribosom. Proses translasi berlangsung dari arah 5'-3' yang dimulai dengan inisiasi pada start kodon (pada mitokondria start kodonnya adalah AUA) di *P-site* ribosom serta penempelan tRNA yang membawa asam amino isoleusin. Proses selanjutnya adalah terjadi penempelan tRNA yang baru pada *A-site* ribosom dengan membawa asam amino yang sesuai dengan kodon pada mRNA yang mengkode protein *Bax*. Kedua proses tersebut akan terus berlangsung dan terjadi translokasi tRNA dari *A-site* pindah ke *P-site* dengan perpindahan asam amino dari tRNA pada *P-site* sebelumnya ke *A-site*. Terjadinya perpindahan asam amino diakibatkan oleh pemutusan ikatan ester pada *acceptor stem* (5'-CCA-3') tRNA. Proses translasi terus berlanjut untuk membentuk asam amino yang nantinya menjadi protein *Bax* dan berhenti

ketika sampai pada stop kodon untuk melakukan terminasi. Stop kodon pada mitokondria bukanlah UAA, UAG, dan UGA melainkan AGA dan AGG. Terminasi juga dipicu oleh pelekatan faktor pelepas (*releasing factor*, RF) yaitu RF1 dan RF3 yang melekat pada *A-site* ribosom. RF1 dan RF3 akan melekat dibagian stop kodon pada *A-site* yang kemudian terjadi pelekatan GTP untuk menghidrolisis ikatan peptida dan melepaskan tRNA terakhir pada *P-site*. Kompleksitas pembuatan protein *Bax* tersebut pun berakhir ketika asam amino selesai dibentuk dan mengalami *folding* untuk menjadi protein.

Mekanisme pembuatan protein *Bax* dilanjutkan dengan aktivasinya. Aktivasi dari protein *Bax* akan melisis membran mitokondria sehingga merangsang pelepasan sitokrom-C, aktifitas *caspase* (*cysteine aspartate-specific protease*) yang merupakan kelompok enzim protease sistein berfungsi dalam mengatur serta mengksekusi sel dengan kematian sel terprogram (apoptosis), serta aktivasi protein *Bax* juga akan menimbulkan fragmentasi DNA.⁵⁶⁻⁵⁹

Selain memicu aktivasi dari ekspresi protein *Bax*, senyawa *allyl sulfur* juga berpengaruh terhadap aktifitas *tumor suppressor gene* (TSG) p53. TSG p53 merupakan gen yang mengkode pembentukan protein p53 yang terletak pada kromosom 17p13.1.⁵⁶ TSG p53 terdapat didalam semua DNA didalam tubuh manusia, termasuk di dalam mtDNA. mtDNA memiliki siklus sel yang sama dengan siklus sel pada DNA nukleus yakni akan melewati fase interfase (G_1 , S, dan G_2) kemudian baru memasuki fase M (mitosis). Peranan TSG p53 terdapat ketika munculnya fragmentasi DNA oleh protein *Bax*, yang akan menghentikan siklus sel pada fase interfase dengan mengaktifasi *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CDKI) seperti p16, p17, p18, p27, dan p57.⁵⁶ Aktifitas ini tentunya tidak mungkin terjadi pada kanker serviks mengingat telah terjadi inaktivasi protein p53 oleh protein E6 dari HPV kanker serviks. Namun suatu studi dari *University of California* menemukan bahwa senyawa *allyl sulfur* pada *Allium sativum L* merangsang ekspresi p53 terhadap aktifitas protein E6 dan

meningkatkan aktivasinya.⁶⁰ Hal tersebutlah yang mengakibatkan aktivasi CDKI tetap dapat berlangsung.

Mekanisme kompleks yang terjadi pada senyawa *allyl sulfur* pada mtDNA memiliki peranan penting dalam pengeluaran sitokrom-C.^{58,59} Tidak hanya itu, kebocoran membran mitokondria juga menyebabkan pengeluaran senyawa *apoptosis-inducing factor* (AIF) seperti DIABLO dan Smac untuk menetralkan sejumlah inhibitor *caspase* yang dikenal sebagai *inhibitor for apoptosis* (IAP) yang nantinya akan meningkatkan laju apoptosis.⁶¹ Pelepasan sitokrom-C dari mitokondria menuju sitoplasma mengakibatkan aktivasi dari aktivator *caspase* Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), berikatan dengan ATP/ADP, dan *caspase* 9 yang nantinya akan membentuk apoptosom.^{58,59,61} Apoptosom nantinya akan bertindak sebagai aktivator pada inisiator *caspase*. *Caspase* 9 dalam bentuk aktifnya kemudian akan mengaktifasi *caspase* eksekutor seperti *caspase* 3 (CPP32, Yama, apopain), *caspase* 6 (Mch2), dan *caspase* 7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1) yang selanjutnya akan menimbulkan badan apoptotik (*apoptotic body*), yakni suatu fragmen sel yang telah terbagi-bagi.⁵⁹ Setelah terbentuk badan apoptotik akan terjadi degradasi oleh makrofag dengan cara memfagositosis. Proses fagositosis terjadi dikarenakan pada badan apoptotik terdapat sinyal pengenalan yaitu reseptor fosfatidilserin (*phosphatidylserine*, PS), protein plasma thrombospondin 1 (TSP 1), dan gula.^{62,63} Sedangkan pada makrofag memiliki beberapa antigen lektin, CD14, *scavenger receptor A* (SR-A), CD36, ABC1/Ced-7, dan $\alpha_v\beta_3$ yang berkonjugasi dengan reseptor vitronectin.^{62,63} Antigen dan reseptor ini nantinya bertemu yang akan merangsang pesinyalan fagositosis dan mengaktifkan anti-inflamasi.

SIMPULAN

Senyawa *allyl sulfur* diperoleh dengan menggunakan metode maserasi. Setelah itu dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan air dan etanol. Selanjutnya konstruksi *DOTAP:Chol* dilakukan dengan

menggunakan reagen DOTAP, kemudian dilanjutkan dengan proses enkapsulasi. Mekanisme administrasi *DOTAP:Chol* adalah melalui jalur parenteral dan internalisasi *nanocarrier DOTAP:Chol* dapat secara langsung melakukan fusi ke dalam membran sel atau melalui endositosis via reseptor. Mekanisme kerja *allyl sulfur* akan menginduksi mtDNA untuk menghasilkan protein *Bax* sehingga akan meningkatkan ekspresi gen p53 untuk melepaskan sitokrom-C. Pelepasan sitokrom-C akan mengaktifasi *Apaf-1* dan menimbulkan kematian sel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121:621-632.
2. International Agency for Research on Cancer. *Cancer Site by Site*. In : World Cancer Report 2008. Lyon: WHO. 2008: 418-23.
3. Mardjiko P. Tumor ganas alat genital. Dalam : Wiknjosastro H, Saifuddin AB, Rachimhadhi T. Editor. Ilmu Kandungan. Edisi Kedua. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. 1999. 380-9.
4. Medianews.com. 70 Persen Kasus Kanker Serviks Ditemukan Sudah Stadium Lanjut. 2011.
5. FDA. Approves Expanded Uses for Gardasil to Include Preventing Certain Vulvar and Vaginal Cancers. U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2008.
6. A. Alvarez-Secord, A. Berchuck, R. Higgins, L. Nycum, et al. A multicenter, randomized, phase II study evaluating the efficacy and safety of combination docetaxel and carboplatin and sequential therapy with docetaxel then carboplatin in patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *JNCI*. 2008.
7. Liu G, Franssen E, Fitch M, Warner E. Patient preference for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007. 15:110-115.
8. Bartel S. Safe practices and financial considerations in using oral chemotherapeutic agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2007;64 (9):Suppl 51;p S8-S14.
9. Morrow KJ, Jr, Bawa R, Wei C. Recent advances in basic and clinical nanomedicine. *Med Clin North Am*. 2007. 91:805-843.
10. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 6 proteins with p53. *Science* 1999;248: 76-9.
11. Aziz MF, Andrijono, Saifuddin AB, editors. *Buku Acuan Nasional Onkologi Ginekologi*. 1st. ed. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. 2006.
12. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MIE, Kwappenberg KMC, van der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High Number of Intraepithelial CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes is Associated with the Absence of Lymph Node Metastases in Patients with Large Early-Stage Cervical Cancer. *Cancer Research*. 2007. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/67/1/354> (akses: 20 November 2011).
13. Raffaghello L, Prigione I, Bocca P, Morandi F, Camoriano M, Gambini C, Wang XH, Ferrone S, Pistoia V. Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene* 2005, 24: 4634-4644.
14. Yang TY, McNally BA, Ferrone S, Liu Y, Zheng P. A single-nucleotide deletion leads to rapid degradation of TAP-1 mRNA in a melanoma cell line. *J Biol Chem* 2003, 278: 15291-15296.
15. Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, Doeberitz MV. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res* 2005, 65: 6418-6424.

16. Petignat P, Roy M. Diagnosis and Management of Cervical Cancer. *BMJ*. 2007. 335(7623):765-68.
17. Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, et al. Functional Attributes of Mucosal Immunity in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Effects of HIV Infection. *Cancer Research*. 2004. 64:6766-74.
18. Ramchandani SM, Houck KL, Hernandez E, Gaughan JP. Predicting Persistent/Recurrent Disease in the Cervix After Excisional Biopsy. *MedGenMed*. 2007. 9(2):24.
19. Department of Reproductive Health and Research and the Department of Chronic Diseases and Health Promotion. *Comprehensive Cervical Cancer Control : A Guide to Essential Practice*. Geneva: WHO, 2006.
20. Tsunoda S, Jobo T, Arai M, et al. Small-cell carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic study of 11 cases. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(2): 295-300
21. Conner MG, Richter H, Moran CA, Hameed A, Albores-Saavedra J. Small cell carcinoma of the cervix: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 23 cases. *Am Diagn Pathol* 2002; 6(6): 345-348.
22. Sato Y, Shimamoto T, Amada S, Asada Y, Hayashi T. Large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathological study of six cases. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(3): 226-30.
23. Knowles LM, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits p34(cdc2) kinase activity through changes in complex formation and phosphorylation. *Carcinogenesis*. 2007. 21:1129-34.
24. Singh SV, Herman-Antosiewicz A, Singh AV, Lew KL, Srivastava SK, Kamath R, Brown KD, Zhang L, Baskaran R. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem*. 2004. 279:25813-22.
25. W. Cai, A. R. Hsu, Z.-B. Li, and X. Chen. Are quantum dots ready for in vivo imaging in human subjects?. *Nanoscale Research Letters*. 2007. vol. 2, no. 6, pp. 265-281.
26. W. Cai and X. Chen. Nanoplatforams for targeted molecular imaging in living subjects *Small*, vol. 3, no. 11, pp. 1840-1854, 2007.
27. R. Ramesh, I. Ito, Y. Saito et al. Local and systemic inhibition of lung tumor growth after nanoparticle-mediated DOTAP gene delivery. *DNA and Cell Biology*. 2004. vol. 23, no. 12, pp.850-857.
28. M.C.Hung, G. N. Hortobagyi, and N. T. Ueno. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/ neuoverexpressing breast and ovarian cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2004. vol. 465, pp. 171-180.
29. W. Li and F. C. Szoka. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007. vol. 24, no. 3, pp. 438-449.
30. Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, et al. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis*. 2004. 25: 1227-36.
31. Saravanan G, Prakash J. Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004. 94:155-8.
32. Dong Xiao, Sunga Choi, Daniel E Johnson, et al. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl -2. Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA. 2004, h 5600-5604.
33. Koh SH, Kwon H, Park KH, Ko JK, Kim JH, Hwang MS, Yum YN, Kim OH, Kim J, et al. Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;133:176-86.

34. Knowles LM, Milner JA. Possible mechanism by which allyl sulfides suppress neoplastic cell proliferation. *J Nutr.* 2007; 131:1061S–6S.
35. S.Y. Wu and N.A. McMillan, *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 2009, **11**, 4, 639
36. Chen, W., Carbone, F. R. & McCluskey, J. 1993. *J. Immunol. Methods* 160, 49
37. Mc Kimm-Breschkin, J. 1993. IXth International Congress of Virology (Abstract) P 15-12.
38. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., and Cullis, P. R. Production of large DOTAP vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985. 812: 55–65.
39. Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., and Janoff, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed lipid-based nanocarrier vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986. 817: 193–196.
40. Fenske, D. B., Wong, K. F., Maurer, E., et al. Ionophore-mediated uptake of ciprofloxacin and vincristine into large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane ion gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998. 1414: 188–204.
41. Pick, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981. 212: 186–194.
42. Kim, B.D., Na, K., Choi, H. K. Preparation and Characterizations of Solid Lipid Nanoparticle Made of Cocoa Butter. *European J. of Pharmaceutical Sciences*, 2005. 24 (2).
43. Lee, C. M. Temperature-Induced Released of All-trans-Retinoic Acid Loaded in Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery. *Macromoleculer Research*. 2008. 16 (8).
44. Wei C, Wei W, Morris M, Kondo E, Gorbounov M, Tomalia DA. Nanomedicine and drug delivery. *Med Clin North Am.* 2007. 91:863–870.
45. Petri N, Bergman E, Forsell P, Hedeland M, et al. First-pass effects of verapamil on the intestinal absorption and liver disposition of fexofenadine in the porcine model. 2010, 38 (9).
46. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligandbinding assay. *Anal Biochem.* 2005. 338:284–293.
47. Low PS, Antony AC. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007. 56:1055–1058.
48. Kelemen LE. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer.* 2006. 119:243–250.
49. Turek JJ, Leamon CP, Low PS. Endocytosis of folate protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *J Cell Sci.* 2008. 106:423–430.
50. M. M. Mady, M. M. Ghannam, W. A. Khalil, et al. Efficient lipid soluble solution delivery with serum into human cancer cells using targeted DOTAP. *Journal of Drug Targeting*, vol. 2007. Vol 12, no. 1, pp. 11–18.
51. Bakht O, Pathak P, London E. Effect of the structure of lipids favoring disordered domain formation on the stability of cholesterol-containing ordered domains (lipid rafts): identification of multiple raft-stabilization mechanisms. *Biophys J.* 2007. 93(12):4307-18.
52. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipid of Mitochondrions: where they are and how they behave?. *Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University.* 2008. 9(2):112-24.
53. Elcock, A. H., and McCammon, J. A. *Biochemistry.* 1996. **35** 12652–12658.
54. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of nutrition.* 2006. 136:716-25.

55. HongYS, Ham YA, Choi J and Kim J. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Experimental and Molecular Medicine*. 2000. Vol.32,No.3, 127-134.
56. Herr, I., Debatin, K.M. Cellular Stress Response and Apoptosis in Cancer Therapy. *Blood Rev* 2007; 98(9): 2603-14.
57. Ashe, P.C., Berry, M.D. Apoptotic Signaling Cascades. *Prog Neuro-Psycho & Biol Psychiatry*. 2008; 27: 199-214.
58. Wetzel EB, Green DR. Caspases Induce Cytochrome c Release from Mitochondria by Activating Cytosolic Factors. *J Biochem*. 1999; 274(25): 17484-90.
59. Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N. Caspase-Dependent Cytosolic Release of Cytochrome c and Membran Translocation of Bax in p53-Induced Apoptosis. *Exp Cell Res*. 2009; 265: 145 – 151.
60. Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *University of California*. 2003;14: 704-718.
61. Ashkenazi A, Dixi V. Death receptors: Signal ligand modulation. *Science*. 2005. 281 : 1305-1308.
62. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 2003. 148, 2207-2216.
63. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2003. 405, 85-90.