

Media Medika Muda

Copyright©2018 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 3, Nomor 3

ARTIKEL ASLI

September – Desember 2018



EKSPRESI WT1 DAN P16 PADA KARSINOMA SEROSUM DERAJAT TINGGI DAN KARSINOMA ENDOMETRIOID DERAJAT TINGGI PADA OVARIUM DI RS Dr. KARIADI SEMARANG, PERIODE 2015–2017

Djamila Zakaria, Udadi Sadhana, Devia Eka

ENGLISH TITLE

ABSTRACT

Background: A high grade serous carcinoma and high grade endometrioid carcinoma are the first and the second most common epithelial malignancy at the ovary. This malignancy has a bad prognosis and frequently found at later stage. It was known, that distinguishing both of the malignancy in high grade stage may be difficult, and WT1 and p16 antibody may aid this distinction.

Methods: It was a descriptive analytic study using cross-sectional design. Thirty paraffin blocks composed of 18 high grade serous carcinoma and 12 high grade endometrioid carcinoma that already diagnosed and reviewed, were stained WT1 and p16 antibody. The difference between each variable will be analyzed statistically using Mann-Whitney test. Statistical significance determined when $p < 0,05$.

Results: WT1 expression in high grade serous carcinoma and high grade endometrioid carcinoma is not significant ($p=0,513$), and p16 expression on both diagnosis also not significant ($p=0,356$).

Conclusion: There are no significant differences found between WT1 and p16 expression in high grade serous carcinoma and high grade endometrioid carcinoma of the ovarii.

Keywords: High grade serous carcinoma, high grade endometrioid carcinoma, ovarii, wt1, p16

ABSTRAK

Latar belakang: Karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium adalah keganasan epithelial terbanyak dan yang kedua terbanyak pada ovarium, yang sering terdeteksi pada tahap lanjut dengan prognosis yang buruk. Secara histopatologi sulit untuk membedakan kedua keganasan ini. Ekspresi WT1 dan p16 dapat digunakan untuk membedakan kedua keganasan ini.

Metode: Penelitian analitik deskriptif dengan desain belah lintang. Sampel sebanyak 30 sampel blok paraffin yang telah didiagnosis sebagai karsinoma ovarium tahun 2015–2017 di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi, yang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu karsinoma serosum derajat tinggi sebanyak 18 sampel dan karsinoma endometrioid derajat tinggi sebanyak 12 sampel, dan dilakukan pengecatan imunohistokimia antibodi monoklonal WT1 dan p16, kemudian dianalisis dengan uji Mann-Whitney.

Hasil: Ekspresi WT1 pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium tidak bermakna ($p=0,513$). Ekspresi p16 pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium tidak bermakna ($p=0,356$).

Simpulan: Terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara Ekspresi WT1 dan p16 pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium.

Kata kunci:

¹⁾ Staf Pengajar Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Karsinoma ovarium adalah salah satu keganasan ginekologi yang mempunyai mortalitas tinggi dan masih menjadi permasalahan kesehatan di seluruh dunia termasuk di Indonesia. karsinoma ovarium di Indonesia menduduki urutan ke-6 terbanyak dari keganasan pada wanita setelah karsinoma serviks, karsinoma payudara, karsinoma kolorektal, karsinoma kulit dan limfoma. Karsinoma ovarium di RSUP Dr. Kariadi menempati urutan ke-7 dari keseluruhan jumlah keganasan yang didiagnosis.

Karsinoma ovarium epitelial merupakan karsinoma ovarium terbanyak yang terjadi pada perempuan. Menurut klasifikasi WHO 2014, karsinoma serosum merupakan keganasan epitelial tersering pada ovarium, diikuti karsinoma endometrioid. Kedua karsinoma ini mempunyai prognosis yang buruk dan sering terdeteksi pada tahap lanjut, terutama pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi.³

Diagnosis karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi sering sulit dibedakan karena kedua keganasan ini sering memberi gambaran yang hampir sama secara morfologi.³⁻⁵ Menurut WHO 2014 secara histopatologis saja sulit untuk membedakan kedua keganasan ini. Pengecatan imunohistokimia yaitu *WT1* dan *p16* sebagai marker karsinoma serosum dapat membantu membedakan kedua jenis karsinoma ini.^{3,6-9} Ekspresi yang kuat dan difus pada *WT1* dan *p16* dapat mengarahkan diagnosis ke karsinoma serosum dibandingkan karsinoma endometrioid yang memberi hasil negatif.^{3,6-9}

Beberapa penelitian mendapatkan bahwa pemeriksaan imunohistokimia *WT1* dapat membantu membedakan karsinoma serosum derajat tinggi dari karsinoma endometrioid derajat tinggi.^{5,10,11} Beberapa penelitian lain menyatakan bahwa ekspresi *p16* meningkat pada kanker ovarium terutama pada kondisi karsinoma serosum derajat tinggi.^{5,10,11} Sel-sel karsinoma tercat kuat dan *diffuse* pada karsinoma serosum dan memberi gambaran *patchy* atau *mosaic* pada karsinoma endometrioid.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan ekspresi *WT1* dan *p16* pada kasus-kasus yang terdiagnosis secara histopatologi sebagai

karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi, Semarang.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan desain *cross sectional*. Sampel yang digunakan adalah *slaid Hematoxyllin Eosin (HE)* dan blok parafin yang telah didiagnosis sebagai karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang tahun 2015-2016 sebanyak 30 sampel, dimana karsinoma serosum sebanyak 18 sampel dan karsinoma endometrioid sebanyak 12 sampel. Selanjutnya dilakukan pengecatan pengecatan imunohistokimia dengan menggunakan antibody monoklonal *WT1* dan *p16*.

Jaringan yang akan dilakukan pengecatan imunohistokimia dilakukan deparafinisasi dengan xylol, rehidrasi dengan alkohol bertingkat, kemudian dicelupkan dalam *buffer citrate*. Celupkan dalam aquades. Teteskan H₂O₂ 3%, diamkan 20 menit. Cuci dengan aquadest.

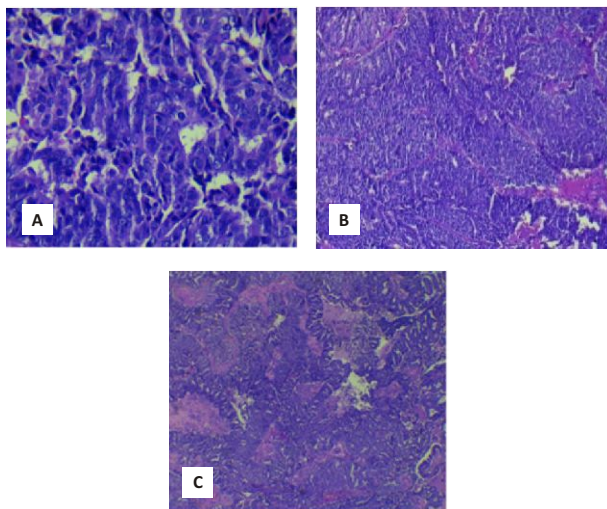
Teteskan PBS 1:9, diamkan selama 2-5 menit, Cuci dengan PBS 1:9. Teteskan sniper (normal serum), diamkan 7,5-10 menit. Cuci dengan *phosphate buffered saline (PBS)* 1:9. Teteskan *antibody primer (Ki-67 dan p53)* dengan pengenceran 1:100. Masukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 0-8°C *overnight*. Cuci dengan PBS 1:9. Teteskan trek *universal link*, diamkan selama 20 menit. Cuci dengan PBS 1:9. Teteskan trek Avidin-HRP label, diamkan selama 20 menit, sebelumnya 3,3'-diaminobenzidine (DAB) disiapkan 20 menit sebelum digunakan. Cuci dengan PBS 1:9. Teteskan larutan DAB, biarkan selama 20 menit. Cuci dengan air suling selama 10 menit pada air mengalir. Rendam dalam larutan Hematoxyllin selama 1-3 menit, lalu air mengalir selama 5 menit. Rendam dalam larutan Lithium Carbonate selama 1 menit. Pencucian selama 5 menit pada air mengalir. Masukkan ke dalam alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, dan absolut 10-15 celup). Masukkan ke dalam xylol I sebanyak 10 celup, xylol I sebanyak 10 celup, xylol III selama 15-30 menit, kemudian angkat dan bersihkan. Dinginkan. *Mounting* dengan Entellan. Tutup dengan *cover glass*.

Hasil pengecatan *WT1* dan *p16* kemudian dibaca oleh dua orang ahli patologi anatomik secara bersama-sama menggunakan metode semi kuantitatif dengan Skor pemeriksaan ekspresi *WT1* dan *p16* menurut metode Allred, penilaian setiap slide dilakukan sebanyak 5x / lapang pandang besar (400X) secara acak / random. Data yang didapatkan akan dinilai berdasarkan Metode *Allred Score*, sebagai berikut :

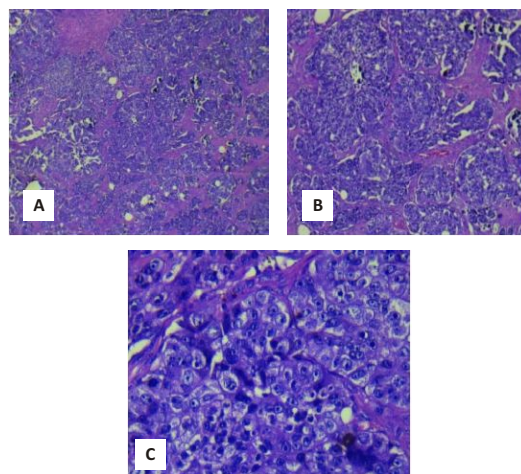
Skor Proporsi	Observasi	Skor Intensitas	Observasi
0	0%	0	Negatif
1	1%	1	Positif Lemah
2	2-10%	2	Positif Sedang
3	1-33%	3	Positif Kuat
4	34-66%		
5	67-100%		

Total Skor Jumlah skor proporsi dan skor intensitas

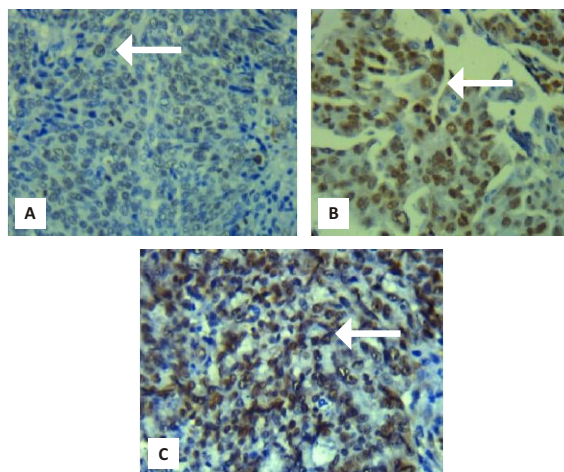
Interpretasi *Total Allred Score* :
 0-1 : negatif
 2-3 : lemah
 4-6 : sedang
 7-8 : kuat



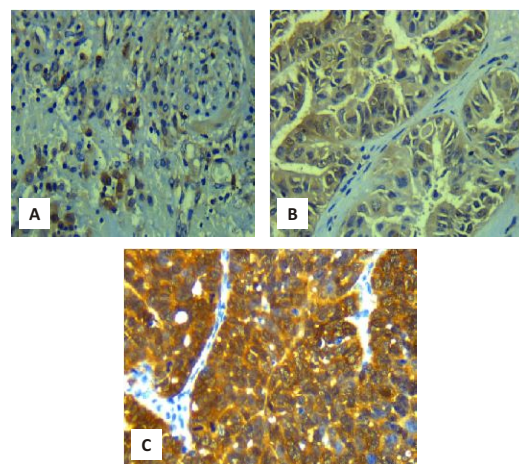
Gambar 1. Histopatologi karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium: A. HE,40x; B. HE, 100x; C. HE, 400x



Gambar 2. Histopatologi karsinoma serosum derajat tinggi : A.HE, 40x; B. HE, 100x; C. HE, 400X



Gambar 3. Intensitas ekspresi *WT1* yang tercatat pada inti sel: A. Ringan (400x). B. Sedang (400x). C. Kuat (400x). Tanda panah menunjukkan inti yang tercatat positif.



Gambar 4. Intensitas ekspresi *p16* yang tercatat pada inti sel dan sitoplasma : A. Ringan (400x). B. Sedang (400x). C. Kuat (400x). Tanda panah menunjukkan inti yang tercatat positif.

Data yang terkumpul akan melalui proses *editing, coding, entrying, dan cleaning data*, kemudian dilakukan analisa statistik deskriptif dan analitik. Data yang terkumpul tidak terdistribusi normal, sehingga dilakukan uji non-parametrik dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*. Hasil penelitian akan dibahas menggunakan teori dan kepustakaan yang ada.

HASIL

Pada penelitian ini didapatkan 30 sampel yang diambil selama periode 2015–2017, terdiri atas 18 kasus karsinoma serosum derajat tinggi ovarium dan 12 kasus karsinoma endometrioid derajat tinggi pada ovarium. Data yang kami ambil meliputi jenis kelamin, usia, pulasan immunohistokimia *WT1* serta pulasan immunohistokimia *p16*. Data usia dibagi menjadi 5 interval dengan rentang usia 10 tahun.

Tabel 2. Karakteristik sampel berdasarkan kelompok usia

Kelompok Kasus	Kelompok Usia					Total
	21–30	31–41	42–52	53–63	64–74	
Karsinoma serosum derajat tinggi	1	3	5	9	0	18
Karsinoma endometrioid derajat tinggi	0	1	5	5	1	12

Berdasarkan tabel 1 di atas, karsinoma serosum derajat tinggi pada ovarium terbanyak terjadi pada usia 53–63 tahun yaitu sebanyak 9 orang, sedangkan

Tabel 3. Persentase Score Allred *WT1*

Score Allred	Karsinoma serosum derajat tinggi		Karsinoma endometrioid derajat tinggi	
	n=18	%	n=12	%
0	6	33,3	4	33,3
1	1	5,6	0	0
2	0	0	0	0
3	2	11,1	0	0
4	2	11,1	1	8,3
5	1	5,6	0	0
6	0	0	2	16,7
7	2	11,1	1	8,3
8	4	22,2	4	33,3

pada karsinoma endometrioid derajat tinggi paling banyak terjadi pada usia 42–52 dan 53–63 tahun masing-masing sebanyak 5 orang.

Berdasarkan tabel 3, pada karsinoma serosum derajat tinggi dengan total 18 sampel didapatkan hasil yang positif sebanyak 12 sampel atau 66,6%.

Pada karsinoma endometrioid derajat tinggi dengan total 12 sampel didapatkan hasil yang positif sebanyak 8 sampel atau 66,7%.

Tabel 4. Persentase Score Allred *p16*

Score Allred	Karsinoma serosum derajat tinggi		Karsinoma endometrioid derajat tinggi	
	n=18	%	n=12	%
0	0	0	0	0
1	0	0	1	8,3
2	2	11,1	2	16,7
3	1	5,6	0	0
4	2	11,1	1	8,3
5	4	22,2	1	8,3
6	3	16,7	0	0
7	5	27,8	2	16,7
8	1	5,6	5	41,7

Tabel 5. Perbedaan ekspresi *WT1* dan *P16* berdasarkan diagnosis karsinoma

Diagnosis	Ekspresi		p [‡]
	<i>WT1</i>	<i>P16</i>	
Karsinoma endometrioid derajat tinggi	6 (0–8)	7 (1–8)	0,388
Karsinoma serosum derajat tinggi	3,5 (0–8)	5,5 (2–8)	0,170
p [‡]	0,513	0,356	

Keterangan : ‡ Signifikan $p < 0,05$

Berdasarkan tabel 4, pada karsinoma serosum derajat tinggi dari total 18 sampel didapatkan hasil yang positif; sesuai dengan kepustakaan hasil positif adalah yang memberi pewarnaan kuat dan difuse pada inti dan sitoplasma sebanyak 6 sampel atau 33,3%.

Pada karsinoma endometrioid derajat tinggi dari total 12 sampel didapatkan hasil yang positif adalah yang memberi pewarnaan yang kuat dan difuse pada inti dan sitoplasma sebanyak 7 sampel atau 58,3%.

Berdasarkan tabel hasil uji *Mann-Witney* didapatkan nilai p hasil pemeriksaan *WT1* dan *p16*

pada karsinoma endometrioid derajat tinggi adalah 0,388 sedangkan nilai p hasil pemeriksaan *WT1* dan *p16* pada karsinoma serosum derajat tinggi adalah 0,170. Hasil uji tersebut memperlihatkan $p > 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna hasil pemeriksaan *WT1* dan *p16* di antara 2 kelompok diagnosis tersebut.

PEMBAHASAN

Berdasarkan kelompok umur, penderita karsinoma serosum derajat tinggi pada ovarium paling banyak pada kelompok 53-63 tahun, dan penderita karsinoma endometrioid derajat tinggi paling banyak pada kelompok umur 42-52 dan kelompok umur 53-63 tahun. Hal ini sesuai dengan kepustakaan yang menyatakan umur rata-rata pada karsinoma serosum derajat tinggi adalah 56 tahun dan umur rata-rata pada karsinoma endometrioid derajat tinggi adalah 58 tahun.^{3,5}

Ekspresi *WT1* pada karsinoma serosum derajat tinggi dari 18 sampel didapatkan hasil positif 12 sampel atau 66,6%, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kobel, *et al* yang menyatakan pada karsinoma serosum derajat tinggi mayoritas akan memberikan ekspresi yang positif dan 20% karsinoma serosum derajat tinggi akan memberi hasil negatif pada pengecatan dengan *WT1*.

Ekspresi *p16* pada karsinoma serosum derajat tinggi dari 18 sampel didapatkan hasil positif 6 sampel atau 33,3%. Hal ini sesuai dengan kepustakaan^{3,5} dan penelitian yang dilakukan oleh Diana Limm *et al*, dan beberapa peneliti lainnya.

Ekspresi *WT1* pada karsinoma endometrioid derajat tinggi dari 12 sampel didapatkan hasil positif 8 sampel atau 66,7%, hal ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kobel, *et al* dan Diana Limm, *et al* yang menyatakan bahwa pada karsinoma endometrioid derajat tinggi memberikan ekspresi *WT1* negatif. Menurut kepustakaan, sebanyak 4% karsinoma endometrioid dapat memberikan hasil positif dengan pengecatan *WT1*.^{3,5} Pada penelitian ini mendapatkan hasil yang tinggi dimungkinkan karena sampel yang terlalu kecil yaitu sebanyak 12 sampel, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Kobel, *et al* (menggunakan 525 sampel karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid, sedangkan Diana Limm, *et al*

menggunakan 109 sampel karsinoma endometrioid.

Ekspresi *p16* pada karsinoma endometrioid dari 12 sampel didapatkan hasil positif kuat dan *diffuse* 7 sampel atau 58,3%. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan Diana Limm *et al* (2016) dimana pada karsinoma endometrioid didapatkan hasil negatif atau *patchy* terhadap pengecatan *p16*. Perbedaan ini bisa disebabkan oleh karena penelitian ini menggunakan sampel dengan jumlah kecil yaitu 12 sampel sedangkan Diana Limm, *et al* menggunakan 109 sampel. WHO 2014 menyatakan bahwa pada karsinoma endometrioid *p16* dapat memberikan hasil positif pada 6% kasus.

Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney*, terdapat perbedaan indeks ekspresi *WT1* dan *p16* pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi, namun tidak bermakna, dengan nilai p pada *WT1* sebesar 0,513 dan p pada *p16* sebesar 0,536. Hal ini berbeda dengan penelitian Philips, *et al* yang menyebutkan ada perbedaan bermakna antara ekspresi *WT1* dan *p16* pada karsinoma serosum derajat tinggi dibandingkan dengan karsinoma jenis lain termasuk karsinoma endometrioid. Perbedaan hasil penelitian ini kemungkinan dikarenakan oleh jumlah sampel yang digunakan oleh peneliti. Philips *et al* menggunakan jumlah sampel karsinoma serosum derajat tinggi sebanyak 38 dan karsinoma endometrioid sebanyak 15 sampel. Russel Vang *et al* (2009) menyebutkan bahwa membedakan karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi adalah sulit walaupun dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia *WT1*.

SIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi *WT1* dan *p16* pada karsinoma serosum derajat tinggi dan karsinoma endometrioid derajat tinggi di ovarium.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistic. *Ca Cancer J Clin*. 2007; 43-66.
2. Globocan (IARC). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalance Worldwide. 2012.
3. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs.

- International Agency for Research on Cancer Lyon. 2014; 15-33.
4. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Conran Pathologic Basis of Disease. Elsevier 9th Edition. 2014; 290-299.
 5. Robboy SJ, Mutter GL, Pratt J. Robboy's Pathology Of Female Reproductive Tracts. Elsevier.2014; 608-617.
 6. Acs G, Pasha T, Zhang PJ. WT1 is Differentially Expressed in Serous, Endometrioid, Clear Cell and Mucinous Carcinoma of The Peritoneum, Fallopian Tube, Ovary, and Endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 2004; 23(2): 110-118.
 7. Page CL, Huntsman DG, Provencher DM, Mason A-MM. Predictive and Prognostic Protein Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Recommendation for Future Studies. *Cancers*. 2010, 2, 913-954.
 8. Vang R, Shih L-M, Kurman RJ. Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 September; 16(5):267-282.
 9. Lin F, Prichard J. Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions Second Edition. Springer. 2015;371-391.
 10. Conklin CMJ, Gilks CB. Differential Diagnosis and Clinical Relevance of Ovarian Carcinoma Subtypes. *Expert Reviews*. *Obstet. Gynecol*. 2013; 8(1):00-00.
 11. Phillips V, Kelly P, McCluggage WG. Increased P16 Expression in High-grade Serous and Undifferentiated Carcinoma Compared With Other Morphologic Types of Ovarian Carcinoma. *Journal of Gynecological Pathology*. 2009 March; 28(2): 179-186.
 12. Wikinson N. Pathology of The Ovary, Fallopian Tube and Peritoneum. Springer. 2014; 78-107.
 13. Soslow RA, Tornos C. Diagnostic Pathology of Ovarian Tumors. Springer. 2011; 1-75.
 14. Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor Suppressor Gene in Normal and Malignat Hematopoiesis. *Nature Publishing Group. Oncogen*. 2002; 21: 3475-2497.
 15. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaria P. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. WH Freeman and Co. 1999.
 16. Hirama TM, Akasi PH, Koeffler. *Cyclin-Dependent Kinase and Their Inhibitors in Haematological Malignancies*. 2000.
 17. Baker VV, Maza OM, Bereks JS. *Molecular Biology and Genetics*. In *Gynecology*. 12th ed. USA: Williams & Wilkins. 1996.
 18. Bast RC, Kufe DW, Pollock RE. *Cancer Medicine*. 5th ed. Holland: B.C Decker Inc. 1998.
 19. Karp G. *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiment*. 3rd ed. New York : Jhon Wiley & Sons Inc. 2002.
 20. Shandilya J, Roberts SGE. A Role Of WT1 In Cell division and Genomic Stability. *Cell Cycle* 2015; 14:1358-1364.
 21. Kaspar HG, Crum CP. The Utility of Immunohistochemistry in The Differential Diagnosis Of Gynecologic Disorder. *Arch Pathol Lab Med*. 2015; 139:39-54
 22. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer Chana, et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLoS Medicine*. 2008 December; 1749-1760.
 23. Lim D, Murali R, Murray MP, Veras E, Park KJ, Soslow RA. Morphological and Immunohistochemical Re-evaluation of Tumors Initially Diagnosed As Ovarian Endometrioid Carcinoma with Emphasis on High-grade Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2016 March; 40(3): 302-312.
 24. Vang R, Shih L-M, Kurman RJ. Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 September; 16(5):267-282.
 25. Kobel M, Kalloger SE, Lee S, Duggan MA, Kelemen LE, Prentice L, et al. Biomarker-based Ovarian Carcinoma typing: A Histological Investigation in The Ovarian Tumor Analysis Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 October; 22(10): 1677-1686.