

PEMAHAMAN TENTANG KESAN VESIKEL
EKSTRASEL YANG TELAH DIARUH
KEMOTERAPI TERHADAP
SEL IMUN MANUSIA

NUR' SYAHADA BINTI AB RAZAK

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

PEMAHAMAN TENTANG KESAN VESIKEL EKSTRASEL YANG TELAH
DIARUH KEMOTERAPI TERHADAP SEL IMUN MANUSIA

NUR' SYAHADA BINTI AB RAZAK

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEHI
IJAZAH SARJANA SAINS (PERUBATAN MOLEKUL)

INSTITUT BIOLOGI MOLEKUL PERUBATAN UKM
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2021

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

23 Ogos 2021

NUR' SYAHADA BINTI AB
RAZAK
P99836

**PERAKUAN TESIS SARJANA / DOKTOR FALSAFAH
(CERTIFICATION OF MASTERS / DOCTORAL THESIS)**

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : NUR' SYAHADA BINTI AB RAZAK

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P99836 Sesi Akademik
(Academic Session) : SEMESTER 2
2020-2021

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : PEMAHAMAN TENTANG KESAN VESIKEL EKSTRASEL
YANG TELAH DIARUH KEMOTERAPI TERHADAP SEL
IMUN MANUSIA

Merujuk kepada Klausa 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai:
(With regard to Clause 4.2 of the UKM Student Intellectual Property Policy (Supplementary), the thesis is the student's property. I hereby declare this thesis as:)

☐ **RAHSIA
(CONFIDENTIAL)**

Mengandungi maklumat rahsia di bawah AKTA RAHSIA RASMI 1972
(Consisting of classified information under the OFFICIAL SECRETS ACT 1972)

☐ **TERHAD
(RESTRICTED)**

Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan
(Consisting of RESTRICTED information which has been determined by the organisation/body where the research was conducted)

☒ **AKSES
TERBUKA
/TIDAK TERHAD
(OPEN ACCESS/
NON-
RESTRICTED)**

Saya membenarkan tesis ini diterbitkan secara akses terbuka, teks penuh atau dibuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(I allow this thesis to be published through open access, full text or copied for study, learning and research purposes only.)

Bagi kategori Akses Terbuka/Tidak Terhad, saya membenarkan tesis (Sarjana/Doktor Falsafah) ini di simpan di Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)* dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

(For the Open Access/Non-Restricted category, I allow this (Master's/Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

1. Perpustakaan UKM mempunyai hak untuk membuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(UKM Library has the right to reproduce the thesis for study, learning and research purposes only.)
2. Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia dibenarkan membuat satu (1) salinan tesis ini untuk tujuan pertukaran antara institusi pengajian tinggi dan mana-mana badan/ agensi kerajaan, tertakluk kepada terma dan syarat.
(UKM Library is allowed to make one (1) copy of this thesis for exchange purpose among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)



TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)



TANDATANGAN PENYELIA /
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE
SIGNATURE)

950317-14-6956

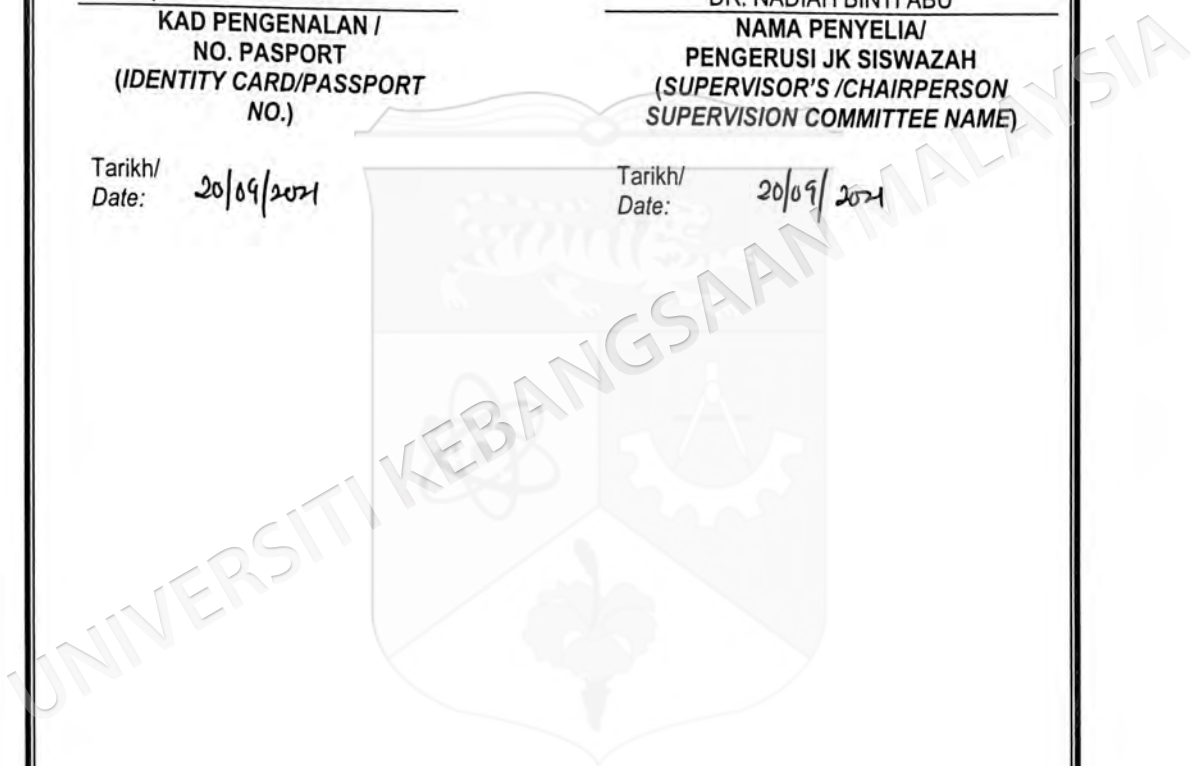
KAD PENGENALAN /
NO. PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT
NO.)

Tarikh/
Date: 20/09/2021

DR. NADIAH BINTI ABU

NAMA PENYELIA/
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE NAME)

Tarikh/
Date: 20/09/2021



PENGHARGAAN

Alhamdulillah! Saya telah berjaya menyelesaikan tesis ini dan menamatkan kerja makmal saya seperti dijadualkan. Namun, semua itu tidak mungkin berlaku tanpa sokongan dan pertolongan daripada banyak individu.

Saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada penyelia utama saya, Dr. Nadiah binti Abu dan penyelia bersama; Dr. Nurul Syakima binti Abdul Mutalib dan Dr. Mohamad Aimanuddin bin Moktar kerana telah memberi saya cadangan yang membina dan kesabaran dalam penyeliaan kajian saya ini. Saya juga bersyukur diatas berpeluang bekerja di UMBI dan menjadi sebahagian daripada kumpulan penyelidikan beliau. Terima kasih untuk segala ilmu yang dicurahkan sepanjang pengajian Sarjana saya ini.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada rakan - rakan dan staf makmal di UMBI kerana telah banyak membantu saya. Saya amat berhutang budi atas bimbingan dan bantuan berterusan mereka serta sokongan untuk menyelesaikan kajian makmal ini.

Saya juga ingin merakamkan ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada bapa dan ahli keluarga terdekat saya. Terima kasih kerana bersabar dan cuba memahami jadual kerja makmal saya yang ketat dan tidak jemu memberikan sokongan moral untuk meneruskan pengajian Sarjana yang mencabar ini.

ABSTRAK

Kanser usus adalah sejenis kanser yang berlaku di bahagian usus dan rektum manusia dan merupakan antara kanser yang paling lazim dihadapi oleh masyarakat dunia termasuk rakyat Malaysia. Seiring dengan pembedahan, kemoterapi menjadi pilihan para doktor dalam merawat pesakit kanser usus. Antara ubat kemoterapi yang diberikan adalah ubat berasaskan platinum seperti *oxaliplatin* yang diperakui sebagai piawai rawatan kanser usus di seluruh dunia termasuk Malaysia. Agen genotoksik ini mempunyai kesan sitotoksik secara langsung kepada sel kanser seperti mengubah DNA, menghalang pembahagian dan pertumbuhan sel serta mampu mendorong kematian sel imunogenik (ICD). Selain itu, ubat kemoterapi ini juga mampu mengubah homeostasis di dalam badan manusia dan memberi kesan kepada sistem imun. Namun, kita masih belum memahami secara sepenuhnya hubungan kait antara ubat kemoterapi dengan persekitaran mikro tumor terutamanya terhadap sel imun. Umum telah diketahui, sel – sel manusia boleh merembes keluar vesikel ekstrasel (EV) yang bersaiz nano sebagai medium berkomunikasi antara sel. Entiti ini juga mampu mengubah dan memberikan tindak balas terhadap sel – sel dalam persekitaran mikro tumor. Oleh itu, di dalam kajian ini, kami cuba untuk memahami kesan EV yang telah diaruh oleh kemoterapi terhadap sel imun manusia, terutamanya sel limfosit T CD8⁺. Morfologi, ukuran dan kadar limpahan EV diperinci menggunakan beberapa kaedah seperti pemblotan *western*, ELISA dan mikroskopi elektron mengikut saranan *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV). EV telah diasingkan daripada 20 sampel serum pesakit kanser usus yang menjalani rawatan kemoterapi berasaskan *oxaliplatin* juga daripada 22 sampel serum pesakit kanser usus yang tidak menjalani sebarang terapi (EV pra-kemoterapi). Kesan fungsian EV diasas secara *in vitro* menggunakan asai ko-kultur antara EV dan sel T CD8⁺ serta sel Jurkat. Selain itu, kami juga telah memprofilkan sitokin yang dirembeskan serta menentukan pengekspresan gen – gen berkaitan tindak balas imun. Kajian ini mendedahkan bahawa ukuran dan kadar limpahan EV adalah sedikit berbeza pasca-kemoterapi berbanding pra-kemoterapi tetapi mempunyai morfologi yang sama. Tambahan pula, sel T CD8⁺ dan sel Jurkat yang dikultur bersama EV pasca-kemoterapi tergencat dalam fasa S langsung mengakibatkan penurunan peratusan sel yang memasuki fasa G2/M. Kadar apoptosis sel T CD8⁺ dan sel Jurkat juga meningkat disebabkan oleh EV pasca-kemoterapi berbanding dikultur bersama EV yang tidak diaruh kemoterapi. Selain itu, gen – gen utama berkaitan dengan sitokin dan kematian sel imun seperti IL-2, sFasL dan Granzyme B diekspresikan lebih tinggi dalam sel T yang telah dikultur bersama EV diaruh kemoterapi. Profil sitokin yang dilepaskan oleh sel – sel imun setelah rangsangan oleh EV pra- dan pasca-kemoterapi juga diekspresikan berbeza – beza seperti IFN- γ dan IL-17. Secara keseluruhannya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa EV yang telah diaruh kemoterapi mampu memberi kesan terhadap fungsi sel limfosit berbanding EV yang tidak diaruh kemoterapi.

UNDERSTANDING THE EFFECT OF CHEMOTHERAPY-INDUCED EXTRACELLULAR VESICLES (CHEMO-EVS) ON HUMAN IMMUNE CELLS

Colorectal cancer (CRC) is a type of cancer that occurs in the human intestine and rectum and it is one of the most common cancers in the world population including among Malaysians. Along with surgery, chemotherapy is the choice of doctors in treating CRC patients. Platinum-based drugs such as oxaliplatin are among chemotherapy drugs which are certified as standard treatments worldwide including Malaysia. These genotoxic agents have a direct cytotoxic effect on cancer cells such as altering the DNA, inhibiting cell division and growth and being able to induce immunogenic cell death (ICD). In addition, this chemotherapy drug is also able to change the homeostasis in the human body and affects the immune system. However, we still do not fully understand the relationship between chemotherapy drugs and the tumor microenvironment, especially in relation to immune cells. It is well-known that human cells can secrete nano-sized extracellular vesicles (EVs) as a medium of communication between cells. This entity is also able to change and respond to cells in the tumor microenvironment. Therefore, in this study, we attempted to understand the effects of EVs that have been induced by chemotherapy including its role on human immune cells, especially CD8⁺ T lymphocyte cells. The morphology, measurement and abundance of EVs were detailed using several approaches such as western blotting, ELISA and electron microscopy as recommended by the International Society of Extracellular Vesicles (ISEV). EVs were isolated from 20 serum samples of CRC patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy as well as from 22 samples serum of CRC patients who did not undergo any therapy (pre-chemotherapy EVs). The functional effects of EVs were investigated *in vitro* using co-culture assays between EVs and CD8⁺ T cells as well as Jurkat cells. Moreover, we have also profiled cytokines secreted by immune cells as well as determined the expression of genes related to the immune response. This study revealed that the size and the abundance of EVs was slightly different post-chemotherapy than pre-chemotherapy but the morphologies are identical. Furthermore, CD8⁺ T cells and Jurkat cells cultured with EVs post-chemotherapy were arrested in S phase resulting in a decrease in the percentage of cells entering the G2/M phase. The apoptosis rate of CD8⁺ T cells and Jurkat cells also increased due to EVs post-chemotherapy compared to those co-cultured with non-induced chemotherapy EVs. Moreover, key-immune related genes to cytokines and immune cell death such as IL-2, sFasL and Granzyme B are expressed higher in T cells that have been cultured with chemotherapy-induced EVs. The profile of cytokines released by immune cells after stimulation by EVs pre- and post- chemotherapy is also expressed differently such as IFN- γ and IL-17. Overall, the results of this study suggest that the EVs that have been induced by chemotherapy are able to affect the function of lymphocytes as compared to EVs that were not induced by chemotherapy.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI ILUSTRASI	xi
SENARAI SINGKATAN	xiv

BAB I	Pengenalan	
1.1	Pendahuluan	1
1.2	Permasalahan Kajian	4
1.3	Objektif Kajian	5
1.4	Hipotesis	5
BAB II	KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1	KANSER USUS	6
	2.1.1 Pengenalan kepada Kanser Usus	6
	2.1.2 Tahap Kanser Usus	7
	2.1.3 Statistik Global dan Tempatan	9
	2.1.4 Pengurusan dan Rawatan Semasa	13
2.2	KEMOTERAPI DAN KANSER USUS	14
	2.2.1 Latar Belakang dan Sejarah Ringkas Kemoterapi	14
	2.2.2 Mekanisme Kemoterapi Sebagai Penghapus Sel Kanser	15
	2.2.3 Kemoterapi Gabungan untuk Kanser Usus	16
2.3	SISTEM IMUN DAN PERSEKITARAN MIKRO TUMOR (TME)	17
2.4	KESAN KEMOTERAPI TERHADAP TME DAN SISTEM IMUN	21
2.5	VESIKEL EKSTRASEL (EV)	24

2.5.1	Pengenalan kepada Vesikel ekstrasel	24
2.5.2	Vesikel Ekstrasel (EV) dan Kanser	26
2.5.3	Vesikel Ekstrasel (EV) dan Sistem Imun	27
BAB III	KAEDAH KAJIAN	
3.1	BAHAN DAN RADAS	30
3.1.1	Bahan	30
3.1.2	Radas	31
3.2	PENGUMPULAN SAMPEL KLINIKAL DAN KELULUSAN ETIKA	31
3.2.1	Kriteria Penolakan Pesakit	32
3.2.2	Kriteria Penerimaan Pesakit	32
3.3	PENGASINGAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)	33
3.4	PERINCIAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)	34
3.4.1	Mikroskopi Elektron Transmisi (TEM)	34
3.4.2	Pemblotan <i>western</i> (<i>Western Blot</i>)	34
3.4.3	Penyerakan Cahaya Dinamik (DLS) (<i>Dynamic Light Scattering</i>)	36
3.4.4	Pengkuantitian Vesikel Ekstrasel (EV)	36
3.5	PENGASINGAN SEL MONONUKLEAR (PBMCs)	37
3.6	PENGISIHAN SEL T SITOTOKSIK MANUSIA (CD8 ⁺)	38
3.7	PENGKULTURAN SEL IMUN DAN JURKAT	39
3.7.1	Keadaan Pengkulturan Sel	39
3.7.2	Pengiraan Sel	39
3.7.3	Pengaktifan Sel Limfosit T	40
3.8	KO-KULTUR SEL IMUN DAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)	40
3.9	PENGAMBILAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)	40
3.10	ASAI KITAR SEL	41
3.11	ASAI APOPTOSIS ANNEXIN V-FITC	42
3.12	PEMPROFILAN SITOKIN	42
3.13	PENGEKSTRAKAN RNA	43

3.13.1	Pengekstrakan RNA	43
3.13.2	Penilaian Kuantiti dan Kualiti RNA	44
3.14	TINDAK BALAS BERANTAI POLIMERASE MASA NYATA (qRT-PCR)	44
3.14.1	Sintesis cDNA	44
3.14.2	Ujian Saringan Gen Anerg Sel T dan Tolerans Imun Manusia melalui qRT-PCR	46
3.15	ANALISIS STATISTIK	47
BAB IV	HASIL KAJIAN	
4.1	DATA KLINIKOPATOLOGI PESAKIT	48
4.2	PENGASINGAN DAN PENGESANAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)	52
4.2.1	Mikroskopi Elektron Transmisi (TEM)	52
4.2.2	Pemblotan <i>Western</i> (<i>Western Blot</i>)	53
4.2.3	Penyerakan Cahaya Dinamik (DLS)	54
4.2.4	Pengkuantitian Vesikel Ekstrasel (EV)	56
4.3	KO-KULTUR SEL LIMFOSIT T BERSAMA VESIKEL EKSTRASEL (EV)	58
4.3.1	Penyisihan Sel T Sitotoksik Manusia CD8 ⁺	58
4.3.2	Pengaktifan Sel T	59
4.3.3	Pengambilan Vesikel Ekstrasel (EV)	60
4.4	ANALISIS ASAI FUNGSIAN SEL IMUN BERSAMA VESIKEL EKSTRASEL	61
4.4.1	Asai Kitar Sel	61
4.4.2	Asai Apoptosis Annexin V-FITC	71
4.5	ANALISIS QRT-PCR DAN SITOKIN	77
4.5.1	Analisis qRT-PCR	77
4.5.2	Pemprofilan Sitokin	81

BAB V	PERBINCANGAN	87
--------------	---------------------	----

BAB VI	KESIMPULAN
---------------	-------------------

6.1	RUMUSAN KAJIAN	102
6.2	LIMITASI KAJIAN	104
6.3	CADANGAN KAJIAN LANJUTAN	106

RUJUKAN	107
----------------	-----

LAMPIRAN

Lampiran A	SURAT KELULUSAN ETIKA	121
Lampiran B	PEMBLOTAN WESTERN (WESTERN BLOT)	124
Lampiran C	PENYEDIAAN MEDIA UNTUK SEL KULTUR	125
Lampiran D	UJIAN SARINGAN GEN ANERGI SEL T DAN TOLERANS IMUN MANUSIA	126
Lampiran E	ANALISA QRT-PCR	127
Lampiran F	PENERBITAN	129

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Senarai klasifikasi sistem – sistem tahap kanser usus (TNM)	8
Jadual 2.2	Perbandingan perubahan yang ketara pada perincian antara AJCC edisi ketujuh dan edisi kelapan yang tertumpu pada Tahap IV kanser usus	8
Jadual 2.3	Senarai kajian – kajian berkaitan kemoterapi dan sistem imun yang menggunakan beberapa jenis kanser sebagai model kajian	22
Jadual 2.4	Senarai kajian – kajian berkaitan EV dan sistem imun yang menggunakan beberapa jenis kanser sebagai model kajian	28
Jadual 3.1	Komponen – komponen untuk sintesis cDNA	46
Jadual 3.2	Tetapan tindak balas berantai polymerase (PCR) untuk sintesis cDNA	46
Jadual 3.3	Komponen – komponen tindak balas qRT-PCR	48
Jadual 3.4	Tetapan qRT-PCR menggunakan pewarna SensiFAST™ SYBR No-ROX	48
Jadual 3.5	Tetapan qRT-PCR menggunakan pewarna Luna® Universal	48
Jadual 4.1	Data klinikopatologi pesakit kanser usus pra dan pasca menjalani kemoterapi adjuvan berasaskan <i>oxaliplatin</i> di Wad Onkologi Jagaan Harian di PPUKM	51
Jadual 4.2	Taburan ukuran partikel (d n.m) dan PDI vesikel ekstrasel	55

SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Carta bar berkembar kadar kematian dan kes baharu 10 jenis kanser termasuk kanser usus di dunia dan Malaysia pada tahun 2018	11
Rajah 2.2	Carta bar taburan tahap kanser usus mengikut sistem TNM dan SEER di negara – negara maju hasil kajian <i>The Cancer Survival in High-Income Countries</i> (SURVMARK-2) insentif kepada fasa kedua the <i>International Cancer Benchmarking Partnership</i> (ICBP)	11
Rajah 2.3	Gambar rajah skema komponen – komponen persekitaraan mikro tumor (TME)	19
Rajah 2.4	Gambar rajah biogenesis pelbagai jenis vesikel ekstrasel	24
Rajah 3.1	Gambaran pengumpulan sampel klinikal pesakit kanser usus	32
Rajah 4.1	Pembahagian sampel pesakit kanser usus	52
Rajah 4.2	Gambar TEM yang dicerap pada magnifikasi 87000x	53
Rajah 4.3	Profil protein molekul daripada EV serum pesakit CRC (1 – 5)	54
Rajah 4.4	Histogram saiz zarah (d.nm) lawan bilangan (%)	56
Rajah 4.5	Asai pengkuantitian EV terhadap 2 kumpulan sampel dan sampel EV yang sepadan (n = 8), (A) Jumlah penuh sampel EV bagi 2 kumpulan sampel (n=42). (B) Purata kepekatan sampel EV yang sepadan sahaja (n=8). (C) Sampel pesakit kanser usus yang sepadan (individu).	58
Rajah 4.6	Gambar rajah kontur sitometri aliran yang menunjukkan peratusan ketulenan subset sel T sebelum (Pre-All) dan selepas (Post-All) disisih setelah diwarna dengan antibodi CD8, CD3 dan CD4. Kuadran kanan atas (UR) pada paksi CD8-APC-A lawan CD3-FITC-A adalah kuadran yang difokuskan. (A) sebelum sisihan (B) selepas sisihan	59

Rajah 4.7	Histogram sitometri aliran pengaktifan Sel T. Hari 0 (atas) adalah populasi sel yang tidak aktif (kawalan) manakala histogram bawah adalah populasi sel T yang telah diaktifkan dan sel T dituai pada hari asai imun dijalankan	60
Rajah 4.8	Histogram sitometri aliran pengambilan EV. (A) Histogram populasi sel T bersama EV yang tidak diwarnakan dengan PKH26 (kawalan). (B) Histogram populasi sel T bersama EV yang telah diwarnakan dengan PKH26	61
Rajah 4.9	Purata peratusan sel (%) untuk Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan ($n = 9$) yang dikultur bersama sel limfosit T CD8 ⁺	64
Rajah 4.10	Graf bar Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan ($n = 9$) mengikut individu setelah dieram bersama sel limfosit T CD8 ⁺	65
Rajah 4.11	Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 1 – 4) setelah dikultur bersama sel limfosit T CD8 ⁺	66
Rajah 4.12	Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 5 – 8) setelah dikultur bersama sel limfosit T CD8 ⁺	67
Rajah 4.13	Asai Kitar Sel terhadap 2 kumpulan sampel EV yang dikultur bersama sel Jurkat selama 24 jam	68
Rajah 4.14	Graf bar Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan ($n = 9$) mengikut individu setelah dieram bersama sel Jurkat	69
Rajah 4.15	Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 1 – 4) setelah dikultur bersama sel Jurkat	70
Rajah 4.16	Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 5 – 8) setelah dikultur bersama sel Jurkat	71
Rajah 4.17	Graf bar (A) kadar pengikatan Annexin V juga peratusan kadar apoptosis sel limfosit T CD8 ⁺ yang telah diaktifkan dan dieram bersama 2 kumpulan EV.(B) Purata peratusan kadar apoptosis (%) bagi 6 pasang sampel EV yang sepadan. (C) Peratusan kadar apoptosis (%) bagi setiap pasang EV yang sepadan (individu)	74

Rajah 4.18	Histogram sitometri aliran asai apoptosis Annexin V terhadap 3 pasang EV sepadan yang telah dikultur bersama sel limfosit T CD8+	75
Rajah 4.19	Histogram kadar pengikatan Annexin V pada sel Jurkat yang telah diaktifkan dan dieram bersama 2 kumpulan EV pesakit – pesakit barah usus. (B) Purata peratusan kadar apoptosis (%) bagi 4 pasang sampel EV yang sepadan. (C) Peratusan kadar apoptosis (%) bagi setiap pasang EV yang sepadan (individu)	76
Rajah 4.20	Histogram sitometri aliran Asai Apoptosis Annexin V terhadap 4 pasang EV sepadan yang telah dikultur bersama sel Jurkat selama 24 jam.	77
Rajah 4.21	Klustergram bagi 3 kumpulan sampel hasil Ujian Saringan Gen Anergik Sel T dan Toleransi Imun Manusia melalui qRT-PCR. Indikator merah menunjukkan ekspresi tinggi manakala indikator hijau menunjukkan ekspresi rendah.	80
Rajah 4.22	Graf bar mengenai lipat ganda perubahan bagi 16 gen terpilih yang berkaitan dengan sitokin dan kematian sel	81
Rajah 4.23	Ekspresi sitokin (IL-2, IL-10, IL-17a dan sFas) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel limfosit T CD8+ setelah dieram bersama EV daripada dua jenis kumpulan.	84
Rajah 4.24	Ekspresi sitokin (IFN- γ , sFasL, Granzyme A dan Granzyme B) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel limfosit T CD8+ setelah dieram bersama EV yang berbeza.	85
Rajah 4.25	Ekspresi sitokin (IL-2, IL-10, IL-17a dan sFas) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel Jurkat setelah dieram bersama kumpulan EV yang berbeza.	86
Rajah 4.26	Ekspresi sitokin (sFasL, IFN- γ , Granzyme A dan Granzyme B) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel Jurkat setelah dieram bersama kumpulan EV yang berbeza.	87

SENARAI SINGKATAN

UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
PPUKM	Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
WHO	Pertubuhan Kesihatan Sedunia
IACR	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
EV	<i>Extracellular vesicles</i> atau vesikel ekstrasel
™	Simbol tanda dagangan
®	Simbol tanda dagangan berdaftar
RNA	Asid Ribonukleik
DNA	Asid Deoksiribonukleik
dNTP	Trifosfat Deoxynucleoside
1x	Pencairan sekali
kDa	Unit kilodalton
IU	Unit antarabangsa
DEPC	Diethylpyrocarbonate
FITC	Fluorescein isothiocyanate
APC	Allophycocyanin
PE	Phycoerythrin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
OD260	Ketumpatan optik pada panjang gelombang 260nm

BAB I

PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Kanser didefinisikan sebagai sesuatu penyakit yang boleh mengakibatkan kematian disebabkan oleh pertumbuhan sel dengan cepat dan penyebaran sel yang tidak terkawal. Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) dengan agensi penyelidikan kanser mereka, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) telah menjalankan projek GLOBOCAN pada setiap tahun untuk mengawasi perkembangan penyakit ini melalui kajian kanser dengan membuat anggaran kes – kes kanser di seluruh dunia. Menurut laporan terkini oleh IARC, terdapat sekitar 10 peratus (1.9 juta) daripada 19.3 juta kes kanser berlaku di seluruh dunia pada tahun 2020 adalah kes kejadian kanser usus. Sebanyak 0.8 juta kes kematian akibat kanser usus turut dilaporkan pada tahun lalu.

Manakala, sebanyak hampir 6.1 ribu jumlah kes kejadian kanser usus dianggarkan berlaku di Malaysia adalah sebahagian daripada 95.2 ribu kes kejadian kanser usus di negara – negara Asia Tenggara yang sedang membangun telah dikumpul dan dilaporkan oleh pangkalan data GLOBOCAN pada tahun 2018. Kes – kes kejadian untuk semua jenis kanser juga diramalkan akan meningkat kepada 29.5 juta kes selari dengan peningkatan dan perubahan populasi demografik masyarakat dunia pada masa hadapan. Trend statistik ini menunjukkan bahawa kanser merupakan satu bebanan kepada sekumpulan besar populasi dunia dan amat penting untuk para penyelidik, khususnya penyelidik bidang kanser untuk menyusun strategi mengatasi masalah kesihatan global ini dengan meningkatkan kesedaran terhadap penyakit ini dalam kalangan masyarakat dunia mahupun tempatan (Bray et al., 2018)

Antara rawatan yang paling lazim diterima oleh pesakit kanser adalah rawatan kemoterapi. Rawatan ini biasanya menggunakan agen genotoksik (agen perosak DNA) untuk menghapuskan kanser. Rawatan berasaskan *oxaliplatin* adalah antara rawatan umum diberikan kepada pesakit yang menderita kanser usus. *Oxaliplatin* merupakan ubat kemoterapi generasi ketiga yang berasaskan platinum. Ubat kemoterapi ini mampu menjadi perosak DNA setelah digabungkan dengan ubat kemoterapi yang lain mahupun diberikan kepada pesakit secara individu (Bakkenist et al., 2018). Terdapat kajian yang telah mengenalpasti bahawa interaksi antara kerosakan DNA pada tumor dengan sistem imun tubuh manusia amat penting dalam memelihara kerentanan tumor serta kemampuannya mempengaruhi keberkesanan terapi (Vulpis et al., 2017). Hampir dua dekad yang lalu, sekumpulan saintis telah berpendapat bahawa kecacatan pada struktur DNA boleh mencetuskan apoptosis pada sel lalu menyumbang kepada ketidaknormalan pada pembahagian sel dan kerintangan sel kanser terhadap pelbagai agen terapi (Norbury & Zhivotovsky, 2004). Tambahan pula, banyak kajian praklinikal menunjukkan bahawa disamping kesan sitotoksik pada sel kanser, sebilangan kecil agen yang merosakkan DNA dapat meningkatkan kematian sel secara imunogenik, mengubah keadaan keradangan persekitaran mikro tumor dan dengan demikian mengaktifkan tindak balas imun antitumor (Opzoomer et al., 2019).

Vesikel ekstrasel (*extracellular vesicles* atau EV) adalah entiti bersaiz nano yang dirembeskan keluar oleh sel dan berperanan besar terutamanya sebagai entiti perantara sel untuk berkomunikasi. EV telah terbukti dapat berinteraksi dengan sel-sel efektor imun di persekitaran mikro tumor juga dalam peredaran darah, memberi isyarat negatif ke sel-sel dan mengganggu fungsi antitumor (Whiteside, 2016, 2017). Terdapat beberapa kajian yang telah menunjukkan bahawa kemoterapi mempunyai kesan terhadap EV, seperti perubahan kargo, perubahan saiz dan limpahannya (Bosch & Rosich, 2008; Keklikoglou et al., 2019; LeBleu & Kalluri, 2019; Lian et al., 2017; Magdalena Derbis, 2015; Yang et al., 2015). Selain itu, terdapat juga kajian berkaitan EV yang mampu memainkan peranan sebagai pengantara dalam persekitaraan sel kanser terutama dari aspek evolusi dan perkembangan tumor melalui rebakan sifat sel kanser ke sel berjiran yang dibawa oleh EV (Wang, 2020).

Walau bagaimanapun, bukti kesan langsung EV terhadap sel-sel imun adalah kurang terutamanya selepas tindakbalas kemoterapi (Ab Razak et al., 2019; Z. Zhang et al., 2019). Oleh itu, kami menjangkakan bahawa EV yang telah diaruh kemoterapi (pasca-kemoterapi) dapat berperanan dalam memodulasi sistem imun tubuh, terutama pada sel limfosit, sel T CD8⁺. Untuk kajian ini EV telah diasingkan dari serum pesakit CRC yang menjalani terapi berasaskan *oxaliplatin* dan pesakit kanser usus tanpa sebarang terapi (pra-kemoterapi). EV telah dicirikan dan dianalisa lebih lanjut mengenai kesannya terhadap sel T CD8⁺ dan sel Jurkat. Profil sitokin yang dilepaskan dari sel dan pengekspresan gen-gen yang berkaitan dengan imun dianalisa. Penyelidikan ini akan membolehkan kita memahami mekanisme molekul EV terutama berkaitan dengan pengimunomodulatan di dalam kanser usus pasca-kemoterapi.



1.2 PERMASALAHAN KAJIAN

Antara terapi yang paling lazim ditawarkan kepada pesakit kanser usus adalah terapi berasaskan *oxaliplatin* seperti FOLFOX dan XELOX. Namun, hanya 40 - 50 peratus pesakit sahaja yang bertindak balas positif terhadap terapi ini. Terdapat kajian yang menunjukkan bahawa rawatan gabungan kemoterapi dengan titik semak imun (*immune checkpoint*) (*immunotherapy*) boleh dijadikan salah satu pendekatan yang lebih efektif untuk rawatan kanser. Namun begitu, hubungan antara kerosakan DNA dan sistem imun masih tidak diketahui secara keseluruhannya (Conway et al., 2018; G. Zhang et al., 2019; J. Zhang et al., 2020). Tindak balas imun khususnya terhadap kanser juga berubah kerana kebanyakan agen yang merosakkan DNA adalah imunogenik. Menurut Rivera Vargas & Apetoh, sifat imunogenik agen perosak DNA seperti kemoterapi merujuk kepada keupayaan agen tersebut untuk mendorong tindak balas imun. Tambahan pula, terapi gabungan turut mempergiat tindakbalas imunogenik kanser. EV telah terbukti menjadi perantara penting dalam pemberian isyarat sel, terutama dalam menjaga homeostasis imun. Setelah diaruh oleh kemoterapi yang merosakkan DNA, EV yang dilepaskan juga terjejas, sehingga mempengaruhi peraturan aliran sel serta persekitaran mikro tumor (TME). Walau bagaimanapun, mekanisme yang tepat mengenai bagaimana EV ini mempengaruhi persekitaran mikro tumor, terutama sel-sel imun masih kurang dikaji (Ab Razak et al., 2019). EV juga dilaporkan memainkan peranan penting dalam rintangan sel kanser terhadap ubat kemoterapi (*oxaliplatin*) yang diberikan kepada pesakit. Lebih penting lagi terdapat banyak laporan mengenai peranan EV yang diperoleh dari tumor (TEX) (Guo et al., 2018; Qiu et al., 2018; Tai et al., 2019; Whiteside, 2016, 2017) terhadap proses kanser seperti metastasis dan rintangan terhadap kemoterapi. Sehingga hari ini, masih tidak banyak kajian yang mengkaji hubungkait diantara EV dan *oxaliplatin* dengan lebih menyeluruh. Jurang ilmu tentang hubungan antara ubat kemoterapi, sistem imun dan kanser juga masih tidak diketahui secara keseluruhannya. Menariknya, penyelidikan lebih lanjut harus lebih baik untuk memahami peranan EV yang diperoleh dari tumor, terutama dari segi aktiviti pemodulan imun sebelum mempertimbangkan peningkatan rawatan untuk pesakit kanser usus. Selanjutnya, kajian ini bertujuan untuk memahami peranan EV dalam mempengaruhi limfosit penting, seperti sel T CD8⁺ setelah diaruh oleh kemoterapi. Kami juga berminat untuk melihat kesan kedua – dua , pra- dan pasca- kemoterapi terhadap sel imun dan fokus kepada kesan EV yang telah diaruh kemoterapi.

1.3 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif utama kajian ini adalah untuk menentukan kesan EV dari pesakit kanser usus pra- dan pasca-kemoterapi (*pre and post chemotherapy*) terhadap sel imun.

Secara khusus, kami menyasarkan untuk:

1. Mencirikan EV berdasarkan penanda permukaan, saiz dan kadar kelimpahan.
2. Mengetahui perbezaan kesan fungsi EV pra- dan pasca-kemoterapi terhadap sel limfosit T.
3. Mengenal pasti profil sitokin dalam sel limfosit T semasa rangsangan oleh EV pra- dan pasca-kemoterapi.
4. Menentukan ekspresi gen utama berkaitan imun dalam subset sel limfosit T setelah rangsangan oleh EV pra- dan pasca-kemoterapi.

1.4 HIPOTESIS

1. EV pasca-kemoterapi mempunyai bentuk yang berbeza dan saiz yang lebih besar daripada EV pra-kemoterapi.
2. EV pasca-kemoterapi menyebabkan peningkatan kadar kematian sel T CD8⁺ dan sel Jurkat berbanding EV sebelum kemoterapi.
3. Sel - sel imun yang dirangsang dengan EV pasca- kemoterapi akan mempunyai profil sitokin yang berbeza dan sitokin dirembes keluar dengan kadar yang lebih banyak berbanding sitokin yang dirembes oleh sel-sel yang dirangsang EV pra-kemoterapi.
4. Tahap ekspresi gen – gen utama yang berkaitan dengan sitokin dan kematian sel imun seperti IL-2, FasL dan Granzyme B adalah lebih tinggi hasil rangsangan oleh EV pasca-kemoterapi.

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 KANSER USUS

2.1.1 Pengenalan kepada Kanser Usus

Usus besar adalah organ yang panjang, bergelung, dan berciri tiub. Ia terletak pada bahagian hujung bahagian usus kecil sehingga rektum. Usus menyerap air dari makanan yang dicerna. Tinja atau najis adalah sisa kumbahan manusia yang bergerak ke rektum melalui usus besar dan meninggalkan tubuh melalui dubur (Hadley, 2012).

Kanser disifatkan sebagai kumpulan penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan dan penyebaran sel yang tidak normal dengan cepat. Kanser juga boleh mengakibatkan kematian jika penyebaran yang tidak terkawal. Kanser usus bermula apabila pengembangan pada lapisan usus besar atau rektum berlaku. Fenomena ini dikenali sebagai polip adenomatous displastik dan boleh merebak ke organ serta nodus limfa (American Cancer Society, 2018). Gejala utama yang biasanya dikesan pada pesakit dengan adenokarsinoma usus adalah kehadiran darah di dalam najis, atau perubahan drastik dalam tabiat proses perkumuhan tinja. Terdapat beberapa ujian pengesanan kanser usus besar yang popular, seperti pemeriksaan rektum, ujian darah okult tinja (iFOBT), kolonoskopi, dan biopsi (American Cancer Society, 2018).

Terdapat banyak faktor yang boleh menyebabkan pembentukan kanser secara langsung atau tidak langsung, seperti faktor genetik dan faktor luaran seperti faktor fizikal, kimia, dan biologi. Pemboleh ubah sedemikian dibahagikan kepada dua kumpulan oleh *American Cancer Society* (ACS) yang fleksibel dan tidak fleksibel. Pemboleh ubah yang menyumbang kepada gaya hidup yang tidak baik boleh diubah

dan dicegah. Selain itu, faktor yang disenaraikan di bawah faktor yang tidak dapat diubah adalah faktor usia, latar belakang peribadi atau keluarga pernah mengidap polip usus, pewarisan genetik, dan Diabetes Jenis 2 (American Cancer Society, 2018).

2.1.2 Tahap Kanser Usus

Dukes pertama kali mencadangkan skema tahap kanser usus pada tahun 1932. Beliau menjalankan banyak kajian lanjut sehingga Jeremy Jess menangani beberapa masalah sistem pada tahun 1987. Klasifikasi klasik Dukes dapat dibahagikan kepada empat (4) tahap utama (tahap A, B, C dan D) berdasarkan perkembangan kanser yang berlaku. Ia melibatkan pemerhatian terhadap penembusan tumor melalui dinding usus dan kehadiran atau ketiadaan keterlibatan nodus limfa berhampiran (Lihat Jadual 2.1) (Akkoca et al. 2014a). Pada tempoh yang lama, para saintis telah menerima, bahawa tahap tumor adalah faktor prognosis yang paling ketara. Jess et al. mengkritik klasifikasi Dukes yang kurang mempertimbangkan tahap penglibatan nodus limfa, tahap tumor dan ciri patologi tumor lain sebelum pengubahsuaian dilakukan (Akkoca et al. 2014b; Fleming et al. 2012). Hal yang demikian kerana para saintis telah menemui hubungkait antara pemeriksaan histopatologi dan ciri-ciri demografi pesakit yang amat penting untuk diambil kira dalam proses diagnosis kanser usus.

Selepas banyak kajian yang dilakukan pada bertahun-tahun semasa, sistem klasifikasi tahap kanser usus telah ditambah baik. Keputusan jenis rawatan sekarang mengkhususkan kepada klasifikasi TNM yang kompleks, kuantitatif dan lebih terperinci, seperti yang dilaporkan oleh *American Joint Cancer Committee* (AJCC) dan *International Association of Cancer* (UICC). Klasifikasi TNM berdasarkan pengagregatan tumor, dengan mengambil kira metastasis dan komponen metastasis sebahagian nodus limfa. Sekiranya tumor telah mempengaruhi sebahagian nodus limfa, atau terdapat faktor prognostik yang memudaratkan, kemoterapi akan diberikan. (American Cancer Society, 2018). Terbaharu, edisi kelapan (8th edition) sistem tahap kanser AJCC (AJCC-8) yang telah dirangka dan dilaksanakan pada 1 Januari 2018 pada peringkat global. AJCC-8 merangkumi perubahan ketara bagi pesakit kanser usus pada tahap IV seperti dalam Jadual 2.2 (Tong et al. 2018)

Di Malaysia, piawai proforma pelaporan histopatologi di hospital menggunakan sistem TNM seperti disarankan oleh Garis Panduan CPG Malaysia (MOH, 2016).

Jadual 2.1 Senarai klasifikasi sistem – sistem tahap kanser usus (TNM) (Akkoca et al. 2014b, 2014a).

Perincian	Dukes	Astler-Coller	TNM
Penembusan tumor terkekang kepada mukosa	A	A	Tis, N0
Penembusan tumor terhad kepada submukosa, tiada penglibatan nodus limfa	A	B1	T1, N0
Penembusan tumor terhad kepada submukosa dengan penglibatan nodus limfa	C	C1	T1, N1-2
Penembusan tumor terhad ke dalam lapisan otot, tiada penglibatan nodus limfa	A	B2	T2, N0
Penembusan tumor terhad ke lapisan otot dengan penglibatan nodus limfa	C	C1	T2, N1-2
Semasa penglibatan tumor pada keseluruhan lapisan otot, tiada penglibatan nodus limfa	B	B2	T3, N0
Semasa penglibatan tumor pada keseluruhan otot tumor dengan penglibatan nodus limfa	C	C2	T3, N1-2
Tumor telah menjaga organ – organ yang berjiran, tiada penglibatan nodus limfa	B	B2	T4, N0
Tumor telah menjaga organ – organ yang berjiran dengan penglibatan nodus limfa	C	C2	T4, N1-2
Faktor - faktor lain walaupun metastasis jarak jauh	D	D	T1-4, N0-2, M1

Jadual 2.2 Perbandingan perubahan yang ketara pada perincian antara AJCC edisi ketujuh dan edisi kelapan yang tertumpu pada Tahap IV kanser usus (Tong et al. 2018).

AJCC – 7 (7 th edition)	AJCC – 8 (8 th edition)
M1b : Perpindahan satu atau lebih organ atau tapak, atau ke peritoneum	M1b : Perpindahan lebih daripada satu organ atau tapak
	M1c : Metastasis peritoneal dengan atau tanpa metastasis organ lain

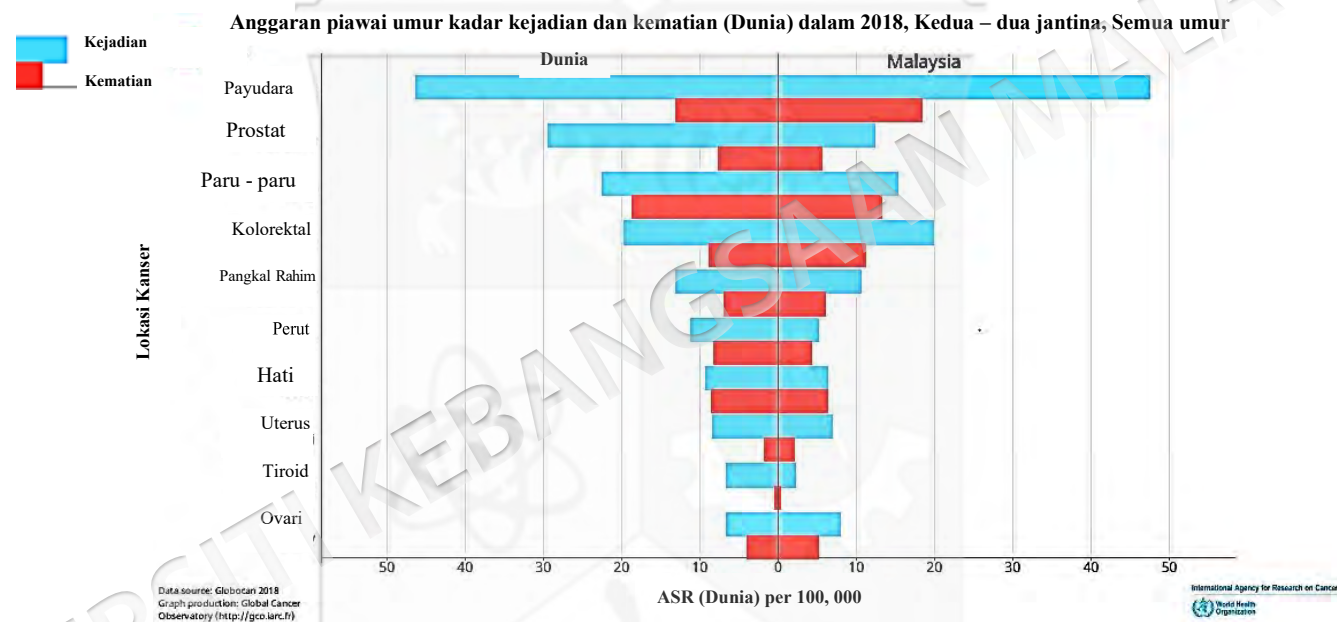
2.1.3 Statistik Global dan Tempatan

Jangka hayat pesakit kanser usus bergantung pada tahap pembentukan kanser sewaktu diagnosis dilakukan. Diagnosis pada peringkat yang lebih lewat mempengaruhi jangka hayat pesakit menjadi singkat sepertimana yang dilaporkan *Canadian Cancer Society*. Kanser usus telah menjadi cabaran global, kerana kadar kelaziman kes (*prevalence*) dan kadar kematian kanser meningkat dengan pantas (Arnold et al. 2017). Status gaya hidup sosioekonomi juga merupakan salah satu faktor risiko utama kanser di negara – negara berpendapatan rendah dan sederhana (Akinyemiju et al. 2017). Carta bar dalam Rajah 2.2 pula menunjukkan taburan tahap kanser usus mengikut sistem TNM dan SEER di negara – negara maju melalui hasil kajian fasa kedua oleh ICBP (GLOBOCAN, 2018). Faktor ini paling sering dilihat di kawasan geografi yang lebih maju dan di negara- negara yang sedang membangun seperti Malaysia. Penyebabnya adalah kompleks, tetapi dipengaruhi faktor penuaan dan perkembangan penduduk (Bray et al. 2018). Kanser usus adalah antara penyebab utama kematian dan merupakan kanser ketiga yang paling biasa dalam kategori kanser gastrousus. Kanser usus adalah penyebab kematian keempat yang paling biasa disebabkan oleh kanser, juga dianggarkan bertanggungjawab untuk hampir 900.000 kematian akibat kanser setiap tahun (Lihat Rajah 2.1). Carta bar berkembar dalam Rajah 2.1 menunjukkan kadar kematian dan kes baharu 10 jenis kanser termasuk kanser usus di dunia dan Malaysia pada tahun 2018. Kira-kira 1.8 juta kes kanser usus baharu dicatatkan dalam pangkalan data GLOBOCAN pada tahun 2018 (Bray et al. 2018).

Kanser usus adalah salah satu kanser yang paling kerap didiagnosis di kalangan rakyat Malaysia. Malaysia adalah negara yang mempunyai pelbagai kumpulan etnik serta sistem budaya dengan jumlah penduduk lebih daripada 28 juta, termasuk tiga kumpulan utama. Oleh kerana Malaysia adalah negara berbilang kaum, sekumpulan penyelidik tempatan telah mengkaji kadar kejadian dan kematian kanser usus di antara tiga kaum utama, Melayu, Cina dan India. Kadar kejadian diukur menggunakan kaedah *overall age-standardised* (ASR). Kadar piawai umur (ASR) ini dihitung dari hasil pengiraan silang untuk membandingkan kejadian kanser dan kematian dengan kadar disesuaikan juga untuk perbandingan antarabangsa. ASR juga ditakrifkan sebagai kadar kes kejadian kanser dan kematian per 100,000 penduduk dengan struktur umur standard.

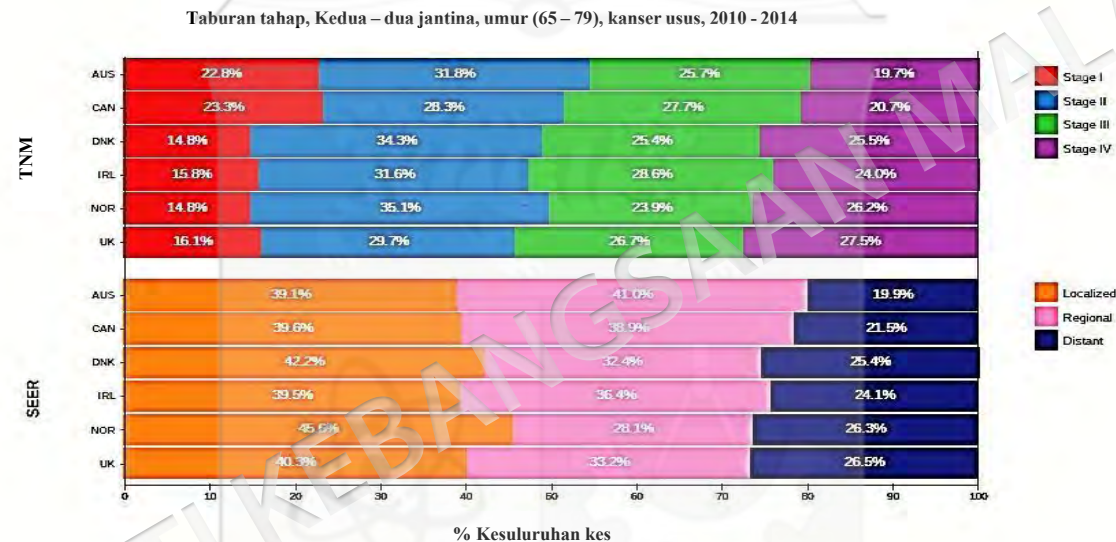
Menurut Abu Hassan et al. (2016), kadar kejadian keseluruhan untuk kanser usus adalah 21.32 kes setiap 100,000. Etnik Cina mempunyai kejadian kanser usus tertinggi (27.35), diikuti oleh etnik Melayu (18.95), dan India (17.55). Kadar kejadian ASR kanser usus adalah 1.33 kali lebih tinggi dalam kalangan jantina lelaki berbanding wanita (masing-masing 24.16 dan 18.14 setiap 100,000). Kematian kanser usus 2011 (44.7%) dicatatkan. ASR keseluruhan kematian adalah 9.79 kes, dengan 11.85 di kalangan orang Cina, diikuti oleh 9.56 di kalangan orang Melayu dan 7.08 dalam kalangan orang India. ASR kematian 1.42 kali lebih tinggi dalam kalangan lelaki (11.46) berbanding wanita (8.05) (Abu Hassan et al., 2016).

Aliran statistik ini menggambarkan beban kanser terhadap sekumpulan besar kumpulan penduduk bumi dan penting untuk meningkatkan kesedaran di kalangan masyarakat terutama para penyelidik untuk mengembangkan strategi mengatasi masalah tersebut.



Rajah 2.1 Carta bar berkembar kadar kematian dan kes baharu 10 jenis kanser termasuk kanser usus di dunia dan Malaysia pada tahun 2018 (GLOBOCAN, 2018). Kadar kejadian kanser usus adalah keempat yang paling biasa di dunia. Kanser usus dianggarkan bertanggungjawab untuk hampir 900.000 kematian.

Sumber : GLOBOCAN 2018



Data source: SURVMARK 2018
Graph production: Global Cancer Observatory
© International Agency for Research on Cancer 2020

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Rajah 2.2 Carta bar taburan tahap kanser usus mengikut sistem TNM dan SEER di negara – negara maju hasil kajian *The Cancer Survival in High-Income Countries* (SURVMARK-2) insentif kepada fasa kedua the *International Cancer Benchmarking Partnership* (ICBP) (GLOBOCAN, 2018). Status gaya hidup sosioekonomi juga merupakan salah satu faktor risiko utama kanser di negara – negara berpendapatan rendah dan sederhana (Akinyemiju et al. 2017)

Sumber : GLOBOCAN 2018

2.1.4 Pengurusan dan Rawatan Semasa

Kejayaan dalam pengesanan dan rawatan awal kanser usus telah menunjukkan masa depan yang menjanjikan dalam beberapa tahun terakhir bagi pesakit dan keluarga mereka (Lopes et al. 2019; Nikolouzakis et al. 2018). Rawatan yang diberikan berpotensi untuk menyembuhkan, memanjangkan jangka hayat dan memberikan kehidupan yang berkualiti kepada pesakit kanser semasa dan selepas rawatan (Rosen 2000). Bergantung kepada tahap kanser dan pemboleh ubah yang lain, kaedah rawatan yang berbeza dapat digabungkan atau digunakan secara serentak. Kanser usus juga dapat dirawat dengan ubat yang dapat diberikan melalui mulut atau disuntik secara langsung ke dalam sistem peredaran darah. Rawatan ini dipanggil rawatan sistemik kerana ia dapat menyerang sel kanser secara menyeluruh kerana ubat bergerak melalui saluran darah untuk mencari dan memusnahkan sel kanser di beberapa lokasi serentak. Terdapat juga pelbagai jenis usaha perubatan yang lain seperti kemoterapi, terapi sasaran (*targeted therapy*) dan imunoterapi untuk merawat kanser usus bergantung kepada jenisnya (Mármol et al. 2017).

Namun begitu, pakar rawatan kanser boleh memilih untuk melakukan terapi setempat (*local therapy*). Rawatan khusus ini memfokuskan pada kawasan yang terkesan tanpa menjejaskan seluruh badan. Di seluruh dunia, pembedahan atau *colectomy* adalah rawatan barisan pertama dalam pendekatan terapi kanser usus untuk menghilangkan tumor primer (*primary tumor*) sepenuhnya. Terapi seperti ini lebih cenderung dilakukan pada tahap kanser yang lebih awal (kanser yang lebih kecil) tetapi boleh juga digunakan dalam keadaan yang lain (Chiorean et al. 2020). Jenis terapi setempat yang digunakan untuk kanser usus merangkumi terapi pembedahan dan radiasi ultralembayung (UV). Semasa dan selepas diagnosis, adalah normal bagi pesakit kanser untuk mengalami beberapa kesan sampingan seperti cirit-birit kronik dan disfungsi usus. Pelaksanaan terapi gen untuk menyembuhkan kanser, seperti imunoterapi, telah menjadi salah satu alternatif yang lebih spesifik berbanding rawatan konvensional (Miller et al. 2019).

2.2 KEMOTERAPI DAN KANSER USUS

2.2.1 Latar Belakang dan Sejarah Ringkas Kemoterapi

Aktiviti genotoksik (*genotoxicity*) dalam genetik adalah potensi agen kimia atau sintetik yang merosakkan DNA dalam sel. Namun, tidak semua agen penyebab kanser bersifat genotoksik (Boyd et al. 2006). Mutagens pula adalah karsinogen genotoksik. Penjanaan kerosakan DNA oleh agen ini sangat penting dalam proses karsinogenesis. Kemoterapi genotoksik menggunakan satu atau lebih kemoterapi genotoksik dalam rawatan kanser. Kemoterapi ini bersifat merosakkan DNA pada sel dan menyebabkan kematian sel (Ren et al. 2017a). Apabila proliferasi sel terus berlanjutan, segala kerosakan DNA pada kanser diturunkan ke keturunan sel-sel kanser. Ubat kemoterapi genotoksik ini bagaimanapun, membahayakan sel kanser dan juga sel normal. Ubat kemoterapi tidak hanya sitotoksik tetapi juga mutagenik. Rawatan dengan ubat ini berpotensi untuk menyebabkan pembentukan kanser sekunder termasuk leukemia (Kartal-Yandim, Adan-Gokbulut & Baran 2016; Maeda & Khatami 2018).

Paul Ehrlich, seorang ahli kimia Jerman yang terkenal telah mencipta istilah kemoterapi pada awal tahun 1900-an untuk menggambarkan penggunaan bahan kimia untuk merawat sebarang penyakit (Bosch & Rosich 2008). Pembangunan ubat-ubatan kemoterapi untuk rawatan kanser bermula lebih dari 50 tahun yang lalu (DeVita & Chu 2008; Spiro & Silvestri 2005). Penemuan dan pembangunan ubat-ubatan kemoterapi lain melonjak menjadi industri bernilai jutaan dolar sejak itu. Ubat-ubatan yang digunakan dalam kemoterapi merupakan campuran beberapa ubat atau rawatan yang sering disebut sebagai *polychemotherapy*. Berdasarkan pemberian, rejimen kemoterapi boleh dibahagikan kepada beberapa kumpulan. Terapi neoadjuvan didefinisikan sebagai terapi yang disediakan sebelum pembedahan atau terapi tempatan termasuk kemoterapi, terapi radiasi, dan imunoterapi (Hayes & Schott 2015). Rawatan tambahan, terapi adjuvan adalah pilihan rawatan untuk membuang sel-sel kanser yang tersisa setelah rawatan primer. Rawatan ini diberikan kepada pesakit kanser usus tahap tiga (3), manakala pesakit kanser usus metastatik tahap empat (4) pula dirawat dengan kemoterapi paliatif (Van Cutsem et al. 2007; Hashiguchi et al. 2020). Modaliti merangkumi penggunaan atau kombinasi kemoterapi dan radioterapi atau imunoterapi. Walaupun begitu, masih ada hubungan yang tidak jelas antara ubat kemoterapi dan

persekitaran mikro tumor. Untuk memudahkan keberkesanan rawatan dan memahami biologi selepas kemoterapi, hubungan antara ubat-ubatan kemoterapi dan sekitarnya harus dikaji lebih lanjut.

2.2.2 Mekanisme Kemoterapi Sebagai Penghapus Sel Kanser

Agen genotoksik menyebabkan kerosakan pada kandungan genetik sel dengan mengganggu jujukan DNA pada lokasi dan struktur tertentu. Interaksi tersebut menyebabkan kerosakan seperti luka, gabungan, pemansuhan bes DNA (*DNA base deletion*), salah pemisahan atau bukan disjungsi (*non-disjunction*) yang menyebabkan kerosakan dan mutasi pada jujukan DNA (Hartwig et al. 2020; Ren et al. 2017b). Sebagai contoh, kromium yang merupakan sejenis logam peralihan berinteraksi dengan DNA dalam pengoksidaan valens yang tinggi, menghasilkan lesi DNA yang menjadi penyebab karsinogenesis. Para penyelidik mendapati bahawa mekanisma kerosakan dan produk pengoksidaan bes DNA adalah hasil interaksi antara DNA dan kromium berkadar tinggi adalah penting dalam formasi *in vivo* kerosakan DNA yang membawa kepada kanser pada populasi manusia yang terdedah kepada kromat (Suh et al. 2019).

Ubat berasaskan platinum, seperti *cisplatin* [*cis* Pt(II)(NH₃)₂Cl₂] dan *carboplatin* mempunyai fungsi yang sama. Ubat ini mempunyai kemampuan untuk membentuk aduk DNA (*DNA fraction*) dengan ikatan kovalen melalui atom platinum. Pengikatan kimia ini aktif sepanjang semua fasa kitaran sel (Abdullah et al. 2006; Chalovich & Eisenberg 2014; Zheng et al. 2014). *Cisplatin* adalah molekul larut air yang mengandungi atom Pt yang terikat kepada empat kumpulan berfungsi (*functional group*). Ikatan Pt - N mempunyai ciri kovalen dan kekal pada dasarnya. Manakala, ikatan Cl adalah lebih stabil. Atom Cl digantikan oleh air dalam plasma dan sitosol sehingga membolehkan molekul mengikat pada kedudukan N7 guanina dan adenina dalam sasaran DNA. Kerosakan DNA seterusnya mencetuskan kematian sel. Walaupun *cisplatin* memberi kesan positif pada beberapa jenis kanser, seperti kanser ovari, namun dikaitkan dengan kerosakan ginjal yang kekal. *Carboplatin* pula dikenal pasti sebagai analog platinum yang kurang toksik berbanding *cisplatin*. Tambahan pula, *oxaliplatin* (OX), analog platinum generasi ketiga yang terdiri daripada atom platinum yang berkait dengan oksalat dan ligand DACH (diaminocyclohexane) (Dasari & Bernard

Tchounwou 2014; Martinho et al. 2019). *Oxaliplatin* menggunakan tapak jalan penyebatan sel yang lain seperti pengangkut kation organik (OCT) 1 dan OCT 2 yang sangat diekspreskan oleh sel kanser usus. Ini menjelaskan mengapa *oxaliplatin* menjadi pilihan rawatan yang berkesan untuk pesakit kanser usus (Cassidy et al. 2011; Cheeseman et al. 2002; Dasari & Bernard Tchounwou 2014; Gu et al. 2019; Rébé et al. 2020; Roy et al. 2016; Stojanovska et al. 2019).

Selain itu, 5-Fluorouracil (5-FU) adalah antimetabolit yang secara strukturnya serupa dengan molekul endogenus dan dapat menghalang sintesis asid nukleik. Ubat ini adalah terbitan dari urasil yang ditukarkan menjadi fluorodeoxyuridylate (F-dUMP) yang bersaing dengan substrat semulajadi yang lain. F-dUMP adalah kompleks pada enzim kovalen yang berfungsi sebagai perencat bunuh diri. Akibatnya, tembunan dUMP dan dUTP juga gangguan terhadap sintesis DNA dalam sel-sel yang membahagi (Cassidy et al. 2011; Gamelin et al. 1996; Roy et al. 2016; Zhang et al. 2008).

Secara konvensional, kemoterapi yang merosakkan DNA tidak hanya mempengaruhi tumor bahkan sistem imun. Indeks terapi koktel ubat ini juga penting untuk pemantauan peningkatan tahap ketoksikan terhadap sel yang sihat.

2.2.3 Kemoterapi Gabungan untuk Kanser Usus

Tujuan rawatan kemoterapi adalah untuk mengganggu aktiviti DNA secara signifikan dan mengaktifkan apoptosis pada sel. Dalam beberapa kes, kanser usus biasanya dirawat dengan rejimen agen pelbagai kerana dapat memberi keberkesanan yang unggul ketika digabungkan. FOLFOX (*leucovorin*, sebatian ubat gabungan asid folinik, 5-FU dan *oxaliplatin*) adalah kemoterapi gabungan yang diluluskan oleh FDA untuk pelbagai jenis kanser termasuk kanser usus jenis metastatik (Hon et al. 2018).

Menurut Faralli, (2015), asid folinik (FOL) atau nama generiknya, *leucovorin* adalah sejenis vitamin (B9) yang diperlukan oleh badan manusia. FOL bukan ubat kemoterapi secara individu. Tetapi, FOL bertindak sebagai adjuvan kepada kemoterapi yang memberikan kesan sitotoksik atau anti-kanser terbaik setelah digabungkan bersama *fluorouracil* (5-FU). Dalam kajian awalnya, Faralli telah membuktikan kesan sitotoksik terapi menggunakan FOL, 5-FU dan *oxaliplatin* secara individu dalam kajian

in vitro yang dianalisa menggunakan asai daya maju sel adalah signifikan. FOL sebaliknya menunjukkan aktiviti vitaminnya yang mempunyai kesan pro-proliferatif seperti kajian-kajian lain seperti yang dilaporkan oleh FDA. Menurut FDA, FOL menunjukkan kesan anti-proliferatif yang lebih tinggi setelah ubat – ubat kemoterapi ini digabungkan (Zoetemelk, Ramzy & Rausch 2020).

Tambahan pula, pesakit – pesakit kanser usus berpendapat *oxaliplatin* adalah pilihan terapi yang efektif sebagai penawar barisan pertama untuk kanser usus metastatik berdasarkan profil toksikiti agen ini. Penggunaan *oxaliplatin* secara individu atau bersama kombinasi ubat kemoterapi lain yang menyebabkan penangkapan mitosis telah digunakan sejak tahun 2002 untuk merawat kanser usus tahap dua (2) atau tiga (3). Kajian menunjukkan bahawa kombinasi oxaliplatin-DNA adalah lebih cekap dalam menghalang sintesis DNA (Cassidy et al. 2011; Hazama et al. 2014; Jonker, Rumble & Maroun 2006; Kim et al. 2010; Roy et al. 2016).

Namun begitu, masih banyak kelemahan kemoterapi yang perlu ditangani dan ditambah baik. Sehingga kini, sekumpulan penyelidik telah menyimpulkan bahawa keberkesanan kemoterapi adalah terhad dan tersekat disebabkan oleh pembangunan rintangan sel kanser terhadap ubat kemoterapi, pemilihan terapeutik dan kesan sampingan yang kurang memuaskan (Tan & Norhaizan 2019). Tambahan pula, Penyusupan makrofaj masuk ke dalam kanser pepejal juga dikaitkan dengan prognosis yang buruk dan berkorelasi dengan rintangan kemoterapi dalam kebanyakan jenis kanser hingga melemahkan tindak balas kemoterapi untuk menghapus kanser. Penyusupan makrofaj ke dalam TME ini juga mengubah suai sistem imun untuk menyokong dan menggalakkan perkembangan kanser pepejal lalu menekan sitotoksiti sel – sel pengantara imun yang lain dalam masa yang sama (Cassetta et al. 2018).

2.3 SISTEM IMUN DAN PERSEKITARAN MIKRO TUMOR (TME)

Sistem imun memainkan dwi-peranan dalam kanser. Ia mempunyai kesan anti-tumor dan pro-tumor. Dalam sistem imun yang dimediasi oleh sel, sel T adalah sejenis sel darah putih yang berperanan luar biasa. Sel - sel imun dipanggil sebagai sel T kerana ia matang di timus (*thymus*) dari timosit. Sel - sel T berkembang biak dengan cepat untuk meningkatkan jumlah sel - sel efektor. Sel T ingatan (*memory T cell*) memberikan

tindak balas yang lebih pantas dan kuat pada masa akan datang. Kehadiran reseptor sel T di permukaan sel dikenali sel T dari limfosit yang lain, seperti sel B dan sel pembunuh semulajadi. Konsep ini dikenali sebagai pengawasan imun (*immunosurveillance*) oleh sistem imun apabila antigen asing dikenal pasti dan mula membunuh sel - sel tumor (Kerkvliet & Lawrence 2010; Nicholson 2016). Oleh itu, sistem imun dapat bertindak sebagai pertahanan penekan kepada tumor (Galli et al. 2020; Wang et al. 2019; Whiteside 2016).

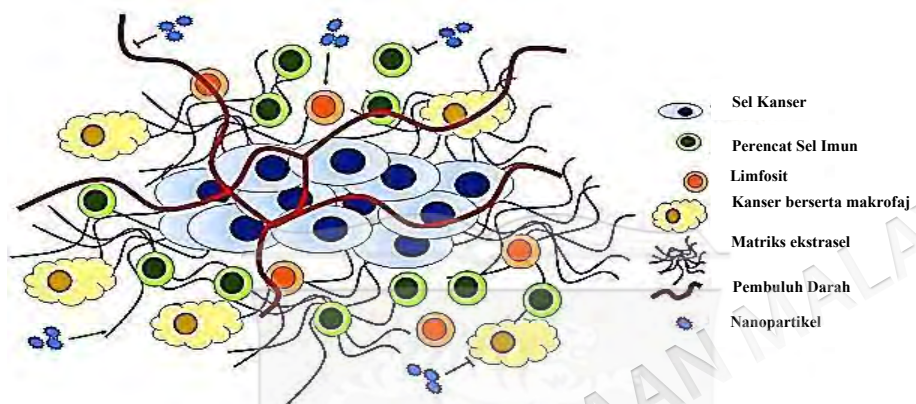
Sejak hampir dua dekad, para saintis telah berusaha untuk mendalami ilmu imunobiologi kanser dengan bantuan data – data penyelidikan yang meyakinkan melalui beberapa kajian. Pada tahun 2004, sekumpulan penyelidik kanser telah memperluas konsep pengawasan imun kepada satu sebutan penyuntingan imun (*immunoediting*) kanser. Mereka berpendapat bahawa pemahaman konsep ini dapat mengembangkan pendekatan imunoterapi yang lebih berkesan untuk mengawal dan membuang kanser dari tubuh manusia (Dunn, Old & Schreiber 2004). Para penyelidik ini juga menyimpulkan bahawa sel – sel imun penyesuai (*adaptive*) dan inat (*innate*) berperanan penting dalam pengawasan imun kanser dalam membantu dan mencegah kemajuan tumor. Hasil kajian mereka juga telah menggariskan tindak balas imun perumah yang rumit untuk mengekspreskan tumor.

Sel T sitotoksik juga disebut sel T CD8⁺ merupakan salah satu pertahanan anti-tumor yang paling penting dalam badan manusia. Sel T ini mengekspresikan glikoprotein CD8 dipermukaan selnya dan mempunyai ingatan terhadapnya. Tambahan pula, sel T CD8⁺ ini mempunyai kemampuan memusnahkan sel -sel yang dijangkiti virus dan sel - sel tumor juga terlibat dalam penolakan pemindahan organ. Sel T pengawal atur (Treg) mengeluarkan IL-10, adenosina dan zarah - zarah yang dapat menyah-aktifkan sel T CD8⁺ ke keadaan anergik yang menawar penyakit autoimun. Tindak balas sitotoksik terjadi secara langsung melalui tapak jalan Fas atau perforin juga melalui pembebasan sitokin secara tidak langsung (Kerkvliet & Lawrence 2010). Dalam kes kanser, fungsi sel T CD8⁺ sebagai anti-tumor sangat bergantung kepada dua faktor penting iaitu pembezaan sel T CD8⁺ dan penyusupan sel T CD8⁺ ke dalam tumor yang berlaku melalui pengangkutan sel T CD8⁺ ke dalam persekitaran mikro tumor (TME). Melalui pendedahan asas molekul, sel T CD8⁺ dan sel T CD4⁺ dapat mengenali

antigen tumor dalam konteks MHC kelas II dan kelas I (Dunn, Old & Schreiber 2004). Sel T CD8⁺ melihat sasarannya dengan mengikat antigen yang berkaitan dengan molekul MHC kelas I, yang terdapat di kesemua permukaan sel yang bernukleus.

Kaji selidik mengenai hubung - kait antara sel imun manusia dan kanser amatlah berguna untuk menjadikan imunoterapi sebagai modal perawatan kanser. Terkini, sekumpulan saintis telah menjalankan kajian tentang metabolisme sel – sel imun dalam kanser (Leone & Powell 2020). Para penyelidik juga berpendapat interaksi antara sel imun dan tumor adalah dinamik di TME dan mewujudkan keadaan TME yang kondusif, kaya dengan sitokin dan faktor pertumbuhan sel (Gun et al. 2019). Pada tahun 2018, sekumpulan penyelidik berpendapat bahawa perubahan metabolik di TME contohnya, hipoksia telah menjadi penentuan tindak balas imun terhadap terapi anti-kanser (Wegiel et al. 2018). Walaupun perubahan metabolisme glukosa yang berlaku di TME masih kurang difahami namun mereka bersetuju bahawa sel kanser dan atau sel imun telah menyesuaikan perkembangan mereka dengan TME dengan cepat.

Oleh itu, semakin ramai saintis berminat untuk mengkaji hubung-kait ini dan menjadikan TME yang digambarkan seperti dalam Rajah 2.3 (Siegler, Kim & Wang 2016) sebagai fokus utama di beberapa makmal – makmal kajian kanser untuk mencari nafas baharu untuk menyembuhkan kanser untuk jangka masa panjang. TME pula terdiri daripada sel kanser, perencat sel imun, limfosit, kanser beserta makrofaj, matriks ekstrasel, pembuluh darah dan nanopartikel. Setiap sel di dalam TME saling berinteraksi dan memainkan peranan yang amat penting dalam perkembangan kanser pepejal bahkan berjaya untuk kekal hidup dalam keadaan TME yang hipoksik (Baginska et al. 2013).



Rajah 2.3 Gambar rajah skema komponen – komponen persekitaraan mikro tumor (TME) (Siegler, Kim & Wang 2016). TME terdiri daripada sel kanser, perencat sel imun, limfosit, kanser beserta makrofaj, matriks ekstrasel, pembuluh darah dan nanopartikel.

Sumber : Siegler, Kim & Wang 2016

2.4 KESAN KEMOTERAPI TERHADAP TME DAN SISTEM IMUN

Kesan kemoterapi terhadap keimunan juga merupakan topik penyelidikan yang menjadi tumpuan para penyelidik kanser. Sebagai contoh, sekumpulan penyelidik di China telah membuat rumusan mengenai kesan kemoterapi dan TME dengan memfokuskan kanser pankreas. Mereka juga berpendapat bahawa kesan efikasi dan toksik secara langsung oleh ubat kemoterapi terhadap sel kanser mampu untuk mengubah TME (Liu, Liao & Zhao 2017). Kumpulan penyelidik ini juga berpendapat bahawa kemoterapi berpotensi mengaktifkan sistem imun dan menyebabkan kematian sel kanser secara imunogenik (ICD) yang memerlukan sel imun sebagai pemain utama selain mengubah landskap TME (Liu et al. 2016). Dapatan kajian ini juga dapat menyokong rumusan kajian yang diterbitkan sebelumnya. Kedua – dua strategi kemoterapi mengeksploitasi sistem imun ini telah diperjelas dengan lebih terperinci (Emens & Middleton 2015).

Menariknya, terdapat kajian menyimpulkan kebolehan kemoterapi untuk mengubah populasi sel sitotoksik T CD8⁺ semasa pesakit kanser payudara menjalani rawatan kemoterapi dan selepas enam (6) bulan (Onyema et al. 2015). Bilangan populasi sel limfosit T dilihat menurun secara konsisten semasa pesakit menjalani kemoterapi dan keadaan tersebut tidak kembali kepada sediakala walaupun setelah enam (6) bulan rawatan dijalankan. Kesan kemoterapi dalam kajian ini adalah merupakan proses penuaan sel limfosit T (*immunosenescence*) yang menyebabkan berkurangnya tindak balas imun dan penganjakkan populasi sel limfosit T kepada statusnya yang kurang berfungsi. Oleh itu, keadaan ini dipercayai mempunyai kaitan rapat dengan kanser (Onyema et al. 2015).

Beberapa tahun yang lalu, sekumpulan penyelidik telah melihat keperluan untuk memahami kesan kemoterapi terhadap fungsi sel imun pada pesakit kanser perut yang masih lagi kurang dikaji. Berdasarkan kajian yang diterbitkan, kemoterapi berkemampuan untuk memberikan galakan kepada fungsi sel imun dengan cekap lalu menghalang penekanan imun dalam tubuh pesakit kanser perut (Wang et al. 2018). Nisbah populasi sel T CD4⁺/CD8⁺ direkodkan meningkat selepas kemoterapi berbanding sebelumnya. Mereka juga berhasil untuk memberikan informasi mengenai

mekanisme FOLFOX-6 yang telah diubah suai untuk melawan kanser perut dan status imun pesakit kanser perut juga dapat dikenalpasti (Wang et al. 2018).

Seterusnya, terdapat kajian yang memfokuskan kesan *oxaliplatin* terhadap tindak balas imun sistemik dalam kajian mereka. Penyelidik ini juga menyimpulkan bahawa ubat kemoterapi *oxaliplatin* tidak menyebabkan penekanan imun tetapi berkebolehan untuk mendorong tindak balas anti-tumor (Stojanovska et al. 2019). Kami telah menjadikan kajian Stojanovska dan rakan – rakan ini sebagai rujukan terbaik. Kajian mereka telah menasarkkan sel limfosit T dan B bagi mengkaji tindak balas imun setelah rangsangan *oxaliplatin* seperti fokus kajian kami. Kaedah kajian yang dijalankan mereka juga berpadanan dengan objektif kajian kami. Tambahan pula, mereka telah mendapati sitokin TNF- α , sejenis sitokin inflamasi juga dirembes keluar oleh sel limfosit dengan kadar yang banyak dan disahkan dengan pengekspresan gen TNF- α yang tinggi. Hasil – hasil kajian mereka ini telah mendorong kami untuk mempergiat usaha untuk mengkaji kesan EV yang diaruh ubat kemoterapi, *oxaliplatin* terhadap sel imun manusia.

Selain itu, terdapat satu ringkasan kajian terkini di Amerika Syarikat menyatakan hasil kajian yang serupa tetapi mereka memfokuskan penggunaan ubat kemoterapi adjuvan, 5-FU yang mampu merawat kanser usus (Gmeiner 2020). Penyelidik di Denmark juga menemui dapatan kajian yang sama ketika mengkaji kesan kemoterapi paliatif terhadap sel imun pesakit kanser ovari berulang (Henriksen et al. 2020). Sebagai ringkasan, senarai kajian – kajian mengenai kemoterapi dan sistem imun adalah seperti dalam Jadual 2.3. Telah menjadi keperluan para doktor untuk meneliti beberapa parameter lain ketika membuat keputusan terapi kanser disebabkan kesan kemoterapi terhadap sistem imun adalah berbeza - beza.

Oleh itu, maklumat mengenai kesan sampingan kemoterapi yang berkait imun ini diperlukan oleh para penyelidik kanser dan informasi – informasi terkini ini dapat meningkatkan tahap pemahaman mereka juga memudahkan mereka membangunkan rekaan rejimen kemoterapi baharu. Dengan itu, kemoterapi dapat diaplikasikan dalam menentang kanser dengan lebih berkesan. (Galluzzi et al. 2015)

Jadual 2.3

Senarai kajian – kajian berkaitan kemoterapi dan sistem imun yang menggunakan beberapa jenis kanser sebagai model kajian (Liu, Liao & Zhao 2017).

Rujukan	Jenis kanser	Rawatan kemoterapi	Sel sasaran	Implikasi dan kesan biologi
(Shevchenko et al. 2013)	Kanser pankreas (PC)	Gemcitabine	Sel Treg	Pengurangan sel T
(Liu et al. 2016)	Kanser pankreas (PC)	Gemcitabine	Makrofaj berkaitan tumor (TAM)	Meningkatkan TAM jenis M2 yang terpolarisasi
(De Palma & Lewis 2013)	Limfoma	Doxorubicin	Makrofaj	Mendorong kematian sel kanser secara imunogenik
(Lotti et al. 2013)	Kanser usus	5-Fluorouracil (5-FU)	Fibroblas berkaitan kanser	Pengaktifan CAF untuk mengekalkan sel-sel permulaan kanser usus oleh sitokin IL-17A
(Denardo et al. 2011)	Kanser payudara	Paclitaxel	Makrofaj berkaitan tumor (TAM)	Pengambilan TAM
(Onyema et al. 2015)	Kanser payudara	Kombinasi beberapa jenis ubat kemoterapi	Sel limfosit T CD8+	Penuaan sel limfosit T (immunosenescence)
(Wang et al. 2018)	Kanser perut	FOLFOX-6	Sel T CD4+/CD8+	Menghalang imunosupresi
(Stojanovska et al. 2019)	-	Oxaliplatin	Sel limfosit T dan B	Meningkatkan nisbah sel imun dan ekspresi TNF- α sebagai tindak balas anti-tumor
(Henriksen et al. 2020)	Kanser ovari berulang	Kombinasi beberapa jenis ubat kemoterapi	Sel imun	Bilangan sel limfosit T dan B berkurangan

2.5 VESIKEL EKSTRASEL (EV)

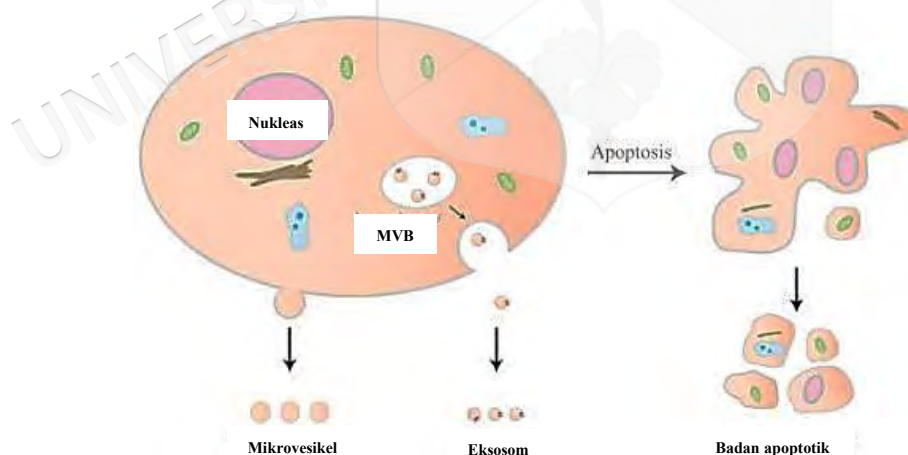
2.5.1 Pengenalan kepada Vesikel ekstrasel

Vesikel ekstrasel (EV) adalah zarah yang mempunyai dua lapisan lipid yang dikeluarkan dari sel secara spontan dan tidak direplikat, tidak seperti sel. EV membolehkan sel - sel berkomunikasi melalui pengangkutan pelbagai jenis kargo yang mengandungi RNA, DNA dan protein. EV adalah zarah berdiameter nano yang terbahagi kepada beberapa jenis. EV merangkumi eksosom (30nm -100 nm), badan apoptotik (*apoptotic bodies*) (50 nm - 5 μ m) dan mikrovesikel (100 nm - 1 μ m) (El Andaloussi et al. 2013; Margolis & Sadovsky 2019; Théry et al. 2006, 2018; Yáñez-Mó et al. 2015). *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) telah menyarankan penggunaan umum perkataan vesikel ekstrasel ketika membincangkan penyelidikan yang berkaitan dengan eksosom dan mikrovesikel. Pada tahun 1987, Johnstone et al. menggunakan istilah 'exosomes' untuk pertama kalinya dalam kajian pematangan retikulosit untuk menggambarkan vesikel yang dihasilkan semasa kultur *in vitro* retikulosit biri-biri. Dalam kajian - kajian terkini, istilah 'exosomes' dan 'mikrovesikel' digunakan dalam beberapa artikel yang diterbitkan. Sebaliknya, penyelidik menggunakan istilah EV secara amnya jika penyelidik gagal untuk mencirikan EV mengikut jenis dengan tepat seperti saranan ISEV. ISEV mencadangkan penggunaan perkataan EV sebagai pengganti istilah seperti 'exosomes' dan 'mikrovesikel' bagi kajian yang dibebani oleh penemuan yang pelbagai, bertentangan dengan definisi dan biogenesis unik yang tidak tepat seperti jangkaan awal kajian. Oleh itu, penggunaan umum perkataan vesikel ekstrasel (EV) adalah lebih digemari oleh penyelidik biologi EV.

Kepelbagaian EV telah menjadi salah satu faktor utama dalam memahami biologi yang berkaitan dengan EV (Chiang & Chen 2019; Colombo et al. 2013; Kowal et al. 2016; Willms et al. 2018). Malah lebih merumitkan apabila pelbagai jenis EV dikeluarkan oleh kumpulan sel yang sama. ISEV telah menyarankan pencirian EV harus merangkumi beberapa aspek penting termasuk ukuran saiz vesikel, morfologi, kandungan EV, kestabilan vesikel dan kehadiran penanda protein. Aspek - aspek

tersebut merupakan butiran yang diperlukan untuk mengesahkan kesahihan hasil kajian. Biogenesis EV juga berbeza, pelbagai bentuk dan dinamik.

Biogenesis EV pula masih lagi kurang dikaji. Keheterogenan EV dan kargonya amat bergantung pada cara dan mekanisma EV dirembes keluar daripada sel asalnya. Rajah 2.4 pula adalah gambaran tentang biogenesis pelbagai jenis EV secara am dan ringkas. Sebagai contoh, biogenesis eksosom dikawal atur oleh mesin kompleks penyisihan endosom yang diperlukan untuk pengangkutan (ESCRT) atau ceramida lipid manakala mikrovesikel dirembes keluar dari sel asalnya melalui proses pertunasan daripada membran sel (Fujita et al., 2016). Badan apoptotik (*apoptotic bodies*) juga adalah subpopulasi EV hasil daripada perpecahan membran (*membrane disintegration*). Subpopulasi ini juga merupakan populasi EV terbesar diameternya dan mempunyai bentuk yang pelbagai. Menurut kajian, badan apoptotik dilepaskan ketika sel menjalani proses apoptosis dalam beberapa tahap. Oleh itu, populasi EV ini mengandungi pelbagai komponen dari sel asalnya termasuk organel dan serpihan DNA. Makrofaj juga mengenali isyarat ekstrasel badan apoptotik yang menarik makrofaj, lalu badan apoptotik lenyap melalui fagositosis (Than et al. 2017).



Rajah 2.4 Gambar rajah biogenesis pelbagai jenis vesikel ekstrasel (Meltzer et al. 2016). EV merangkumi eksosom (30nm -100 nm), badan apoptotik (*apoptotic bodies*) (50 nm - 5 μ m) dan mikrovesikel (100 nm - 1 μ m)

Sumber : Meltzer et al. 2016

2.5.2 Vesikel Ekstrasel (EV) dan Kanser

Para penyelidik tempatan mahupun luar negara juga berminat untuk memahami peranan EV dalam kanser. Penglibatan EV secara langsung pada TME telah menjadikan EV sebagai pemain utama dalam interaksi antara sel di TME (Willms et al. 2018). Peranan EV sebagai penyampai maklumat dan bebanan daripada satu sel kepada yang lain adalah yang paling ketara. Namun, masih banyak fungsi EV dalam kanser yang lain masih memerlukan penyelidikan yang lebih mendalam dan teliti.

Metastasis adalah cabaran dan penyebab utama kematian pesakit – pesakit kanser. Justeru itu, kajian terhadap EV yang diterbitkan daripada sel kanser (Tumor-derived EVs) dalam metastatik kanser adalah antara yang paling popular seperti hipotesis sekumpulan penyelidik sejak berabad lalu (Willms et al. 2018). Saintis lain juga percaya bahawa EV dapat membuka jalan baharu untuk memperhebat strategi terapi kanser dengan memahami mekanisme metastatik melalui perpindahan EV (Fujita, Yoshioka & Ochiya 2016). Beberapa kajian lain juga telah berjaya melaporkan dan mengenalpasti EV sebagai perantara dalam beberapa tapak jalan isyarat yang membawa beban kargo. Sel – sel berkomunikasi melalui EV dengan memindahkan komponen isyarat sebagai permulaan proses selular (Fujita, Yoshioka & Ochiya 2016). Perpindahan komponen – komponen EV ini juga amatlah berguna untuk menyokong proses metastasis kanser.

Secara dasar, ramai penyelidik kanser berpendapat EV berpotensi menjadi penanda diagnosis (*diagnostic marker*) atau pengesan awal kanser dengan menggunakan ciri fisiologi EV yang mencerminkan fisiologi sel asalnya. Sebagai contoh, EV yang berasal daripada sel kanser dapat dikenalpasti dengan tepat dan mudah di TME kerana mengandungi bahan genetik seperti protein dan miRNA yang tertentu. Strategi dan taktik ini dapat mengesan kehadiran sel kanser di dalam tubuh pesakit lebih awal dan kedar kematian dan kelangsungan hidup pesakit kanser dapat ditambah baik (Fujita et al. 2014; Fujita, Yoshioka & Ochiya 2016).

Penemuan – penemuan baharu tentang fungsi biologi EV dalam kanser telah membuka peluang dan memberikan idea kepada para penyelidik kanser untuk menggunakan EV sebagai pemain utama dalam sistem penghantaran ubat (*drug delivery system*). Pada tahun 2019, sekumpulan penyelidik berpendapat dan menyarankan EV digunakan dalam pemuatan ubat (*drug loading*) (Walker et al. 2019). Kepelbagaian EV juga membantu fungsi EV dalam sistem penghantaran ubat ini kerana EV dapat diterbitkan melalui pelbagai sel perumah dan mudah diubah suai mengikut sasaran penghantaran ubat kelak. Tambahan pula, penggunaan EV telah dilaporkan dalam fasa pertama ujian klinikal pada tahun 2005 (Escudier et al. 2005).

2.5.3 Vesikel Ekstrasel (EV) dan Sistem Imun

Sehingga ke hari ini, terdapat banyak fungsi EV yang dicadangkan oleh para penyelidik. Peranan EV adalah untuk memodulasi tindak balas imun, termasuk rangsangan imun dan penekanan imun. Saintis menganggap EV berfungsi sebagai pengutus intrasel, menyampaikan beban efekturnya atau memberi isyarat makromolekul antara sel tertentu. Tambahan pula, fungsi dan potensi EV merupakan peranan EV dalam biologi tumor yang paling dapat difahami. Sebagai contoh, Magdalena Derbis dan rakan penyelidik (2015) telah bersetuju bahawa eksosom berpotensi sebagai penanda biologi dalam pengembangan dan tindak balas terapi terhadap kanser ovari dan kanser usus (Hon et al. 2017). EV juga berperanan sebagai pengantara perkembangan dan rintangan terhadap kemoterapi kanser pankreas. EV boleh diaplikasikan dalam rawatan kanser pankreas sebagai perangsang imun yang berkaitan dengan tumor, pembawa ubat (*drug carrier*) dan sasaran terapeutik seperti terapi imun (Taghikhani et al. 2020; Walker et al. 2019).

Menariknya, EV mampu mengekalkan topologi *Antigen Presenting Cell* (APC) di permukaan vesikelnya. Oleh itu, EV mampu merangsang sel T CD8⁺ dan CD4⁺ secara langsung walaupun aktiviti tersebut 10 hingga 20 kali kurang berkesan berbanding APC induk. Sejak itu, EV telah menjadi subjek kajian pengaktifan sel T untuk mengkaji kesan EV dan terbukti EV mengambil bahagian dalam penekanan imun dalam keadaan yang berbeza (Das C, Lucia MS 2017; Vincent-Schneider et al. 2002).

Satu kajian baru – baru ini telah menunjukkan bahawa rawatan sel kanser payudara dengan topotecan inhibitor topoisomerase I, kemoterapi antitumor, secara signifikan meningkatkan pengeluaran DNA daripada muatan kargo EV, yang menyebabkan pengaktifan sel dendritik melalui isyarat cGAS-STING secara *in vitro* dan *in vivo* (Kitai et al. 2017). Penemuan ini menunjukkan bahawa DNA daripada EV juga dapat mengaktifkan tindak balas sel imun antivirus setelah DNA dimuatkan dalam keadaan tertentu semasa rawatan radiasi atau kemoterapi (Kitai et al. 2017; Zhou et al. 2020).

Selain itu, ramai penyelidik telah memrumuskan bahawa EV berupaya meningkatkan dan menekan tindak balas imun dan boleh memberi manfaat kepada imunoterapi. EV dalam sistem imun sangat fleksibel walaupun EV juga akan meningkatkan risiko kesan buruk yang tidak dapat diramalkan setelah sel – sel berkomunikasi melalui EV (Burrello et al. 2016; Xie et al. 2020; Zhang & Grizzle 2014). Kajian – kajian yang berkaitan EV dan sistem imun yang menggunakan beberapa jenis kanser sebagai model kajian adalah seperti tersenarai dalam Jadual 2.4

Jadual 2.4 Senarai kajian – kajian berkaitan EV dan sistem imun yang menggunakan beberapa jenis kanser sebagai model kajian.

Rujukan	Jenis kanser	Kargo Vesikel luar sel	Sel sasaran	Implikasi dan kesan biologi
(Huber et al. 2005)	Kanser usus	CD63 dan ligan Fas	Sel limfosit T	Mempertingkatkan kadar apoptosis sel T
(Wieckowski et al. 2009)	Sel karsinoma skuama kepala dan leher (HNSCC)	-	Sel limfosit T CD8 ⁺ , CD4 ⁺ dan Treg	Meningkatkan apoptosis sel T CD8 ⁺ , mengaktifkan sel T CD4 ⁺ dan meningkatkan perkembangan serta mengurangkan aktiviti sel Treg
(Fabbri et al. 2012)	Kanser paru - paru	miR-21 dan miR-29a	Makrofaj	Aktifkan molekul TLR untuk memulakan tindak balas imun
(Ding et al. 2015)	Kanser pankreas (PC)	miR-212-3p	Sel dendritik (DC)	Merencat ekspresi protein RFXAP sejenis faktor transkripsi untuk MHC II
(Besse et al. 2016)	Kanser paru – paru tidak kecil (NSCLC)	PD-L1	Sel limfosit T	Mengatur PD-L1 dan menyekat pengaktifan sel T di sel dendritik
(Ying et al. 2016)	Kanser ovari epitelium	miR-222-3p	Makrofaj	Mengatur kepolaran makrofaj M2
(Kitai et al. 2017)	Kanser payudara	DNA	Sel dendritik (DC) dan sel limfosit T CD8	DC diaktifkan melalui isyarat STING dan mendorong kepada imuniti antitumor
(Haderk et al. 2017)	Leukemia limfosit kronik (CLL)	RNA bukan pengekodan (Noncoding RNA)	Monosit	Keradangan berkaitan kanser dan pelepasan imun melalui ekspresi PD-L1
(Gao et al. 2018)	Kanser paru - paru	Reseptor Faktor Pertumbuhan Epidemis (EGFR)	Makrofaj	Menindas imuniti antivirus
(Chen et al. 2019)	Melanoma metastatik	PD-L1	Sel limfosit T	Menindas sistem imun
(Kim et al. 2019)	Kanser paru – paru tidak kecil (NSCLC)	PD-L1	Sel limfosit T CD8 ⁺	Mengurangkan rembesan sitokin dan mendorong apoptosis sel T CD8 ⁺
(Pritchard et al. 2020)	Kanser paru - paru	p53	Makrofaj	Mendorong polarisasi M0 kepada M2
(Azambuja et al. 2020)	Glioblastoma	Arginase-1 ⁺	Makrofaj	Makrofaj diprogram semula untuk mendorong perkembangan glioblastoma
(Sharma et al. 2020)	Melanoma	MTEX	Sel limfosit T CD8 ⁺ dan sel NK	Mengurangkan fungsi sel – sel effektor imun
(Yin et al. 2020)	Glioblastoma	GBex	Sel limfosit T CD8 ⁺ , CD4 ⁺ , sel NK dan Makrofaj	Memprogram semula fungsi semua jenis sel imun secara <i>in vitro</i> dan mengubah frekuensi sel – sel imun secara <i>in vivo</i> serta mewujudkan, mengekalkan persekitaran tertekan imun

BAB III

KAEDAH KAJIAN

3.1 BAHAN DAN RADAS

3.1.1 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan untuk kajian ini ialah: Total Exosomes Isolation Reagent (dari serum) (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), 1x penimbal fosfat salin (PBS, First Base, Amerika Syarikat), kit Quick Start™ Bardford protein assay (BIO-RAD, Amerika Syarikat), 1x penimbal Laemmli sampel (BIO-RAD, Amerika Syarikat), Penanda ukuran protein (BIO-RAD All Blue Precision Standards, Amerika Syarikat), antibodi primer Santa Cruz Biotechnology: CD9 (C-4) (sc-13118), antibodi primer Novus Biologicals: TSG101 (4A10) (NB200-112), antibodi sekunder berkonjugat Horseradish peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology), reagen pengesanan Pierce ECL Western Blotting Substrate (Life Technologies, Amerika Syarikat), kit EXOCET (No. Katalog EXOCET96A-1, System BioSciences, Amerika Syarikat), Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Science, Amerika Syarikat), medium RPMI-1640 (Nacalai Tesque, Jepun), serum janin sapi (Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat) dan antibiotik (Penicillin-Streptomycin) (Nacalai Tesque, Jepun), antibodi spesifik bermagnetik CD4 (PE), CD8a (APC) dan CD3 (FITC) (Biolegend, Amerika Syarikat), kit EasySep™ (No. Katalog 17953, STEMCELL Technologies, Kanada), trypan biru (Trypan Blue) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat), aktivator sel T Human ImmunoCult CD3 / CD28 (25 µl per ml, STEMCELL Technologies, Kanada), sitokin IL-2 (100 IU per ml) (STEMCELL Technologies, Kanada), pewarna pendarfluor merah PKH26 (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), BD Cycletest Plus DNA Kit (BD Bioscience, Amerika Syarikat), kit asai

Annexin V-FITC (BD Bioscience, Amerika Syarikat), Human CD8 / NK Panel LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit (BioLegend, Amerika Syarikat), GeneJET™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), kit Sintesis cDNA Tetro (Tetro™ cDNA Synthesis Kit) (Bioline Reagent, UK), kit Ujian Saringan Gen Anergi Sel T dan Tolerans Imun Manusia (AccuTarget™ Human qPCR Screening Kit) (Bioneer, Republic of Korea), perwarna agen saling selit (*intercalating agent*) (SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit) (Bioline, Kanada) dan (Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit) (New England Biolabs, Amerika Syarikat).

3.1.2 Radas

Senarai alat radas yang digunakan dalam kajian ini ialah: Kabinet Biokeselamatan Kelas II (NuAire, Amerika Syarikat), ChemiDoc Imagers XRS (BIO-RAD, Amerika Syarikat), ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), kit Sel ‘Dip’ Universal (ZEN1002), pembaca plat spektrofotometri Vairoscan™ Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), pengempar (Eppendorf 5810R centrifuge plus swing-out rotor, Eppendorf AG, Hamburg, Jerman), Magnet EasySep™ (No. Katalog 18000, STEMCELL Technologies, Kanada), inkubator New Brunswick CO2 (Eppendorf AG, Jerman), slaid hemositometer (Resistance, Jerman), mikroskop Nikon Eclipse TS100 Inverted Microscope (Nikon, Jepun), sitometri aliran BD FACSVerse™ (BD Bioscience, Amerika Syarikat), mesin NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), mesin Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika Syarikat), mesin pengitar terma 96-telaga Veriti™ (Applied Biosystems, Amerika Syarikat) dan mesin pengitar terma CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Amerika Syarikat).

3.2 PENGUMPULAN SAMPEL KLINIKAL DAN KELULUSAN ETIKA

Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM, Pusat Perubatan UKM, Cheras telah meluluskan permohonan etika kajian ini (JEP-2019-089). Surat kelulusan etika, kebenaran bertulis dan helaian informasi mengenai kajian ini adalah seperti dalam LAMPIRAN A. Persetujuan dan kebenaran bertulis telah diambil dari pesakit kanser usus yang menepati kriteria. Seterusnya, sebilangan sampel darah pesakit telah

dikumpul mengikut saiz sampel klinikal yang telah dikira menggunakan formula kemudiannya diproses untuk kajian lanjut seperti kaedah yang telah diterbitkan (Ludwig et al. 2017). Formulanya adalah berasal dari Zhang et al. 2014 untuk asai imun dan formula terbitan daripada Snedecor dan Cochran (1989) seperti ditulis dibawah (s, sisihan piawai (*standard deviation*), d, perbezaan untuk dikesan (*difference to be detected*) dan C, pemalar (*constant*)). Seramai 16 orang pesakit (sampel) diperlukan untuk mencapai ketepatan 0.05 ujian dalam kajian. Mengikut pengiraan kalkulator saiz sampel dianggarkan bahawa kami memerlukan sekurang-kurangnya 10 sampel bagi setiap kumpulan, untuk mencapai kekuatan statistik 90%, dengan sekurang-kurangnya 2 kali ganda perbezaan (*2-fold differences*). Selain itu, kami juga perlu mengkaji 7 pasang sampel yang sepadan untuk dapat menolak hipotesis nol (*null hypothesis*) bahawa perbezaan tindak balas ini adalah sifar dengan kebarangkalian (*power*) 0.9.

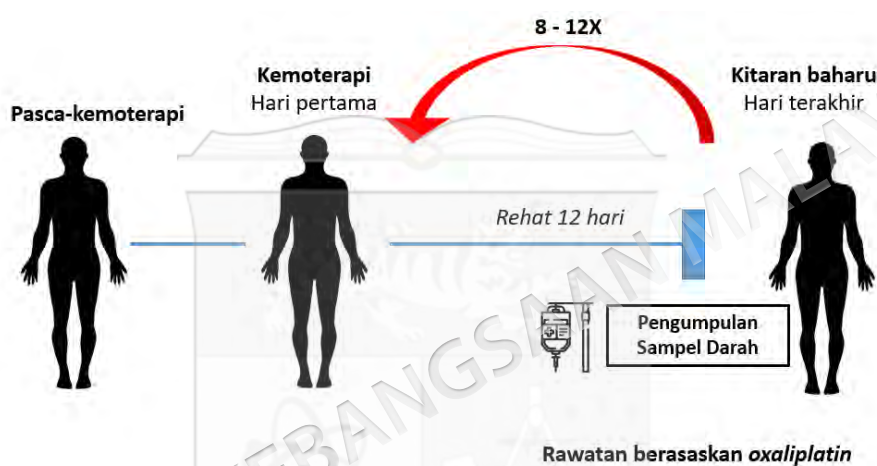
$$n = 1 + 2C \left(\frac{s}{d} \right)^2$$

3.2.1 Kriteria Penolakan Pesakit

Pesakit yang telah menjalani rejimen kemoterapi jenis selain FOLFOX atau XELOX dan enggan memberikan persetujuan berdasarkan maklumat juga dikecualikan dari kajian ini. Di samping itu, pesakit yang mempunyai kanser jenis lain selain kanser usus ditolak kerana boleh mengganggu kejayaan kajian atau meningkatkan risiko untuk mendapatkan hasil yang kurang memuaskan.

3.2.2 Kriteria Penerimaan Pesakit

Kriteria pesakit yang diterima haruslah merangkumi populasi kajian secara konsisten, boleh dipercayai, seragam dan tertumpu (Garg, 2016). Pesakit yang memberi persetujuan untuk terlibat dalam kajian hanyalah terhad kepada pesakit yang telah menjalani sekurang-kurangnya 4-6 kitaran kemoterapi berasaskan *oxaliplatin* (FOLFOX atau XELOX). Gambaran pengumpulan sampel klinikal pesakit kanser usus pula adalah seperti dalam Rajah 3.1. Mereka juga haruslah telah didiagnos tidak mempunyai malignan atau penyakit lain kecuali kanser usus. Pesakit yang sepadan dengan kriteria penerimaan telah dikenalpasti dan telah mendapat persetujuan atau keizinan mereka untuk mengambil bahagian dalam kajian ini secara sukarela sebelum sampel darah mereka diambil.



Rajah 3.1 Gambaran pengumpulan sampel klinikal pesakit kanser usus. Darah didermakan oleh pesakit kanser yang telah menjalani sekurang – kurangnya 4 – 6 kitaran kemoterapi berasaskan *Oxaliplatin*. Darah mereka juga disampelkan pada hari terakhir setiap kitaran setelah berehat 12 hari selepas menjalani rawatan tersebut.

3.3 PENGASINGAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)

Vesikel ekstrasel (EV) di dalam kajian ini diasingkan dengan kaedah pemendakan (*precipitation*). Secara amnya, 25 µl daripada serum diambil dari BioBank UMBI-PPUKM. Kemudian, vesikel ekstrasel diasingkan dengan menambahkan 5 µl Total Exosomes Isolation Reagent (dari serum) (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) dengan 25 µl serum. Larutan yang homogen kemudian dieram pada suhu 4°C selama 30 - 45 minit, diikuti dengan pengempuran pada 12,000xg pada suhu 4°C selama 20 minit. EV terkandung dalam palet di bahagian bawah tiub. Selepas itu, sebanyak 25 µl 1x penimbal fosfat salin (PBS, First Base, Amerika Syarikat) telah dipipet berkali-kali untuk melarutkan EV dan EV disimpan pada 80°C sehingga diperlukan.

3.4 PERINCIAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)

3.4.1 Mikroskopi Elektron Transmisi (TEM)

EV yang telah diekstrak dari serum pra-kemoterapi dan pasca-kemoterapi dilarutkan (1 : 1000) dan dilapisi pada grid tembaga dengan 0.125% Formvar pada kloroform dan diwarnakan dengan 3% uranyl asetat dalam air suling berganda (dH₂O). Slaid yang telah siap kemudiannya dicerap di bawah Bright Field TEM di Jabatan Perkhidmatan Makmal Diagnostik (JPMD) PPUKM untuk mengesahkan ukuran bentuk dan integriti vesikel ekstrasel (Abu et al., 2020).

3.4.2 Pemblotan western (*Western Blot*)

Kehadiran protein yang relevan termasuk *Tumor Susceptibility Gene*, TSG101 dan penanda protein yang lain yang terdapat pada EV telah diuji secara pemblotan western. Secara ringkas, protein dari EV pra- dan pasca-kemoterapi diekstrak menggunakan penimbal lisis urea (*urea lysis buffer*) dan kepekataannya diukur melalui asai Bradford (BIO-RAD, Amerika Syarikat) mengikut prosedur pengeluar kit Quick Start™ Bradford protein assay (BIO-RAD, Amerika Syarikat). Kit asai tersebut lengkap dengan reagen piawaian protein pada tujuh kepekatan yang telah dipra-cairkan (0.125,

0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, dan 2.0 mg/ml). Satu lengkung piawai (*standard curve*) telah dibina dan perlu mencapai $R^2 > 0.9$ bagi memastikan ketepatan pada penentuan kepekatan protein. Kepekatan protein dikira sebagai $\mu\text{g protein} / \mu\text{l}$ dan $50 \mu\text{g protein} / \text{telaga}$. Protein dilarut mengikut nisbah 1:1 kepada 1x penimbal Laemmli sampel (BIO-RAD, Amerika Syarikat) dengan penambahan 5% β -mercaptoetanol sebagai agen denaturasi dan dididihkan selama 5 minit pada suhu 95°C pada blok termo. Kemudian, protein diasingkan melalui kaedah elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Gel tindanan (5%) berada di atas gel pemisah (12%) dan sikat 1.5 mm 10-telaga diletakkan sebelum gel tindanan mengeras. Sebanyak 180V diperlukan untuk proses elektroforesis selama satu jam dalam 1x penimbal SDS sehingga pewarna sudah menghampiri bahagian bawah gel. Penanda ukuran protein (BIO-RAD All Blue Precision Standards, Amerika Syarikat) (Lihat LAMPIRAN B) telah dimasukkan ke dalam satu lorong telaga yang diperuntukkan untuk penanda berat molekul bersama sampel protein - protein yang telah dididihkan ke dalam setiap satu telaga.

Langkah seterusnya, protein dipindahkan ke atas membran *Nitrocellulose* dengan kaedah pemindahan basah pada suhu 4°C pada kuasa 300mA selama 90 minit direndam di dalam 1x penimbal pindah (*Transfer buffer*). Protein bermigrasi keluar daripada gel dan melekat pada membran. Membran yang terkandung protein kemudiannya direndam dalam 5% susu skim di dalam 1x TBS-T (campuran garam tris-buffered (TBS) dan Tween 20) selama sejam di atas rotator untuk memblok membran sebelum pengikatan antibodi ke atas membran dilakukan sebagai langkah terakhir dalam pemblotan *western*. Seterusnya, antibodi primer digunakan pada nisbah pencairan masing - masing : Santa Cruz Biotechnology: CD9 (C-4) (1:1000, sc-13118), berat molekul 24 kDa dan Novus Biologicals: TSG101 (4A10) (1:1000, NB200-112), berat molekul 46 kDa dalam 1x TBS-T. Membran dibiarkan semalaman pada suhu 4°C untuk proses pewarnaan membran. Membran dibilas 3 kali dengan TBS-T selama 10 minit pada keesokan harinya sebelum pewarnaan antibodi sekunder. Antibodi sekunder berkonjugat *Horseradish peroxidase* (HRP) (1: 3000, Santa Cruz Biotechnology) digunakan dalam eksperimen ini, dilarutkan dalam 1x TBS-T dan membran diwarnakan selama satu jam pada suhu bilik. Lebihan konjugat dibilas dengan 1x TBS-T sebanyak tiga kali dan pedapan tersebut diwarnakan dengan reagen pengesanan

Pierce ECL Western Blotting Substrate (Life Technologies, Amerika Syarikat) bagi tujuan pengimejan. Setelah itu, pedapan tersebut dicerap menggunakan mesin ChemiDoc Imagers XRS (BIO-RAD, Amerika Syarikat) dengan kadar segera didedahkan kepada *chemiluminescence*. Pembuktian kehadiran penanda permukaan pada serum EV dapat dilakukan setelah pedapan diperoleh.

3.4.3 Penyerakan Cahaya Dinamik (DLS) (*Dynamic Light Scattering*)

Pengesahan ukuran EV diukur melalui kaedah penyerakan cahaya dinamik menggunakan sistem ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Analisis zetasizer dilakukan di Makmal Morfologi, Pusat Penyelidikan iCRIM, UKM Bangi. Sebilangan kecil isi padu (5 μ l) dari 4 set EV yang diekstrak dari serum sebelum dan selepas kemoterapi dilarutkan dalam 1.5 ml 1x PBS. Kit Sel 'Dip' Universal (ZEN1002) digunakan sepanjang analisis Zeta Potensi dan ukuran zarah dianalisis (Hon et al., 2019). Pengukuran dilakukan dengan 3 eksperimen bebas termasuk tetapan indeks bias (*refractive index*, RI) yang diselaraskan pada 1.370 dan kadar penyerapan (*absorption*) 0.005. Kedua – dua nilai ini diperlukan untuk mengubah taburan daripada intensiti berdasarkan isipadu atau bilangan mengikut jenis bahan yang telah dipilih untuk diukur. Tetapan bahan yang telah dipilih untuk diukur menggunakan sistem DLS ini adalah mikrovesikel. Data yang telah dikumpul dan dianalisis menggunakan Perisian Zetasizer (V7.03) oleh Malvern Instruments.

3.4.4 Pengkuantitian Vesikel Ekstrasel (EV)

Pengasingan EV telah dilakukan terlebih dahulu mengikut prosedur piawai dan EV dihitung mengikut protokol piawai pengeluaran kit EXOCET (No. Katalog EXOCET96A-1, System BioSciences, Amerika Syarikat) yang dicapai dengan mengukur aktiviti asetilkolinesterase (AChE). Kira-kira 50 μ l penimbal lisis ditambah ke 5 μ l dengan jumlah keseluruhan 55 μ l. Kemudian, campuran itu dieram pada suhu 37°C selama 5 minit untuk membebaskan protein EV. Tiub diputar selama 15 saat dan kemudian, diikuti dengan emparan pada 1500xg selama 5 minit untuk membuang serpihan. Supernatan dipindahkan ke tiub yang baru di dalam ais. Satu pencairan bersiri dengan penimbal PBS-B dalam tiub berasingan dilakukan untuk mencairkan piawai

EXOCET. Seterusnya, asai EXOCET selesai di plat 96 telaga. Penimbal tindak balas (dibuat pada hari yang sama) dicampur dengan piawai atau sampel hingga jumlah keseluruhan 100 µl setiap tindak balas. Plat dibiarkan selama 20 minit pada suhu bilik. Terakhir, plat dibaca menggunakan pembaca plat spektrofotometri Varioskan™ Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) dengan segera pada panjang gelombang 405 nm dan kuantiti EV dikira menggunakan lengkung piawai (*standard curve*). Bacaan kepekatan sampel diplot pada lengkung piawai.

3.5 PENGASINGAN SEL MONONUKLEAR (PBMCS)

Darah baharu yang tidak dibekukan sumbangan daripada penderma sihat dikumpul dalam tabung vacutainer yang mengandungi Heparin sejenis agen antikoagulan, dipindahkan ke dalam tabung empar 50 ml. Isi padu 1x PBS yang sama ditambahkan untuk mencairkan darah dengan nisbah 2 : 3 Ficoll-Paque kepada darah telah cair pada suhu bilik dilapiskan dalam tabung empar 50 ml yang lain. Darah dilapis dengan berhati-hati dan perlahan-lahan ke dinding tiub, ke atas lapisan Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Science, Amerika Syarikat). Kemudian, tiub diempar menggunakan rotor ayunan, (Eppendorf 5810R centrifuge plus swing-out rotor, Eppendorf AG, Hamburg, Jerman) pada suhu 21°C 400xg selama 30 minit, pecutan pada angka 9 dan tanpa penahan. Lapisan pertama adalah plasma darah, di bahagian paling atas disimpan dalam tiub NUNC untuk penyimpanan BioBank UMBI-PPUKM, manakala lapisan sel mononuklear (MNCs) dipindahkan ke dalam tiub empar 15 ml yang baru. Seterusnya, sebanyak tiga kali ganda kepada jumlah isi padu penuh lapisan sel mononuklear diisi dengan isi padu 1x PBS untuk mencuci MNC sebelum diempar selama 10 minit pada kelajuan 10xg pada suhu bilik. Selepas itu, supernatan dibuang. Pengemparan diulang setelah 7 ml 1x PBS dan palet dipipet berulang kali untuk langkah mencuci kali kedua. Supernatan dibuang dan palet diampai semula dalam 1 ml medium lengkap RPMI-1640 (Nacalai Tesque, Jepun), 10% serum janin sapi (Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat) dan 1% antibiotik (Penicillin-Streptomycin) (Nacalai Tesque, Jepun) (Lihat LAMPIRAN C) untuk persiapan pengiraan sel. Cara pengiraan sel dilakukan mengikut BAHAGIAN 3.7.2 dan sel digunakan pada hari yang sama.

3.6 PENGISIHAN SEL T SITOTOKSIK MANUSIA (CD8⁺)

Untuk analisis sitometri aliran, sel mononuklear diasingkan oleh Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Korea) dengan emparan kecerunan ketumpatan dan telah dikira sebelum langkah pengisihan sel limfosit T. Kira - kira 200,000 sel dan jumlah keseluruhan isi padu hingga 200 µl 1x PBS yang perlu ditambah telah dikira. Semua sel dipindahkan ke dalam tiub polipropilena untuk analisis sitometri aliran. Kemudian, sel dilabel dengan 5 µl antibodi spesifik bermagnetik CD4 (PE), CD8a (APC) dan CD3 (FITC) (Biolegend, Amerika Syarikat). Campuran yang telah sedia disimpan di dalam ais sehingga pengukuran. Sel yang selebihnya dipalet dan menjadi subjek kepada prosedur pemilihan negatif imunomagnetik sel T CD8⁺ menggunakan EasySep™ Kit (STEMCELL Technologies, Kanada). Protokol piawai pengeluar telah digunakan (No. Katalog 17953, STEMCELL Technologies, Kanada). Ketulenan subset sel limfosit T CD8⁺ adalah lebih daripada 90%, dengan daya maju lebih daripada 98%. Sebilangan kecil penimbal EasySep™ sel 5×10^7 / ml ditambah ke palet. Sekitar 50 µl koktel pilihan ditambah ke setiap 1 ml campuran sampel sel dan dibiarkan pada suhu bilik selama 5 minit. Sementara itu, sfera pesat divorteks selama 20 saat dan sebanyak 50 µl ditambah ke setiap 1 ml sampel sel. Isi padu penimbal EasySep™ diisi sehingga 2.5 ml isipadu akhir dicampur dengan berhati-hati. Diikuti dengan meletakkan tiub pengumpulan sel di Magnet EasySep™ (No. Katalog 18000, STEMCELL Technologies, Kanada) tanpa penutup selama 3 minit dalam magnet. Sementara tiub pengumpulan sel masih kekal di dalam magnet, keseluruhan kandungan tiub dituang ke dalam tiub empar 15 ml yang baru. Sel limfosit T CD8⁺ siap terasing dan digunakan terus dan diempar pada 10xg selama 5 minit. Kemudian, sel - sel palet dipipet semula dalam 1 ml media lengkap dan sel dihitung seperti dijelaskan dalam BAHAGIAN 3.7.2. Tiub polipropilena disediakan dengan 200,000 sel / ml yang baru diasingkan. Sekitar 5 µl setiap antibodi spesifik (CD4 (PE), CD8a (APC) dan CD3 (FITC)) (Biolegend, Amerika Syarikat) ditambah ke dalam tiub dan prosedur untuk analisis sitometri aliran diulang. Lebihan sel dikultur dalam kelalang kultur (*culture flask*) T-75 cm² dengan 8 ml media lengkap RPMI-1640 (Nacalai Tesque, Jepun), 10% serum janin sapi (FBS) dan 1% Penstrep (Nacalai Tesque, Jepun) (Lihat LAMPIRAN C) untuk penyediaan. Kelalang itu kemudian dicerap di bawah mikroskop cahaya terbalik sebelum disimpan di bawah atmosfera yang lembab sebanyak 5% (v/v) CO₂ pada suhu 37°C di dalam New Brunswick CO₂

Incubator (Eppendorf AG, Jerman) dan sel limfosit T tersebut diaktifkan semalaman untuk asai fungsian.

3.7 PENGKULTURAN SEL IMUN DAN JURKAT

3.7.1 Keadaan Pengkulturan Sel

Sel imun seperti sel limfosit T CD8⁺ disisih dan dikultur dalam media lengkap yang mengandungi RPMI-1640 (Nacalai Tesque, Jepun), 10% FBS yang EV-tersusut setelah diultra-empar semalaman (Lihat LAMPIRAN C) untuk penyediaan. Semua media untuk sel kultur dilengkapi dengan 1% antibiotik Penstrep. Sel - sel dikultur dalam kelalang kultur (*culture flask*) T-25 cm² atau T-75 cm² bergantung pada kepadatan sel. Plat kultur dan kelalang dieram di bawah atmosfera lembab iaitu 5% (v/v) CO₂ pada suhu 37°C untuk pemeliharaan sel.

3.7.2 Pengiraan Sel

Pengiraan sel menggunakan kaedah pengasingan sel 0.8% trypan biru (*Trypan Blue Exclusion*) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat). Sebanyak 10 µl campuran pewarna dan sel (1 : 1) diletakkan pada slaid hemositometer (Resistance, Jerman). Sel kemudian dicerap menggunakan Nikon Eclipse TS100 Inverted Microscope (Nikon, Jepun) pada lensa objektif x10. Sel hidup menunjukkan sitoplasma yang jelas dan bilangan sel dikira. Bilangan sel dalam populasi dikira menggunakan formula yang berikut ;

Bilangan Sel

(*sel per ml*)

Jumlah sel dikira

$$= \frac{\text{Bilangan Persegi sudut Besar dikira} \times \text{Faktor Pencairan}}{\times 10^4}$$

3.5.1 Pengaktifan Sel Limfosit T

Sel limfosit T CD8⁺ yang baru diasingkan (1×10^6 sel per ml) juga sel Jurkat diaktifkan semalaman dengan aktivator sel T Human ImmunoCult CD3 / CD28 (25 μ l per ml, STEMCELL Technologies, Kanada) dan sitokin IL-2 (100 IU per ml) (STEMCELL Technologies, Kanada) dalam RPMI yang baru disediakan.

3.6 KO-KULTUR SEL IMUN DAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)

Sel - sel imun dituai dan dimasukkan ke dalam plat kultur 96 telaga pada ketumpatan sel 5×10^4 sel per 100 μ l untuk asai apoptosis Annexin V-FITC. Dalam beberapa eksperimen, 1×10^6 sel per ml dikultur dalam plat. Media kultur lengkap adalah seperti dijelaskan (Lihat LAMPIRAN C) untuk penyediaan. Kira - kira 3 μ l daripada 5 μ g EV yang telah diasing ditambah ke dalam telaga - telaga yang telah ditentukan mengikut susun atur eksperimen. Sebanyak isi padu yang sama 1x PBS dimasukkan ke dalam telaga sebagai telaga kawalan. Plat kemudian dieram di bawah atmosfera lembab 5% (v/v) CO₂ pada suhu 37°C semalaman atau dua hari bergantung pada asai fungsian.

3.7 PENGAMBILAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)

Sel limfosit T yang telah diaktifkan dituai dan dikultur seperti dinyatakan dalam BAHAGIAN 3.8. EV telah diwarnakan mengikut prosedur yang disarankan oleh pengeluar dengan beberapa pengubahsuaian dilakukan. Kira – kira 100 μ l pencair C (Diluent C) dipipet berulang kali dengan 50 μ g EV yang telah diasing. Kemudian, sejumlah 300 μ l pula dicampurkan bersama 1.4 μ l pewarna pendarfluor merah PKH26 (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat). Kedua – dua campuran digabung dan ditinggalkan pada suhu bilik selama 5 minit sebelum 1% FBS diletakkan untuk memberhentikan reaksi. Setelah itu, EV yang telah diwarnakan dikultur bersama sel limfosit T yang telah diaktifkan kemudian dieram di bawah atmosfera lembab 5% (v/v) CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam. Sel T dan EV dipalet pada 10xg selama 5 minit sebelum dipipet berulang kali dengan 500 μ l 1x PBS dan dinilai menggunakan mesin bersistem sitometri aliran BD FACSVerse™ (BD Bioscience, Amerika Syarikat).

3.8 ASAI KITAR SEL

Sel Jurkat (1×10^6 sel / ml) telah diaktifkan semalaman dengan aktivator sel T Human ImmunoCult CD3 / CD28 (25 μ l per ml, STEMCELL Technologies, Kanada) dan sitokin IL-2 (100 IU per ml) dalam RPMI yang baru disediakan. Sel-sel yang diaktifkan dikultur dengan EV seperti yang dijelaskan dalam BAHAGIAN 3.8. Ko-kultur dituai pada hari berikutnya dan asai kitar sel dijalankan menggunakan BD Cycletest Plus DNA Kit (BD Bioscience, Amerika Syarikat) dengan pengubahsuaian. Asai kitar sel ini juga dinilai menggunakan mesin bersistem sitometri aliran BD FACSVerse™ (BD Bioscience, Amerika Syarikat). Supernatan daripada sel kultur yang dituai telah diaspirat dan sebanyak 50 μ l atau kurang ditinggalkan dalam tiub tanpa mengganggu palet. Lebih kurang 100 μ l penimbal larutan dipipet berulang kali dan divorteks dengan perlahan pada kadar kelajuan rendah diikuti dengan pengemparan selama 5 minit pada kelajuan 300xg pada suhu bilik. Supernatan diaspirat tanpa mengganggu palet dan sedia untuk proses pewarnaan. Sebanyak 125 μ l larutan A (penimbal tripsin) ke dalam setiap tiub, dicampur dengan baik. Campuran kemudian dipindah ke dalam tiub polipropilena sebelum dibiarkan pada suhu bilik selama 10 minit. Seterusnya, 100 μ l larutan B (penimbal RNase dan perencat tripsin) ditambah ke dalam tanpa mengeluarkan larutan A dan dieram selama 10 minit pada suhu bilik tanpa perlu vorteks campuran larutan A dan B. Lebih kurang 100 μ l larutan C yang disejukkan (pewarna PI) telah dicampur ke dalam setiap tiub dengan berhati-hati. Tanpa tiub divorteks, tiub diletakkan dan dieram dalam ais dan tanpa didedahkan kepada cahaya sehingga dianalisis di mesin sitometri aliran dalam masa 3 jam setelah larutan C dicampur dan diampai semula bersama sel. Menurut pengeluar, larutan A mengandungi tripsin dalam larutan pembasuh tetrahidroklorida bersperma (*spermine tetrahydrochloride detergent buffer*) untuk memisah fragmen tisu pepejal secara enzimatik serta mencerna membran sel dan sitoskeleton. Manakala larutan B pula mengandungi penimbal RNase dan perencat tripsin dalam penimbal penstabil untuk menstabilkan kromatin nuklear (*nuclear chromatin*). Akhir sekali, larutan C mengandungi pewarna PI, sejenis pewarna pendarfluor secara stoikiometrik (*stoichiometrical*) terikat pada nukleus untuk membersihkan dan nukleus diasing untuk dinilai oleh sitometri aliran.

3.9 ASAI APOPTOSIS ANNEXIN V-FITC

Sel limfosit T CD8⁺ yang baru diasingkan (1×10^6 sel per ml) juga sel Jurkat diaktifkan semalaman dengan aktivator sel T Human ImmunoCult CD3 / CD28 (25 μ l per ml, STEMCELL Technologies, Kanada) dan sitokin IL-2 (100 IU per ml) dalam RPMI yang baru disediakan. Selanjutnya, sel - sel yang telah diaktifkan dikultur dengan EV seperti yang dijelaskan dalam BAHAGIAN 3.8. Ko-kultur dituai pada hari berikutnya dan peratusan apoptosis sel T CD8⁺ diukur dengan sitometri aliran menggunakan pewarnaan dalam asai Annexin V-FITC (BD Bioscience, Amerika Syarikat) mengikut prosedur yang disarankan pengeluar produk dengan beberapa pengubahsuaian mengikut keperluan eksperimen. Palet kultur diampai semula dalam 100 μ l penimbal pengikat yang disediakan dalam kit. Kemudian, campuran itu dipindahkan ke dalam tiub polipropilena 5 ml dan 1 μ l pewarna Annexin V-FITC dan 1 μ l Propidium Iodida (PI) ditambah dengan berhati-hati untuk mewarna sel - sel. Campuran dibiarkan dalam keadaan yang gelap pada suhu bilik selama 15 minit. Sekitar 400 μ l penimbal pengikat ditambah lagi dalam campuran sel dan pewarna dan dinilai dalam Sistem BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Bioscience, Amerika Syarikat). Aktiviti apoptosis diukur dan dibandingkan dengan sampel kawalan.

3.10 PEMPROFILAN SITOKIN

Supernatan dari kultur (asai Apoptosis Annexin V-FITC) dipungut, disimpan dan digunakan sebagai sampel untuk pemprofilan sitokin. Satu panel asai imun yang berasaskan manik - manik multipleks, platform Human CD8 / NK Panel LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit (BioLegend, Amerika Syarikat) dijalankan menggunakan sitometri aliran. Tiga belas (13) sitokin manusia yang terdiri daripada IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17a, TNF- α , sFas, sFasL, IFN- γ , Granzyme A, Granzyme B, Perforin dan Granulysin dihitung secara serentak menggunakan Sistem BD FACSVerse™. Asai ini dianalisis mengikut protokol pengeluar (BioLegend, Amerika Syarikat). Lebih kurang 25 μ l penimbal asai LEGENDplex™ yang telah dibancuh semula, dicampur dengan baik dengan koktail piawai panel Human CD8 / NK yang dibiarkan pada suhu bilik selama 10 minit sebelum digunakan. Supernatan

bertindak sebagai sampel dalam asai ini juga dimasukkan bersama manik - manik campuran yang telah divorteks, sebanyak 25 μ l pengesan antibodi juga telah dimasukkan ke dalam telaga yang sama. Plat asai ditutup rapat dan dibalut dengan kerajang aluminium seluruhnya dengan rapi bagi mengelakkan plat terdedah kepada cahaya secara langsung dan ditinggalkan di atas pengocak plat kira - kira pada kelajuan 250 rpm selama 2 jam pada suhu bilik. Seterusnya, 25 μ l pewarna Streptavidin - Phycoerythrin (SA-PE) ditambah ke setiap telaga yang terdapat dalam plat asai. Kemudian, plat asai dibalut dengan rapi dan langkah mengkocak plat diulang selama 30 minit. Setiap campuran asai yang terdapat dalam setiap telaga kemudian dipindahkan ke dalam tiub mikroempar 1.5 ml secara berasingan. Diikuti dengan pengemparan pada kelajuan 250xg selama 5 minit pada suhu 20°C. Supernatan dikeluarkan sebanyak mungkin sebelum 200 μ l 1x penimbal basuh ditambah dan dipipet semula. Seterusnya, campuran dieram selama 1 minit serta pengemparan diulang. Manik - manik yang telah dicuci dipipet semula dengan 300 μ l 1x penimbal basuh sebelum dipindahkan ke dalam tiub polipropilena dan profil sitokin diukur dalam sistem BD FACSVerse™ sitometri aliran (BD Bioscience, Amerika Syarikat).

3.11 PENGEKSTRAKAN RNA

3.11.1 Pengekstrakan RNA

RNA telah diekstrak menggunakan GeneJET™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) mengikut protokol pengeluar dengan pengubahsuaian. Penimbal lisis yang telah dicampur bersama β -mercaptoetanol (20 μ l) bertindak sebagai agen lisis untuk memulakan pengekstrakan RNA jumlah daripada sel kultur. Sel dipaletkan dengan pengemparan selama 5 minit pada kelajuan 250xg pada suhu bilik. Setelah itu, supernatan dibuang dengan berhati - hati sebelum sebanyak 300 μ l penimbal lisis dipipet berulang kali dan divorteks selama 10 saat untuk memusnahkan membran pada sel. Kemudian, 180 μ l etanol telah dicampur bersama sel lisat dengan dipipet berulang kali. Sebanyak 700 μ l lisat dipindahkan ke kolum penulenan RNA GeneJET™ yang disediakan oleh pengeluar bersama tiub pungutan. Diikuti dengan pengemparan lisat pada kelajuan 11,500 rpm selama 2 minit pada suhu bilik dan aliran terus di tiub pungutan dibuang. Setelah itu, langkah pengemparan baki lisat diulang. Sebanyak 700 μ l penimbal basuh 1 yang telah ditambah etanol dimasukkan ke dalam turus penulenan

RNA yang sama dan langkah pengemparan diulang. Aliran terus di tiub pungutan juga dibuang. Kemudian, 600 µl penimbal basuh 2 telah dimasukkan ke turus penulenan RNA GeneJET™ yang sama dan langkah pengemparan diulang. Seterusnya, 250 µl penimbal basuh 2 yang sama dimasukkan dan langkah pengemparan juga diulang. Kolum penulenan telah dipastikan kering dengan betul dengan mengempar kolum penulenan RNA yang kosong tanpa penambahan sebarang penimbal. Setiap aliran terus dibuang setelah proses pengemparan. Akhir sekali, lebih kurang 30 µl Air Bebas Nuklease (*Nuclease-free water*) dipipet ke tengah-tengah membran turus penulenan RNA GeneJET™ setelah dipindahkan ke tiub pengumpulan yang baru dan diempar untuk mengelusi RNA. RNA yang tulen disimpan pada suhu -80°C sehingga analisis seterusnya.

3.11.2 Penilaian Kuantiti dan Kualiti RNA

Kuantiti dan kualiti RNA yang diekstrak telah dinilai menggunakan mesin spektrofotometer NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). Mesin NanoDrop™ mengukur kuantiti dan kualiti RNA menggunakan sumber cahaya, spektrofotometer menganalisis pada bacaan serapan OD260, OD280, A260/280 dan A260/230. Kira-kira 1 µl sampel dipipet di atas kekaki mesin spektrofotometer. Air bebas RNase digunakan untuk penentukuran (*calibration*) sebelum bacaan serapan sampel dibaca. Bacaan serapan A260/280 perlulah berada pada nilai diantara 1.80 hingga 2.1 bagi memastikan kualiti RNA yang tulen tanpa sebarang kontaminasi protein. Manakala, mesin Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika Syarikat) pula digunakan untuk menilai kadar integriti RNA (RIN). RIN yang melepasi semakan mutu angka 7 dan keatas dianggap baik dapat membolehkan sampel RNA yang berkualiti digunakan untuk kaedah kajian seterusnya.

3.12 TINDAK BALAS BERANTAI POLIMERASE MASA NYATA (QRT-PCR)

3.12.1 Sintesis cDNA

Sampel - sampel RNA yang telah diekstrak telah digunakan sebagai subjek sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan sebelum pengesanan gen melalui qPCR bagi pengekspresi RNA. Kit Sintesis cDNA Tetro (Tetro™ cDNA Synthesis Kit) (Bioline Reagent, UK) telah digunakan seperti prosedur yang disarankan oleh pengeluar dengan

pengubahsuaian. Kesemua reagen telah dibiarkan ke suhu bilik dan setiap tindak balas disediakan di dalam ais sepanjang prosedur eksperimen. Sebelum itu, templat sampel RNA jumlah telah diselaraskan kepada kepekatan 20 ng untuk setiap tindak balas sintesis cDNA. Kemudian, kesemua reagen seperti Jadual 3.1 telah dicampur di dalam tiub mikroempar berisipadu 0.2 ml yang berpenutup rata dan berdinding nipis (Axygen Inc, Amerika Syarikat) secara berasingan mengikut tetapan sampel RNA dan telah dipipet berulang kali dan dibiarkan di dalam ais sebelum proses tindak balas berantai polimerase (PCR) dan proses sintesis cDNA dimulakan menggunakan mesin pengitar terma 96-telaga Veriti™ (Applied Biosystems, Amerika Syarikat). Campuran tindak balas sejumlah isipadu 20 µl telah dieram selama 10 minit pada suhu 25°C diikuti dengan eraman pada suhu 45°C selama sejam sebelum dipanaskan ke suhu 85°C selama 5 minit dan dibiarkan pada suhu 4°C sehingga sampel dialih dan disimpan pada suhu -20°C sehingga digunakan seperti Jadual 3.2.

Jadual 3.1 Komponen – komponen untuk sintesis cDNA.

Komponen	Isipadu (µl)
RNA jumlah	n (mengikut jumlah isipadu yang diperlukan untuk mencapai 20 ng RNA jumlah)
Primer: Hexamer rawak (Random Hexamer or GSP)	1
10mM Campuran dNTP	1
5X Penimbal RT	4
Perencat RNase RiboSafe (RNase Inhibitor)	1
200 µ/µl Transkriptase balik Tetro (Reverse Transcriptase)	1
Air terawat DEPC (DEPC-treated water)	n
Jumlah Isipadu	20

Jadual 3.2 Tetapan tindak balas berantai polimerase (PCR) untuk sintesis cDNA.

Proses Tindak balas Berantai Polimerase (PCR)	Suhu (Masa)
Pra-inkubasi (Pre-incubation)	25°C (10 min)
Amplifikasi (Amplification)	45°C (60 min)
	85°C (5 min)
Penyejukan (Cooling)	4°C (∞)

3.5.1 Ujian Saringan Gen Anergik Sel T dan Toleransi Imun Manusia melalui qRT-PCR

Selepas cDNA telah disintesis, cDNA menjadi templat kepada ujian saringan gen melalui qPCR mengikut panduan yang dicadangkan oleh pengeluar Kit Ujian Saringan Gen Anergik Sel T dan Toleransi Imun Manusia (AccuTarget™ Human qPCR Screening Kit) (Bioneer, Republic of Korea) dengan pengubahsuaian. Sebanyak 84 set primer ke depan dan berlawanan (*Forward and Reverse primers*) di setiap telaga plat 96 telaga (Lihat LAMPIRAN D) dan 92 gen termasuk gen kawalan yang terdiri daripada *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PPIA*, *RPL13A* dan *RPLP0* telah dilarutkan semula kepada kepekatan akhir 30 pmoles/μl dengan 50 μl air suling berganda (dH₂O), divortex dan sebelum digunakan. Pengukuran tahap ekspresi gen mRNA dilakukan dengan menyaring gen – gen tersebut bersama perwarna agen saling selit (*intercalating agent*) (SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit) (Bioline, Kanada) juga (Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit) (New England Biolabs, Amerika Syarikat). Reagen – reagen seperti yang disenarai seperti Jadual 3.3 telah dibiarkan ke suhu bilik dan setiap campuran tindak balas dengan jumlah isipadu 20 μl disimpan di dalam ais sepanjang prosedur eksperimen. Setelah kesemua reagen telah tersedia dalam tiub mikroempar atau plat berisipadu 0.2 ml yang berpenutup rata dan berdinding nipis (Axygen Inc, Amerika Syarikat), proses tindak balas berantai polimerase masa nyata (*Real-Time PCR*) (qRT-PCR) telah dilakukan terhadap campuran tindak balas tersebut. Bergantung kepada jenis Master Mix qPCR, tetapan proses tindak balas polimerase pada mesin pengitar terma CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Amerika Syarikat) adalah seperti yang disenaraikan seperti Jadual 3.4 dan Jadual 3.5. Akhir sekali, analisis ujian saringan gen ini telah dibuat menggunakan perisian BIO-RAD CFX dan ekspresi relatif telah ditetapkan dan dikira dengan menggunakan kaedah $2^{-\Delta\Delta C_q}$

(Kuang et al., 2018; Rao et al., 2013).

Jadual 3.3 Komponen – komponen tindak balas qRT-PCR.

Komponen	Isipadu (µl)	Kepekatan Akhir
2X SensiFAST™ SYBR atau Luna® Universal qPCR Master Mix	10	1X
Air suling berganda (dH ₂ O)	4	-
Templat (cDNA)	1	20 ng
Primer (Forward and Reverse primers) (AccuTarget™ Human qPCR Screening Kit)	5	30 pmoles/µl
Jumlah Isipadu	20	

Jadual 3.4 Tetapan qRT-PCR menggunakan pewarna SensiFAST™ SYBR No-ROX.

Proses Tindak balas Berantai Polymerase (PCR)	Suhu (Masa)	Kitaran
Pengaktifan Polimerase (Polymerase Activation)	95°C (2 min)	1X
Denaturasi (Denaturation)	95°C (5 saat)	40X
Penyepuhlindapan (Annealing)	58°C (10 saat)	
Pemanjangan (Extension)	72°C (2 saat)	

Jadual 3.5 Tetapan qRT-PCR menggunakan pewarna Luna® Universal.

Proses Tindak balas Berantai Polymerase (PCR)	Suhu (Masa)	Kitaran
Pengaktifan Polimerase (Polymerase Activation)	95°C (1 min)	1X
Denaturasi (Denaturation)	95°C (15 saat)	40X
Penyepuhlindapan (Annealing)	58°C (25 saat)	
Pemanjangan (Extension)	72°C (30 saat)	

3.6 ANALISIS STATISTIK

Perisian Prism (GraphPad, ver. 8.0) digunakan untuk menganalisis statistik kajian ini. Ujian-t dilakukan semasa membandingkan dua kumpulan dengan dua-sisi dan tidak berpasangan. Nilai-P kurang daripada 0.05 telah dianggap signifikan. Nilai min ditunjukkan oleh garis mendatar, dan sisihan piawai ditunjukkan oleh bar ralat dalam setiap gambar rajah dan graf. Perbandingan analisis statistik tiga atau lebih kumpulan dibuat dengan menggunakan ujian analisis satu arah (ANOVA).

BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 DATA KLINIKOPATOLOGI PESAKIT

Seramai 42 orang pesakit kanser usus yang menerima rawatan di Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (PPUKM) telah terlibat dalam kajian ini. Sampel-sampel pesakit kanser usus pula telah dibahagikan kepada dua kumpulan utama, iaitu pasca-kemoterapi, iaitu seramai 20 orang pesakit kanser usus menjalani terapi adjuvan berasaskan *oxaliplatin* di Wad Onkologi Jagaan Harian di PPUKM dan kumpulan sampel pesakit pra-kemoterapi pula terdiri daripada 22 orang pesakit kanser usus yang direkrut dari Wad Pembedahan, PPUKM. Data klinikopatologi pesakit kanser usus pra dan pasca menjalani kemoterapi adjuvan berasaskan *oxaliplatin* adalah seperti dalam Jadual 4.1. Sebanyak 9 pasang sampel EV yang sepadan (pra dan pasca kemoterapi) daripada pesakit kanser usus yang sama juga telah berjaya dikumpul untuk kajian ini.

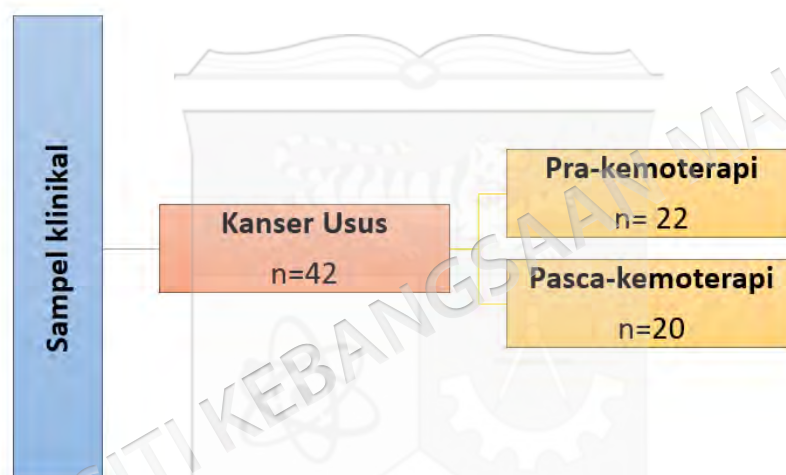
Berdasarkan data yang terkumpul, jumlah pesakit - pesakit kanser usus berjantina lelaki dan perempuan yang telah bersetuju untuk mengambil bahagian dalam kajian ini sebelum mereka menjalani kemoterapi adalah sama banyak. Majoriti daripada mereka berusia dalam lingkungan umur 60 – 69 tahun semasa sampel diambil dan pesakit yang berketurunan Melayu adalah yang paling ramai dan sebahagian besar daripada mereka telah didiagnos menghidap kanser usus pada tahap III dan IV.

Manakala, sampel terkumpul untuk kumpulan pasca-kemoterapi merangkumi jumlah pesakit kanser usus lelaki dan perempuan yang sama banyak dan mereka yang berusia dalam lingkungan 60 - 69 tahun semasa sampel diambil adalah kumpulan yang paling ramai. Mengikut data terkumpul, populasi pesakit kanser usus ini didominasi oleh kaum Melayu dan Cina yang menerima rawatan di Wad Onkologi Jagaan Harian di PPUKM dan mereka telah didiagnos menghidap kanser usus pada tahap yang lewat. Pesakit kanser usus pada lazimnya telah berada di tahap III dan diikuti tahap IV pada fasa diagnosis dan fasa pengumpulan sampel pesakit untuk kajian ini. Rajah 4.1 (A) dan (B) menunjukkan gambaran pengumpulan sampel klinikal pesakit kanser usus dilakukan dan pembahagian kumpulan sampel pesakit kanser usus dalam kajian ini.



Jadual 4.1 Data klinikopatologi pesakit kanser usus pra dan pasca menjalani kemoterapi adjuvan berasaskan *oxaliplatin* di Wad Onkologi Jagaan Harian di PPUKM.

Perincian data	Pra-kemoterapi	Pasca-kemoterapi
	Jumlah pesakit n, (%)	Jumlah pesakit n, (%)
Jumlah sampel	22	20
Jantina		
Lelaki	11 (50)	10 (50)
Perempuan	11 (50)	10 (50)
Kumpulan umur		
<50	7 (31.8)	6 (30)
50 dan keatas	15 (68.2)	14 (70)
Kaum		
Melayu	17 (77.3)	9 (45)
Cina	5 (22.7)	9 (45)
India	0 (0)	2 (10)
Tahap Kanser		
I	1 (4.5)	0 (0)
II	1 (4.5)	0 (0)
III	17 (77.3)	17 (85)
IV	3 (13.6)	3 (15)

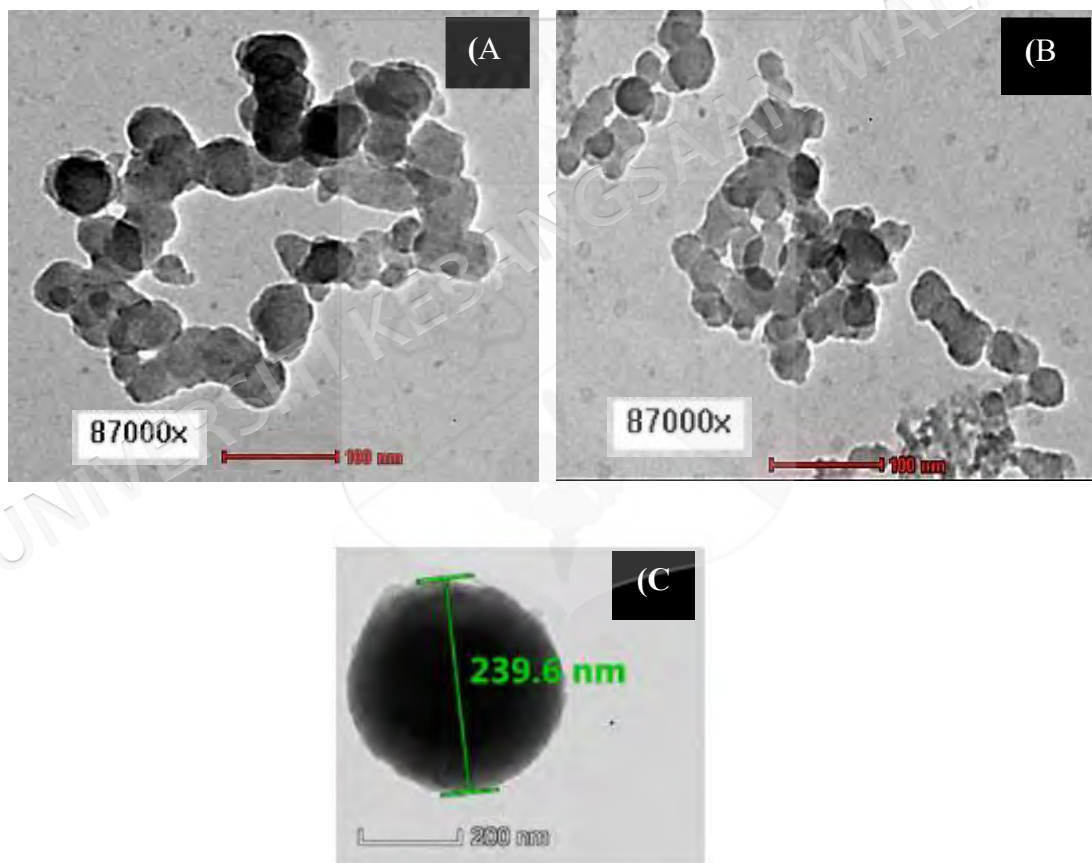


Rajah 4.1 Pembahagian sampel pesakit kanser usus. Kumpulan sampel klinikal Kanser Usus (n=42) terbahagi kepada 2 iaitu Pra-kemoterapi (n=22) dan Pasca-kemoterapi (n=20). Terdapat sembilan (9) daripada keseluruhan sampel adalah sepadan (pra- dan pasca-kemoterapi) daripada pesakit yang sama.

4.2 PENGASINGAN DAN PENGESANAN VESIKEL EKSTRASEL (EV)

4.2.1 Mikroskopi Elektron Transmisi (TEM)

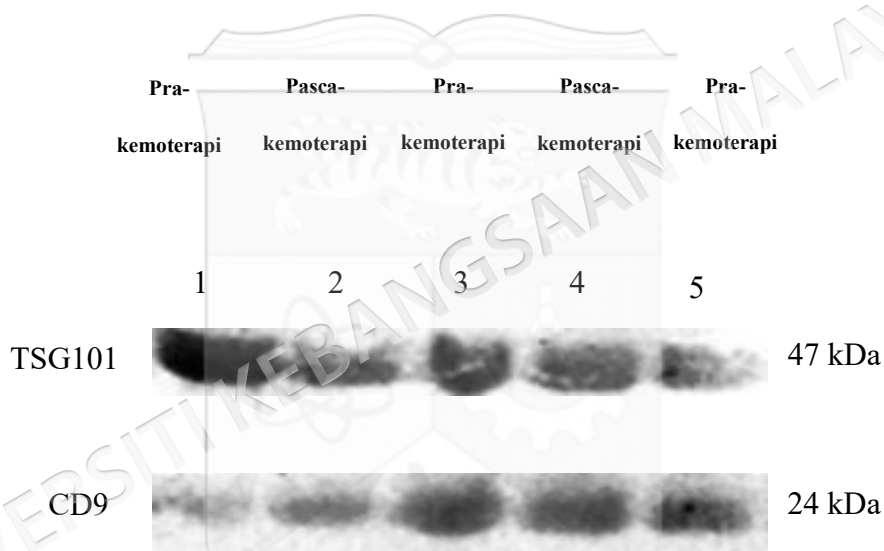
EV yang telah diasingkan dari serum pesakit kanser usus telah dicerap menggunakan mikroskopi elektron transmisi (TEM) di bawah sudut satah. EV yang diekstrak dari serum pesakit pra-kemoterapi dan pasca-kemoterapi menunjukkan ciri-ciri yang serupa seperti ditunjukkan pada Rajah 4.2. Kedua-dua EV (pra dan pasca) ini muncul berbentuk vesikel yang bulat atau sfera berskala nano antara 218.57 hingga 251.20 dn.m seperti perincian klasik yang pernah dilaporkan oleh penyelidik – penyelidik biologi EV sebelum ini. (Ludwig et al. 2017, Barranco et al. 2019)



Rajah 4.2 Gambar TEM yang dicerap pada magnifikasi 87000x (A & B). (A) EV serum pra-kemoterapi. (B) EV serum pasca-kemoterapi. (C) EV serum pasca-kemoterapi (individu) yang berukuran skala diameter 239.6 nm

4.2.2 Pemblotan *western* (*Western Blot*)

Komposit pemblotan *western* yang ditunjukkan dalam Rajah 4.3 menunjukkan profil protein molekul daripada EV serum pesakit kanser usus. Sampel serum pesakit yang sepadan telah dipilih secara rawak untuk pemblotan *western* ini. Blot telah dimuatkan dengan 50 µg protein EV dalam setiap telaga pada gel SDS secara konsisten untuk mengesahkan kehadiran vesikel ekstrasel dalam serum pesakit kanser usus. TSG101 merupakan penanda endogenus bagi eksosom telah dapat dikesan bagi setiap protein termasuk penanda tetraspanin CD9.



Rajah 4.3 Profil protein molekul daripada EV serum pesakit kanser usus (1 – 5).

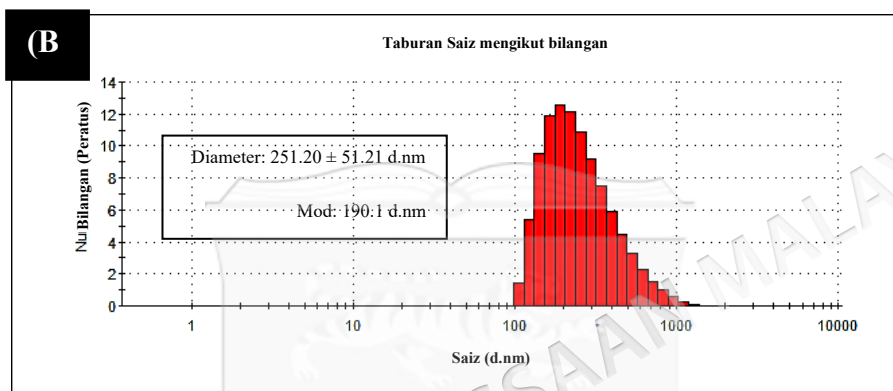
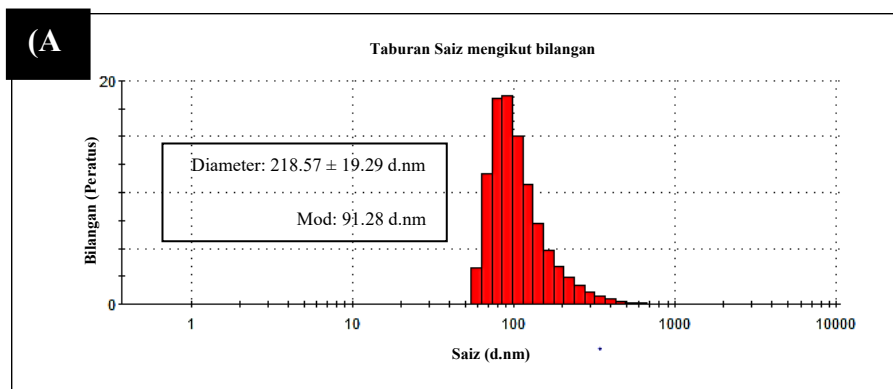
4.2.3 Penyerakan Cahaya Dinamik (DLS)

Selain daripada TEM, *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) juga telah mencadangkan analisis menerusi DLS. ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) telah digunakan sebagai salah satu usaha minimum untuk kajian EV (Lotvall et al. 2014; Witwer et al. 2017). Analisis DLS mendedahkan keanekajenisan ukuran EV yang telah diasingkan dari pesakit kanser usus dari tiga (3) pembahagian sampel yang dilakukan dalam tiga (3) experiment bebas. Berdasarkan data yang telah diperolehi, EV saiznya diantara 218.57 hingga 251.20 dn.m. EV pasca-kemoterapi pula mempunyai mod diameter terbesar iaitu 190.10 d.nm seperti dalam Jadual 4.2. Manakala, EV pra-kemoterapi mempunyai ukuran saiz purata terkecil, 218.57 d.nm berbanding EV pasca-kemoterapi. Perbezaan ukuran zarah – zarah ini signifikan bagi semua kumpulan EV ($P=0.0023$) dan EV pra-kemoterapi didapati jauh lebih kecil. Berdasarkan Rajah 4.4, zarah EV pesakit kanser usus pra-kemoterapi didapati bergerak dan diukur secara berkelompok (*aggregates*) manakala saiz EV pesakit kanser pasca-kemoterapi adalah bertaburan dan pelbagai dalam bahan pencair semasa analisis DLS dijalankan.

Data index polidispersiti (PDI) juga telah diukur pada masa yang sama. PDI bertindak sebagai penunjuk julat saiz EV. Julat angka PDI sekitar 0.30 - 0.50 adalah taburan saiz zarah pelbagai mod yang berperanan sebagai penanda untuk mengesahkan EV sebagai zarah biologi dirembeskan dalam pelbagai variasi bentuk dan saiz. Data DLS yang telah diukur dan dianalisa telah membuktikan kehadiran EV yang telah dirembes keluar oleh serum pesakit kanser usus secara semulajadi dalam pelbagai bentuk dan saiz seperti dalam Jadual 4.2.

Jadual 4.2 Taburan ukuran partikel (d n.m) dan PDI vesikel ekstrasel

Sampel	Purata distribusi ukuran partikel (d.nm)	Mod diameter (d.nm)	Index polidispersiti (Polidispersity Index, PDI)
Pra-kemoterapi	218.57 $\pm$ 19.29	91.28	0.32 $\pm$ 0.02
Pasca-kemoterapi	251.20 $\pm$ 51.21	190.10	0.34 $\pm$ 0.08



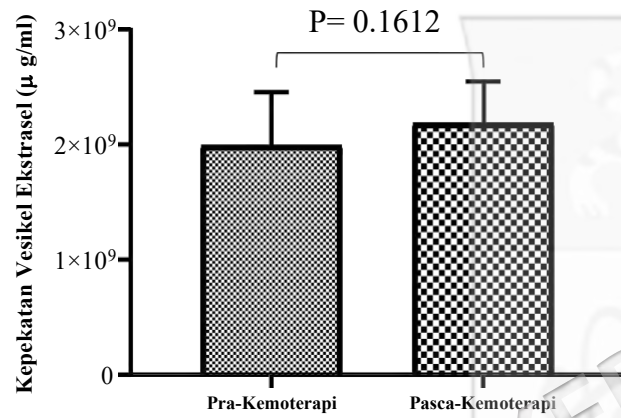
Rajah 4.4 Histogram saiz zarah (d.nm) lawan bilangan (%). (A) EV pesakit kanser usus pra-kemoterapi. (B) EV pesakit kanser usus pasca-kemoterapi. Saiz EV pesakit kanser pasca-kemoterapi adalah bertaburan dan pelbagai berbanding EV pesakit pra-kemoterapi.

4.2.4 Pengkuantitian Vesikel Ekstrasel (EV)

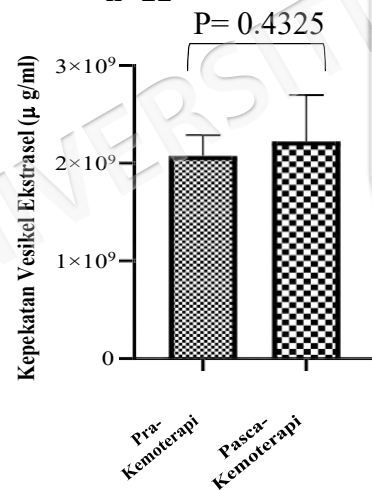
Aktiviti asetilkolinesterase (AchE) telah diaplikasikan untuk mengukur kepekatan atau limpahan EV. Limpahan EV pasca kemoterapi adalah lebih tinggi daripada EV pra kemoterapi. Kepekatan fisiologi EV tidak dapat ditentukan dalam kajian kami dan masih kurang dikaji oleh penyelidik lain tetapi aktiviti asetilkolinesterase (AchE) ini telah membantu kami untuk mengukur kepekatan atau kadar limpahan EV dengan mudah dan pantas.

Analisa untuk asai pengkuantitian EV ini juga telah difokuskan kepada lapan (8) sampel EV yang sepadan. Sampel – sampel EV pra dan pasca kemoterapi untuk seorang pesakit kanser usus yang sama ($n = 8$) adalah seperti ditunjukkan dalam Rajah 4.5. Berdasarkan hasil data asai yang telah dianalisa, kepekatan EV pasca-kemoterapi adalah lebih pekat berbanding EV pra-kemoterapi namun ianya tidak signifikan. Selain itu, limpahan EV adalah berbeza – beza bagi setiap seorang pesakit kanser yang mempunyai sampel pra dan pasca. Sebagai contoh, pengurangan kadar limpahan EV dapat dilihat setelah penderma 4 menerima rawatan kemoterapi sementara EV penderma – penderma lain menjadi lebih pekat pasca rawatan kemoterapi berbanding sebelum rawatan dibuat seperti dalam Rajah 4.5 (C).

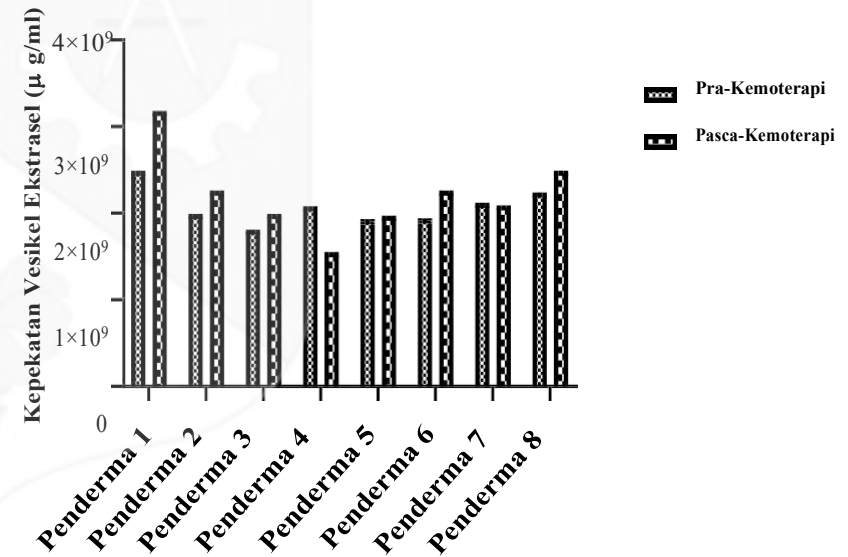
(A)



(B)



(C)

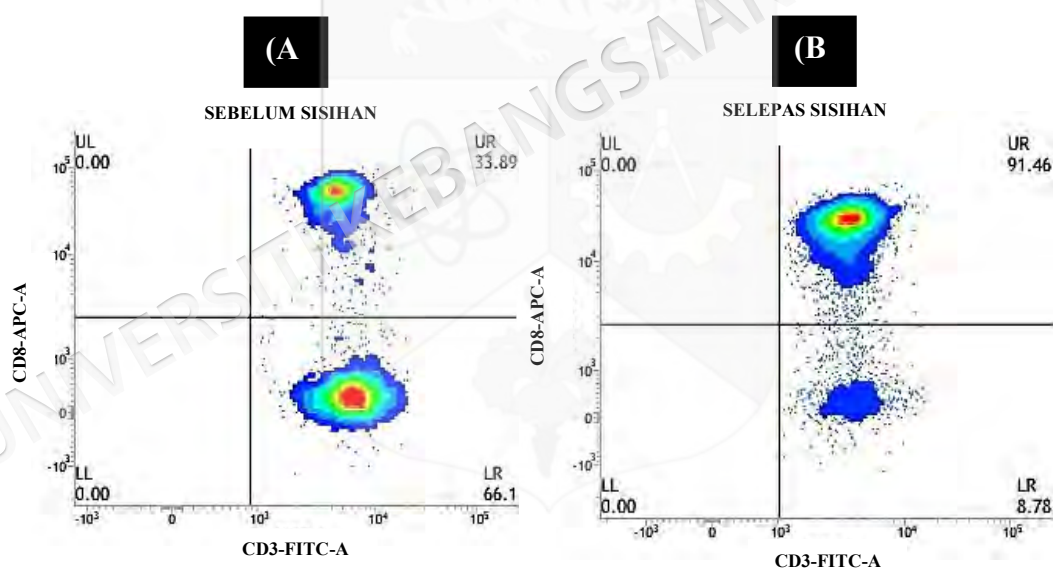


Rajah 4.5 Asai pengkuantitian EV terhadap 2 kumpulan sampel dan sampel EV yang sepadan ($n=8$), (A) Jumlah penuh sampel EV bagi 2 kumpulan sampel ($n=42$). (B) Purata kepekatan sampel EV yang sepadan sahaja ($n=9$). (C) Sampel pesakit kanser usus yang sepadan (individu).

4.3 KO-KULTUR SEL LIMFOSIT T BERSAMA VESIKEL EKSTRASEL (EV)

4.3.1 Penyisihan Sel T Sitotoksik Manusia CD8⁺

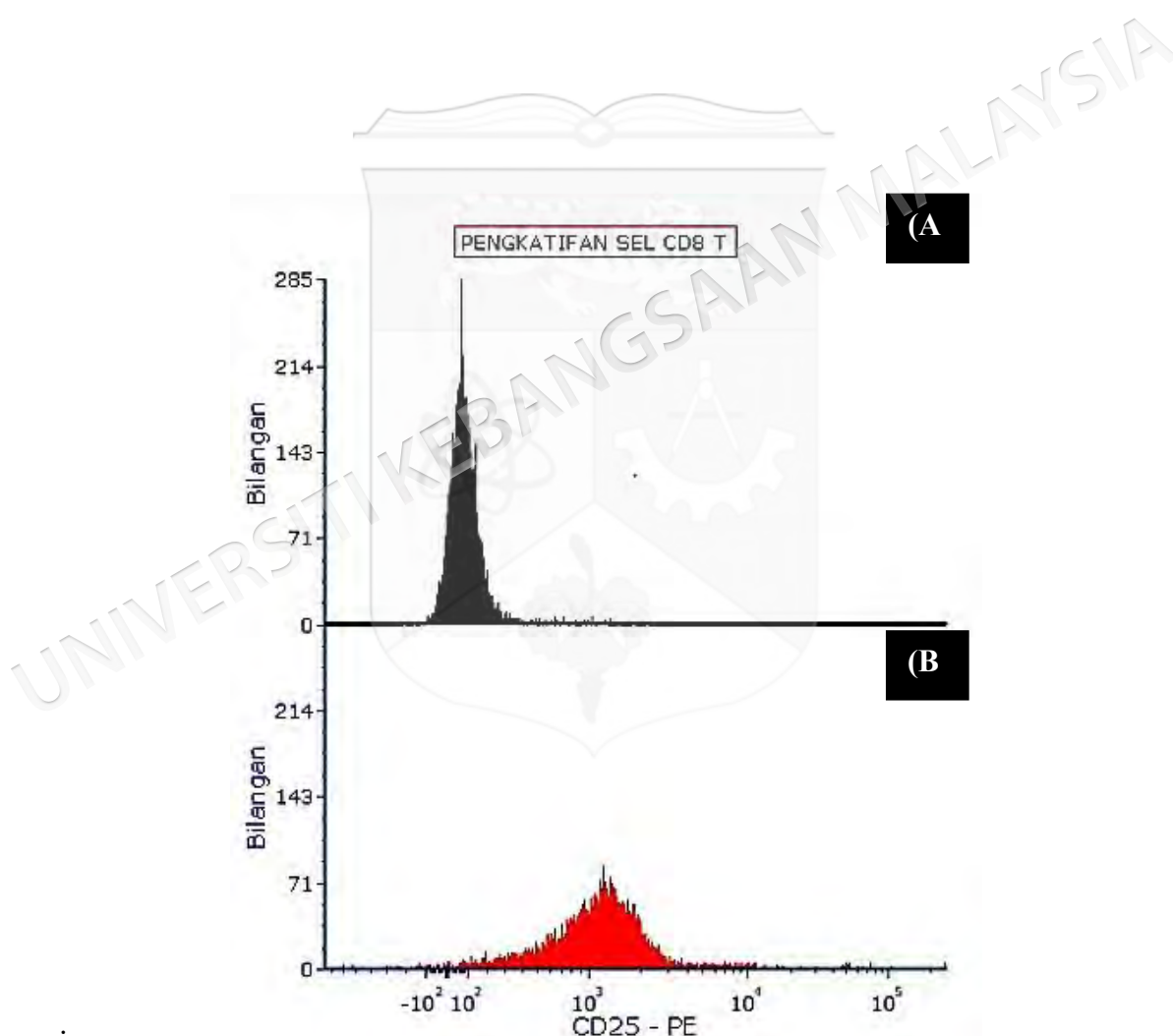
Sel T sitotoksik manusia CD8⁺ telah berjaya disisih daripada penderma yang sihat secara sukarela. Penyisihan sel T bagi kajian ini telah dibuat menggunakan kaedah pemilihan negatif. Ketulenan subset sel T juga telah dipastikan untuk mencapai ketulenan 90% dan ke atas sebelum digunakan sebagai sel efektor untuk asai fungsian dalam kajian ini. Populasi sel T CD3⁺ CD8⁺ yang diperlukan telah dikenalpasti pada sukuan kanan atas seperti dalam Rajah 4.6. Perbezaan peratusan ketulenan subset sel T sebelum dan selepas berjaya disisih juga dapat ditentukan pada sukuan kanan atas. Berdasarkan analisis sitometri aliran, kami telah berjaya menyisih sel limfosit T CD8⁺ dengan ketulenan lebih daripada 90% seperti dalam Rajah 4.6 (B) selepas sisihan.



Rajah 4.6 Gambar rajah kontur sitometri aliran yang menunjukkan peratusan ketulenan subset sel T sebelum (Pre-All) dan selepas (Post-All) disisih setelah diwarnakan dengan antibodi CD8, CD3 dan CD4. Kuadran kanan atas (UR) pada paksi CD8-APC-A lawan CD3-FITC-A adalah kuadran yang difokuskan. (A) sebelum sisihan (B) selepas sisihan.

4.3.2 Pengaktifan Sel T

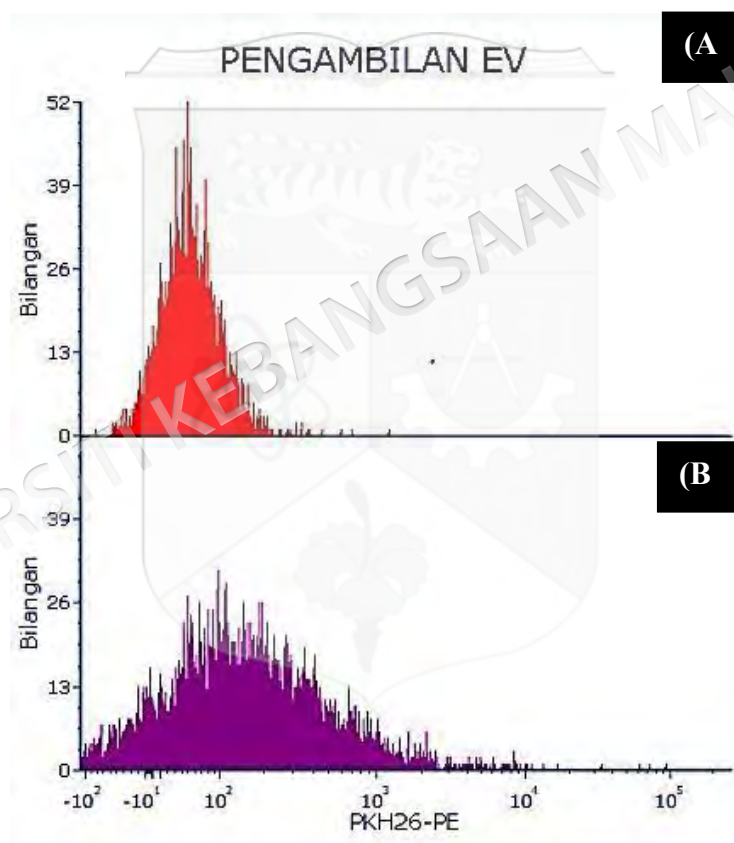
Pengaktifan Sel T secara *in vitro* telah diukur menggunakan sitometri aliran. Plot histogram sitometri aliran adalah seperti yang ditunjuk dalam Rajah 4.7. Kedudukan populasi sel T yang telah diaktifkan telah beranjak daripada kedudukan populasi sel T yang tidak diaktifkan iaitu pada Hari 0 (kawalan) setelah dilabelkan dengan antibodi CD25 PE-A. Kedudukan populasi sel T yang telah beralih tempat pada hari sel dituai untuk asai fungsian imun dijalankan ini menunjukkan bahawa sel T telah berjaya diaktifkan secara *in vitro*.



Rajah 4.7 Histogram sitometri aliran pengaktifan Sel T. Hari 0 (atas) adalah populasi sel yang tidak aktif (kawalan) manakala histogram bawah adalah populasi sel T yang telah diaktifkan dan sel T dituai pada hari asai imun dijalankan.

4.3.3 Pengambilan Vesikel Ekstrasel (EV)

Pengambilan EV juga telah dianalisa menggunakan kaedah sitometri aliran setelah EV diwarnakan dengan pewarna pendarflour PKH26 yang berwarna merah dan dikultur bersama sel limfosit T selama 24 jam. Kedudukan populasi sel T yang telah beralih tempat juga dapat menunjukkan sel T berjaya ambil-naik EV secara *in vitro* berdasarkan plot histogram sitometri aliran dalam Rajah 4.8.



Rajah 4.8 Histogram sitometri aliran pengambilan EV. (A) Histogram populasi sel T bersama EV yang tidak diwarnakan dengan PKH26 (kawalan). (B) Histogram populasi sel T bersama EV yang telah diwarnakan dengan PKH26.

4.4 ANALISIS ASAI FUNGSIAN SEL IMUN BERSAMA VESIKEL EKSTRASEL

4.4.1 Asai Kitar Sel

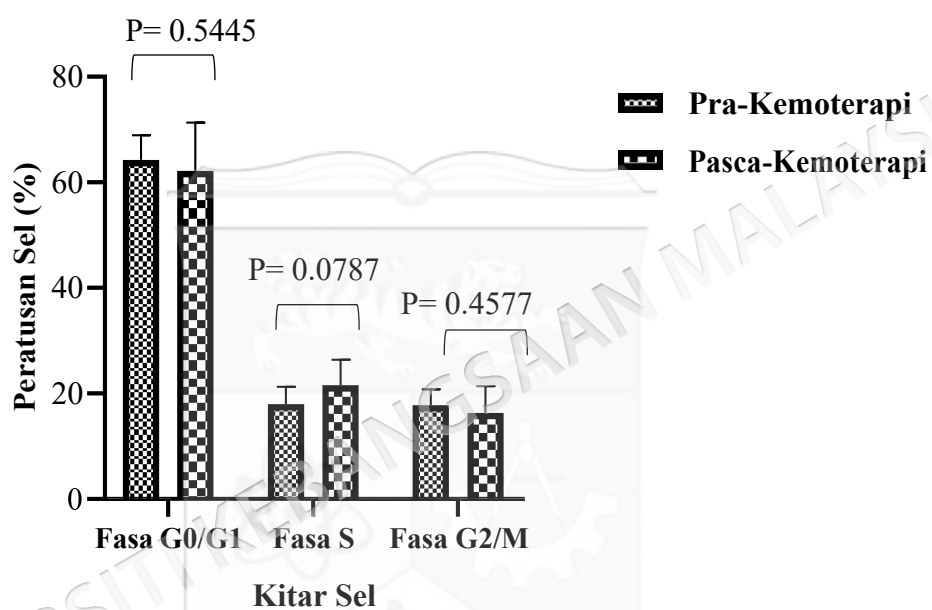
Asai kitar sel merupakan salah satu asai fungsian utama dalam kajian ini. Asai kitar sel telah menunjukkan kebolehan EV meninggalkan kesan terhadap sel imun terutamanya sel limfosit T CD8⁺. Berdasarkan kajian ini, proses kitar sel bagi sel limfosit T didapati agak sedikit terganggu dengan kehadiran EV yang telah dan tidak diaruh oleh kemoterapi daripada serum pesakit kanser usus yang sepadan (n = 9). Pada peringkat awal aktiviti kitar sel, peratusan sel T yang berada dalam Fasa G0/G1 adalah sedikit menurun setelah sel T dieram bersama dengan EV pasca-kemoterapi (P=0.5445) berbanding sel limfosit T CD8⁺ yang dieram bersama EV yang tidak diaruh kemoterapi. Tambahan pula, sel limfosit T CD8⁺ didapati tergencat dalam Fasa S (P=0.0787) dalam kitar sel setelah dieram bersama EV pra- dan pasca-kemoterapi. Justeru itu, mengakibatkan penurunan peratusan sel limfosit T CD8⁺ masuk ke dalam Fasa G2/M (P=0.4577) di mana proses mitosis berlaku seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4.9.

Berdasarkan hasil kajian dalam Rajah 4.10 – 4.12 pula, hampir kesemua penderma EV mempunyai pola peratusan sel bagi setiap fasa – fasa kitar sel yang sama namun mempunyai perbezaan yang tidak ketara. EV pasca-kemoterapi bagi Penderma 2 memberikan kesan yang ketara berbanding sampel – sampel EV yang lain. Hanya sebanyak 6.2 % sel, peratusan paling sedikit memasuki Fasa G2/M setelah dirangsang oleh EV diaruh kemoterapi Penderma 2 berbanding peratusan tertinggi, 21.06 % sel berjaya masuk ke Fasa G2/M setelah dieram bersama EV selepas kemoterapi Penderma 7.

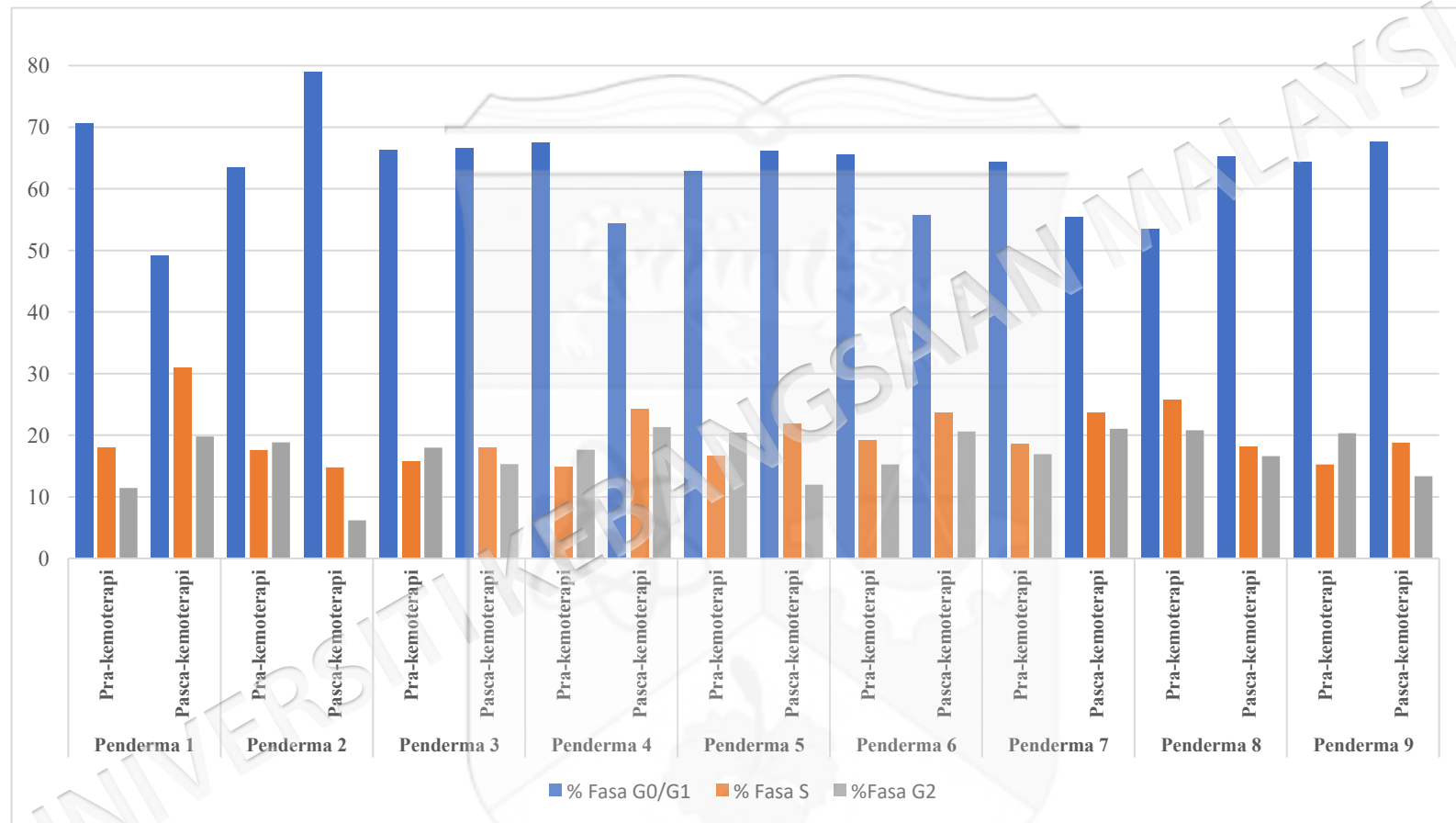
Selain sel limfosit T CD8⁺, asai kitar sel juga telah dilakukan untuk mengkaji kesan fungsian EV terhadap sel Jurkat. Asai ini juga merupakan asai fungsian utama dalam kajian ini. Berdasarkan hasil kajian, proses kitar sel Jurkat didapati telah tergendat di Fasa S setelah dikultur bersama EV diaruh kemoterapi. Tindak balas ini juga telah mengakibatkan penurunan peratusan sel memasuki Fasa G2/M untuk proses mitosis. Hal ini kerana peratusan sel dalam Fasa G0/G1 telah turun hampir separuh daripada jumlah keseluruhannya dalam Fasa S untuk proses sintesis DNA. Perbezaan peratusan sel Jurkat yang telah dikultur bersama EV yang sihat adalah signifikan secara statistiknya berbanding EV diaruh kemoterapi ($P=0.0087$). Oleh itu, hanya sebanyak 5.22% sel Jurkat berjaya memasuki ke Fasa G2/M dalam kitar sel, hampir tiga kali ganda lebih rendah berbanding peratusan sel Jurkat dalam Fasa G2/M (15.27%) hasil ko-kultur bersama EV semalaman (Rajah.4.13).

Rajah 4.13 – 4.16 pula adalah hasil kajian sel Jurkat dieram bersama 9 pasang sampel EV yang sepadan. Hasil kajian menunjukkan purata peratusan sel Jurkat yang memasuki Fasa S turun sebanyak hampir tiga kali lebih rendah berbanding purata peratusan sel Jurkat dalam Fasa G0/G1. Tambahan pula, purata peratusan sel Jurkat yang tergendat dalam Fasa S selepas sel Jurkat dikultur bersama EV yang diaruh kemoterapi berbanding sebelum diaruh kemoterapi adalah signifikan pada nilai $p=0.0313$. Kesemua penderma – penderma yang sepadan mempunyai pola penurunan peratusan sel yang berjaya masuk ke Fasa G2/M dan proses kitar sel tergendat dalam Fasa S. Selain itu, hanya 13.69% sel Jurkat berjaya memasuki Fasa G2/M setelah distimulasi oleh EV yang diaruh kemoterapi Penderma 9. Peratusan ini adalah yang paling sedikit berbanding peratusan tertinggi, 21.41% sel memasuki ke Fasa G2/M selepas dieram bersama EV selepas kemoterapi Penderma 4.

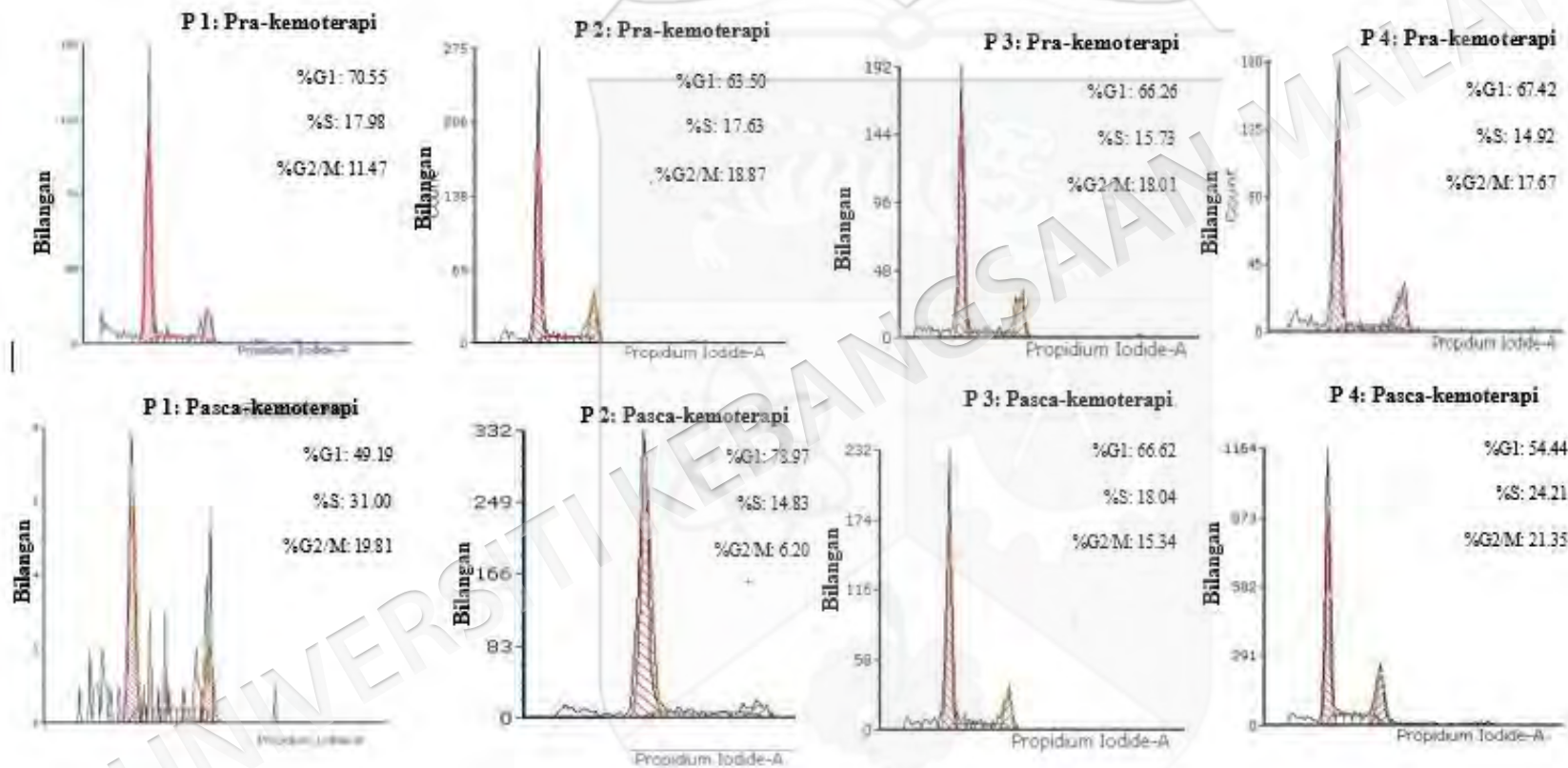
Namun, kesan kehadiran EV terhadap proses kitar sel bagi sel limfosit T CD8⁺ adalah tidak signifikan untuk perbandingan antara pra- dan pasca-kemoterapi bagi setiap fasa dalam asai kitar sel yang telah dijalankan. Peratusan sel yang berjaya memasuki Fasa S dan Fasa G2/M dalam kitar sel ini kemudiannya dikaji dengan lebih mendalam untuk mengkaji kebolehan EV diaruh kemoterapi mengakibatkan peningkatan kadar kematian sel imun. Asai fungsian lain seperti Asai Apoptosis Annexin V adalah diperlukan untuk menyokong dapatan kajian asai ini.



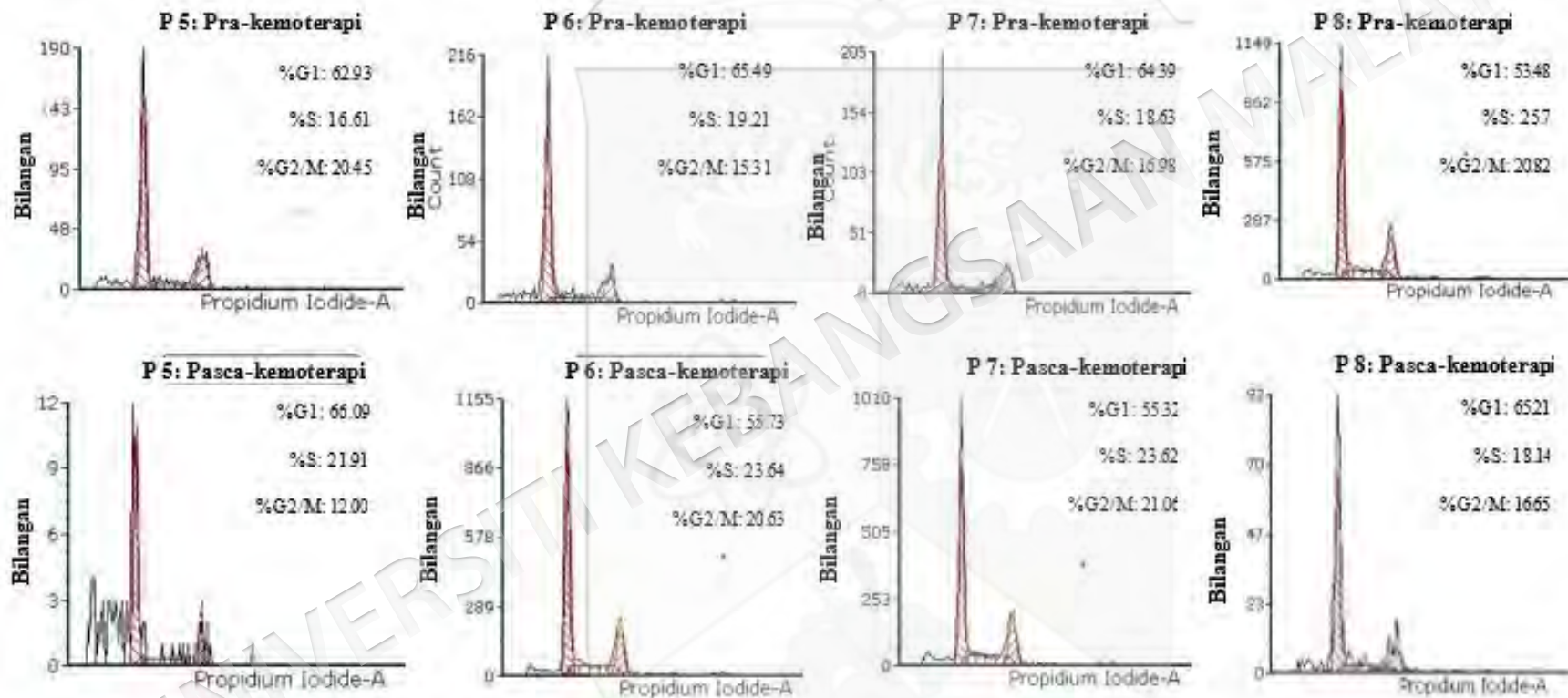
Rajah 4.9 Purata peratusan sel (%) untuk Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (n = 9) yang dikultur bersama sel limfosit T CD8⁺.



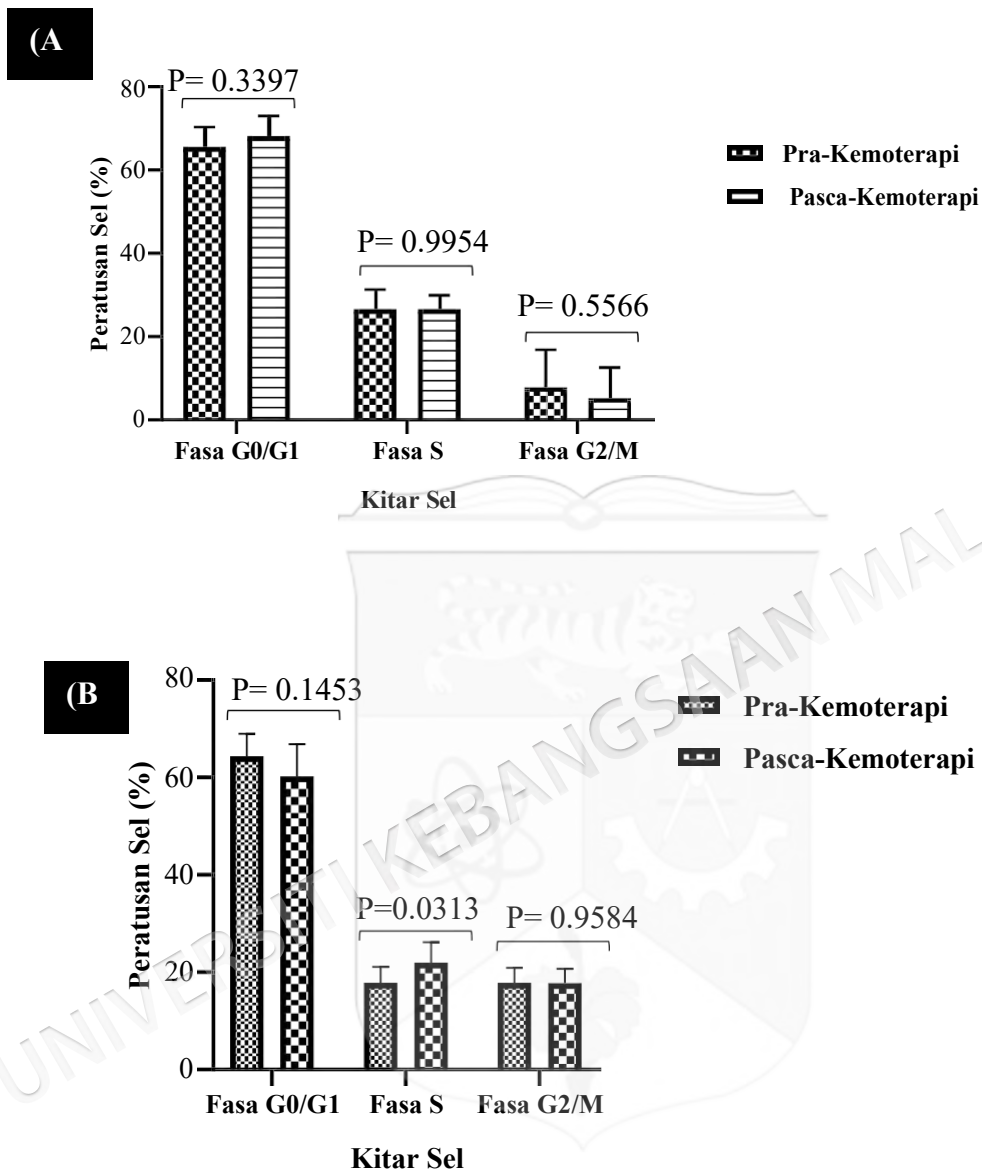
Rajah 4.10 Graf bar Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (n = 9) mengikut individu setelah dieram bersama sel limfosit T CD8⁺.



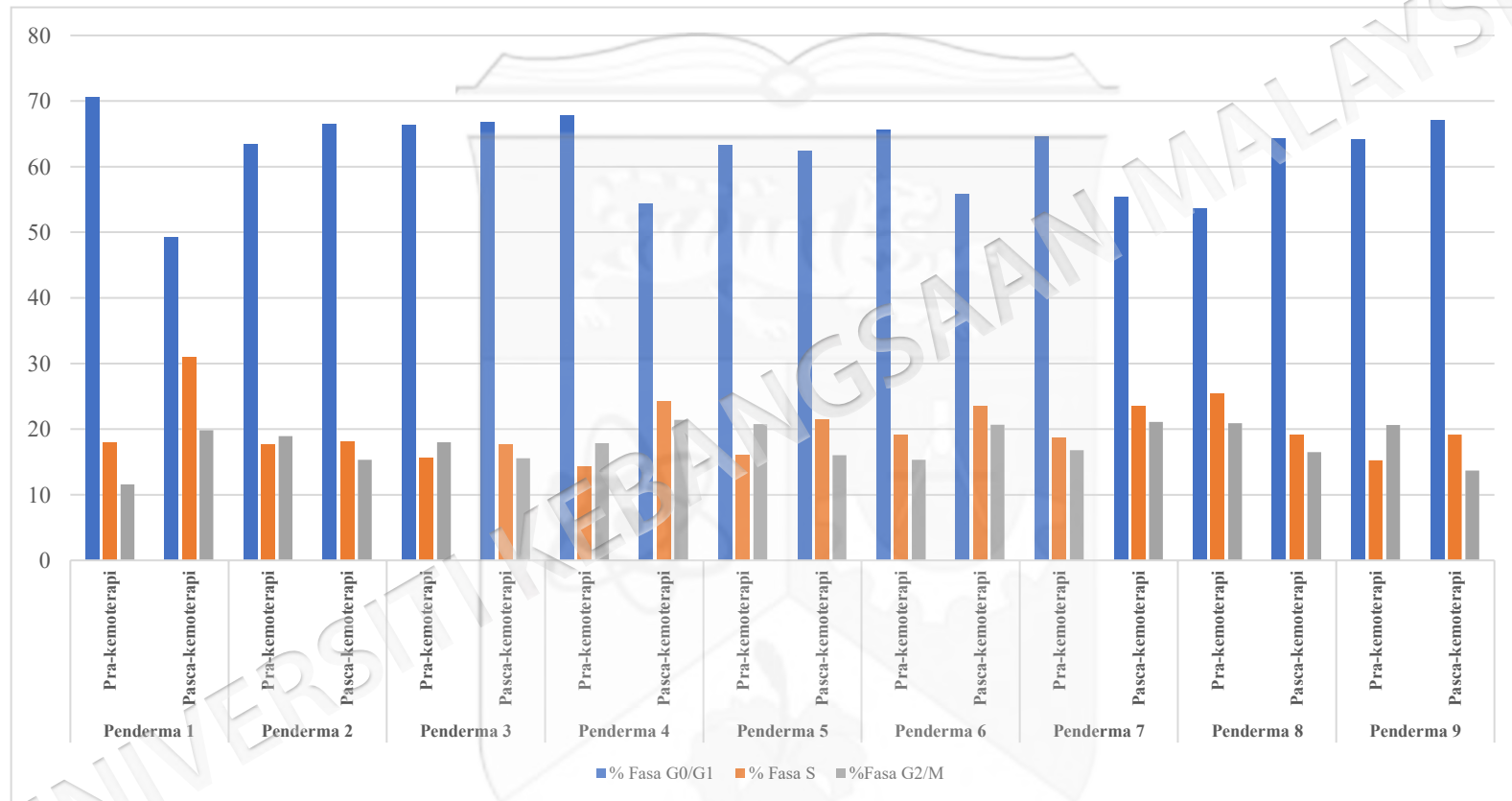
Rajah 4.11 Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 1 – 4) setelah dikultur bersama sel limfosit T CD8⁺.



Rajah 4.12 Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 5 – 8) setelah dikultur bersama sel limfosit T CD8⁺.

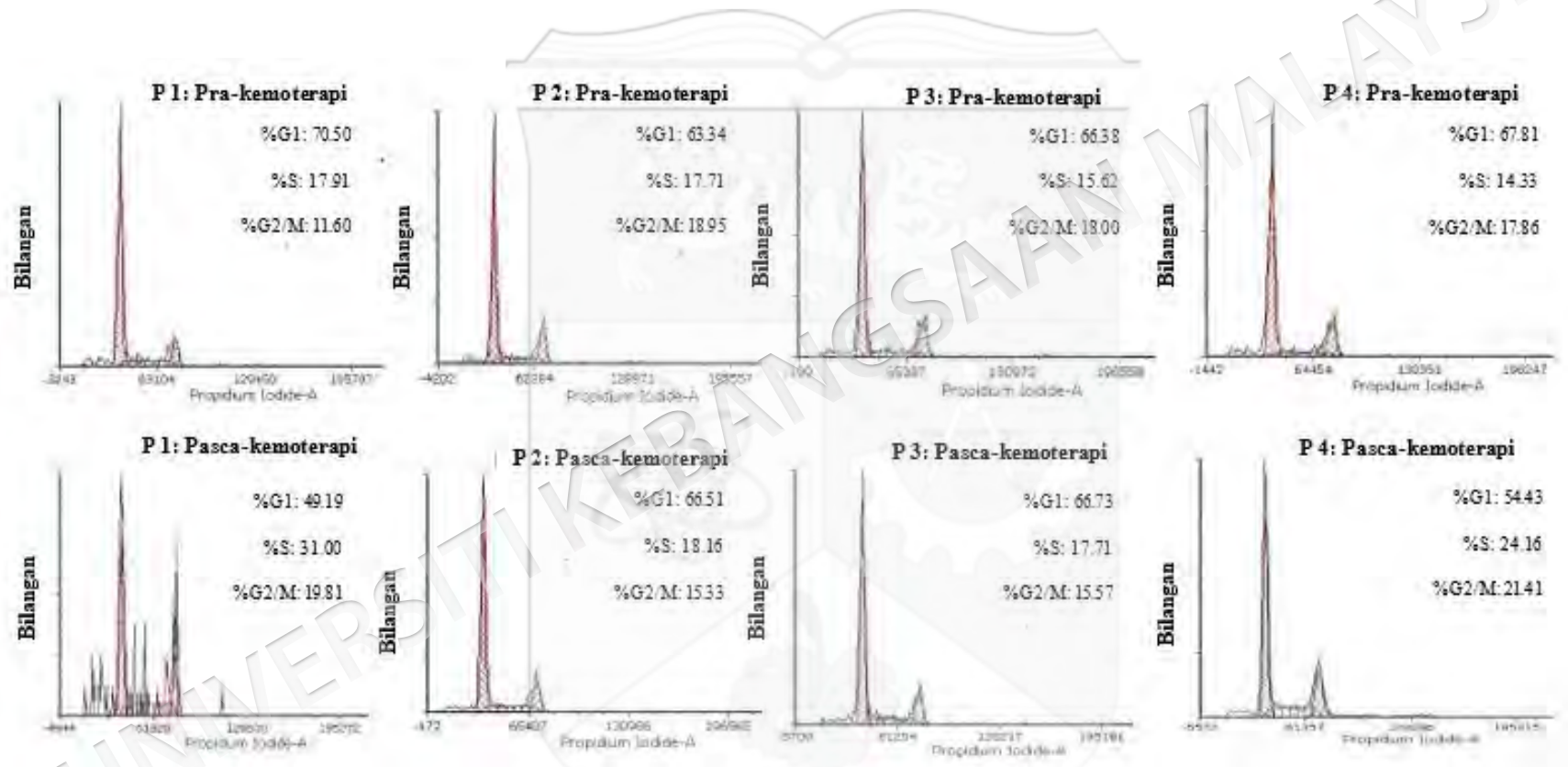


Rajah 4.13 (A) Asai Kitar Sel terhadap 2 kumpulan sampel EV yang dikultur bersama sel Jurkat selama 24 jam. (B) Purata peratusan sel (%) untuk Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan ($n = 9$) yang dikultur bersama sel Jurkat

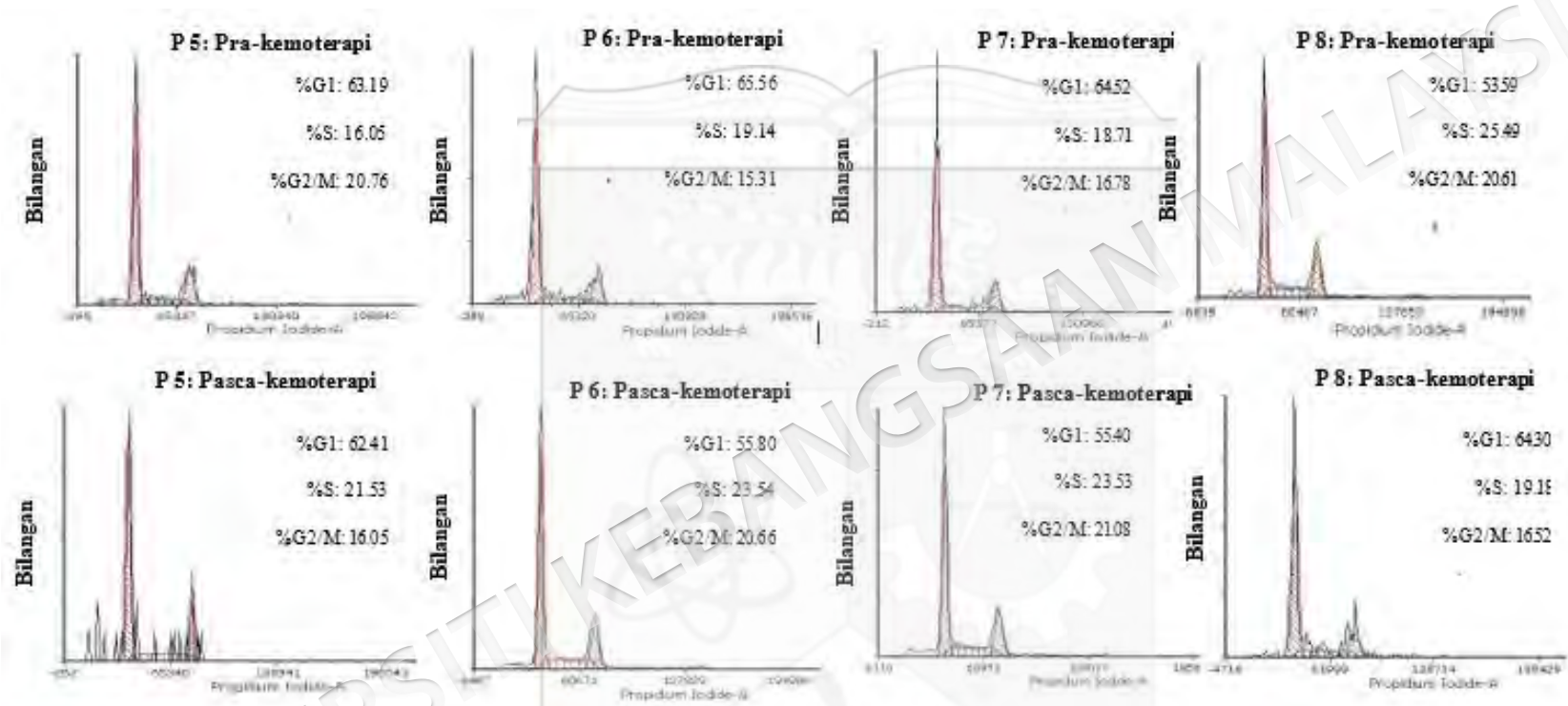


Rajah 4.14

Graf bar Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (n = 9) mengikut individu setelah dieram bersama sel Jurkat.



Rajah 4.15 Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 1 – 4) setelah dikultur bersama sel Jurkat.



Rajah 4.16 Histogram sitometri aliran Asai Kitar Sel terhadap sampel EV yang sepadan (Penderma 5 – 8) setelah dikultur bersama sel Jurkat.

4.4.2 Asai Apoptosis Annexin V-FITC

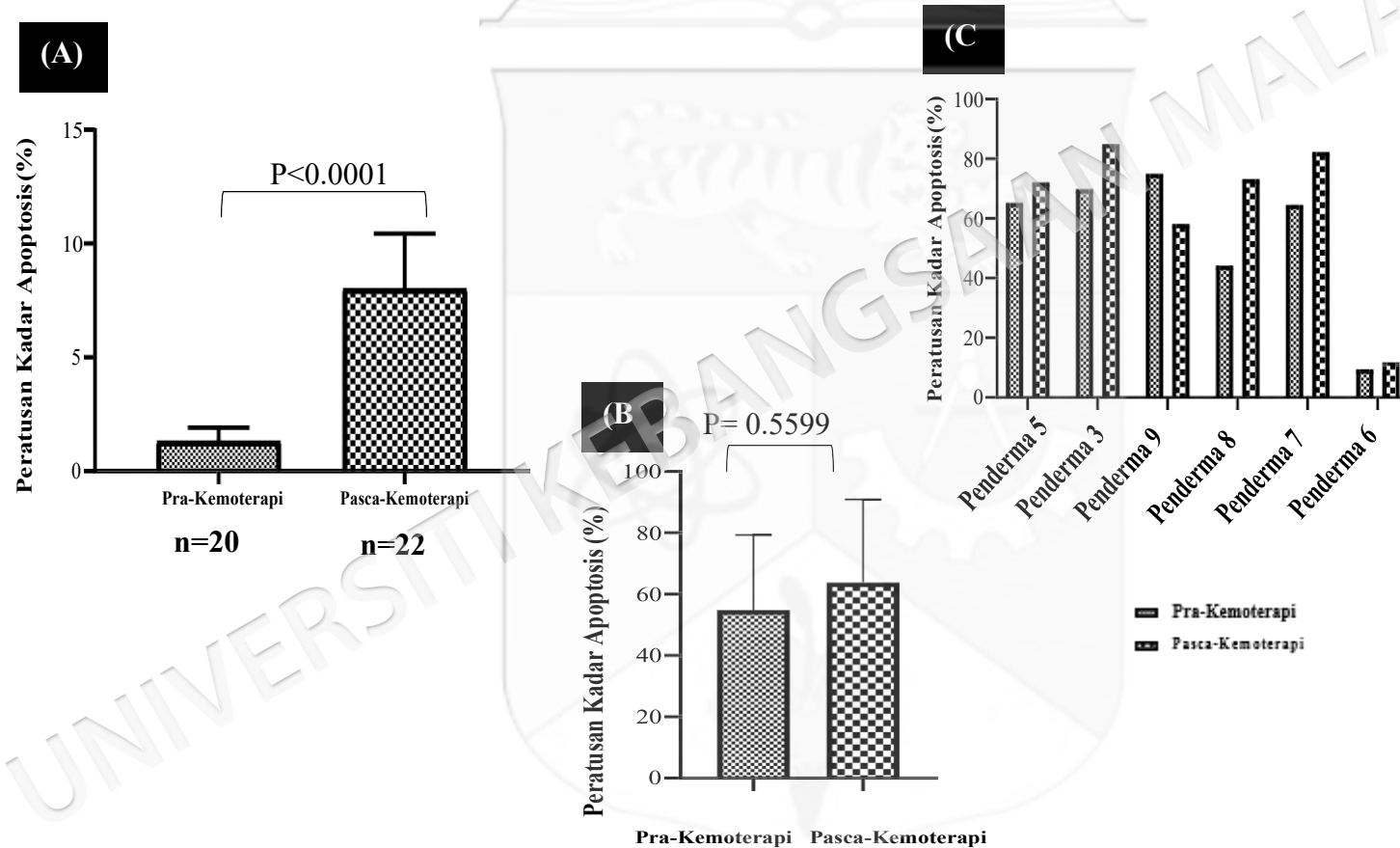
Asai apoptosis Annexin V-FITC telah dilakukan terhadap sel limfosit T CD8⁺ setelah dikultur bersama EV selama 24 jam untuk menilai fungsi biologi EV terhadap sel limfosit T CD8⁺. Berdasarkan data yang terkumpul menggunakan sitometri aliran, peningkatan kadar kematian sel adalah signifikan untuk setiap perbandingan antara kumpulan sampel EV. EV selepas kemoterapi telah memberi kesan terburuk terhadap kadar kematian sel limfosit T CD8⁺ berbanding EV yang tidak diaruh kemoterapi seperti histogram yang ditunjukkan dalam Rajah 4.17 (A).

Berdasarkan peratusan kadar apoptosis yang telah dianalisa, EV pasca-kemoterapi mempunyai kadar kematian sel yang tinggi berbanding EV yang tidak diaruh oleh kemoterapi ($P < 0.0001$) seperti dalam Rajah 4.18 (A).

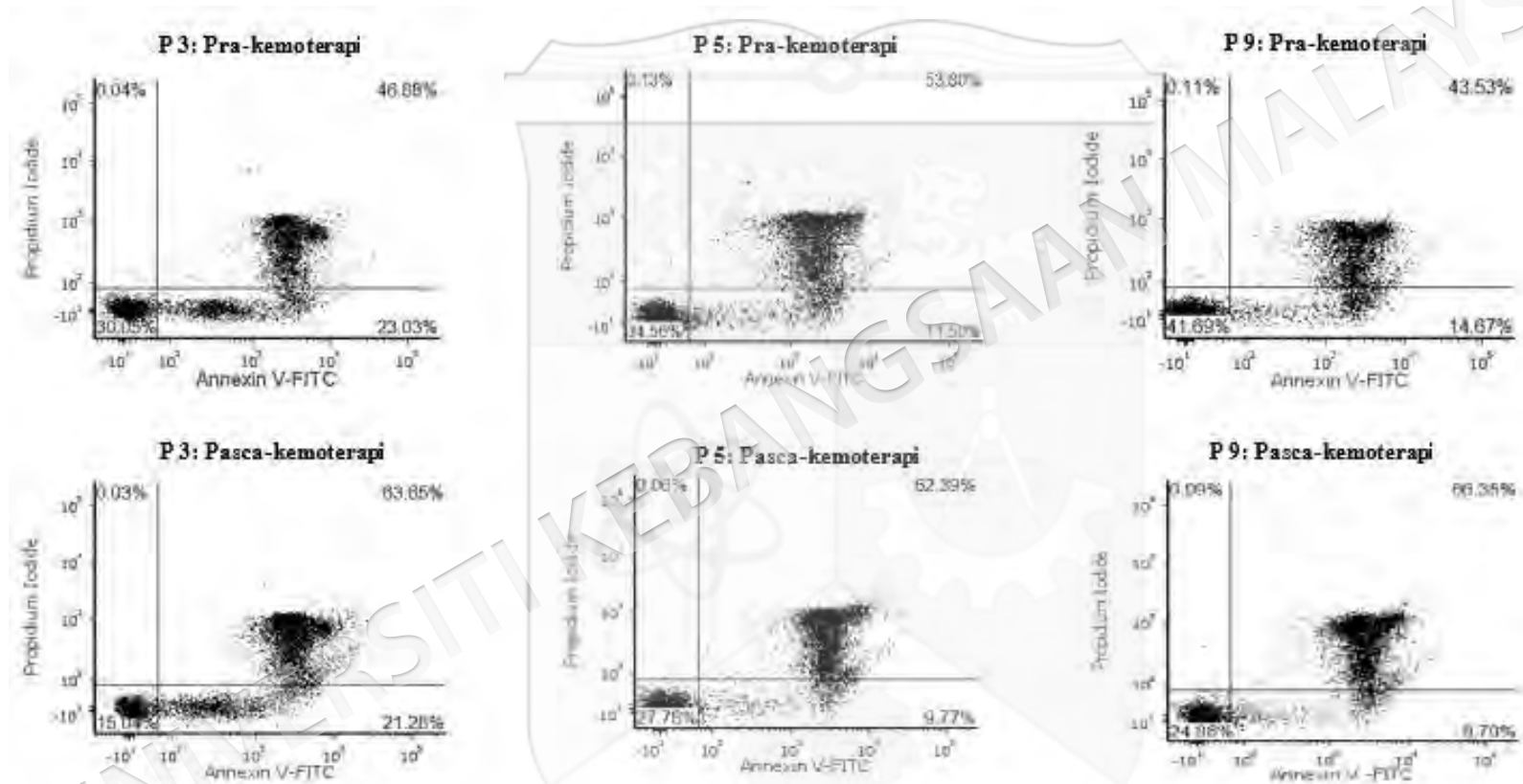
Perbandingan peratusan kadar sel apoptosis juga telah dilakukan terhadap enam (6) pasang sampel EV yang sepadan ($n = 6$). Bagaimanapun, peningkatan purata kadar kematian sel limfosit T CD8⁺ selepas diaruh bersama EV selepas kemoterapi adalah tidak signifikan ($P = 0.5599$). Setiap sampel – sampel yang sepadan mempunyai pola peningkatan kadar kematian sel selepas diaruh dengan EV selepas kemoterapi kecuali Penderma 9 seperti histogram dalam Rajah 4.17 (C).

Asai apoptosis Annexin V-FITC ini juga diaplikasikan untuk menilai kematian sel Jurkat setelah diaram dengan EV sebelum pemeriksaan fungsi biologi EV pada sel Jurkat dianalisa. Berdasarkan hasil kajian, Tambahan pula, sel Jurkat yang telah dikultur bersama EV diaruh kemoterapi mengalami peningkatan kadar apoptosis sel berbanding kumpulan sampel yang lain termasuk EV yang tidak diaruh kemoterapi pada nilai $p < 0.0001$.

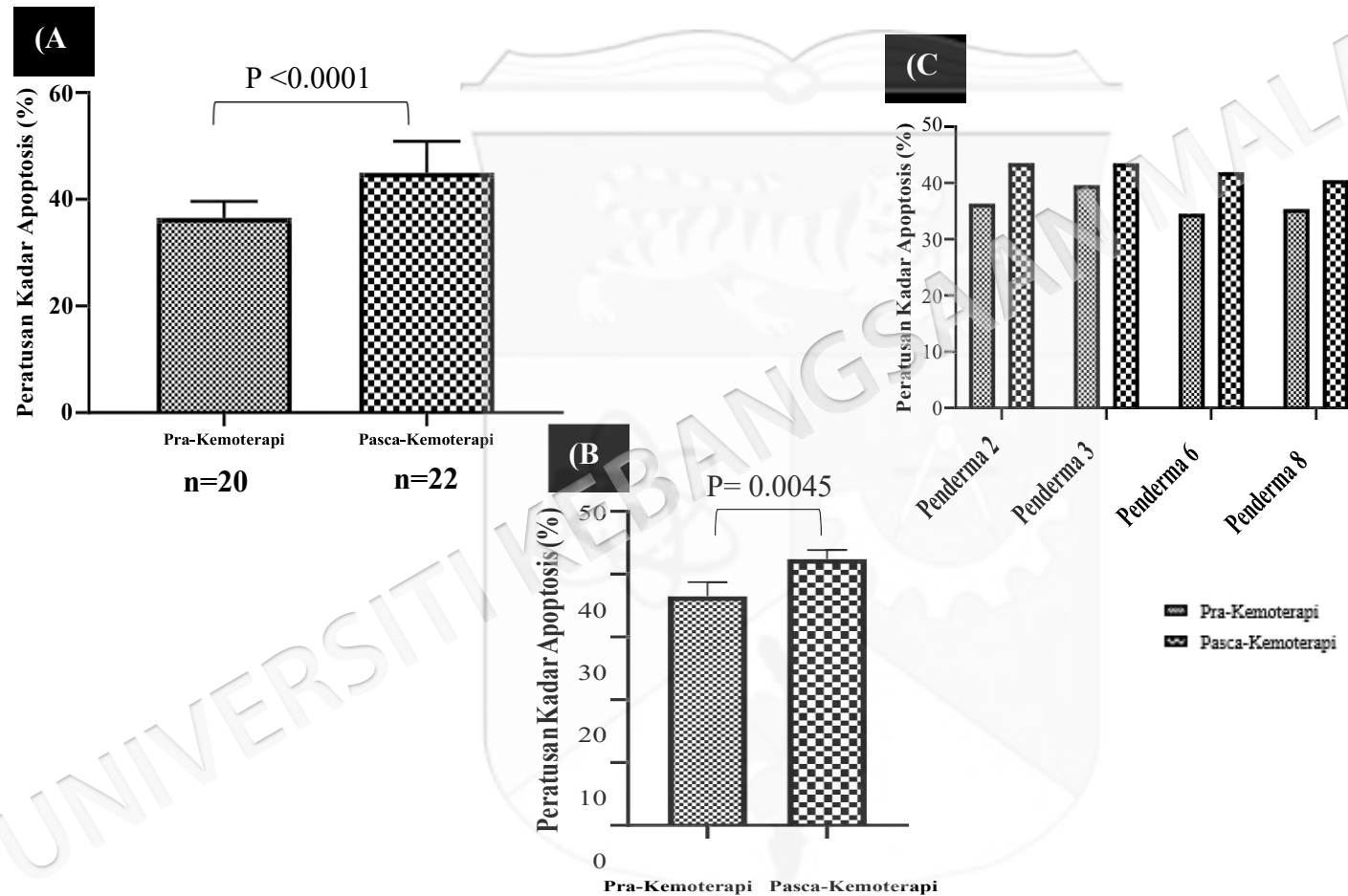
Tambahan pula, peningkatan purata peratus kadar apoptosis sel Jurkat selepas dikultur bersama empat (4) sampel penderma EV adalah ketara ($P=0.0045$) setelah perbandingan antara sel Jurkat dikultur bersama EV yang diaruh kemoterapi juga sebelum diaruh kemoterapi dianalisa. Peningkatan kadar apoptosis juga dapat dilihat setelah sel Jurkat diaram bersama EV selepas kemoterapi terhadap keempat – empat penderma EV secara individu seperti dalam Rajah 4.19 (C). Kadar peningkatan kematian sel Jurkat selepas diaram bersama EV selepas kemoterapi Penderma 2 adalah paling tinggi, 7.19% perbezaannya berbanding diaram EV tidak diaruh kemoterapi.. Manakala, EV selepas kemoterapi penderma 3 kurang memberi kesan terhadap kematian sel Jurkat, peratusan kadar kematian sel Jurkat hanya naik sebanyak 3.88% berbanding diaram bersama EV yang tidak diaruh kemoterapi.



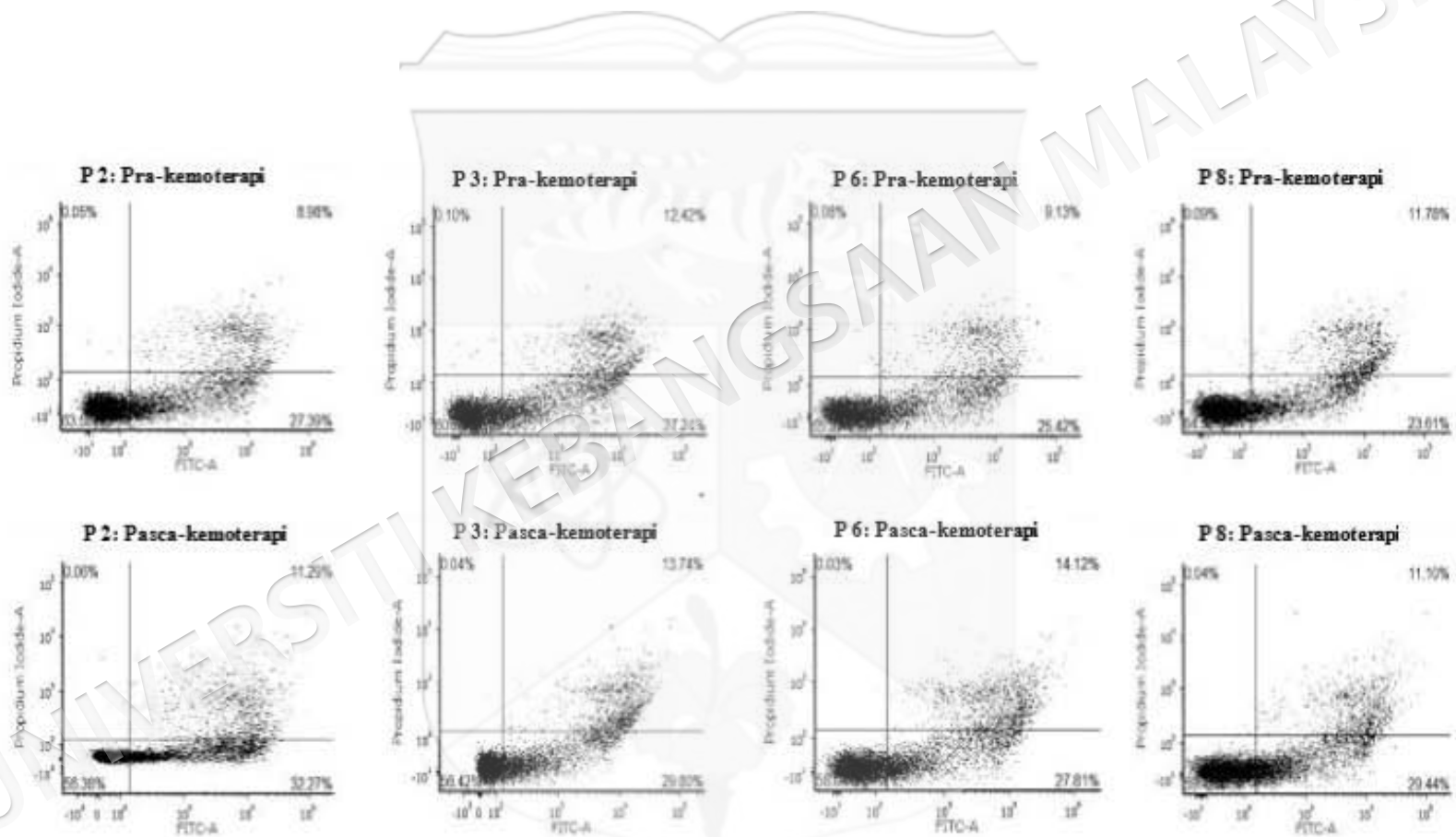
Rajah 4.17 Graf bar (A) kadar pengikatan Annexin V juga peratusan kadar apoptosis sel limfosit T CD8⁺ yang telah diaktifkan dan dieram bersama 2 kumpulan EV.(B) Purata peratusan kadar apoptosis (%) bagi 6 pasang sampel EV yang sepadan. (C) Peratusan kadar apoptosis (%) bagi setiap pasang EV yang sepadan (individu)



Rajah 4.18 Contoh histogram sitometri aliran asai apoptosis Annexin V terhadap 3 pasang EV sedapan yang telah dikultur bersama sel limfosit T CD8⁺



Rajah 4.19 Histogram kadar pengikatan Annexin V pada sel Jurkat yang telah diaktifkan dan dieram bersama 2 kumpulan EV pesakit – pesakit barah usus. (B) Purata peratusan kadar apoptosis (%) bagi 4 pasang sampel EV yang sepadan. (C) Peratusan kadar apoptosis (%) bagi setiap pasang EV yang sepadan (individu)



Rajah 4.20 Contoh histogram sitometri aliran Asai Apoptosis Annexin V terhadap 4 pasang EV sepadan yang telah dikultur bersama sel Jurkat selama 24 jam.

4.5 ANALISIS QRT-PCR DAN SITOKIN

4.5.1 Analisis qRT-PCR

Sel limfosit T CD8⁺ yang dikultur bersama EV semalaman pula telah dituai dan dipalet untuk pengekstrakan RNA, sintesis cDNA dan ujian saringan gen berkaitan anergi sel T dan tolerans imun manusia melalui kaedah qRT-PCR. Kesemua gen – gen telah dianalisa mengikut 3 kumpulan sampel; PBS (kawalan), sebelum terapi dan selepas terapi.

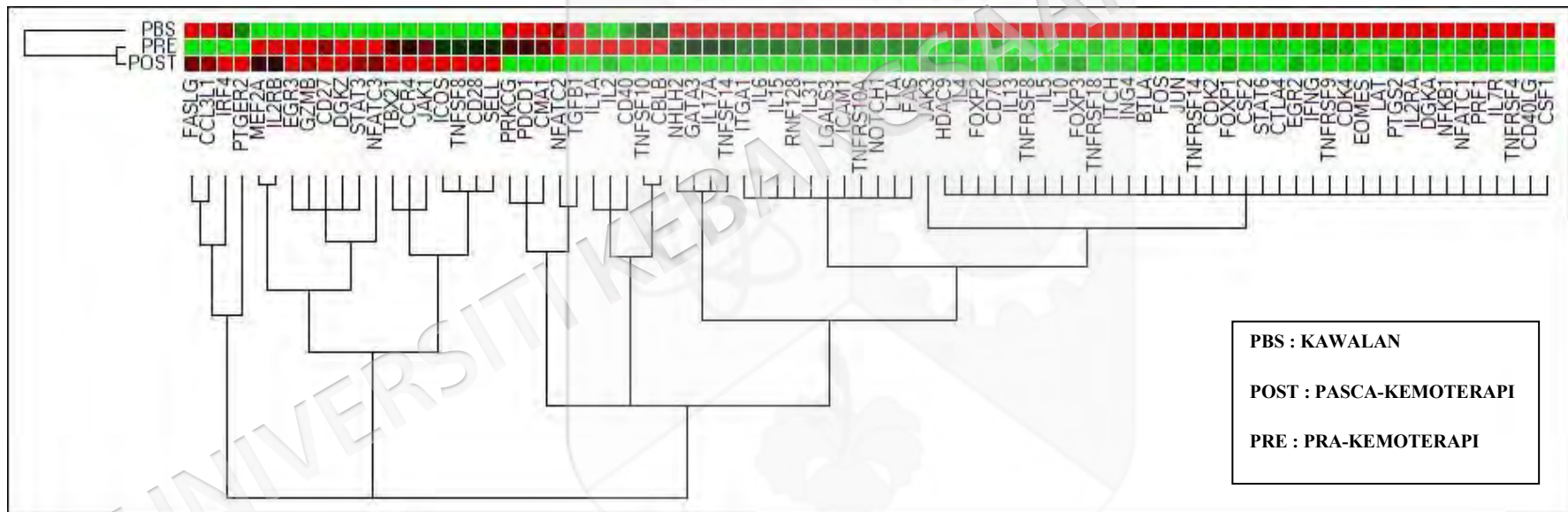
Sejumlah 84 gen telah dinormalisasikan kepada 8 gen rujukan iaitu *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PPIA*, *RPL13A* dan *RPLP0*. Ekspresi relatif dikira dengan menggunakan kaedah $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Rajah 4.22 menunjukkan graf bar tentang lipat ganda perubahan bagi 16 gen terpilih dan berkaitan dengan sitokin dan kematian sel.

Hasil pengesahan melalui qRT-PCR, terdapat 9 gen (*CD40*, *EGR3*, *IL1A*, *IL2*, *IL2RB*, *JAK1*, *NFATC3*, *STAT3* dan *TBX2*) daripada saringan sebanyak 84 gen diregulasi lebih tinggi sebelum terapi berbanding kawalan. Manakala, sebahagian besar daripada jumlah gen disaring mempunyai tahap regulasi gen yang lebih rendah. Tambahan pula, hanya 7 gen (*CD28*, *EGR3*, *JAK1*, *SELL*, *STAT3*, *TBX2* dan *TNFSF8*) daripada 84 gen diekspres lebih tinggi selepas terapi berbanding kawalan. Terdapat 8 gen (*CD40LG*, *FOXP1*, *IL13*, *IRF4*, *JAK3*, *PTGER2*, *PTGS2* dan *TNFRSF8*) pula telah dikenalpasti diekspres lebih tinggi setelah perbandingan antara sebelum terapi dan selepas terapi dengan majoriti gen – gen tidak mengalami perubahan ekspresi atau diregulasi lebih rendah.

Terdapat 5 gen iaitu Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (*PTGS2*), Fos Proto-Oncogene (*FOS*), Forkhead Box P2 (*FOXP2*), Interleukin 10 (*IL10*) dan Interleukin 7 Receptor (*IL7R*) telah disahkan mempunyai nilai ekspresi yang signifikan, nilai p (<0.05) bagi kumpulan sebelum terapi berbanding kawalan. Manakala, terdapat 7 gen pula telah disahkan mempunyai nilai ekspresi yang signifikan, nilai p (<0.05) bagi kumpulan selepas terapi berbanding kawalan. Kesemua 7 gen ini adalah gen yang sama, 4 gen yang signifikan sebelum terapi kecuali *IL10* termasuk 3 lagi gen yang lain iaitu Lymphotoxin Alpha (*LTA*), Early Growth Response 3 (*EGR3*) dan Fas Cell Surface Death Receptor (*FAS*). Berdasarkan data yang telah dianalisa, ekspresi gen *PTGS2* selepas terapi mempunyai nilai p yang paling signifikan berbanding semua gen yang lain ($P=0.008438$). Ekspresi gen *FAS* selepas terapi pula diekspresi paling kurang signifikan pada nilai $p=0.045293$. Menariknya, hanya gen *EGR3* diekspresi lebih tinggi secara ketara berbanding kawalan pada nilai $p=0.036546$ sementara gen – gen lain diekspresi lebih rendah berbanding kawalan, sebelum dan selepas terapi.

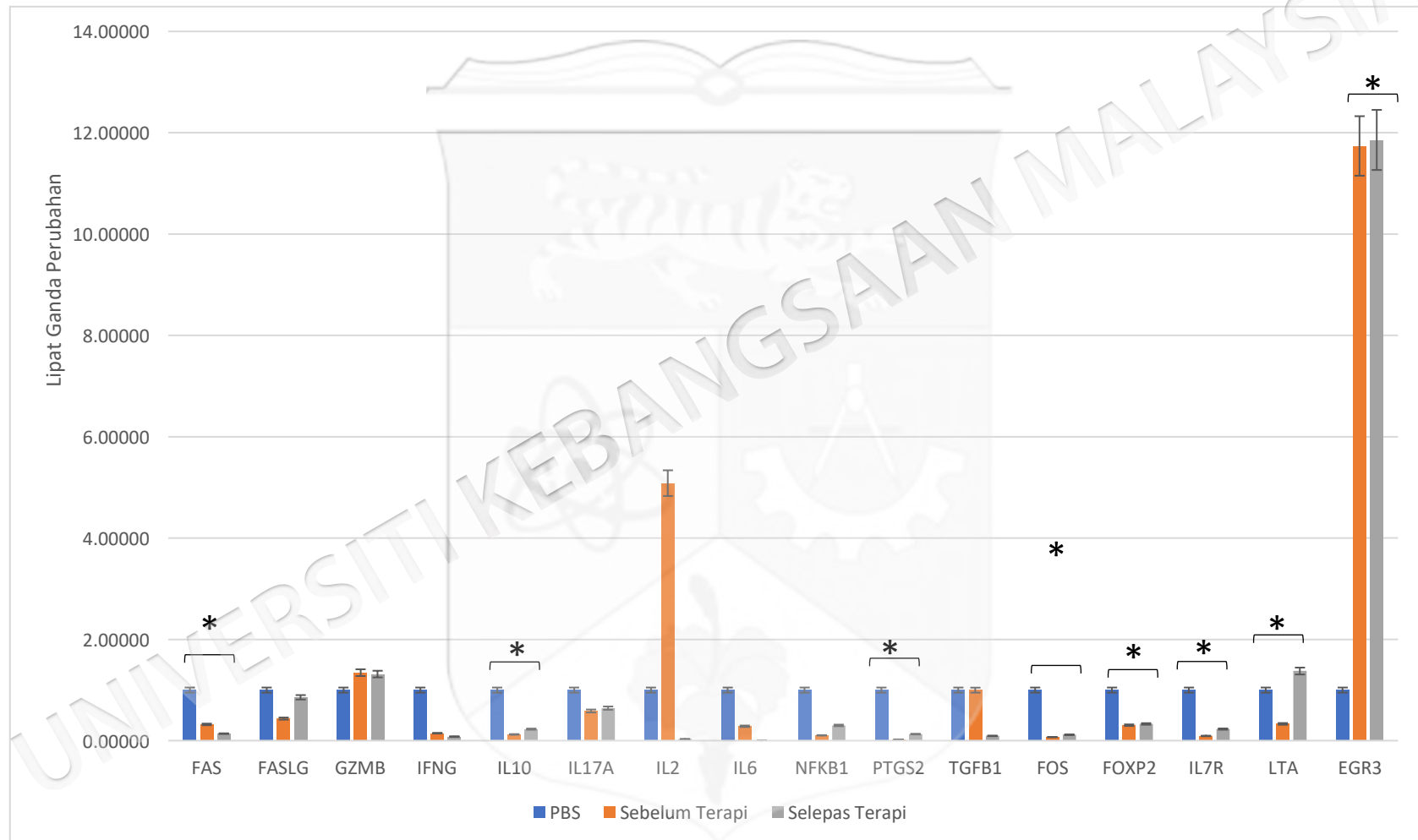
Hasil analisa qRT-PCR ini juga telah mendedahkan gen berkaitan kematian sel dan sitokin seperti Interleukin 2 (*IL2*) dan Granzyme B (*GZMB*) diregulasi secara positif selepas kemoterapi masing – masing dengan nilai 1.30386 dan 1.31604. Walaubagaimanapun, tahap regulasi gen – gen ini disahkan tidak mengalami perubahan berbanding kawalan dengan masing – masing juga mempunyai nilai $p=0.386877$ dan 0.387677.

Oleh itu, dapatan daripada hasil analisa qRT-PCR ini juga perlu dikaji dengan lebih mendalam dengan memprofilkan sitokin yang telah dirembeskan keluar oleh sel limfosit T CD8⁺ menggunakan sampel ko-kultur sel bersama EV yang sama untuk pengesanan lanjut.



Rajah 4.21

Klustergram bagi 3 kumpulan sampel hasil Ujian Saringan Gen Anergik Sel T dan Tolerans Imun Manusia melalui qRT-PCR. Indikator merah menunjukkan ekspresi tinggi manakala indikator hijau menunjukkan ekspresi rendah.



Rajah 4.22 Graf bar mengenai lipat ganda perubahan bagi 16 gen terpilih yang berkaitan dengan sitokin dan kematian sel.

4.5.2 Pemprofilan Sitokin

Seterusnya, supernatan yang telah dikumpul daripada ko-kultur sel T CD8⁺ bersama EV digunakan untuk pemprofilan sitokin pula. Ekspresi sitokin telah diukur menggunakan sitometri aliran dan dianalisa secara individu seperti dalam Rajah 4.23 dan Rajah 4.24.

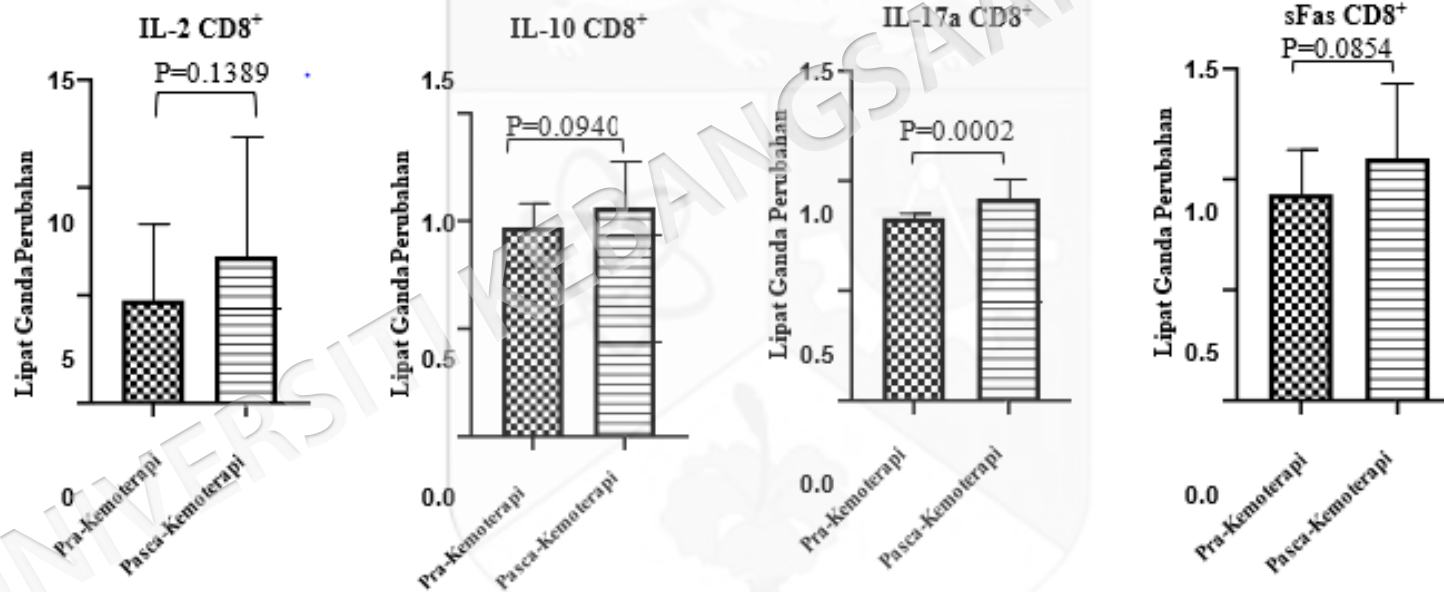
Hasil kajian menunjukkan perbezaan ekspresi sitokin – sitokin berkaitan pengaktifan sel imun dan kematian sel secara signifikan selepas sel limfosit T CD8⁺ dieram bersama EV selepas kemoterapi. Berdasarkan lipat ganda perubahan, sitokin IL-2 merupakan sitokin yang paling banyak dirembeskan berbanding sitokin – sitokin yang lain. Sitokin IL-2 yang dirembes keluar oleh sel limfosit T CD8⁺ meningkat selepas dikultur bersama EV diaruh kemoterapi berbanding EV tidak diaruh kemoterapi pada nilai $p=0.1389$.

Sitokin Inteferon-gamma (IFN- γ) pula sitokin kedua tertinggi kadar rembesannya berdasarkan lipat ganda perubahan seperti dalam Rajah 4.24. Peningkatan ekspresi IFN- γ oleh sel limfosit T CD8⁺ adalah signifikan setelah sel T dieram bersama EV diaruh kemoterapi ($P=0.0092$). Sitokin – sitokin berkaitan dengan kematian sel seperti sFasL dan Granzyme B juga dirembeskan secara signifikan oleh sel limfosit T CD8⁺ dengan nilai P terlaras pada 0.0263 untuk sFasL dan 0.0002 untuk Granzyme B setelah distimulasi oleh EV diaruh kemoterapi.

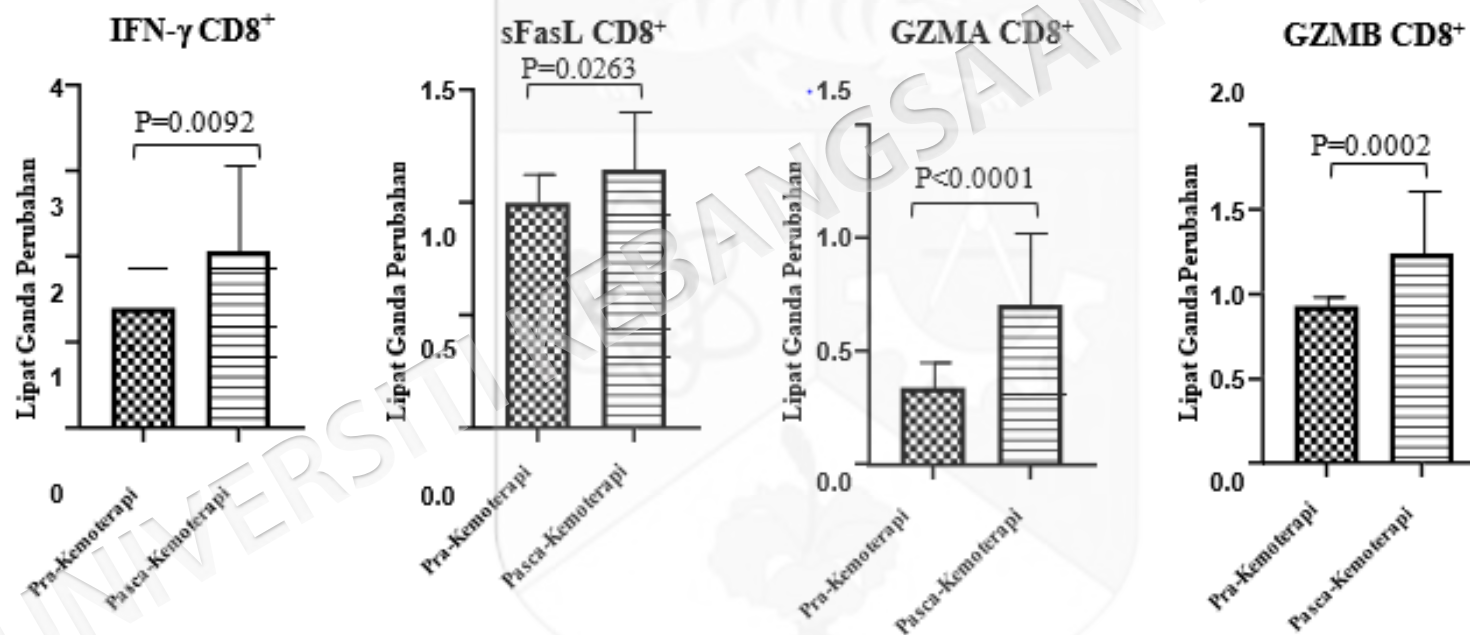
Ekspresi sitokin dirembes keluar oleh sel Jurkat selepas rangsangan 2 kumpulan sampel Vesikel ekstrasel; EV diaruh kemoterapi dan EV tidak diaruh kemoterapi juga telah diukur. Lapan (8) sitokin (IL-2, IL-10, sFas, sFasL, IL-17a, IFN- γ , Granzyme A dan Granzyme B) dirembeskan secara berbeza-beza dan signifikan semasa rangsangan EV terhadap sel Jurkat. Objektifnya adalah untuk mencari hubung kait antara rembesan sitokin oleh sel Jurkat ini dengan aktiviti apoptosis mereka selepas dikultur bersama EV yang diaruh dan tidak diaruh kemoterapi.

Hasil kajian (Rajah 4.25 dan Rajah 4.26) menunjukkan bahawa sitokin IL-2 telah dirembes keluar oleh sel Jurkat selepas dikultur bersama EV diaruh kemoterapi dengan jumlah yang ketara lebih kurang berbanding sampel EV tidak diaruh kemoterapi ($P=0.1576$). Granzyme A dan Granzyme B pula mempunyai profil sitokin yang sama setelah perbandingan antara kedua – dua sampel EV. Penurunan ekspresi Granzyme B rangsangan EV diaruh kemoterapi adalah signifikan pada nilai $p=0.0014$ namun penurunan tahap ekspresi Granzyme A yang dirembes keluar oleh sel Jurkat pula tidak signifikan hasil stimulasi EV diaruh kemoterapi ($P=0.0645$).

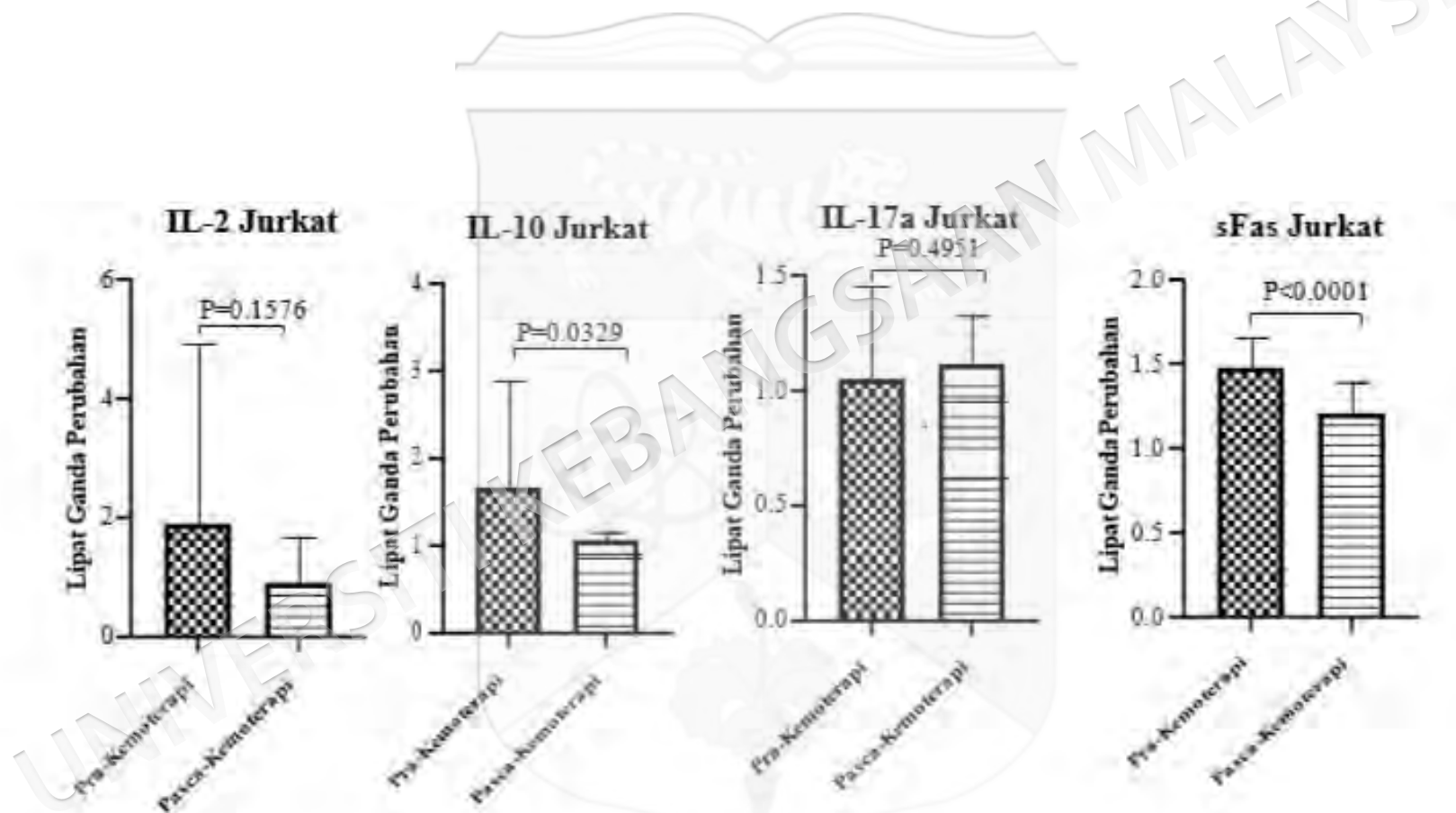
Ekspresi sFas dan sFasL yang merupakan pemain - pemain utama dalam tindak balas imun yang berkait rapat dengan kematian sel pula lebih rendah selepas sel Jurkat dieram bersama EV diaruh kemoterapi. Masing – masing dengan penurunan yang signifikan pada nilai $p < 0.0001$ dan 0.0384 .



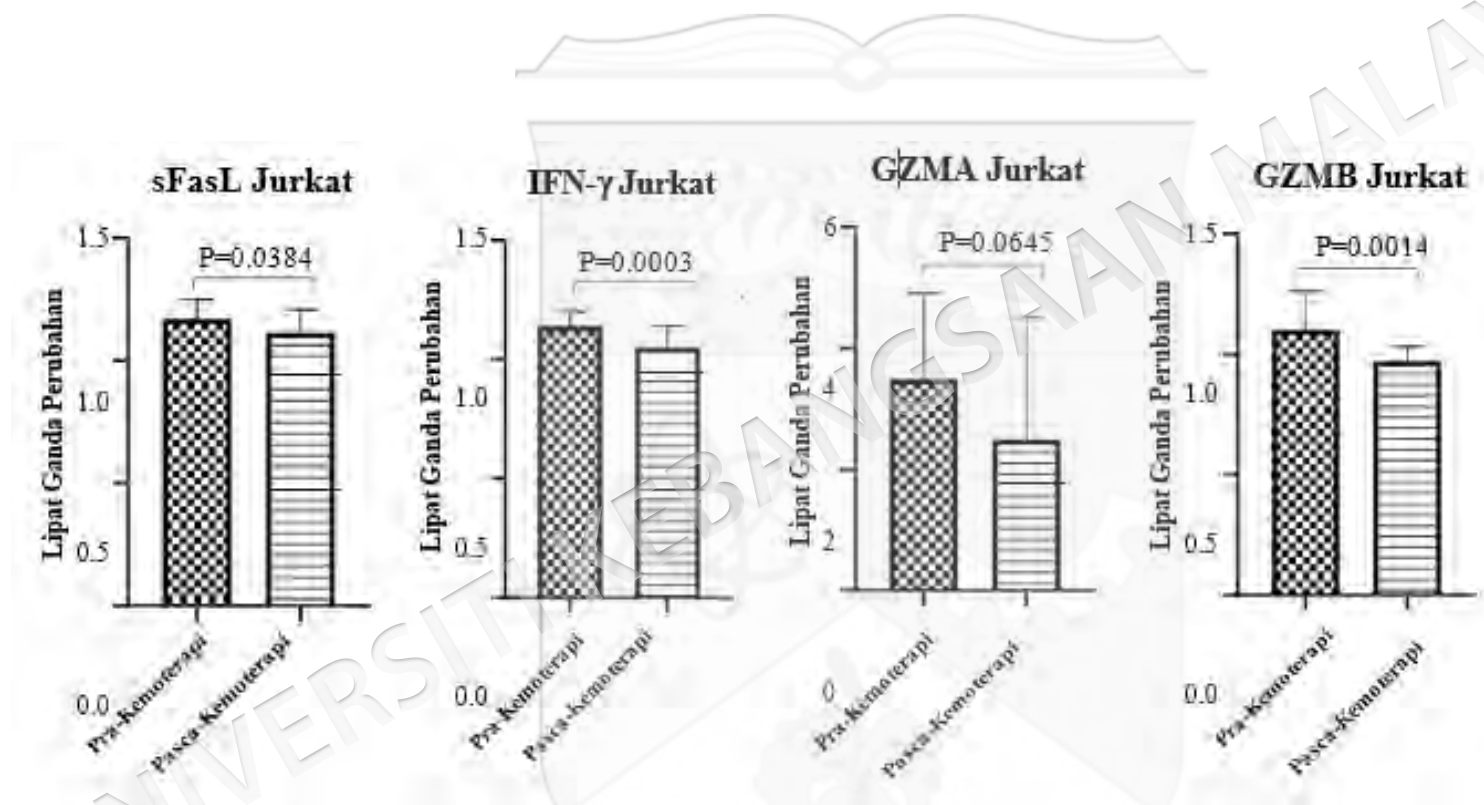
Rajah 4.23 Ekspresi sitokin (IL-2, IL-10, IL-17a dan sFas) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel limfosit T CD8⁺ setelah dieram bersama EV daripada dua jenis kumpulan.



Rajah 4.24 Ekspresi sitokin (IFN- γ , sFasL, Granzyme A dan Granzyme B) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel limfosit T CD8⁺ setelah dieram bersama EV yang berbeza.



Rajah 4.25 Ekspresi sitokin (IL-2, IL-10, IL-17a dan sFas) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel Jurkat setelah diaram bersama kumpulan EV yang berbeza.



Rajah 4.26 Ekspresi sitokin (sFasL, IFN- γ , Granzyme A dan Granzyme B) yang dirembeskan secara berbeza oleh sel Jurkat setelah diaram bersama kumpulan EV yang berbeza.

BAB V

PERBINCANGAN

Ubat kemoterapi berasaskan platinum generasi ketiga seperti *oxaliplatin* telah diperakui dapat merawat kanser usus secara efektif. Tetapi, penambahbaikan terapi ni dalam melawan kanser masih diperlukan kerana agen genotoksik ini mampu mengubah struktur DNA sel kanser dan normal lalu menyebabkan kematian sel secara imunogenik dan mengubah persekitaran mikro tumor (Bakkenist, Lee & Schmitz 2018; Swift & Golsteyn 2014). Impak kemoterapi terhadap sel limfosit T pesakit kanser usus juga masih kurang dikaji. Sel – sel perlu berkomunikasi dan saling berinteraksi untuk menjalankan pelbagai proses biologi demi kelangsungan hayat sel selain memberikan tindak balas terhadap stimulus dan keadaan persekitarannya dengan memberikan isyarat secara lokal mahupun jarak jauh. Sel kanser dan sel – sel lain seperti sel imun menghantar entiti bersaiz nano yang dikenali sebagai vesikel ekstrasel (EV) pelbagai variasi untuk memberikan isyarat dan sebagai medium komunikasi kepada sel penerima.

Hampir setiap kajian *in vitro* yang memfokuskan kepada biologi EV telah memperincikan ISEV (Bickmore & Miklavcic 2020; Carnino, Lee & Jin 2019; Karttunen et al. 2019; Ludwig et al. 2017; Ramirez et al. 2018; Royo et al. 2020; Théry et al. 2018). Dalam kajian ini, kami telah memilih untuk mengasingkan EV daripada serum pesakit kanser usus menggunakan kit komersial pemendakan polietilena glikol (Polyethylene glycol (PEG) precipitation) sebelum dicirikan. EV dapat dipaletkan setelah PEG, sejenis larutan yang bersifat hidrofilik (*hydrophilic*) mengurangkan kelarutan EV. Kami memilih kaedah pemendakan menggunakan kit komersial kerana protokolnya tidak memerlukan langkah pengubahsuaian tambahan, bersesuaian untuk

sampel yang berskala kecil dan terhad selain tidak memerlukan peralatan yang berteknologi tinggi (Andreu et al. 2016; D. Lewis & G. Metcalf 1998; Li et al. 2017).

Walaupun bagaimanapun, kaedah pengasingan EV secara pemendakan ini masih mempunyai kekurangannya. Mendakan EV adalah tidak sepenuhnya tulen dan dimendakan bersama kontaminan lain seperti protein dan bendasing (*impurities*) dengan kepekatan yang tinggi (Karttunen et al. 2019). Tambahan pula, EV yang telah diasing menggunakan kit komersial tidak dapat dibezakan mengikut jenis – jenis EV seperti eksosom, mikrovesikel ataupun badan apoptosis (*apoptotic bodies*). Oleh itu, pengasingan EV mengikut teknik ini memerlukan langkah tambahan jika ketulenan EV merupakan subjek utama penyelidikan. Namun, oleh kerana sampel kami adalah sampel Biobank yang mempunyai isipadu yang kecil, kami tidak dapat melakukan pengasingan tambahan. Terdapat juga beberapa kajian telah mengasingkan EV daripada serum pesakit menggunakan teknik yang sama (Andreu et al. 2016; Tesovnik et al. 2020; Zhang et al. 2020a). Sebagai contoh, EV telah diasingkan daripada serum pesakit CRC yang mempunyai indeks jisim badan (BMI) yang tinggi dan rendah menggunakan kit komersial yang sama terdapat di makmal kami sebelum ini (Abu et al. 2020).

Kaedah perincian EV yang telah diasing daripada setiap jenis sel asal pula masih tidak mempunyai piawai yang diseragamkan. Oleh itu, kami telah mengambil kira saranan ISEV yang mencadangkan setiap kajian biologi EV perlu menggunakan sekurang – kurangnya dua (2) teknologi yang berbeza untuk memperincikan EV secara fizikal oleh kerana faktor kepelbagaian EV. Kami telah memilih untuk menyiasat struktur dan saiz EV melalui cerapan di sudut satah menggunakan mikroskopi elektron transmisi (TEM) juga menilai taburan saiz EV melalui kaedah penyerakan cahaya dinamik (DLS). Selain itu, ISEV menyarankan sekurang – kurangnya tiga (3) kaedah perincian EV melalui komposisi proteinnya untuk pengesahan kehadiran EV dalam sampel biologi di dalam setiap kajian berkaitan biologi EV. Kami juga telah membuat pembloatan *western* (*Western Blot*) untuk membuktikan kehadiran EV dalam serum pesakit kanser usus dan mengira kuantiti limpahan EV dalam serum pesakit kanser usus (Théry et al. 2018).

Hasil cerapan TEM membolehkan kami melihat rupa bentuk EV yang unik seperti dilaporkan oleh penyelidik sebelum ini yang menjumpai vesikel bersaiz 30 hingga 100 nm (Hong et al. 2020; Ludwig et al. 2017). Penyelidik lain juga berjaya menemui EV yang berbentuk sfera setelah dicerap menggunakan mikroskopi daya atomik (AFM) dalam kondisi cecair dan EV muncul berbentuk cawan (*cupped-shaped*) yang tipikal (Chiang & Chen 2019). Tambahan pula, bentuk asli EV yang sfera juga dapat dipelihara dan muncul ketika EV dicerap menggunakan teknologi cryo-TEM (*cryo-electron microscopy*) seperti dilaporkan oleh sekumpulan penyelidik lain (Chuo, Chien & Lai 2018). Hasil cerapan TEM kami juga dapat memperlihatkan EV sebelum dan selepas diaruh kemoterapi tidak berubah secara morfologinya tetapi taburan ukuran partikel EV sebelum dan selepas kemoterapi adalah berbeza setelah saiz dan bilangan EV dikira dengan lebih teliti dan tepat pada permukaan vesikel yang sfera dengan menggunakan teknologi DLS. Menurut hasil kajian oleh penyelidik sebelum ini, mereka telah mengesahkan bahawa EV yang diaruh oleh agen kemoterapi seperti *vincristine* (VCR) berdos rendah tidak meninggalkan kesan terhadap rupa bentuk EV (Wang et al. 2019). EV yang dicerap oleh mereka juga mempamerkan morfologi yang sama seperti hasil kajian kami. Namun begitu, kajian – kajian yang tertumpu kepada kaedah mencirikan EV secara fizikal dan berminat untuk melihat morfologi EV masih kurang dijalankan oleh kerana para penyelidik masih mencari kaedah terbaik untuk mengasing EV dengan cara yang terbaik lalu morfologi EV dapat diperlihara dan dicerap dengan baik.

Walaupun bagaimanapun, analisa DLS ini masih mempunyai kekurangannya. Kami dan penyelidik lain juga berpendapat bahawa kaedah DLS ini tidak dapat mengukur saiz zarah biologi seperti EV ini dengan tepat kerana pengukuran saiz EV boleh diganggu oleh zarah – zarah lain yang melekat pada permukaan EV atau zarah lain bertembung dengan EV semasa pengiraan saiz secara hidrodinamik ini dilakukan (Théry et al. 2018). Tambahan pula, zarah EV bergerak secara rawak (*Brownian motion*) dalam bahan pencair dan hadir dalam pelbagai bentuk dan saiz menyebabkan mesin DLS menangkap EV bersama zarah lain yang berselerak atau berkelompok dalam pencair pada masa yang sama. Suhu, sudut penyerakan cahaya dan faktor persekitaran lain juga memainkan peranan penting semasa operasi analisa DLS diukur dan dikira (Tomb et al. 1997).

Vesikel ekstrasel pasca kemoterapi kelihatan lebih kecil dalam Rajah 4.2 namun didapati lebih besar diameter saiznya berdasarkan data DLS kerana perbezaan ketumpatan bahan pencair yang digunakan untuk melarut dan menjadi medium EV untuk diukur (DLS) dan dicerap (TEM). EV bergerak bebas (*Brownian motion & hydrodynamic*) dan bertaburan dalam bahan pencair, melekat atau berkelompok sebagai zarah lipoprotein semasa pengukuran DLS manakala EV telah diawet di slaid grid karbon (*fixed on carbon grid slide*). Walaubagaimanapun, saiz EV yang dapat dilihat & dicerap TEM tidak menjadi fokus kajian kami, kaedah TEM diguna untuk melihat morfologi fizikal EV dan saiz EV diukur dengan tepat pada permukaan zarah EV menggunakan mesin DLS. Oleh itu, gambar TEM yang dicerap adalah data kualitatif bagi kajian ini dan data ukuran zarah EV daripada kaedah DLS pula merupakan data kuantitatif yang dapat kami kumpulkan.

Berdasarkan hasil kajian kami pula, setiap 2 kumpulan sampel EV; pra- kemoterapi dan pasca-kemoterapi adalah berbeza taburan diameter saiznya. EV pasca- kemoterapi dalam kajian kami adalah besar saiz diameternya berbanding EV pra- kemoterapi. Penyelidik lain juga telah berusaha untuk mengukur EV pra- dan pasca- kemoterapi dengan menggunakan beberapa teknologi lain selain DLS seperti Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) dan juga Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS). Hasil kajian mereka telah menunjukkan EV yang diaruh kemoterapi mempunyai saiz yang ketara lebih besar berbanding EV sihat dan diikuti oleh EV tidak diaruh kemoterapi secara statistiknya (Aharon et al. 2017; Bar-Sela et al. 2020). Perubahan dan perbezaan saiz EV pasca-kemoterapi berbanding pra-kemoterapi ini didapati tidak menjejaskan dan memberi kesan langsung kepada rupa bentuk EV. Hal ini berkemungkinan kerana kedua – dua populasi EV ini dirembes keluar oleh sel dengan biogenesis yang sama. Namun, mekanisme yang tepat tentang bagaimana EV sebelum dan selepas kemoterapi ini dirembes keluar oleh sel asalnya masih tidak dapat dipastikan. Para penyelidik lain juga berhadapan limitasi ini dimana biogenesis dan keheterogenan EV ini masih tinggal tanda tanya dan diusahakan (Fujita, Yoshioka & Ochiya 2016; Hong et al. 2016; Ludwig et al. 2017).

Oleh itu, kaitan saiz EV secara langsung kepada kesan dari proses kemoterapi tidak dapat dipastikan dan memerlukan kajian lanjutan kerana kajian kami tidak mengkaji kandungan atau kargo sebagai contoh, *Oxaliplatin* yang dibawa oleh EV sepenuhnya. Namun beberapa kajian lain telah mendapati saiz dan kepekatan EV berubah selepas rangsangan kemoterapi (Aharon et al. 2017; Bar-Sela et al. 2020).

Seterusnya, kami mendapati EV diaruh kemoterapi lebih kaya limpahnya berbanding EV tidak diaruh kemoterapi. Hasil kajian ini dapat disokong oleh dapatan kajian penyelidik – penyelidik sebelum ini yang berhasil merumuskan kepekatan limpan EV setelah rawatan kemoterapi. Sebagai contoh, kemoterapi telah menyebabkan peningkatan rembesan sejenis ezim yang berkait dengan eksosom (Bandari et al. 2019). Tambahan pula, sekumpulan penyelidik lain telah berhasil menentukan kadar limpan dan kepekatan EV diaruh kemoterapi menggunakan NTA. Mereka telah mengkaji EV sebagai penanda kepada pemantauan dan ramalan prognosis kepada penyakit kanser payudara. Hasil kajian mereka telah mendapati bahawa EV pesakit kanser payudara adalah 40 kali ganda lebih pekat berbanding orang yang sihat. Selain itu, kadar limpan EV juga meningkat semasa pesakit kanser payudara menjalani kemoterapi dan sebelum kemoterapi neoadjuvan diberikan kepada pesakit kanser payudara. Mereka juga berpendapat pola peningkatan kadar limpan EV ini dapat dikaitkan dengan kegagalan terapi (König et al. 2018).

Pemblotan *western* juga telah mengesahkan kehadiran EV dalam serum pesakit kanser usus dengan kehadiran protein TSG101 dan CD9 sebagai penanda. Suhu dan cara penyimpanan protein – protein perlu dijaga dengan baik dan berhati – hati untuk memastikan protein mudah rosak ini dapat dipelihara dengan baik. Walaubagaimanapun, pembloatan *western* ini dapat menunjukkan keheterogenan ekspresi protein dalam sampel EV kami. Pangkalan data *Cancer GeneticsWeb* pula telah melaporkan protein *Tumor susceptibility gene 101* (TSG101) memainkan peranan penting dalam perkembangan beberapa jenis kanser. Sejak dua dekad yang lalu, TSG101 telah menjadi tarikan utama dalam kajian para penyelidik kanser payudara (Guo et al. 2019b). Manakala, kajian terkini pada tahun 2019 oleh sekumpulan penyelidik yang telah menilai tahap ekspresi TSG101 dan CD81 melalui pembloatan *western* walaupun EV tidak berjaya diasingkan pada tahap ketulenan yang tinggi semasa pengasingan EV plasma pesakit kanser ovari menggunakan kit komersial dalam kajian pemprofilan proteomik mereka (Zhang, Ou & Wu 2019). Selain hasil pembloatan *western* kami, terdapat juga kajian – kajian lain telah mengesahkan kehadiran protein CD9 dalam kajian mereka melalui kaedah yang sama (Madeo et al. 2018).

Pada tahun 2018 pula, sekumpulan penyelidik berjaya mengesan dan menilai beberapa jenis tetraspanins yang penting dalam perkembangan kanser prostat seperti CD9 dan CD151 terutamanya dalam phenotaip metastatik setelah mengasingkan EV melalui kaedah penirisan ultra (*ultrafiltration*) dengan penambahbaikan. Mereka juga telah berjaya mengesan kehadiran protein CD63 sebagai penanda lazim bagi EV dalam kajian yang sama (Brzozowski et al. 2018). Sekumpulan penyelidik lain pula telah melaporkan dapat mengesan kehadiran lebih banyak protein dalam sampel EV mereka seperti HSP70, TSG101, CD81, CD9, CD63 dan GAPDH melalui pembloatan *western* hasil pengasingan EV daripada sampel biologikal dengan mengaplikasikan kaedah berasaskan wayarnano bermagnetik (*magnetic nanowires*). Kaedah tersebut dikatakan lebih efisien juga berupaya mengasingkan EV dengan 3 kali ganda lebih banyak perolehannya berbanding kaedah konvensional (Lim et al. 2019). Justeru itu, kami berpendapat bahawa pengesanan kehadiran protein – protein penanda EV melalui kaedah pembloatan *western* ini amat bergantung dan dipengaruhi oleh pemilihan dan cara EV diasing.

Teknologi sitometri aliran pula telah diaplikasi untuk mengukur peratus ketulenan sel limfosit T subset $CD8^+$ selepas kaedah penyisihan dilakukan. Hal yang demikian dilakukan untuk memastikan sel limfosit yang berjaya disisih dan sel – sel dapat dikultur dengan kondisi yang baik dan tepat sebelum digunakan sebagai subjek asai fungsian dalam kajian ini (Cossarizza et al. 2019; Saeys, Van Gassen & Lambrecht 2016).

Tambahan pula, terdapat kajian biologi berkaitan sel limfosit T yang juga telah menggunakan sel Jurkat sebagai model prototaip sistem imun manusia termasuk kajian ini. Pemilihan sel Jurkat sebagai subjek uji kaji adalah kerana sel leukemia ini merupakan titisan sel (*cell line*) limfosit T manusia yang tidak mortal dan berpotensi memimik proses kritikal tindak balas imun (Chen & Nong 2018). Penglibatan sel Jurkat dalam kajian ini juga dapat membantu kami memahami fungsi biologikal sel imun manusia dengan lebih baik serta membantu dalam perbandingan secara terus dengan subset sel T $CD8^+$ dalam analisa setiap asai fungsian yang dijalankan (Guo et al. 2019a; Qu et al. 2009; Valle-Reyes et al. 2018). Sekumpulan saintis, Moore et al., 2008 telah mengesahkan sel Jurkat adalah sel limfoma subset sel T $CD4^+$ / $CD8^-$ yang mengekspresikan reseptor sel T (TCR) endogenus. Oleh itu, kami telah memilih untuk menggunakan titisan sel Jurkat ini dalam kajian kami kerana amat bersesuaian dengan tema kajian kami yang ingin memahami kesan EV diaruh kemoterapi terhadap sel imun manusia.

Asai kitar sel pula adalah asai fungsian yang dijalankan untuk menentukan profil DNA sel setelah dilabelkan dengan pewarna yang khusus dan data kajian diperolehi dengan menggunakan sitometri aliran. Dalam kajian kami, EV diaruh kemoterapi berupaya mengganggu proses kitar sel limfosit T dan sel Jurkat. Hasil analisa asai kitar sel telah menunjukkan sampel klinikal EV secara individu dan kumulatif tidak mempunyai perbezaan dari segi pola kitar sel namun peratusan sel yang berada di setiap fasa – fasa kitar sel adalah berbeza. Kedua – dua sel imun; sel limfosit T dan sel Jurkat tergendak di Fasa S secara signifikan setelah perbandingan pra- dan pasca-kemoterapi dibuat. Menariknya, hasil kajian kami ini dapat disokong oleh satu kajian yang telah dijalankan di China. Kitar sel limfosit T $CD8^+$ telah didapati tergendak di Fasa S secara signifikan setelah nisbah sel pada fasa tersebut menurun berbanding kawalan setelah

distimulasi oleh EV terbitan kanser buah pinggang (RenCa) (Xu et al. 2019). Terkini, sekumpulan penyelidik pula telah menentukan kesan EV yang diterbitkan daripada sel selanjara kanser perut terhadap sel limfosit T CD8⁺ melalui asai kitar sel. Menurut kajian mereka, sel limfosit T CD8⁺ telah terkesan dengan ketara dan tergendat dalam Fasa G2 setelah diinkubasi dengan 100 µg/ml EV (Liu et al. 2020). Mereka telah menggunakan beberapa kepekatan EV (1, 10, 100 µg/ml) dalam kajian mereka untuk melihat kesan EV pelbagai kepekatan terhadap progress kitar sel limfosit T CD8⁺. Kedua – dua hasil kajian ini telah menunjukkan EV terbitan sel kanser mampu mengganggu proses kitar sel limfosit T dan merencat sel pada fasa yang berbeza – beza.

Seterusnya, kami telah memilih untuk menjalankan asai apoptosis annexin V-FITC bagi menyiasat kesan fungsi EV yang diaruh dan tidak diaruh kemoterapi terhadap sel limfosit T terutamanya kadar kematian sel. Peranan EV dalam persekitaran mikro tumor juga telah dibincangkan oleh para penyelidik kanser yang lain. Sebagai contoh, EV yang telah diasingkan daripada serum pesakit kanser dan sel selanjara kanser (*cancer cell lines*) berupaya untuk menindas sel limfosit T dengan meningkatkan kadar kematian sel (Abu et al. 2020; Ludwig et al. 2017; Muller et al. 2016; Sharma et al. 2020). Kami juga mengharapkan asai kematian sel ini dapat menyokong hasil kajian asai kitar sel oleh kerana kedua – dua asai ini saling berkait rapat dalam memberikan gambaran tentang kegiatan sel dalam tubuh manusia terutamanya untuk mengekalkan homeostasis. Hasil kajian kami telah menunjukkan EV diaruh kemoterapi akan dan telah menyebabkan sel limfosit T CD8⁺ dan sel Jurkat mati dengan kadar lebih banyak berbanding EV yang tidak diaruh kemoterapi seperti jangkaan awal kami dan disokong dengan dapatan kajian lain (Ludwig et al. 2017). Kadar kematian sel imun ini yang meningkat ini juga seiringan dengan penurunan ketara peratusan sel yang berjaya masuk ke dalam Fasa G2/M untuk meneruskan kitar sel (Mitosis) dimana sel imun telah terencat dalam fasa pertengahan kitar sel, Fasa S (sintesis DNA) selepas dirangsang oleh EV diaruh kemoterapi berbanding sebelum kemoterapi dalam hasil kajian kami.

Selain itu, EV daripada kanser juga dilaporkan menyebabkan peningkatan kadar kematian sel Jurkat yang telah diaktifkan juga protein berkaitan kematian sel, FasL dilaporkan mempunyai tahap ekspresi lebih tinggi berbanding EV kawalan (Kobilka 2012). Beberapa tahun yang lalu, terdapat satu kajian telah menjalankan asai kematian sel ini terhadap sel Jurkat dan mendapati EV meningkatkan kadar kematian sel Jurkat namun bergantung pada kepekatan EV. Mereka juga merumuskan EV diterbitkan

daripada kanser ini membawa lebih ligan perencat dan cenderung untuk memberikan kesan penekanan imun seperti laporan kajian yang telah diterbitkan sebelumnya (Ludwig et al. 2018; Theodoraki, Hoffmann & Whiteside 2018). Oleh itu, perbezaan kesan fungsi EV pra- dan pasca-kemoterapi terhadap sel limfosit T dan sel Jurkat dapat diperlihatkan dan diketahui melalui kedua – dua asai fungsian yang dijalankan dalam kajian ini dengan sokongan laporan kajian – kajian terdahulu.

Terkini, sekumpulan penyelidik juga merumuskan bahawa EV terbitan kanser kepala dan leher pada tahap yang lewat menyebabkan kadar apoptosis sel limfosit T CD8⁺ lebih tinggi berbanding EV daripada tahap permulaan kanser. Mereka juga melaporkan kadar kematian sel imun tersebut adalah bergantung pada tahap kanser (Beccard et al. 2020). Oleh itu, kami dapat mengaitkan hasil kajian ini dengan dapatan kajian kami. Peningkatan kematian sel limfosit T dan sel Jurkat adalah diatas faktor kehadiran EV diaruh kemoterapi dan sampel klinikal kami kumpulkan adalah pada tahap kanser yang lewat. Justeru itu, EV diaruh kemoterapi diperlihatkan telah meningkatkan kadar kematian sel imun berbanding EV yang tidak diaruh kemoterapi

Kami juga berpendapat bahawa sel – sel tidak lagi dapat hidup dan berkembang kerana sel telah mati kerana proses kitar sel terhenti atau tergendak dalam Fasa S dimana proses sintesis DNA berlaku sebelum sel dapat berkembang dan menyambung kitar sel untuk proses Mitosis. Walaubagaimanapun, mekanisme yang lebih tepat tentang kematian sel tidak dapat dipastikan dalam kajian ini. Namun, kami juga telah berusaha menjalankan kajian lanjut untuk mencari hubungkait Fas/FasL yang berperanan penting dalam aktiviti kematian sel imun melalui saringan gen -gen berkaitan melalui qRT-PCR dan pemprofilan sitokin.

Tapak jalan anergi sel T dan tolerans imun manusia pula telah difokuskan untuk menentukan ekspresi gen utama berkaitan imun dalam subset sel limfosit T setelah rangsangan oleh EV diaruh dan tidak diaruh kemoterapi. Saringan 84 gen melalui kaedah qRT-PCR ini membantu kami mengetahui pola ekspresi gen – gen oleh sel limfosit T yang merupakan barisan hadapan dalam sistem imun yang mampu memberikan tindak balas imun melindungi tubuh daripada anasir luar serta menentang kanser.

Gen - gen yang paling terkesan setelah sel limfosit T distimulasi oleh EV adalah Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (*PTGS2*), Fos Proto-Oncogene (*FOS*), Forkhead Box P2 (*FOXP2*), Interleukin 10 (*IL10*), Interleukin 7 Receptor (*IL7R*), Lymphotoxin Alpha (*LTA*), Early Growth Response 3 (*EGR3*) dan Fas Cell Surface Death Receptor (*FAS*). Gen *PTGS2* (Ensembl: ENSG00000073756) atau *COX-2* adalah gen yang bertanggungjawab mengkodkan protein yang terlibat dalam inflamasi dan mitogenesis. Terdapat kajian pula telah menyifatkan gen ini amat berkait rapat dengan penyakit gastrousus (GI) seperti Bursitis dan Ulser Gastrik (*Gastric Ulcer*) dimana berada dalam kumpulan penyakit yang sama seperti CRC. Inflamasi adalah faktor risiko yang paling lazim dikaitkan dengan CRC serta penglibatan polimorfisme gen ini (Vogel et al. 2014; Zhang et al. 2020b). Sekumpulan penyelidik pula telah berusaha untuk mencari jalan membuka sempadan sel limfosit T dengan menyasarkan paksi *COX-2* untuk merawat penyakit kanser pankreas (Conejo-Garcia 2019). Sedekad lalu, sekumpulan penyelidik telah menerangkan peranan gen *COX-2* ini dalam proliferasi dan kematian sel, terutamanya dalam tumor pepejal (*solid tumor*) seperti kanser usus dan kanser payudara seterusnya mengaitkan ekspresi gen ini dengan situasi klinikal pesakit (Sobolewski et al. 2010).

Dalam konteks imuniti kanser pula, ekspresi *COX-2* didapati mengurangkan kepekaan sel – sel kanser terhadap sel T antigen berspesifik (antigen-specific T cells) yang diaktifkan serta mendorong ekspresi IL-4 dan IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase). Pembebasan interferon gamma (IFN- γ) juga memodulasi aktiviti imun tersebut dengan dipicu oleh pengaktifan TCR khusus antigen (Cells, Itoh & Germain 1997; Göbel et al. 2014). Deregulasi gen *COX-2* ini juga meningkatkan ambang kematian sel kanser (Göbel et al. 2014). Gen ini telah diekspres ketara lebih tinggi oleh sel limfosit T setelah perbandingan antara pra- dan pasca-kemoterapi dalam kajian kami. Hal ini dapat memberikan maklumat bahawa kehadiran EV pesakit CRC telah memudahkan sel limfosit T untuk mengenali lalu membunuh sel kanser. Dapatan kajian ini juga dapat merumuskan kesan EV diaruh kemoterapi terhadap sel imun dan aktiviti sitotoksik sel limfosit T terhadap sel kanser.

Gen *IL-17a* (Ensembl: ENSG00000112115) pula mengkodkan sejenis sitokin yang pro-inflamasi dihasilkan oleh sel limfosit T yang telah diaktifkan. Sitokin ini juga

boleh merangsang ekspresi IL-6 dan PTGS2/COX-2. Hasil saringan gen dan pemprofilan sitokin telah menunjukkan gen ini diekspreskan lebih tinggi oleh sel limfosit T pasca-kemoterapi dan dapat dikaitkan dengan beberapa penyakit inflamasi yang kronik. Menurut penyelidikan yang diterbitkan beberapa tahun lalu, HMGB1, sejenis protein nuklear yang juga bertanggungjawab dalam aktiviti inflamasi dan mampu menjalankan tugas sitokin dengan memicu tindak balas imun yang berkuasa juga telah diekspres oleh sel limfosit T dengan lebih tinggi pasca-kemoterapi (Stojanovska et al. 2018) seperti hasil kajian kami. Interaksi dan kesan antara ubat kemoterapi seperti *oxaliplatin* dengan sel imun juga telah dikaji oleh penyelidik yang sama dan mereka telah melaporkan bahawa sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 telah dirembes keluar oleh sel pada kadar yang sama sebelum dan selepas diaruh oleh kemoterapi (Stojanovska et al. 2019). Hal ini dapat menerangkan bahawa *oxaliplatin* tidak memberikan kesan kepada kadar rembesan sitokin IL-6 oleh sel imun. Selain itu, terdapat kajian yang telah memfokuskan hubungkait dan tahap ekspresi IL-6 dan IL-17 dengan kehadiran EV dan mereka berjaya menemui kesan rangsangan IL-6 terhadap kesan anti kanser (Guo et al. 2018). Walaubagaimanapun, tahap ekspresi gen *IL-6* dalam kajian kami ini telah direkodkan menurun pasca-kemoterapi bertentangan dengan hasil kajian penyelidikan yang lain (Shao et al. 2020) dan ekspresi kedua – dua sitokin, IL-17a dan IL-6 ini juga tidak seiringan. Sebaliknya, kajian oleh sekumpulan penyelidik pula telah melaporkan sitokin IL-6 telah dirembes keluar oleh sel limfosit T CD8⁺ dan CD4⁺ dengan lebih tinggi dan IL-17 pula menurun selepas rangsangan EV (Ye et al. 2014).

Selain itu, gen *Fos* (Ensembl: ENSG00000170345) pula dikatakan berkait dengan apoptosis sel dalam kes – kes tertentu. Pengesahan ekspresi gen *Fos* yang signifikan pra- dan pasca-kemoterapi berbanding kawalan ini juga amat menarik untuk dikaji dengan lebih mendalam lagi. Protein Fos ini juga dikenali sebagai pengawal atur bagi proses pencambahan, pembezaan dan transformasi sel. Berdasarkan kajian *Genome-Wide Association Study* (GWAS) pula, penyakit inflamasi kronik seperti Crohn's Disease adalah antara penyakit paling lazim berhubung kait dengan protein Fos ini (Yuan et al. 2017). Tambahan pula, gen *FOXP2* (Ensembl: ENSG00000128573) yang diekspres dengan ketara pra- dan pasca-kemoterapi ini pula berpotensi memainkan peranan dalam perkembangan tisu saraf, kardiovaskular dan gastrousus. Tahap ekspresi

gen ini juga adalah rendah dalam kanser payudara dan kanser gastrik (Herrero & Gitton 2018). Anotasi ontologi gen (GO) pula menyifatkan gen sitokin seperti IL-10 (Ensembl: ENSG00000136634) terlibat dalam aktiviti sitokin yang dirembeskan oleh monosit dimana aktiviti penekanan imun berlaku namun kurang oleh limfosit. Kesan pleiotropi gen ini dalam pengawalaturan imun dan inflamasi adalah sama seperti laporan kajian penemuan fungsi gen *PTGS2* terutamanya berperannya sebagai anti-inflamasi (Iyer & Cheng 2012; Zhang et al. 2010). Oleh itu, hasil saringan gen melalui kaedah qRT-PCR ini amat membantu kami mengenalpasti kesan EV diaruh kemoterapi terhadap sel imun manusia serta kaitannya dengan penyakit yang berkaitan GI seperti kanser usus dan penyakit – penyakit yang lain.

Menariknya, saringan gen kami dapat mengesahkan tahap ekspresi gen *LTA* (Ensembl: ENSG00000226979) secara signifikan pasca-kemoterapi berbanding kawalan. Gen sitokin ini paling lazim diekspreskan oleh sel limfosit dan telah disahkan penglibatannya dalam formasi organ limfoid sekunder dan fungsinya dalam aktiviti apoptosis sel dalam penyelidikan terdahulu. Limfotoksin yang diekspres oleh sel limfosit ini juga bersifat sitotoksik kepada sel kanser secara *in vitro* dan *in vivo*. Berdasarkan saringan gen kami, gen *LTA* ini diekspres lebih tinggi pasca-kemoterapi berbanding tidak diaruh kemoterapi. Hal yang demikian dapat membuktikan keberkesanan dan keupayaan ubat kemoterapi seperti *oxaliplatin* dalam merawat kanser usus. Tambahan pula, gen *EGR3* yang didapati diekspres paling tinggi pasca-kemoterapi seperti saringan gen yang telah dibuat ini terlibat dalam perkembangan sel limfosit. Dapatan kajian ini dapat merumuskan bahawa EV diaruh kemoterapi menyebabkan kematian sel limfosit dengan lebih banyak namun masih ada sel limfosit yang masih berkembang secara aktif dalam masa yang sama. Hal ini kerana gen *LTA* dan gen *EGR3* telah diekspres tinggi oleh sel limfosit T pasca-kemoterapi berdasarkan saringan gen melalui qRT-PCR lalu menjawab persoalan kajian bahawa kehadiran EV yang diaruh ubat kemoterapi, *oxaliplatin* ini adalah penyebab kepada kematian sel kanser dan imun secara imunogenik (ICD).

Walaupun, ekspresi gen *IFNG* (Ensembl: ENSG00000111537) dan profil sitokin yang larut ini adalah berbeza. Profil sitokin menunjukkan sitokin ini dirembeskan dengan kadar ketara lebih tinggi selepas diaruh kemoterapi. Hal ini

menunjukkan aktiviti sitotoksik oleh sel limfosit T adalah aktif (Bhat et al. 2017; Ni & Lu 2018) namun dapatan saringan gen melalui qRT-PCR menunjukkan ekspresi gen ini adalah berkurangan pasca-kemoterapi. Terdapat satu kajian terkini telah melaporkan rawatan FOLFOX telah meningkatkan fungsi efektor sel TIL (*Tumor infiltrating lymphocytes*). Kajian ini dapat memperlihatkan sel limfosit T CD8 yang berantigen spesifik telah mengekspreskan sitokin IFNG dan TNF α pada kadar lipatan lima (5) hingga tujuh (7) ganda kali lebih tinggi selepas kemoterapi berbanding kawalan (Guan et al. 2020). Oleh itu, kajian ini dapat menyokong dan menjadi rujukan kepada dapatan kajian kami. Menariknya, terdapat laporan kajian yang menerangkan dua peranan interferon ini dalam aktiviti regulasi sel kanser dimana terdapat banyak faktor dapat mempengaruhi rembesan dan ekspresi interferon ini (Mojic, Takeda & Hayakawa 2018; Ni & Lu 2018). Terdapat kajian juga telah membuktikan EV diterbit daripada kanser mengubah ekspresi gen dan corak sitokin dirembes keluar disebabkan oleh pengayaan kargo EV yang penting untuk perkembangan kanser (Liu et al., 2020).

Gen *IL2* (Ensembl: ENSG00000109471) pula mengkodkan protein yang merembeskan sitokin yang amat penting dalam proliferasi sel limfosit T dan B serta pengaktifannya. Sitokin ini juga dikenali sebagai faktor pertumbuhan sel T juga limfokin. Aberasi kromasomal yang melibatkan *IL2* ini juga dijumpai dalam bentuk Leukemia limfoblastik akut sel T (T-ALL), sejenis malignan neoplasma yang agresif pada sumsum tulang. Gen *IL2* ini telah disahkan diregulasi secara positif melalui saringan gen menggunakan kaedah qRT-PCR namun tidak signifikan. Regulasi positif gen ini membuktikan sel limfosit T berada dalam mod aktif dan bersedia untuk memberikan tindak balas imun terhadap rangsangannya. Berdasarkan profil sitokin kajian ini pula, sitokin *IL2* dirembes keluar oleh sel limfosit T CD8⁺ dan sel Jurkat pada kadar ekspresi berbeza – beza. Kadar rembesan sitokin ini didapati dipengaruhi oleh kehadiran EV yang diaruh kemoterapi. Hal ini menunjukkan sel limfosit T CD8⁺ yang telah diaktifkan merembes keluar sitokin *IL2* sebagai respon kepada kehadiran ubat kemoterapi yang dibawa oleh EV dalam kargonya. Terdapat kajian lain yang turut memfokuskan pemprofilan sitokin dimana mereka berjaya menemui hasil kajian yang hampir sama seperti kajian yang pernah diterbitkan. EV dilaporkan memicu pengisyaratan NF- κ B dan meningkatkan rembesan sitokin berkenaan inflamasi pada sel monosit (Chow et al., 2014).

Umum juga telah mengetahui bahawa gen *Fas* (Ensembl: ENSG00000026103) mengkodkan protein yang berperanan besar dalam aktiviti kematian sel berprogram. Ekspresi gen ini ketara lebih rendah selepas kemoterapi berbanding kawalan dalam saringan gen kami. Hal ini mengesahkan bahawa ubat kemoterapi kurang memberikan kesan buruk terhadap kematian sel limfosit namun hasil saringan gen ini bercanggah dengan hipotesis kajian ini mengenai tahap kematian sel imun juga tidak menyokong hasil asai – asai fungsian yang telah dijalankan. Profil sitokin juga telah menunjukkan sitokin sFas dirembes keluar oleh sel Jurkat menurun dengan signifikan setelah diaram bersama EV diaruh kemoterapi trend yang sama seperti tahap ekspresi gen yang telah disaring. Protein yang dikod oleh gen *FASLG* (Ensembl: ENSG00000117560) dan gen *Fas* adalah saling melengkapi dalam tapak jalan pengisyratan FAS/FASLG yang sangat penting untuk regulasi sistem imun, termasuk kematian sel T secara AICD mahupun sitotoksik (Jeong et al. 2005; Muller et al. 2016; Shao et al. 2020). Isyarat yang saling dihantar oleh kedua – dua gen ini memberikan implikasi terhadap kemajuan beberapa jenis kanser. Menurut hasil kajian kami, gen *FASLG* telah diekspreskan lebih tinggi pasca-kemoterapi melalui saringan gen dan sFasL dirembes keluar oleh sel limfosit T ketara lebih tinggi kadarnya selepas diaruh kemoterapi. Hal ini jelas menunjukkan interaksi antara FAS/FASLG pada permukaan sel limfosit T adalah aktif dan menyokong kepada kematian sel imun kesan kehadiran EV diaruh kemoterapi. Manakala, sekumpulan penyelidik telah mengenalpasti punca kepada kematian sel limfosit yang disebabkan oleh proses pemfosforilan (*phosphorylation*) pada protein p38 MAPK (Shen et al., 2020). Abusamra et al. pula telah menerbitkan satu kajian berkaitan kematian sel limfosit T CD8⁺ yang saling berinteraksi dengan EV. Dalam kajian mereka, EV didapati telah menindas fungsi sel limfosit T sebagai pemain utama sistem imun. Ligan Fas yang ekspreskan oleh EV terbitan kanser dikatakan telah menjadi titik tolak kepada kematian sel limfosit T CD8⁺. Penemuan mereka mengenai pemusnahan sistem imun yang dipengaruhi oleh kehadiran EV yang menjadi penyebab utama kematian sel imun ini pula dapat dihubungkan dan menyokong hasil kajian kami ini. EV diaruh kemoterapi telah menyebabkan sel limfosit T mengekspreskan sFasL dengan kadar lebih tinggi dan kadar kematian sel limfosit juga dilihat meningkat setelah rangsangan EV seiringan dengan dapatan kajian oleh Abusamra et al. (2005).

Selain gen *Fas*, gen *GZMB* (Ensembl: ENSG00000100453) juga antara gen yang berkaitan dengan kematian sel. Gen yang mengkodkan Granzyme B yang dirembes keluar oleh sel limfosit T sitotoksik ini penting dalam aktiviti lisis sel juga mampu mencetuskan apoptosis sel sasaran dengan penjanaan enzim aktif seperti protease. Sebagai contoh, terdapat kajian yang telah menunjukkan *GZMB* memainkan peranan penting membunuh sel berparasit melalui tapak jalan pengisyratan bebas caspase (Yang et al., 2018). Menurut kajian kami pula, gen ini juga diregulasi secara positif selepas kemoterapi seperti disahkan melalui kaedah qRT-PCR yang telah memberi indikasi peningkatan kadar apoptosis sel dan aktiviti lisis sel sedang giat berlaku. Hasil pemprofilan sitokin kami juga telah memperkukuh hasil saringan gen *GZMB* ini. Granzyme B telah dirembeskan dengan kadar lebih tinggi secara signifikan kesan inkubasi EV diaruh kemoterapi bersama sel limfosit T namun sel Jurkat pula menurun dengan ketara. Kebanyakan penyakit berkaitan limfoma atau leukemia juga amat berkait rapat dengan gen ini. Kajian terkini oleh penyelidik lain telah memfokuskan perforin dan granzyme B untuk menilai fungsi sel limfosit T CD8⁺ dan kesan sel mieloma terhadap sel limfosit T. Hasil kajian mereka telah menunjukkan EV terbitan sel mieloma menghalang kematian sel Treg dan sel limfosit T CD8⁺, memacu proliferasi dan mengurangkan ekspresi perforin (Shao et al., 2020). Walaubagaimanapun, kajian tentang EV dan kesan terhadap sel imun terutamanya dalam konteks rembesan dan ekspresi sitokin tidak banyak dijalankan.

Saringan gen melalui qRT-PCR dan analisis sitokin ni juga amat bergantung antara satu sama yang lain kerana sitokin – sitokin yang dirembes keluar oleh sel imun dikodkan oleh gen – gen tertentu. Analisa qRT-PCR pula adalah lebih sensitif dan tepat berbanding pemprofilan sitokin yang dikumpul untuk memberi maklumat tentang tindak balas imun yang sedang berlaku di dalam tubuh badan manusia. Pengesanan tahap ekspresi gen dan mRNA sitokin melalui kaedah qRT-PCR ini juga adalah langkah terbaik untuk penyelidikan diagnostic (Forlenza et al., 2012).

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 RUMUSAN KAJIAN

Kajian ini adalah merupakan antara kajian perintis di Malaysia yang memfokuskan fungsi biologi vesikel ekstrasel (EV) daripada kanser usus. Kami juga telah berjaya menyelidik kesan EV yang diperoleh dari pesakit kanser usus pra- dan pasca-kemoterapi terhadap sel imun iaitu sel limfosit T CD8⁺. Secara keseluruhannya, hasil kajian kami telah berjaya menyokong hipotesis kajian seterusnya menjawab persoalan kajian yang telah menjadi penentu arah kajian ini.

Hasil kajian kami telah menunjukkan EV diaruh kemoterapi adalah hampir seiras secara fizikal, berbentuk bulat atau sfera berbanding EV tidak diaruh kemoterapi namun mempunyai saiz dan kadar limpahan yang berbeza. EV yang berskala nano bertaburan saiznya adalah diantara 218.57 hingga 251.20 nm. EV pasca-kemoterapi adalah lebih pekat dengan anggaran $> 2 \times 10^9$ $\mu\text{g/ml}$ berbanding EV sebelum kemoterapi. Perincian EV ini adalah peringkat dan langkah terpenting dalam setiap kajian berkenaan biologi EV bagi memastikan EV telah berjaya diasing dan diciri sebelum digunakan dalam asai – asai seterusnya. Kompilasi penemuan dan informasi daripada kajian EV terdahulu telah dikumpul oleh *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) dan menjadi rujukan kepada semua penyelidik EV. ISEV juga bertindak sebagai penentu dan pengubah piawai pencirian EV saban tahun. Keheterogenan EV pula menjadi halangan dan cabaran utama dalam pemilihan terbaik kaedah pengasingan dan perincian untuk mengurangkan risiko, kekurangan dan mempertingkatkan penjaan hasil kajian EV yang tepat semasa kajian dijalankan.

Seterusnya, kami telah dapat mengetahui bahawa kesan fungsi EV pra- dan pasca-kemoterapi adalah berbeza setelah beberapa asai fungsian dijalankan. Keseluruhannya, EV diaruh kemoterapi berkemampuan untuk merencatkan kitar sel dalam Fasa S, hampir sebanyak 50% sel tidak berjaya masuk ke Fasa S melepasi Fasa G0/G1. Menariknya, hanya tinggal 20% berjaya masuk ke Fasa G2/M berbanding keseluruhan peratusan sel di fasa permulaan kitar sel. Kesan fungsi EV ini seterusnya menjawab persoalan kematian sel T CD8⁺ dan sel Jurkat dengan kadar yang lebih banyak dengan lipat ganda perubahan masing – masing hampir > 3 dan 1 berbanding kesan EV tidak diaruh kemoterapi seperti jangkaan awal kami. Tambahan pula, EV berpasangan yang sepadan telah diasing daripada penderma – penderma pula memberikan impak yang berbeza – beza perbandingan pra- dan pasca-kemoterapi mengikut setiap individu itu sendiri.

Kami juga telah dapat menentukan tahap ekspresi gen utama berkaitan imun dalam subset sel limfosit T setelah rangsangan oleh EV pra- dan pasca-kemoterapi. Hasil saringan gen – gen yang tertumpu kepada tapak jalan anergi sel T dan tolerans imun manusia telah mengesahkan tahap ekspresi gen – gen utama yang berkaitan dengan sitokin dan kematian sel imun seperti IL-2 dan Granzyme B yang diregulasi lebih tinggi hasil rangsangan oleh EV diaruh kemoterapi namun tidak signifikan. Manakala, gen – gen yang berkaitan dengan perkembangan sel limfosit, inflamasi pada persekitaran usus dan penyakit berkaitan gastrousus (GI) seperti gen *PTGS2*, *Fos*, *LTA*, *Fas*, *FOXP2*, *IL10*, *IL7R* dan *EGR3* pula diekspres secara signifikan pra- dan pasca-kemoterapi. Hal ini dapat menunjukkan kesan dan interaksi EV terhadap sel imun dalam persekitaran usus dan mikro tumor adalah berbeza. Rangsangan EV diaruh kemoterapi terhadap sel limfosit T juga dilihat mendorong penyakit gastrousus seperti kanser usus dapat bertapak dengan jayanya dengan mengganggu ekspresi gen – gen penting dalam pengekalan homeostasis sel imun secara normal. Tambahan pula, kami telah mengenal pasti profil sitokin yang dirembes keluar oleh sel limfosit T semasa rangsangan oleh EV tidak diaruh dan diaruh kemoterapi. Sel – sel imun yang dirangsang dengan EV pasca- kemoterapi mempunyai profil sitokin yang berbeza daripada sel – sel yang tidak dirangsang EV. Hasil pemprofilan sitokin ini amat membantu kami untuk mencari kaitan ekspresi gen – gen utama imun dengan kadar rembesan sitokin oleh sel limfosit T dalam mempertahankan tubuh manusia daripada dieksploitasi oleh sel kanser

Kesimpulannya, hasil kajian kami dapat merumuskan bahawa kemoterapi dapat mempengaruhi sifat dan fungsian EV terutamanya dari segi imunomodulasi terhadap sel limfosit. Walaubagaimanapun, kajian lanjutan masih diperlukan untuk memperkasa pemahaman tentang biologi EV ini memandangkan kajian ini hanyalah kajian awal pembukti - konsep (*preliminary proof-of-concept study*).

6.2 LIMITASI KAJIAN

Cabaran terbesar dalam melaksanakan kajian ini bermula dari peringkat awal kajian selain cabaran dalam pengubahsuaian protokol pengeluaran yang tersedia ada untuk setiap eksperimen dalam kajian ini. Sampel – sampel klinikal telah mula dikumpulkan sebaik sahaja mendapat kelulusan etika. Faktor kekangan masa telah menghadkan kami untuk mengumpul sampel – sampel yang sepadan dengan lebih banyak. Hanya sebanyak sembilan (9) pasang sampel pesakit kanser usus yang sepadan (pra- dan pasca-kemoterapi) telah berjaya dikumpul untuk kajian ini. Secara keseluruhannya., kami juga berkesempatan untuk mengumpul sejumlah 42 orang pesakit kanser usus pra- dan pasca-kemoterapi menjalani rawatan kemoterapi ($n = 22$, $n = 20$) dalam jangkaan masa yang telah dirancang.

Pengasingan EV juga antara limitasi yang perlu kami hadapi setelah sampel serum pesakit kanser usus berjaya dikumpulkan disebabkan keheterogenan EV. Penyelidik biologi EV lazimnya menggunakan kaedah ultraempuran, emparan cerun ketumpatan, kromatografi pengasingan saiz dan pemendakan berasas-polimer untuk pengasingan EV di peringkat awal kajian mereka. Kesemua teknologi – teknologi ini berkemampuan untuk menghasilkan tahap perolehan EV yang berbeza – beza dan menyusutkan cecair protein dan lipoprotein daripada sampel EV. Kami juga tidak dapat menentukan jenis EV yang telah kami asing, sama ada eksosom ataupun mikrovesikel telah berjaya diasingkan mengikut perincian yang tepat.

Setiap EV telah diasingkan menggunakan kit berskala kecil yang sedia ada di pasaran dengan cepat dan lebih mudah. Namun, teknik pengasingan ini tidak spesifik kepada sel – sel asal tertentu dan masih memerlukan beberapa langkah pengayaan EV untuk meningkatkan perolehan dan ketulenan EV selepas diasing. Walaubagaimanapun, kit pengasingan yang dikomersialkan adalah lebih fleksibel

skalanya dan mempunyai protokol yang telah ditetapkan oleh pengeluar. Kit pengasingan juga tidak mampu untuk mengatasi masalah dan meminimalkan kehadiran protein serum seperti albumin yang telah dapat diperlihat dalam pemblotan *western* dalam kajian ini. Seterusnya, teknologi lain yang dapat digunakan untuk mengukur saiz EV dengan lebih tepat dan tersedia ada di Malaysia adalah terhad. Sebagai contoh, ramai penyelidik di luar Malaysia lebih cenderung untuk memilih teknologi *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) berbanding *Dynamic Light Scattering* (DLS) seperti kami gunakan dalam kajian ini. Tambahan pula, kami hanya mempunyai pilihan untuk menggunakan kaedah DLS kerana sukar untuk mendapatkan teknologi NTA di Malaysia. Namun begitu, kedua – dua kaedah ini tidak mempunyai banyak perbezaan malah mengukur zarah dengan ketepatan yang hampir sama namun DLS mengukur zarah dengan lebih pantas sebaliknya NTA boleh memberikan resolusi yang lebih tinggi.

Seterusnya, kami tidak dapat menentukan sel asal EV yang telah kami asingkan daripada serum pesakit kanser usus untuk kajian ini. Sampel serum pesakit kanser usus mengandungi variasi jenis EV yang dirembes keluar oleh sel – sel seperti sel normal, sel imun mahupun sel kanser yang mengelilingi tubuh manusia. Oleh itu, kajian kami tidak terhad untuk mengkaji sel yang menyumbang kepada imunomodulasi EV secara spesifik. Kajian lebih lanjut untuk menyiasat kesan fungsi imun yang disebabkan oleh seluruh populasi EV atau populasi EV yang tertentu sahaja masih diperlukan untuk pemahaman yang lebih baik.

6.3 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

Zarah biologi bersaiz nano seperti EV ini berpotensi untuk dijadikan sebagai penanda biologi bagi membantu para doktor membuat pengesanan awal pesakit kanser usus mahupun penyakit yang lain. EV juga mampu untuk menjanjikan masa depan yang cerah dengan penglibatannya dalam bidang penyelidikan perubatan. EV juga boleh menyumbang kepada perekaan dan pembangunan ubat dalam bidang ubat ketepatan (*precision medicine*). Para penyelidik akan datang boleh menggunakan EV sebagai vektor kepada terapi kanser yang lebih terarah juga khusus untuk seseorang pesakit melalui kaedah penghantaran ubat yang telah direka khas untuk penerimanya. Masa depan kajian biologi EV juga boleh menumpukan pencarian dan memperkenalkan piawai untuk mengasingkan EV dengan lebih baik dan mampu untuk mengatasi cabaran keheterogenan EV.

Disamping itu, beberapa penambahbaikan juga perlu diberikan perhatian untuk mengatasi limitasi yang kami hadapi dalam kajian ini. Pengumpulan sampel – sampel klinikal boleh diperluaskan kepada beberapa buah hospital dan pusat perubatan yang lain untuk mendapatkan sampel EV yang sepadan dengan lebih banyak disamping dapat mengatasi kekangan masa. Selain itu, sampel klinikal juga boleh dikumpul pada setiap kitaran kemoterapi untuk membuat perbandingan berterusan kesan EV bagi setiap penderma. Teknik – teknik untuk mengasingkan EV juga perlu ditambah baik untuk mencirikan EV secara fizikal dan komposisinya sebelum digunakan dalam asai fungsian pada masa hadapan.

Selain itu, kesan EV terhadap sistem imun dan persekitaraan mikro tumor juga boleh dikaji dengan lebih lanjut dengan mengkultur EV bersama sel – sel imun yang lain seperti sel pembunuh semula jadi (*NK cells*) dan subset sel limfosit yang lain. Para penyelidik yang akan datang juga boleh menjalankan kajian sel kultur secara *in vitro* dan *in vivo* untuk memahami mekanisme biologi EV dengan lebih mendalam. Oleh itu, kesan EV sebelum dan selepas kemoterapi terhadap sel imun manusia dapat dikaji dan dinilai dengan lebih tepat dan berjaya.

RUJUKAN

- Ab Razak, N.S., Ab Mutalib, N.S., Mohtar, M.A. & Abu, N. 2019. Impact of Chemotherapy on Extracellular Vesicles: Understanding the Chemo-EVs. *Frontiers in Oncology* 9: 1113.
- Abdullah, A., Huq, F., Chowdhury, A., Tayyem, H., Beale, P. & Fisher, K. 2006. [No title found]. *BMC Chemical Biology* 6(1): 3.
- Abu, N., Othman, N., Ab Razak, N.S., Bakarurraini, N.A.A.R., Nasir, S.N., Soh, J.E.C., Mazlan, L., Azman, Z.A.M. & Jamal, R. 2020. Extracellular Vesicles Derived From Colorectal Cancer Affects CD8 T Cells: An Analysis Based on Body Mass Index. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 564648.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S. & Chen, C.C. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* 113(1): 1–11.
- Akinyemiju, T., Ogunsina, K., Okwali, M., Sakhuja, S. & Braithwaite, D. 2017. Lifecourse socioeconomic status and cancer-related risk factors: Analysis of the WHO study on global ageing and adult health (SAGE): Lifecourse socioeconomic status and cancer-related risk factors. *International Journal of Cancer* 140(4): 777–787.
- Akkoca, A.N., Yanık, S., Özdemir, Z.T., Cihan, F.G., Sayar, S., Cincin, G., Çam, A. & Özer, C. (n.d.). TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma: 8.
- Aksoy, B.A., Aksoy, P., Wyatt, M., Paulos, C. & Hammerbacher, J. 2018. Human primary T cells: A practical guide. preprint, PeerJ Preprints.:
- Andreu, Z., Rivas, E., Sanguino-Pascual, A., Lamana, A., Marazuela, M., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., de la Fuente, H. & Yáñez-Mó, M. 2016. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *Journal of Extracellular Vesicles* 5(1): 31655.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66(4): 683–691.

- Azambuja, J.H., Ludwig, N., Yerneni, S., Rao, A., Braganhol, E. & Whiteside, T.L. 2020. Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes. *Neuro-Oncology Advances* 2(1): vdaa056.
- Bakkenist, C.J., Lee, J.J. & Schmitz, J.C. 2018. ATM Is Required for the Repair of Oxaliplatin-Induced DNA Damage in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 17(4): 255–257.
- Beccard, I.J., Hofmann, L., Schroeder, J.C., Ludwig, S., Laban, S., Brunner, C., Lotfi, R., Hoffmann, T.K., Jackson, E.K., Schuler, P.J. & Theodoraki, M.-N. 2020. Immune Suppressive Effects of Plasma-Derived Exosome Populations in Head and Neck Cancer. *Cancers* 12(7): 1997.
- Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Le Chevalier, T., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., Ploix, S., Vimond, N., Peguillet, I., Th  ry, C., Lacroix, L., Zoernig, I., Dhodapkar, K., Dhodapkar, M., Viaud, S., Soria, J.-C., Reiners, K.S., Pogge von Strandmann, E., V  ly, F., Rusakiewicz, S., Eggermont, A., Pitt, J.M., Zitvogel, L. & Chaput, N. 2016. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *OncoImmunology* 5(4): e1071008.
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N. & Frazer, I.H. 2017. Interferon-   derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death & Disease* 8(6): e2836–e2836.
- Bickmore, D.C. & Miklavcic, J.J. 2020. Characterization of Extracellular Vesicles Isolated From Human Milk Using a Precipitation-Based Method. *Frontiers in Nutrition* 7: 22.
- Bosch, F. & Rosich, L. 2008. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology* 82(3): 171–179.
- Boyd, L.A., McCann, M.J., Hashim, Y., Bennett, R.N., Gill, C.I.R. & Rowland, I.R. 2006. Assessment of the Anti-Genotoxic, Anti-Proliferative, and Anti-Metastatic Potential of Crude Watercress Extract in Human Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* 55(2): 232–241.
- Brzozowski, J.S. 2018. Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion. *SCIENTIFIC REporTS*: 13.

- Carnino, J.M., Lee, H. & Jin, Y. 2019. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respiratory Research* 20(1): 240.
- Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Rittweger, K., Gilberg, F. & Saltz, L. 2011. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *British Journal of Cancer* 105(1): 58–64.
- Cheeseman, S.L., Joel, S.P., Chester, J.D., Wilson, G., Dent, J.T., Richards, F.J. & Seymour, M.T. 2002. A 'modified de Gramont' regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 87(4): 393–399.
- Chiang, C. & Chen, C. 2019. Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level. *Journal of Biomedical Science* 26(1): 9.
- Chiorean, E.G., Nandakumar, G., Fadelu, T., Temin, S., Alarcon-Rozas, A.E., Bejarano, S., Croitoru, A.-E., Grover, S., Lohar, P.V., Odhiambo, A., Park, S.H., Garcia, E.R., Teh, C., Rose, A., Zaki, B. & Chamberlin, M.D. 2020. Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Global Oncology*(6): 414–438.
- Chuo, S.T.-Y., Chien, J.C.-Y. & Lai, C.P.-K. 2018. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *Journal of Biomedical Science* 25(1): 91.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C. & Raposo, G. 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* 126(24): 5553–5565.
- Conejo-Garcia, J.R. 2019. Breaking barriers for T cells by targeting the EPHA2/TGF- β /COX-2 axis in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Investigation* 129(9): 3521–3523.
- Conway, J.R., Kofman, E., Mo, S.S., Elmarakeby, H. & Van Allen, E. 2018. Genomics of response to immune checkpoint therapies for cancer: implications for precision medicine. *Genome Medicine* 10(1): 93.
- Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740: 364–378.

- DeVita, V.T. & Chu, E. 2008. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research* 68(21): 8643–8653.
- Ding, G., Zhou, L., Qian, Y., Fu, M., Chen, J., Chen, J., Xiang, J., Wu, Z., Jiang, G. & Cao, L. 2015. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget* 6(30): 29877–29888.
- Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. 2004. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21(2): 137–148.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O. & Wood, M.J.A. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12(5): 347–357.
- Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M.-P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., Boccaccio, C., Bonnerot, C., Dhellin, O., Movassagh, M., Piperno, S., Robert, C., Serra, V., Valente, N., Le Pecq, J.-B., Spatz, A., Lantz, O., Tursz, T., Angevin, E. & Zitvogel, L. 2005. [No title found]. *Journal of Translational Medicine* 3(1): 10.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D. & Croce, C.M. 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(31): E2110–E2116.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S.F. & Wang, H.L. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3(3): 21.
- Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T. & Takeshita, F. 2014. The Impact of Extracellular Vesicle-Encapsulated Circulating MicroRNAs in Lung Cancer Research. *BioMed Research International* 2014: 1–8.
- Fujita, Y., Yoshioka, Y. & Ochiya, T. 2016. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Science* 107(4): 385–390.
- Galli, F., Aguilera, J.V., Palermo, B., Markovic, S.N., Nisticò, P. & Signore, A. 2020. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era

of immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39(1): 89.

Gao, L., Wang, L., Dai, T., Jin, K., Zhang, Z., Wang, S., Xie, F., Fang, P., Yang, B., Huang, H., van Dam, H., Zhou, F. & Zhang, L. 2018. Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity. *Nature Immunology* 19(3): 233–245.

Göbel, C., Breitenbuecher, F., Kalkavan, H., Hähnel, P.S., Kasper, S., Hoffarth, S., Merches, K., Schild, H., Lang, K.S. & Schuler, M. 2014. Functional expression cloning identifies COX-2 as a suppressor of antigen-specific cancer immunity. *Cell Death & Disease* 5(12): e1568–e1568.

Guan, Y., Kraus, S.G., Quaney, M.J., Daniels, M.A., Mitchem, J.B. & Teixeira, E. 2020. FOLFOX Chemotherapy Ameliorates CD8 T Lymphocyte Exhaustion and Enhances Checkpoint Blockade Efficacy in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology* 10: 586.

Gun, S.Y., Lee, S.W.L., Sieow, J.L. & Wong, S.C. 2019. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biology* 25: 101174.

Guo, L., Zhu, Y., Li, L., Zhou, S., Yin, G., Yu, G. & Cui, H. 2019. Breast cancer cell-derived exosomal miR-20a-5p promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts by targeting SRCIN1. *Cancer Medicine* 8(12): 5687–5701.

Haderk, F., Schulz, R., Iskar, M., Cid, L.L., Worst, T., Willmund, K.V., Schulz, A., Warnken, U., Seiler, J., Benner, A., Nessling, M., Zenz, T., Göbel, M., Dürig, J., Diederichs, S., Paggetti, J., Moussay, E., Stilgenbauer, S., Zapatka, M., Lichter, P. & Seiffert, M. 2017. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Science Immunology* 2(13): eaah5509.

Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H.-J., Monien, B., Rietjens, I.M.C.M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P. & Eisenbrand, G. 2020. Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology* 94(6): 1787–1877.

Hayes, D.F. & Schott, A.F. 2015. Neoadjuvant Chemotherapy: What Are the Benefits for the Patient and for the Investigator? *JNCI Monographs* 2015(51): 36–39.

Hazama, S., Nakamura, Y., Tanaka, H., Hirakawa, K., Tahara, K., Shimizu, R., Ozasa, H., Etoh, R., Sugiura, F., Okuno, K., Furuya, T., Nishimura, T., Sakata, K., Yoshimatsu, K., Takenouchi, H., Tsunedomi, R., Inoue, Y., Kanekiyo, S.,

- Shindo, Y., Suzuki, N., Yoshino, S., Shinozaki, H., Kamiya, A., Furukawa, H., Yamanaka, T., Fujita, T., Kawakami, Y. & Oka, M. 2014. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *Journal of Translational Medicine* 12(1): 108.
- Henriksen, J.R., Nederby, L., Donskov, F., Waldstrøm, M., Adimi, P., Jakobsen, A. & Steffensen, K.D. 2020. Prognostic significance of baseline T cells, B cells and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) in recurrent ovarian cancer treated with chemotherapy. *Journal of Ovarian Research* 13(1): 59.
- Herrero, M.J. & Gitton, Y. 2018. The untold stories of the speech gene, the FOXP2 cancer gene. *Genes & Cancer* 9(1-2): 11–38.
- Hon, K.W., Abu, N., Ab Mutalib, N.-S. & Jamal, R. 2018. miRNAs and lncRNAs as Predictive Biomarkers of Response to FOLFOX Therapy in Colorectal Cancer. *Frontiers in Pharmacology* 9: 846.
- Hong, C.-S. (n.d.). Increased small extracellular vesicle secretion after chemotherapy via upregulation of cholesterol m: 10.
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G. & Rivoltini, L. 2005. Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Escape. *Gastroenterology* 128(7): 1796–1804.
- Itoh, Y. & Germain, R.N. (n.d.). Single Cell Analysis Reveals Regulated Hierarchical T Cell Antigen Receptor Signaling Thresholds and Intracelonal Heterogeneity for Individual Cytokine Responses of CD42 T Cells: 10.
- Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum, Hashiguchi, Y., Muro, K., Saito, Y., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., Hotta, K., Ishida, H., Ishiguro, M., Ishihara, S., Kanemitsu, Y., Kinugasa, Y., Murofushi, K., Nakajima, T.E., Oka, S., Tanaka, T., Taniguchi, H., Tsuji, A., Uehara, K., Ueno, H., Yamanaka, T., Yamazaki, K., Yoshida, M., Yoshino, T., Itabashi, M., Sakamaki, K., Sano, K., Shimada, Y., Tanaka, S., Uetake, H., Yamaguchi, S., Yamaguchi, N., Kobayashi, H., Matsuda, K., Kotake, K. & Sugihara, K. 2020. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology* 25(1): 1–42.

- Jasenosky, L.D., Nambu, A., Tsytsykova, A.V., Ranjbar, S., Haridas, V., Kruidenier, L., Tough, D.F. & Goldfeld, A.E. 2020. Identification of a Distal Locus Enhancer Element That Controls Cell Type-Specific *TNF* and *LTA* Gene Expression in Human T Cells. *The Journal of Immunology* 205(9): 2479–2488.
- Jonker, D., Rumble, R.B., Maroun, J., & the Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-Based Care. 2006. Role of Oxaliplatin Combined with 5-Fluorouracil and Folinic Acid in the First- and Second-Line Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *Current Oncology* 13(5): 173–184.
- Kartal-Yandim, M., Adan-Gokbulut, A. & Baran, Y. 2016. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Critical Reviews in Biotechnology* 36(4): 716–726.
- Karttunen, J., Heiskanen, M., Navarro-Ferrandis, V., Das Gupta, S., Lipponen, A., Puhakka, N., Rilla, K., Koistinen, A. & Pitkänen, A. 2019. Precipitation-based extracellular vesicle isolation from rat plasma co-precipitate vesicle-free microRNAs. *Journal of Extracellular Vesicles* 8(1): 1555410.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S. & Whiteside, T.L. (n.d.). Fas Ligand-Positive Membranous Vesicles Isolated from Sera of Patients with Oral Cancer Induce Apoptosis of Activated T Lymphocytes: 12.
- Kim, Y.S., Hong, J., Sym, S.J., Park, S.H., Park, J., Cho, E.K., Lee, J.H. & Shin, D.B. 2010. Oxaliplatin, 5-fluorouracil and Leucovorin (FOLFOX-4) Combination Chemotherapy as a Salvage Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Research and Treatment* 42(1): 24.
- Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K.J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T. & Kawai, T. 2017. DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology* 198(4): 1649–1659.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M. & Théry, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(8): E968–E977.

- Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C. & Bishop, D.J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLOS ONE* 13(5): e0196438.
- Le Roy, B., Tixier, L., Pereira, B., Sauvanet, P., Buc, E., Pétorin, C., Déchelotte, P., Pezet, D. & Balayssac, D. 2016. Assessment of the Relation between the Expression of Oxaliplatin Transporters in Colorectal Cancer and Response to FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy: A Case Control Study. *PLOS ONE* 11(2): e0148739.
- Leone, R.D. & Powell, J.D. 2020. Metabolism of immune cells in cancer. *Nature Reviews Cancer* 20(9): 516–531.
- Lim, J., Choi, M., Lee, H., Kim, Y.-H., Han, J.-Y., Lee, E.S. & Cho, Y. 2019. Direct isolation and characterization of circulating exosomes from biological samples using magnetic nanowires. *Journal of Nanobiotechnology* 17(1): 1.
- Liu, J., Wu, S., Zheng, X., Zheng, P., Fu, Y., Wu, C., Lu, B., Ju, J. & Jiang, J. 2020a. Immune suppressed tumor microenvironment by exosomes derived from gastric cancer cells via modulating immune functions. *Scientific Reports* 10(1): 14749.
- Liu, J., Wu, S., Zheng, X., Zheng, P., Fu, Y., Wu, C., Lu, B., Ju, J. & Jiang, J. 2020b. Immune suppressed tumor microenvironment by exosomes derived from gastric cancer cells via modulating immune functions. *Scientific Reports* 10(1): 14749.
- Liu, Q., Li, Y., Niu, Z., Zong, Y., Wang, M., Yao, L., Lu, Z., Liao, Q. & Zhao, Y. 2016. Atorvastatin (Lipitor) attenuates the effects of aspirin on pancreatic cancerogenesis and the chemotherapeutic efficacy of gemcitabine on pancreatic cancer by promoting M2 polarized tumor associated macrophages. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35(1): 33.
- Lopes, G., Stern, M.C., Temin, S., Sharara, A.I., Cervantes, A., Costas-Chavarri, A., Engineer, R., Hamashima, C., Ho, G.F., Huitzil, F.D., Moghani, M.M., Nandakumar, G., Shah, M.A., Teh, C., Manjarrez, S.E.V., Verjee, A., Yantiss, R. & Correa, M.C. 2019. Early Detection for Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *Journal of Global Oncology*(5): 1–22.
- Ludwig, S., Floros, T., Theodoraki, M.-N., Hong, C.-S., Jackson, E.K., Lang, S. & Whiteside, T.L. 2017. Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research* 23(16): 4843–4854.

- Madeo, M., Colbert, P.L., Vermeer, D.W., Lucido, C.T., Cain, J.T., Vichaya, E.G., Grossberg, A.J., Muirhead, D., Rickel, A.P., Hong, Z., Zhao, J., Weimer, J.M., Spanos, W.C., Lee, J.H., Dantzer, R. & Vermeer, P.D. 2018. Cancer exosomes induce tumor innervation. *Nature Communications* 9(1): 4284.
- Maeda, H. & Khatami, M. 2018. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clinical and Translational Medicine* 7(1).
- Margolis, L. & Sadovsky, Y. 2019. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLOS Biology* 17(7): e3000363.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. & Rodríguez Yoldi, M. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18(1): 197.
- Martinho, N., Santos, T.C.B., Florindo, H.F. & Silva, L.C. 2019. Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Frontiers in Physiology* 9: 1898.
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L. & Siegel, R.L. 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69(5): 363–385.
- Mojic, M., Takeda, K. & Hayakawa, Y. 2017. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immune evasion. *International Journal of Molecular Sciences* 19(1): 89.
- Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W.E. & Whiteside, T.L. 2016. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Scientific Reports* 6(1): 20254.
- Ni, L. & Lu, J. 2018. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine* 7(9): 4509–4516.
- Nicholson, L.B. 2016. The immune system. *Essays in Biochemistry* 60(3): 275–301.
- Nikolouzakis, T., Vassilopoulou, L., Fragkiadaki, P., Mariolis Sapsakos, T., Papadakis, G., Spandidos, D., Tsatsakis, A. & Tsiaoussis, J. 2018. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncology Reports*.

Onyema, O.O., Decoster, L., Njemini, R., Forti, L.N., Bautmans, I., Waele, M.D. & Mets, T. 2015. Chemotherapy-induced Changes and Immunosenescence of CD8⁺ T-Cells in Patients with Breast Cancer. *ANTICANCER RESEARCH*: 9.

Opzoomer, J.W., Sosnowska, D., Anstee, J.E., Spicer, J.F. & Arnold, J.N. 2019. Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer. *Frontiers in Immunology* 10: 1654.

Othman, N., Jamal, R. & Abu, N. 2019. Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. *Frontiers in Immunology* 10: 2103.

Pritchard, A., Tousif, S., Wang, Y., Hough, K., Khan, S., Strenkowski, J., Chacko, B.K., Darley-Usmar, V.M. & Deshane, J.S. 2020. Lung Tumor Cell-Derived Exosomes Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells* 9(5): 1303.

Qu, J.-L., Qu, X.-J., Qu, J.-L., Qu, X.-J., Zhao, M.-F., Teng, Y.-E., Zhang, Y., Hou, K.-Z., Jiang, Y.-H., Yang, X.-H. & Liu, Y.-P. 2009. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncologica* 48(8): 1173–1180.

Ramirez, M.I., Amorim, M.G., Gadelha, C., Milic, I., Welsh, J.A., Freitas, V.M., Nawaz, M., Akbar, N., Couch, Y., Makin, L., Cooke, F., Vettore, A.L., Batista, P.X., Freezor, R., Pezuk, J.A., Rosa-Fernandes, L., Carreira, A.C.O., Devitt, A., Jacobs, L., Silva, I.T., Coakley, G., Nunes, D.N., Carter, D., Palmisano, G. & Dias-Neto, E. 2018. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale* 10(3): 881–906.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. & Lin, X. 2014. An improvement of the 2^{−(delta delta CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis: 13.

Rosen, S.A. 2000. Initial Presentation With Stage IV Colorectal Cancer: How Aggressive Should We Be? *Archives of Surgery* 135(5): 530.

Sharma, P., Diergaarde, B., Ferrone, S., Kirkwood, J.M. & Whiteside, T.L. 2020. Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Scientific Reports* 10(1): 92.

Shen, T., Huang, Z., Shi, C., Pu, X., Xu, X., Wu, Z., Ding, G. & Cao, L. 2020. Pancreatic cancer-derived exosomes induce apoptosis of T lymphocytes through the p38

MAPK-mediated endoplasmic reticulum stress. *The FASEB Journal* 34(6): 8442–8458.

Siegler, E.L., Kim, Y.J. & Wang, P. 2016. Nanomedicine targeting the tumor microenvironment: Therapeutic strategies to inhibit angiogenesis, remodel matrix, and modulate immune responses. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2(2): 69–78.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. & Diederich, M. 2010. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology* 2010: 1–21.

Stojanovska, V., Prakash, M., McQuade, R., Fraser, S., Apostolopoulos, V., Sakkal, S. & Nurgali, K. 2019. Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses. *BioMed Research International* 2019: 1–15.

Suh, M., Wikoff, D., Lipworth, L., Goodman, M., Fitch, S., Mittal, L., Ring, C. & Proctor, D. 2019. Hexavalent chromium and stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Toxicology* 49(2): 140–159.

Tai, Y.-L., Chu, P.-Y., Lee, B.-H., Chen, K.-C., Yang, C.-Y., Kuo, W.-H. & Shen, T.-L. 2019. Basics and applications of tumor-derived extracellular vesicles. *Journal of Biomedical Science* 26(1): 35.

Tesovnik, T., Kovač, J., Pohar, K., Hudoklin, S., Dovč, K., Bratina, N., Trebušak Podkrajšek, K., Debeljak, M., Veranič, P., Bosi, E., Piemonti, L., Ihan, A. & Battelino, T. 2020. Extracellular Vesicles Derived Human-miRNAs Modulate the Immune System in Type 1 Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 202.

Theodoraki, M.-N., Hoffmann, T.K. & Whiteside, T.L. 2018. Separation of plasma-derived exosomes into CD3⁽⁺⁾ and CD3⁽⁻⁾ fractions allows for association of immune cell and tumour cell markers with disease activity in HNSCC patients: CD3⁺ and CD3⁽⁻⁾ exos in plasma of HNSCC patients. *Clinical & Experimental Immunology* 192(3): 271–283.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* 30(1).

- Tong, G.-J., Zhang, G.-Y., Liu, J., Zheng, Z.-Z., Chen, Y., Niu, P.-P. & Xu, X.-T. 2018. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World Journal of Clinical Oncology* 9(7): 148–161.
- Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J.-L., Van Laethem, J.-L., Maurel, J., Richardson, G., Wolf, M. & Amado, R.G. 2007. Open-Label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25(13): 1658–1664.
- Vogel, L.K., Sæbø, M., Høyer, H., Kopp, T.I., Vogel, U., Godiksen, S., Frenzel, F.B., Hamfjord, J., Bowitz-Lothe, I.M., Johnson, E., Kure, E.H. & Andersen, V. 2014. Intestinal PTGS2 mRNA Levels, PTGS2 Gene Polymorphisms, and Colorectal Carcinogenesis. *PLoS ONE* 9(8): e105254.
- Vulpis, E., Cecere, F., Molfetta, R., Soriani, A., Fionda, C., Peruzzi, G., Caracciolo, G., Palchetti, S., Masuelli, L., Simonelli, L., D'Oro, U., Abruzzese, M.P., Petrucci, M.T., Ricciardi, M.R., Paolini, R., Cippitelli, M., Santoni, A. & Zingoni, A. 2017. Genotoxic stress modulates the release of exosomes from multiple myeloma cells capable of activating NK cell cytokine production: Role of HSP70/TLR2/NF- κ B axis. *OncoImmunology* 6(3): e1279372.
- Walker, S., Busatto, S., Pham, A., Tian, M., Suh, A., Carson, K., Quintero, A., Lafrence, M., Malik, H., Santana, M.X. & Wolfram, J. 2019. Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Theranostics* 9(26): 8001–8017.
- Wang, J., Li, D., Cang, H. & Guo, B. 2019a. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine* 8(10): 4709–4721.
- Wang, X., Qiao, D., Chen, L., Xu, M., Chen, S., Huang, L., Wang, F., Chen, Z., Cai, J. & Fu, L. 2019b. Chemotherapeutic drugs stimulate the release and recycling of extracellular vesicles to assist cancer cells in developing an urgent chemoresistance. *Molecular Cancer* 18(1): 182.
- Wegiel, B., Vuerich, M., Daneshmandi, S. & Seth, P. 2018. Metabolic Switch in the Tumor Microenvironment Determines Immune Responses to Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 8: 284.

- Whiteside, T. 2016. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Tumor-Induced Immune Suppression. *Vaccines* 4(4): 35.
- Wieckowski, E.U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M.J., Storkus, W.J. & Whiteside, T.L. 2009. Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 183(6): 3720–3730.
- Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M.J.A. & Vader, P. 2018. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Frontiers in Immunology* 9: 738.
- Xie, M., Xiong, W., She, Z., Wen, Z., Abdirahman, A.S., Wan, W. & Wen, C. 2020. Immunoregulatory Effects of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 11: 13.
- Xu, H., Li, N., Yao, N., Xu, X., Wang, H., Liu, X. & Zhang, Y. 2019. CD8⁺ T cells stimulated by exosomes derived from RenCa cells mediate specific immune responses through the FasL/Fas signaling pathway and, combined with GM-CSF and IL-12, enhance the anti-renal cortical adenocarcinoma effect. *Oncology Reports*.
- Ye, S., Li, Z.-L., Luo, D., Huang, B., Chen, Y.-S., Zhang, X., Cui, J., Zeng, Y. & Li, J. 2014. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 5(14): 5439–5452.
- Yin, Z., Fan, J., Xu, J., Wu, F., Li, Y., Zhou, M., Liao, T., Duan, L., Wang, S., Geng, W. & Jin, Y. 2020. Immunoregulatory Roles of Extracellular Vesicles and Associated Therapeutic Applications in Lung Cancer. *Frontiers in Immunology* 11: 2024.
- Ying, X., Wu, Q., Wu, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X. & Wang, X. 2016. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 7(28): 43076–43087.
- Zhang, H.-G. & Grizzle, W.E. 2014. Exosomes. *The American Journal of Pathology* 184(1): 28–41.

- Zhang, J., Zhang, L. & Yang, H. 2014. Sample Size Consideration for Immunoassay Screening Cut-Point Determination. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 24(3): 535–545.
- Zhang, M., Fan, Y., Che, X., Hou, K., Zhang, C., Li, C., Wen, T., Wang, S., Cheng, Y., Liu, Y. & Qu, X. 2020. 5-FU-Induced Upregulation of Exosomal PD-L1 Causes Immunosuppression in Advanced Gastric Cancer Patients. *Frontiers in Oncology* 10: 492.
- Zhang, W., Ou, X. & Wu, X. 2019. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *International Journal of Oncology*.
- Zheng, Y.-R., Suntharalingam, K., Johnstone, T.C., Yoo, H., Lin, W., Brooks, J.G. & Lippard, S.J. 2014. Pt(IV) Prodrugs Designed to Bind Non-Covalently to Human Serum Albumin for Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society* 136(24): 8790–8798.
- Zhou, X., Xie, F., Wang, L., Zhang, L., Zhang, S., Fang, M. & Zhou, F. 2020. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. *Cellular & Molecular Immunology* 17(4): 323–334.
- Zoetemelk, M., Ramzy, G.M., Rausch, M. & Nowak-Sliwinska, P. 2020. Drug-Drug Interactions of Irinotecan, 5-Fluorouracil, Folinic Acid and Oxaliplatin and Its Activity in Colorectal Carcinoma Treatment. *Molecules* 25(11): 2614.

LAMPIRAN A

SURAT KELULUSAN ETIKA



UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
The National University of Malaysia

Pusat Pengurusan Penyelidikan dan Instrumentasi / Centre for Research and Instrumentation Management

Rujukan: UKM PPU/11/01/EP-2019-009
 Tarikh: 17 Mei 2019

Dr. Nadiah Abu
 Institut Pendidikan Molekul UKM (IJMB)
 Universiti Kebangsaan Malaysia

Y. Bhj. Profesor Datuk Dato' Datin Tuan Puan

KELULUSAN ETIKA MENJALANKAN PENYELIDIKAN DI UKM

Tajuk Penyelidikan: *Understanding the Effects of Chemosensory-Induced Experiences (Chemosensory) on Human Taste Success*

Penkara yang tersebut di atas adalah diujuk:

1. Sukasta diadunikan Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM meluluskan permohonan penyelidikan Y. Bhj. Profesor Datuk Dato' Datin Tuan Puan bagi tajuk diatas. Tempoh kelulusan penyelidikan adalah daripada 15 Mei 2019 – 15 Mei 2021. Sila kemukakan sebarang Laporan Keseluruhan Sampungan, Laporan Kemajuan Setiap 6 Bulan dan Laporan Akhir sebagai penyelidik dan hantar kepada Jawatankuasa Etika Penyelidikan (JKM)
2. Sukasta bingkikan profil penyelidik ini hanya boleh dipaparkan kepada pihak yang berkepentingan untuk kelulusan menjalankan penyelidikan dan Tindakan. Diketahui Penyelidikan Fakulti atau Pengarah Pusat/Institusi

Sedian, jama kama.

Yang benar,

PROFESOR DATUK DR. FUAD ISMAIL
 Pengarah
 Jawatankuasa Etika Penyelidikan
 Universiti Kebangsaan Malaysia

1. Pengarah
 Pusat Pengurusan Penyelidikan dan Instrumentasi (ICRM)
 Universiti Kebangsaan Malaysia

2. Pengarah
 Institut Pendidikan Molekul UKM (IJMB)
 Universiti Kebangsaan Malaysia

3. Profesor Datuk Dr. A. Rahman A. Jamal
 Dr. Nurul Syakima Ab. Mubtali
 Nur Syahada Ab. Razak
 Institut Pendidikan Molekul UKM (IJMB)
 Universiti Kebangsaan Malaysia

Sekretariat Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia, Tingkat 1, Blok 1001, Hospital Cemerlang Terasa Akhir, Pusat Telekomunikasi
 Jalan Yap Kwan Seng, 61000 Cyberjaya, Selangor Darul Ehsan, MALAYSIA. Telefon: 4633-8149/8148/8049

Menghimpun Harapan, Menggala Masa Depan • Inspiring Futures, Nururing Possibilities www.ukm.my

LAMPIRAN A

KEBENARAN BERTULIS

BORANG KEIZINAN

Tajuk Kajian: Pemahaman fungsi eksosom di dalam pesakit kolorektal kanser yang membuat rawatan kimoterapi terhadap sel T limfosit

Nama Penyelidik:

Saya, IC No:

- telah membaca maklumat yang disediakan dalam **Helaian Maklumat Pesakit** termasuklah risiko kajian ini dan telah mendapat penerangan oleh doktor mengenai tujuan dokumen ini.
- telah diberi masa secukupnya dan semua persoalan telah dijawab dengan memuaskan.
- faham tentang hak untuk menarik diri pada bila-bila masa dari kajian ini.
- faham bahawa maklumat mengenai saya sebagai pesakit tidak akan didedahkan
- dengan sukarelanya menjadi sebahagian dari kajian ini dan akan memberi maklumat yang diperlukan kepada doktor, jururawat dan kakitangan yang berkaitan apabila diminta.

-- Tandatangan	Tarikh
- Saksi (jika ada)	Penyelidik
-- Tandatangan	Tandatangan
- Nombor IC	Nombor IC
-- Tarikh	Tarikh

Penyelidik Utama: Dr. Nadiyah Abu

Penyelidik Bersama: Ms Syahada Razak

UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI)

UKM Medical Centre, Jln Yaacob Latif,

56000 Cheras Kuala Lumpur.

Tel:

03-9145 9068 / 9073 atau 013-5103138 (Dr. Nadiyah)

LAMPIRAN A

HELAIAN INFORMASI

MAKLUMAT UNTUK PESAKIT

KAJIAN KANSER KLOREKTAL

Pemahaman fungsi eksosom di dalam pesakit kolorektal kanser yang membuat rawatan kimoterapi terhadap sistem imun



Kanser Kolorektal, merupakan sejenis kanser yang berlaku di bahagian usus besar dan rektum. Di Malaysia, kanser kolorektal merupakan antara kanser yang paling lazim dihadapi oleh rakyat Malaysia. Terdapat pelbagai jenis factor yang mempengaruhi penyakit ini termasuk kecukupan sistem imunisasi. Ini termasuk rawatan kimoterapi yang dilakukan. Eksosom merupakan molekul yang baru dikenalpasti yang terlibat dalam beberapa proses biologi molekul. Oleh itu, tujuan kajian ini adalah untuk memahami fungsi eksosom di dalam pesakit kanser kolorektal yang membuat rawatan immunoterapi ke atas sistem imun.

APAKAH FAEDAHNYA?

Tidak terdapat secara langsung hasil penglibatan di dalam kajian ini. Walaupun bagaimanapun, penerbitan yang diperolehi dari kajian ini akan menjadi asas kepada ujian diagnostik bagi menilai risiko kegagalan rawatan di dalam pesakit kanser kolorektal pada masa hadapan. Hasil kajian dan maklumat biopasenda anda akan diberi berdasarkan kepada permintaan anda.

DATA & KERAHSIAAN

Maklumat yang diperolehi dari kajian ini akan dilaporkan dan diterbitkan. Ciptaan maklumat hanya boleh dilakukan oleh kumpulan penyelidik yang terlibat sahaja. Walaupun bagaimanapun, pihak lain boleh mendapatkan data penyelidikan ini dengan kebenaran dari penyelidik utama. Laporan yang diperolehi akan dilaporkan secara keseluruhan dan tidak akan menunjuk kepada mana-mana individu ataupun pesakit. Futhu, maklumat dari setiap pesakit adalah sulit.

PERLUKAH SAYA TERLIBAT DALAM KAJIAN INI?

Penyertaan dalam kajian ini adalah secara sukarela. Sekiranya anda bersetuju untuk turut serta, anda perlu menandatangani borang keizinan dan anda akan diberi salinan borang keizinan dan juga risalah Maklumat kepada Pesakit Keputusan anda untuk penyertaan dalam kajian ini tidak akan mempengaruhi rawatan perubatan anda.

Pesakit dan keluarganya ini boleh dilibatkan walaupun telah bersetuju pada awalnya. Data yang diperolehi dari anda tidak akan digunakan dan akan dilaporkan. Penyelidik juga berhak mengahmarikan anda dari kajian jika perlu. Anda tidak akan menerima satu hampangan atau sebagai pesakit.

PENGENALAN

Anda dijemput untuk menyertai kajian ini. Kami merancang untuk mengambil specimen dari 16 orang dewasa yang menghidap penyakit kanser kolorektal yang sedang membuat rawatan kimoterapi. Sebelum bersetuju menyertai kajian ini, adalah penting bagi anda untuk membaca dan memahami butiran maklumat di dalam risalah ini.

TUJUAN KAJIAN

Kajian ini bertujuan untuk memahami fungsi eksosom dalam sistem imunisasi pesakit kanser kolorektal yang menjalani kimoterapi.

APA YANG TERLIBAT DI DALAM KAJIAN INI?

Kajian ini akan melibatkan pengambilan lebih 6 ml (1.2 cawan kecil) sampel darah. Pengambilan darah akan dilakukan sekali pada setiap kitaran kimoterapi selama 6 kitaran. Prosedur pengambilan darah ini adalah merupakan prosedur rutin bagi rawatan pesakit kanser kolorektal. Sampel darah yang diambil akan dilakukan pengesanan eksosom. Pesakit dijangkakan akan terlibat di dalam kajian ini tidak melebihi tiga tahun dari sampel pertama diambil.

APAKAH RISIKONYA?

Proses persampelan bagi kajian ini dibuat di dalam risiko biasa pengambilan darah rutin rawatan pesakit kanser kolorektal. Proses ini tidak mengganggu prosedur piri dan terapi, juga tidak menambahkan risiko kepada pesakit. Oleh itu, tiada isu pampasan dan/atau rawatan kepada kecederaan atau komplikasi dari rawatan sama kajian ini.

BAYARANDAN PAMPASAN

Penyertaan anda adalah secara sukarela. Anda tidak akan dikenakan sebarang bayaran untuk penyertaan anda. Anda juga tidak akan dibayar bagi penglibatan dalam penyelidikan ini. Anda hanya perlu membayar caj hospital seperti biasa.

SIAPA YANG BOLEH SAYA HUBUNGI?

Sekiranya terdapat sebarang persoalan, anda boleh dihubungi kepada:

Penyelidik utama : Dr. Nadiah Abu
 Penyelidik berseutu : Ms Nur Syahada Ab Razak
 Alamat : Institut Perubatan Molekul UKM (UPM)
 Pusat Perubatan UKM, 50570 Kuala Lumpur
 Telefon : 03-9145 9048 / 9073 atau
 013-9103138 (Dr. Nadiah)

Atau

SEKRETARIAT PENYELIDIKAN PERUBATAN & INOVASI
 Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
 Tingkat 15, Bangunan Praktikaliti,
 Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak,
 56000 Cheras, Kuala Lumpur

Tel: 603-9145 9480 / 9481
 Faks: 603 - 9145 5634
 Email: ppri@ppri.ukm.edu.my

LAMPIRAN B
PEMBLOTAN WESTERN (WESTERN BLOT)

Penyediaan Gel Tindanan (*Stacking Gel*) dan Gel Pemisah (*Resolving Gel*)

	Gel Tindanan	Gel Pemisah
	4%	12%
30% Bis/Akrilamida	1.98 ml	6.0 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 ml	-
1,5M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.75 ml
10% SDS	150 ul	150 ul
dH ₂ O	9 ml	5.03 ml
TEMED	15 ul	7.5 ul
10% APS	75 ul	75 ul
Jumlah Isipadu	15 ml	15 ml

Penanda ukuran protein (BIO-RAD *All Blue Precision Standards*, Amerika Syarikat)



LAMPIRAN C

PENYEDIAAN MEDIA UNTUK SEL KULTUR

Media lengkap untuk pengkulturan sel limfosit T dan sel Jurkat

Komponen	Isipadu
Media RPMI 1640 (Nacalai, Jepun)	45 ml
10% serum janin sapi (<i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS) atau FBS yang EV-tersusut	4.5 ml
1% antibiotik (Penicillin-Streptomycin) (Nacalai, Jepun)	450 ul

Penyediaan FBS yang EV-tersusut (*EV-depleted FBS*) melalui kaedah Ultraempar

Sebanyak 10 ml FBS telah dituras menggunakan penuras cakera pakai buang 0.2 mikron ke dalam setiap tiub buka atas (*open top tube*) (Beckman Coulter, Amerika Syarikat). Kemudian, tiub – tiub tersebut telah diletakkan pada timba hayun (*swing bucket*) dengan skru tutup (*screw cap*) diketatkan. Kesemua 6 timba hayun disangkutkan sekemas mungkin pada rotor SW41 Ti dan diputar secara manual untuk memastikan disangkut dengan rapi. Rotor diletakkan pada pemegang rotot dan lohong (*vent*) ditutup dengan kemas. Parameter telah ditetapkan pada mesin Ultrapengempar pada tetapan suhu 4°C dengan kelajuan 100,000xg dan mesin diaktifkan dan dibiarkan bekerja selama 18 jam atau dibiarkan semalaman. Sejumlah 8 hingga 9 ml FBS dipindahkan daripada tiub buka atas kepada tiub pungutan (*collection tube*) 50 ml secara berhati – hati. Tiub pungutan yang mengandungi FBS yang EV-tersusut telah ditutup dan disimpan pada suhu -20°C dengan label kemas.

LAMPIRAN D
UJIAN SARINGAN GEN ANERGI SEL T DAN TOLERANS IMUN MANUSIA

Peta plat primer (AccuTarget™ Human qPCR Screening Kit)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LTA	CD40LG	IFNG	GZMB	TGFB1	TNFRSF8	CSF2	EGR2	IL1A	CD28	PTGER2	PRF1
B	IL5	IL13	FASLG	PRKCG	CDK2	FOS	IL17A	NHLH2	ICOS	IL4	SELL	IL2
C	CDK4	TNFSF14	TNFRSF4	FAS	CSF1	TNFRSF18	CD27	IL6	CMA1	IL2RA	CCL3L1	TNFSF10
D	IL7R	CTLA4	IL10	CCR4	IL15	LAT	IRF4	PDCD1	IL10RA	TNFSF8	IL2RB	RNF128
E	BTLA	CD70	ICAM1	DGKA	NFKB1	LGALS3	TNFRSF14	JAK3	STAT3	ITCH	DGKZ	CBLB
F	FOXP1	FOXP2	TBX21	EGR3	STAT6	NFATC2	MEF2A	FOXP3	TNFRSF9	CD40	NOTCH1	JAK1
G	ING4	JUN	HDAC9	LEP	PTGS2	NFATC1	ITGA1	GATA3	NFATC3	IL31	TNFRSF10A	EOMES
H	ACTB	B2M	GAPDH	GUSB	HPRT1	PPIA	RPL13A	RPLP0				

LAMPIRAN E
ANALISA QRT-PCR

Jadual 4.3 Senarai gen yang mempunyai nilai ekspresi signifikan bagi kumpulan sebelum dan selepas terapi berbanding kawalan.

Gen	Sampel	Nilai p (<0.05)	Regulasi	Indikasi Regulasi Gen berbanding kawalan
PTGS2	Sebelum terapi	0.020684	-43.8376	Rendah
FOS	Sebelum terapi	0.021473	-13.91132	Rendah
FOXP2	Sebelum terapi	0.032595	-3.27275	Rendah
IL10	Sebelum terapi	0.034557	-8.02872	Rendah
IL7R	Sebelum terapi	0.038998	-10.54174	Rendah
PTGS2	Selepas terapi	0.008438	-6.88486	Rendah
FOS	Selepas terapi	0.013067	-8.47522	Rendah
IL7R	Selepas terapi	0.026807	-144.92191	Rendah
FOXP2	Selepas terapi	0.028112	-3.03466	Rendah
LTA	Selepas terapi	0.029691	-6.39554	Rendah
EGR3	Selepas terapi	0.036546	11.85908	Tinggi
FAS	Selepas terapi	0.045293	-7.14865	Rendah

Jadual 4.4 Senarai gen yang berkaitan dengan sitokin dan kematian sel bagi kumpulan sebelum dan selepas terapi berbanding kawalan.

Gen	Sampel	Nilai p	Regulasi	Indikasi Regulasi Gen berbanding kawalan
FASL	Sebelum terapi	0.972687	-2.29918	Rendah
FAS	Sebelum terapi	0.243811	-3.11193	Rendah
GZMB	Sebelum terapi	0.732348	1.34267	Tidak berubah
IL17A	Sebelum terapi	0.474145	-1.70757	Tidak berubah
TGFB1	Sebelum terapi	0.948558	-1.00271	Tidak berubah
FASL	Selepas terapi	0.446244	-1.16515	Tidak berubah
GZMB	Selepas terapi	0.387677	1.31604	Tidak berubah
IL10	Selepas terapi	0.27713	-4.3881	Rendah
IL17A	Selepas terapi	0.062954	-3.6154	Rendah
IL2	Selepas terapi	0.386877	1.30386	Tidak berubah
TGFB1	Selepas terapi	0.343268	-2.04541	Rendah

LAMPIRAN F

PENERBITAN



Impact of Chemotherapy on Extracellular Vesicles: Understanding the Chemo-EVs

Nur Syahada Ab Razak¹, Nurul Syakima Ab Mutalib¹, M. Aiman Mohhtar and Nadiah Abu^{1*}

UMM Medical Centre, UMM Medical Molecular Biology Institute (UMBI), Kuala Lumpur, Malaysia

Chemotherapy is the standard go-to treatment for cancer, besides surgery and radiation. It has recently come to light that the interaction between chemotherapy and the immune system is important in maintaining tumor immunity as well as influencing the efficacy of the therapy. However, ample preclinical studies have shown that in addition to direct cytotoxic effects on cancer cells, a fraction of chemotherapeutic agents may promote immunogenic cell death, and alter the inflammatory milieu of the tumor microenvironment. Extracellular vesicles (EV) have been shown to interact with the tumor microenvironment by delivering alternative signals to the surrounding cells; as a result, this results in interference with each cell's capability to eradicate tumors or give advantages to cancer cells so as to survive therapy. Chemotherapy-induced extracellular vesicles (chemo-EVs) have been theorized to be carrying different cargo loads than non-chemotherapy-induced EVs. Aside from chemoresistance, there is growing evidence to suggest that chemo-EVs could dictate tumor behavior, especially in terms of metastasis, immune response, and cancer stemness. This mini-review attempts to summarize and evaluate recent developments on the role of chemo-EVs in other aspects of tumor-related processes.

Keywords: exosomes, microvesicles, drug, therapy, cancer

OPEN ACCESS

Edited by:

Jeffrey A. Victorson,
University of Massachusetts Medical
School, United States

Reviewed by:

Antonio Curi,
University of Bologna, Italy
Alessandro Pozzi,
San Martino Hospital (IRCCS), Italy
Korinna Kallithras,
Queen Mary University of London,
United Kingdom

*Correspondence to:

Nadiah Abu
nadiah.abu@um.edu.my

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 27 June 2019

Accepted: 07 October 2019

Published: 10 November 2019

Citation:

Ab Razak NS, Ab Mutalib NM,
Mohhtar MA and Abu N (2019) Impact
of Chemotherapy on Extracellular
Vesicles: Understanding the
Chemo-EVs. Front. Oncol. 9:1112.
doi: 10.3389/fonc.2019.01112

INTRODUCTION

It is estimated that ~1,735,350 new cancer cases will be diagnosed in the United States per year, of which 600,640 people will die from these cancer-related diseases (1). The treatment for cancer varies depending on the stage, age of the patient, type of cancer, and presence of metastasis. Now advanced treatments have been created and used to treat cancer, such as immune checkpoint blockade therapy and innovative surgical methods. Nevertheless, though advances in cancer treatment are promising, the usage of basic chemotherapy drugs to eradicate cancer is still commonly and widely used throughout the world.

The term chemotherapy was coined in the early 1900s by Paul Ehrlich, a famous German chemist, to describe any use of chemicals to treat any diseases (2). The introduction of chemotherapeutic drugs for the treatment of cancers dated back more than 50 years ago (3, 4). Since then, the invention and creation of other chemotherapeutic drugs skyrocketed into a multi-billion dollar industry (3, 5). The chemotherapy drugs are often a combination of multiple drugs or therapies, also termed polychemotherapy. These include several non-cytotoxic classes of therapy, such as hormonal therapy, and targeted therapy (biologic therapy) (6). There are multiple classes of chemotherapy drugs including taxanes, anthracyclines, anthraquinones, monoclonal antibodies