

Media Medika Muda

Copyright©2018 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 3, Nomor 3

ARTIKEL ASLI

September – Desember 2018



PERBEDAAN ANTARA EKSPRESI TUMOR ACTIVATING MACROPHAGE (TAM/CD68) DAN TUMOR SUPPRESSOR GENE (P16) PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA SERVIKS UTERI YANG RESIDIF DAN TIDAK RESIDIF DI RSUP Dr. KARIADI SEMARANG

Ira Citra Ningrom¹⁾, Dik Puspasari²⁾, Indra Wijaya²⁾, Vega Karlowee²⁾, MeiraDewi²⁾, Siti Amarwati²⁾

THE DIFFERENCE BETWEEN EXPRESSION OF TUMOR ACTIVATING MACROPHAGE (TAM/CD68) AND TUMOR SUPPRESSOR GENE (P16) ON THE RESIDIVE AND NON RESIDIVE SQUAMOUS CARCINOMA OF THE UTERINE CERVIX AT RSUP Dr. KARIADI SEMARANG

ABSTRACT

Background: Cervical Carcinoma is most common woman carcinoma in the world.¹ Squamous Cell Carcinoma is the most common type, overcome all caused by persistent infection of Human Papilloma Virus (HPV), more than 70% showed a squamous histology picture.¹ Some study says that CD68 plays an important role in HPV invasion and CD68 increase related to cervical malignant transformation.⁴ P16 is a cyclin-dependent kinase inhibitor that shown highly expressed in altering infection with oncogenic HPV.⁵ It needs to be studied more about capability of macrophages number and role of P16 assessed by IHC treatment to predict the prognosis of patients with cervical carcinoma. The purpose of this study was to investigate differences expression of CD68 and P16 on cervical carcinoma which reside and not reside in RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Methods: There were 29 samples of squamous cell carcinoma cases in the laboratory of RSUP dr. Kariadi Semarang, 2016–2017. Sample taken by consecutive sampling method, divided into 2 groups based on reside and not reside, then performed imunohistokimia using CD68 and P16 then calculated percentage. Differences of each will be analyzed statistically.

Results: There were significant differences CD68 examination between residual and non-residual squamous cell carcinoma groups ($p < 0.05$). There were no significant differences p16 examination between the 2 groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Expression of CD68 was significantly higher in reside squamous cell carcinoma compared to non-reside one. Expression of p16 is higher but not significant, inresidive compared to the non-reside one.

Keywords: Cervix-cell carcinoma-residive-CD68-P16

ABSTRAK

Latar belakang: Karsinoma serviks uteri merupakan karsinoma tersering pada wanita di dunia. Dengan dengan 580.000 kasus baru pada tahun 2012, dan Karsinoma Sel Skuamosa merupakan jenis yang tersering dijumpai. Beberapa jurnal penelitian mengatakan bahwa CD68 mempunyai peran penting pada invensi HPV dan peningkatan jumlah CD68 berhubungan erat dengan transformasi keganasan pada cerviks.⁴ P16 merupakan telah terbukti sangat diekspresikan dalam mengubah infeksi dengan jenis HPV onkogenik.⁵ Oleh karena itu perlu dikaji lebih lanjut mengenai kapabilitas jumlah makrofag dan peranan P16 yang dinilai dengan pemeriksaan IHC untuk memprediksi prognosis pasien dengan karsinoma serviks. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi CD68 dan P16 pada Karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif di RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Metode: Terdapat 30 sampel kasus karsinoma sel skuamosa serviks uteri di laboratorium RSUP Dr. Kariadi, tahun 2015–2017. Sampel diambil dengan metode *consecutive sampling*, dibagi menjadi 2 grup berdasarkan residif dan tidak residif, kemudian dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi CD68 dan P16 lalu dihitung persentasinya. Perbedaan setiap variabel akan dianalisa secara statistik. Hasil: terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan CD68 di antara kelompok karsinoma sel skuamosa yang residif dan tidak residif ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara hasil pemeriksaan p16 di

¹⁾ Residen Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, RSUP Dr. Kariadi, Semarang

²⁾ Staf Pengajar Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, RSUP Dr. Kariadi, Semarang

antara 2 kelompok tersebut ($p > 0,05$).

Simpulan: Ekspresi CD68 lebih tinggi secara bermakna pada karsinoma sel skuamosa yang residif dibandingkan dengan yang tidak residif. Ekspresi p16 lebih tinggi namun tidak bermakna, pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dibandingkan dengan yang tidak residif.

Kata kunci: Serviks-karsinoma sel skuamosa-residif-CD68-P16

PENDAHULUAN

Karsinoma serviks uteri merupakan karsinoma yang paling sering terjadi pada wanita di dunia, dengan 580.000 kasus baru pada tahun 2012, dan terhitung 7,5% dari seluruh wanita penderita karsinoma serviks uteri meninggal dunia. Angka kejadian karsinoma serviks di dunia meningkat dengan estimasi 378.000 pada tahun 1980 hingga 500.000 per tahun.¹

Hampir seluruh karsinoma serviks disebabkan oleh infeksi persisten dari salah satu jenis *Human Papilloma Virus* (HPV) dan lebih dari 70% menunjukkan gambaran histologi skuamosa.¹ Salah satu jurnal penelitian mengatakan bahwa CD68 mempunyai peran penting pada infeksi HPV dan peningkatan jumlah CD68 berhubungan erat dengan transformasi keganasan pada serviks. Berbagai data pada jurnal penelitian tersebut mendukung peran TAMs (CD68) sebagai predictor prospektif untuk *HPV-related cervical Carcinogenesis*, yang menyoroti pentingnya untuk penelitian lebih lanjut dari TAMs (CD68) yang terlibat dalam karsinoma serviks.⁴

Pada berbagai jurnal penelitian mengatakan bahwa P16 digunakan untuk menilai adanya infeksi *human papilloma virus* (HPV) pada lesi-lesi di serviks. P16^{INK4a} (p16) merupakan *cyclin-dependent* kinase inhibitor yang telah terbukti sangat diekspresikan dalam mengubah infeksi dengan jenis HPV onkogenik dan diyakini menjadi penanda pengganti untuk prakanker.⁵

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *case control* untuk menilai perbedaan ekspresi CD68 dan p16 antara karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif di RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia. Sampel dari penelitian ini adalah sampel blok paraffin dari pasien karsinoma serviks yang telah didagnosis sebagai Karsinoma Sel Skuamosa Serviks Uteri di RSUP Dr. Kariadi

Semarang pada tahun 2016–2017 yang diambil secara *consecutive sampling* yaitu peneliti memilih dengan cara memasukkan semua sampel yang memenuhi kriteria inklusi sampai jumlah sampel terpenuhi. dengan jumlah sampel total 29 blok paraffin. Kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif. dengan jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 15 blok paraffin untuk kelompok residif dan 14 blok paraffin untuk kelompok tidak residif.

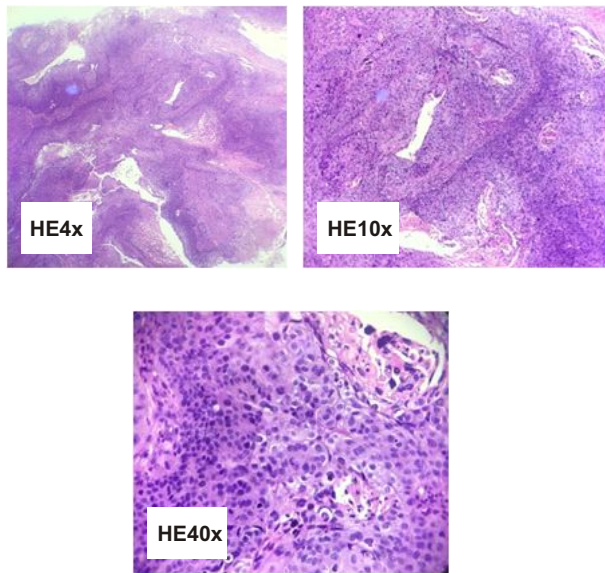
Sediaan histopatologi dengan pengecatan hematoxylin - eosin diperiksa ulang gambaran histopatologinya. Seluruh sampel yang telah terkumpul kemudian dilakukan pengecatan immunohistokimia CD68 yang merupakan marker *tumor associated macrophage* (TAM) dan p16 yang merupakan marker *tumor suppressor gene*. Data yang diambil dari penelitian ini adalah ekspresi CD68 dan p16 pada masing-masing kelompok dengan menggunakan *immunohistochemistry score* yang mengukur distribusi proporsi sel yang terekspresi positif dengan nilai : skor 0 = tidak terekspresi, skor 1 = kurang dari 10% sel terekspresi, 2 = 10–50% sel terekspresi, 3 = 50–90% sel terekspresi, 4 lebih dari 90% sel terekspresi. Data diambil melalui pembacaan oleh 2 ahli patologi anatomi secara *blind* pada 5 lapangan pandang besar, pembesaran 400X obyektif, pada area dengan ekspresi antibodi dengan intensitas sedang sampai kuat, tanpa nekrosis, kemudian dilakukan analisis data untuk melihat perbedaan ekspresi TAM (CD68) dan p16 pada kelompok residif dan tidak residif menggunakan uji *Chi-Square* dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$.

HASIL

Pada penelitian ini didapatkan 29 sampel yang selama periode 2016 – 2017, terdiri atas 15 kasus karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan 14 kasus karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang tidak residif. Data yang kami ambil meliputi usia dan pulasan immunohistokimia CD68 serta

Tabel 1. Karakteristik Sampel Berdasarkan Kelompok Usia

Kelompok Kasus	Kelompok Usia					Total
	21-30	31-41	42-52	53-63	64-74	
Karsinoma Sel Skuamosa serviks uteri yang residif	0	0	9	4	1	15
Karsinoma Sel Skuamosa serviks uteri yang tidak residif	0	0	10	4	0	14

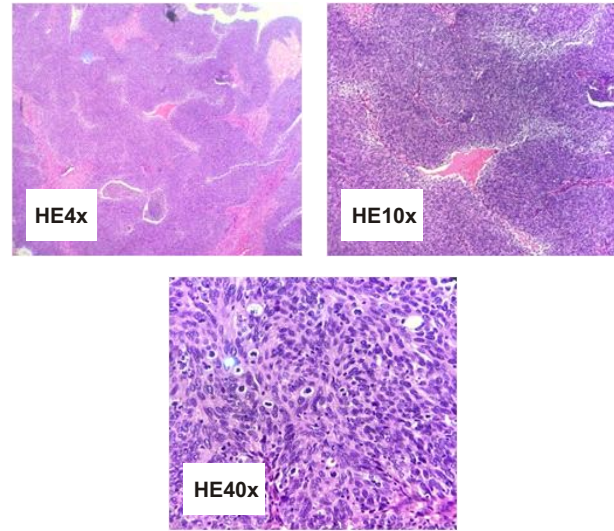


Gambar1. Histopatologi karinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif

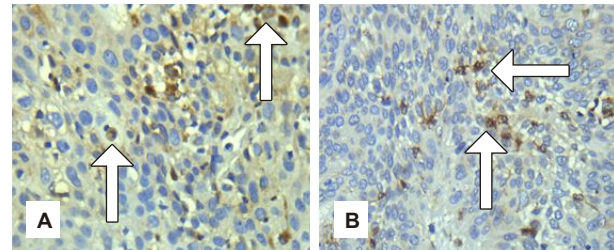
pulasan immunohistokimia P16 pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif. Data usia dibagi menjadi 5 interval dengan rentang usia 10 tahun.

Berdasarkan tabel 1, karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif terbanyak terjadi pada usia 42 sampai 52 tahun yaitu sebanyak 9 orang. Sedangkan pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang tidak residif paling banyak terjadi pada usia 42 sampai 52 tahun yaitu sebanyak 10 orang. Gambaran histopatologi pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada gambar1 dan 2.

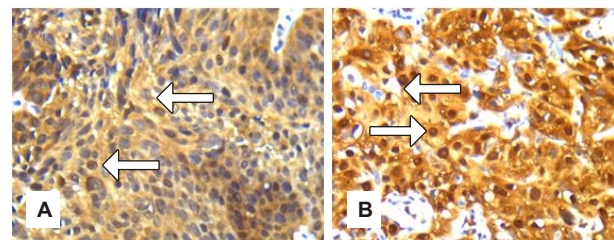
Sampel yang sudah dipilih dan di re-evaluasi kemudian dilakukan pemeriksaan immunohistokimia CD68 dan P16 dengan intensitas sedang sampai kuat dapat dilihat pada gambar 3 dan 4.



Gambar2. Histopatologi karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang tidak residif



Gambar3. Intensitas ekspresi CD68 yang terpulas pada membran sitoplasmik: A. Sedang (400x) B. Kuat (400x)

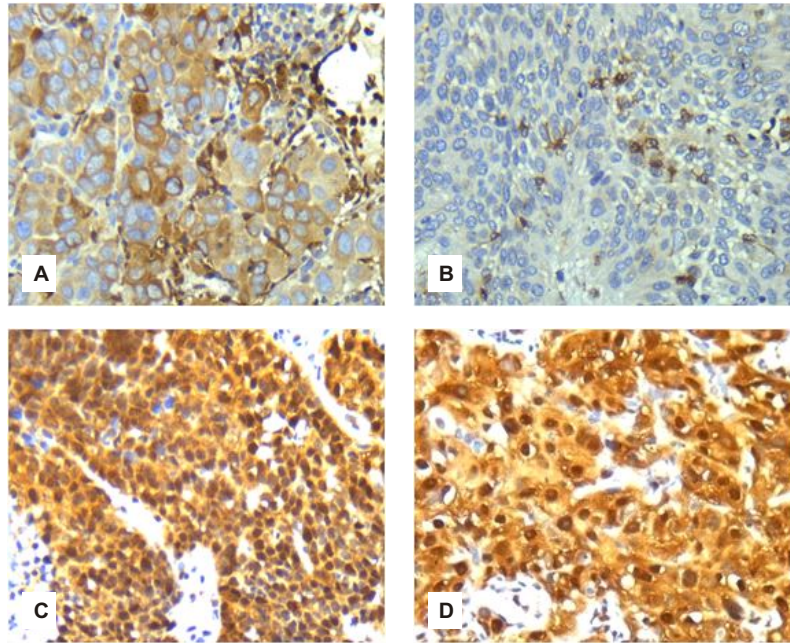


Gambar4. Intensitas ekspresi P16 yang terpulas pada inti dan sitoplasma: A. Sedang (400x) B. Kuat (400x)

Tabel 2. Perbedaan ekspresi CD68 dan P16 pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak

Diagnosis	Ekspresi	
	CD68	p16
Residif	2,73 ± 0,88	3,40 ± 0,63
Tidak residif	1,21 ± 0,80	2,79 ± 1,19
<i>p</i> *	0,001	0,143

Keterangan : *Signifikan bila $p < 0,05$



Gambar 5. Ekspresi CD68 pada kelompok residif (A), ekspresi CD68 pada kelompok tidak residif (B), ekspresi p16 pada kelompok residif (C), ekspresi p16 pada kelompok tidak residif (D).

Tabel hasil uji *Mann-Witney* didapatkan nilai *p* hasil pemeriksaan CD68 pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif adalah 0,001. Hasil uji tersebut memperlihatkan nilai $p < 0,05$, maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan CD68 di antara kelompok karsinoma sel skuamosa yang residif dan tidak residif. Nilai *p* hasil pemeriksaan p16 pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri yang residif dan tidak residif adalah 0,143. Hasil uji tersebut memperlihatkan nilai $p > 0,05$, maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara hasil pemeriksaan p16 di antara 2 kelompok tersebut.

PEMBAHASAN

Berdasarkan kelompok umur, penderita karsinoma sel skuamosa serviks uteri baik yang residif maupun tidak residif terbanyak pada kelompok 42 sampai 52 tahun, hal ini sesuai dengan kepustakaan yang menyatakan umur rata-rata pada karsinoma sel skuamosa serviks uteri adalah 55 tahun.

Inflamasi saat ini dianggap berperan dalam terjadinya kanker yang meliputi inisiasi, promosi, angiogenesis, dan metastasis.^{12,13} Aktivasi onkogen

dapat menginduksi terbentuknya mediator-mediator radang dan infiltrasi sel-sel radang. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa tipe sel radang dan fungsinya dapat berperan dalam memicu pertumbuhan maupun menghambat pertumbuhan tumor. Infiltrasi sel radang leukosit pada tumor telah lama diketahui berhubungan dengan karsinogenesis.^{10,11} Diantara populasi sel-sel radang, makrofag memiliki peran yang sangat besar, 50% dari keseluruhan sel radang di sekitar tumor pada karsinoma terdiri dari makrofag, makrofag ini disebut sebagai *Tumor associated macrophage* (TAM).¹⁴ TAM berasal dari monosit darah perifer yang bermigrasi ke jaringan dengan perantaraan mediator kimia dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang beredar, dan direkrut ke dalam tumor oleh berbagai kemokin dan faktor pertumbuhan dilepaskan oleh sel-sel tumor, termasuk kanker serviks.^{10,11,14}

TAM dapat memproduksi berbagai sitokin dan kemokin, serta faktor-faktor pertumbuhan untuk sel epitel dan sel endotel, yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan tumor, neoangiogenesis dan metastasis. TAM mengekspresikan dan melepaskan berbagai faktor pertumbuhan seperti faktor pertumbuhan epidermal, *fibroblast growth factor* (FGF-2), *transforming growth factor* (TGF- β), *vascular*

endothelial growth factor (VEGF), dan *platelet derived growth factor* (PDGF). Selain itu, TAM mampu memacu proses neoangiogenesis. Neoangiogenesis awalnya dianggap disebabkan hanya oleh sel tumor sendiri, namun penelitian terkini menyebutkan bahwa TAM memegang peranan penting dalam regulasi angiogenesis tumor. TAM masuk ke dalam lingkungan tumor oleh berbagai faktor proangiogenic, termasuk IL-1, VEGF, IL-8, bFGF, dan TNF- α .^{10,13,14}

Dengan demikian, tampak bahwa TAM memicu pertumbuhan massa tumor. Jumlah TAM yang sedikit tampak berefek pada regresi tumor dan menghambat metastasis, sebaliknya, peningkatan jumlah infiltrat TAM mempercepat perkembangan tumor dan metastasis tumor. Peningkatan jumlah TAM berkorelasi dengan aktivitas proliferasi tumor yang tinggi dan indeks Ki-67 yang tinggi.^{11,14}

Pada penelitian kami, tampak bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara ekspresi TAM (CD68) pada karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dan tidak residif. Dimana distribusi ekspresi TAM (CD68) lebih banyak pada kelompok karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dibanding kelompok yang tidak residif. Sehingga dapat dikatakan bahwa semakin banyak ekspresi TAM (CD68) menjadi penanda adanya kemungkinan residif atau prognosis yang lebih buruk. Seperti dikatakan pada kepustakaan bahwa berbagai data pada jurnal penelitian mendukung peran TAM sebagai predictor prospektif untuk cervical carcinogenesis.^{10,11}

Gen p16 adalah gen penekan tumor yang menghasilkan protein p16 yang berfungsi sebagai pengikat CDK4/CDK6 sehingga mampu menghambat siklus sel. Aktifitas p16 diperlukan oleh sel pada fase G1 menuju fase S. Mutasi yang terjadi pada gen p16 menghasilkan protein p16 yang tidak mampu mengikat CDK4/CDK6, sehingga menyebabkan tidak terkontrolnya siklus sel sehingga timbul proses keganasan.⁵⁻⁷

Pada penelitian kami, tampak bahwa terdapat perbedaan ekspresi p16 yang tidak signifikan pada kelompok karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dan tidak residif. Dimana distribusi ekspresi p16 lebih banyak pada kelompok karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dibanding kelompok yang tidak residif, namun tidak bermakna karena nilai p yang didapat $>0,05$.

Hal ini disebabkan karena perkembangan, progresivitas dan rekurensi karsinoma sel skuamosa, tidak hanya dipengaruhi oleh p16 sebagai tumor supresor gen saja namun ada faktor lain yang tidak dinilai dalam penelitian ini.

Dalam kepustakaan dijelaskan bahwa gen penekan tumor merupakan gen normal yang berperan untuk mencegah perkembangan neoplasma. Gen penekan tumor umumnya mengkode protein yang menghambat proliferasi sel. Kehilangan regulator ini dapat menyebabkan terjadinya kanker. Lima kelas protein yang biasa dikode oleh gen penekan tumor yaitu :

1. Protein intraseluler, seperti p16 cyclin-dependent kinase inhibitor, yang menghambat pembelahan melalui fase tertentu dari siklus sel.
2. Hormon reseptor yang fungsinya untuk menghambat pembelahan sel.
3. Protein pengontrol *checkpoint* yang menghambat siklus sel jika terjadi kerusakan DNA atau kromosom abnormal.
4. Protein yang bisa menginduksi apoptosis.
5. Enzim yang berperan dalam perbaikan DNA.

Transformasi sel normal menjadi sel kanker disertai dengan hilangnya fungsi dari satu atau lebih gen penekan tumor, seperti gen yang mengkode faktor transkripsi (p53 dan WT1), dan pengatur siklus sel (pRb dan p16), NF1, PTEN, dan VHL. Sebagian besar dari protein-protein ini dikode melalui kerja gen penekan tumor sebagai penghambat proliferasi sel apabila pertumbuhan sel mulai tidak terkontrol. Pada sebagian besar kanker terjadi inaktivasi protein-protein yang berfungsi normal pada siklus sel termasuk p16.¹⁵

SIMPULAN

Didapatkan perbedaan yang bermakna ekspresi CD68 antara karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dan karsinoma sel skuamosa servik uteri yang tidak residif, dimana diperoleh kecenderungan ekspresi CD68 lebih tinggi pada karsinoma sel skuamosa yang residif di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang periode 1 Januari 2016 sampai 1 Januari 2017.

Didapatkan perbedaan yang tidak bermakna ekspresi p16 antara karsinoma sel skuamosa servik uteri yang residif dan karsinoma servik uteri yang tidak residif, meskipun diperoleh kecenderungan ekspresi p16 lebih tinggi pada karsinoma sel

skuamosa servik uteri yang residif di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang periode 1 Januari 2016 sampai 1 Januari 2017.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
2. Mutter GL, Prat J, editors. Pathology of the female reproductive tract. 3th ed. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2014.
3. Budiharjo. Profil kesehatan provinsi Jawa Tengah tahun 2006 [Internet]. Indonesia: Jawa Tengah; 2009 [updated 2009 Jan; cited 2018 April]. Available from: <http://www.dinkesjatengprov.go.id/dokumen/profil/profil2006/bab5.htm>.
4. Chen XJ, Han LF, Wu XG, Wei WF, Wu LF, Yi HY, *et al*. Clinical significance of CD163+ and CD68+ tumor-associated macrophages in high-risk HPV-related cervical cancer. *J Cancer*. 2017 Oct 17;8(18):3868-3875.
5. Yu LL, Chen W, Lei XQ, Qin Y, Wu ZN, Pan QJ, *et al*. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):21181-9.
6. Purushotham K, Ibtisam BM, Yip JL, Ankur B. Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagn Pathol*. 2014;9:202.
7. Asmuddin. Peran gen p16 pada siklus sel terhadap pembentukan kanker. *JKM*. 2004; 4(1):63-74.
8. Prat J. Pathology of cancers of the female genital tract. *J. Prat / International Journal of Gynecology & Obstetrics* . 2012: 137-50.
9. Lin J, Albers AE, Qin J, Kaufmann AM. Prognostic significance of overexpressed p16^{INK4a} in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(9): e106384.
10. Seminerio I, Kindt N, Descamps G, Bellier J, Lechien JR, Mat Q, *et al*. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget*. 2018 Feb 16; 9(13): 11046-11059.
11. Li J, Zhang BZ, Qin YR, Bi J, Liu HB, Li Y, *et al*. CD68 and interleukin 13, prospective immune markers for esophageal squamous cell carcinoma prognosis prediction. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):15525-15538.
12. Eiro N, Gonzalez L, Fernandez-Garcia B, Lamelas M. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *Plos One Press*. 2012.
13. Fernandez-garcia B, Junquera S, Lamelas ML, Lo A, Vizoso FJ, Gonza LO. Impact of CD68 / (CD3 + CD20) Ratio at the Invasive Front of Primary Tumors on Distant Metastasis Development in Breast Cancer. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052796
14. Zhang C, Hu X, Liu X-Y, *et al*. Effect of tumor-associated macrophages on gastric cancer stem cell in omental milky spots and lymph node micrometastasis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):13795-13805.
15. Bast RC, Kufe DW, Pollock RE. *Cancer Medicine*. 5th ed. Holand: B.C Decker Inc. 1998
16. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins and Contran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier 9th Edition. 2014; 290-299.
17. Ch'ng ES, Jaafar H, Tuan Sharif SE. Breast tumor angiogenesis and tumor-associated macrophages: histopathologist's perspective. *Patholog Res Int*. 2011;2011:572706. doi:10.4061/2011/572706.
18. Zhang C, Hu X, Liu X-Y, *et al*. Effect of tumor-associated macrophages on gastric cancer stem cell in omental milky spots and lymph node micrometastasis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):13795-13805.
19. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86(November):1065-1073. doi:10.1189/jlb.0609385.