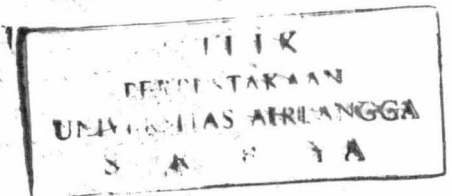


Karya Tulis Ilmiah Akhir PPDS-I Ilmu Bedah

**KORELASI EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)* DENGAN *GRADING*
HISTOPATOLOGI PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA
KEPALA LEHER**

PPDS, IB. 29/16
Ate
r



Oleh :

dr. Kipsanang Akemah

Pembimbing :

Prof. dr. Sunarto Reksoprawiro SpB(K)Onk

Dr. Faroek Hoesin , SpPA(K)

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-I
LABORATORIUM ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA/RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA
2005**

Lembar pengesahan

**KORELASI EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)* DENGAN *GRADING*
HISTOPATOLOGI PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA LEHER**

Karya akhir penelitian ini telah diuji dan disetujui

Pada tanggal : 12 Juli 2005

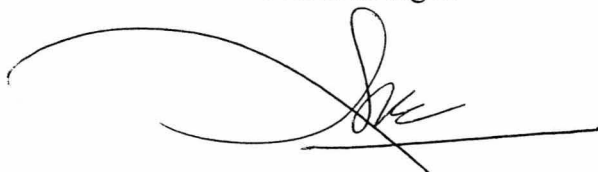
Oleh:

Pembimbing I



Prof. dr. Sunarto Reksoprawiro SpB(K) Onk

Pembimbing II



Dr. Faroek Hoesin, SpPA(K)

Penguji



Dr. Heru Purwanto, SpB(K) Onk.MSc

Penguji



Dr. Yoga Wijayahadi, SpB(K) KL

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa melimpahkan karunianya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah akhir **KORELASI EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2(COX-2)* DENGAN *GRADING* HISTOPATOLOGI PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA LEHER** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan dokter spesialis bidang studi Ilmu Bedah di Laboratorium Ilmu Bedah FK UNAIR/RSUD Dr Soetomo Surabaya.

Laporan karya tulis ilmiah akhir ini secara garis besar berisi latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian dan manfaat penelitian, juga dibahas secara singkat teori yang berkaitan dengan ekspresi protein *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher. Diterangkan pula mengenai kerangka konseptual yang merupakan ringkasan dari konsep yang berhubungan dengan variabel-variabel yang diteliti serta metodologi penelitiannya.

Dalam penulisan laporan karya tulis ilmiah akhir ini masih jauh dari sempurna, untuk itu dengan rendah hati diharapkan saran dan kritik dalam upaya perbaikan dan penyempurnaan laporan karya tulis ilmiah akhir ini.

Akhir kata saya ucapkan terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada semua pihak yang telah ikut membantu, membimbing dan mendidik saya selama menempuh dan menyelesaikan program pendidikan spesialis saya.

Dalam kesempatan ini, saya juga menyatakan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

7. Heru Purwanto, dr, SpB(K)Onk.MSc, selaku penguji pada penelitian ini yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan serta perbaikan dalam penelitian saya ini.
8. Yoga Wijayahadi, dr, SpBKL, selaku penguji pada penelitian ini yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan serta perbaikan dalam penelitian saya ini.
9. Budiono, dr,MKes, yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing saya khususnya dalam bidang statistic dan metodologi penelitian.
10. Dyah Fauziah, dr, SpPA dan seluruh teman sejawat/rekan residen, paramedis serta karyawan di lingkungan Laboratorium/SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah banyak membantu dan jalinan kerja sama yang baik selama masa pendidikan maupun selama menyelesaikan penelitian ini.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini serta ucapan terima kasih yang tulus saya sampaikan kepada seluruh pasien yang telah memberikan peranan besar dalam penelitian ini.
12. Terima kasih dan rasa hormat saya yang tulus dan tak terhingga saya sampaikan kepada orang tua serta saudara-saudari saya yang dengan penuh kasih sayang dan pengorbanan telah membesarkan dan mendidik saya sejak kecil hingga dapat menempuh pendidikan dokter dan dokter spesialis bedah, bapak dan ibu mertua dan seluruh keluarga yang penuh pengertian dan pengorbanannya, saya ucapkan terima kasih.

13. Istri saya I Jane Jiraldi, Ir, kedua anakku tersayang Timothy Alden Jiraldi Akemah dan Elizabeth Tracey Odella Jiraldi Akemah, terima kasih untuk seluruh cinta, kasih sayang, pengorbanan dan dorongan yang terus menerus diberikan selama pendidikan.

Surabaya, Juli 2005

Kipsanang . A

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat teoritis	3
1.4.2 Manfaat klinis	3
BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN	4
2.1 Keganasan pada kepala leher	4
2.2 <i>Staging</i> karsinoma sel skuamosa kepala leher	5
2.3 <i>Grading</i> histopatologi karsinoma sel skuamosa	7
2.4 <i>Cyclooxygenase</i>	8
2.5 Mekanisme <i>cyclooxygenase-2</i> terhadap tumorigenesis	10
2.6 Angiogenesis	11
2.7 Apoptosis	13
2.8 Peningkatan <i>COX-2</i> pada keganasan kepala leher	14

2.9	Teknik imunohistokimia	16
	2.9.1 Metode pengecatan imunohistokimia	17
	2.9.2 Pemeriksaan <i>COX-2</i> dengan teknik imunohistokimia	19
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1	Kerangka Konseptual	20
3.2	Hipotesis	21
BAB 4	METODE PENELITIAN	
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	22
4.2	Populasi, sampel, besar sampel, teknik pengambilan sampel, kriteria inklusi, eksklusi	22
	4.2.1 Populasi	22
	4.2.2 Sampel	22
	4.2.3 Besar sampel	23
	4.2.4 Pengambilan sampel	23
	4.2.5 Kriteria inklusi	24
	4.2.6 Kriteria eksklusi	24
4.3	Variabel Penelitian	24
4.4	Definisi Operasional Variabel Penelitian	24
	4.4.1 Ekspresi <i>COX-2</i>	24
	4.4.2 <i>Grading</i> histopatologi	25
4.5	Kerangka Operasional	26
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	26
	4.6.1 Lokasi	26
	4.6.2 Waktu penelitian	26
4.7	Tahap Penelitian	27
4.8	Analisa Data	27

BAB 5	HASIL PENELITIAN	29
BAB 6	PEMBAHASAN	38
6.1	Gambaran umum hasil penelitian	38
6.2	Korelasi ekspresi <i>COX-2</i> dengan <i>grading</i> histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher	39
6.3	Penggunaan obat penghambat <i>COX-2</i> pada keganasan	40
6.4	Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam Pemeriksaan imunohistokimia	43
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	47
KEPUSTAKAAN		48

DAFTAR GAMBAR

1. Biosintesa prostaglandin	8
2. Konsep dasar pembentukan <i>COX</i>	10
3. Tumor angiogenesis	12
4. Pelepasan signal angiogenesis	13
5. Gambar-gambar hasil pemeriksaan imunohistokimia <i>COX-2</i>	32

DAFTAR TABEL

1. Tabel 1. Karakteristik penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher di Bagian Bedah Kepala Leher RSUD Dr. Soetomo Surabaya	29
2. Tabel 2. Diagnosis klinis penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher	30
3. Tabel 3. Korelasi antara diferensiasi sel dengan intensitas ekspresi <i>COX-2</i>	30

DAFTAR LAMPIRAN

1. Teknik pengecatan Hematoksin Eosin cara Meyer	53
2. Teknik pulasan imunohistokimia dengan antibodi <i>NCL-COX-2</i> dari sediaan blok parafin.	54
3. Cara menghitung jumlah sel yang tercatat positif pada pemeriksaan imunohistokimia COX-2	56
4. Program tetap teknik pemeriksaan di Laboratorium Patologi Anatomi, RSUD. Dr. Soetomo Surabaya.	58
5. Rekapitulasi data penderita	59
6. Hasil analisis statistik	60
7. Data sheet Cyclooxygenase-2	63

CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) WITH HISTOPATHOLOGICAL GRADING IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Kipsanang Akemah, Faroek Hoesin, Sunarto Reksoprawiro

Department of Surgery Medical Faculty Airlangga University Dr. Soetomo Hospital
Surabaya

ABSTRACT

Back ground : Malignancy of head and neck are the sixth most common cancers world-wide, and squamous cell carcinomas predominate (90%) among malignancies of the upper aerodigestive tract. Epidemiological studies provided the first evidence that the COX-2 may be involved in the pathogenesis of malignancy and overexpressed in any kind of malignancies

Objective : To find whether COX-2 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma and how is the correlation between the expression of COX-2 with the histopathological grading in head and neck squamous cell carcinoma.

Method : This is a cross sectional study. Samples are all paraffin blocks of head and neck squamous cell carcinoma patients stored in Department of Pathology Anatomy Dr. Soetomo Hospital Surabaya, in the year of 2004-2005, with any histopathological grading from well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated/undifferentiated. All the 30 paraffin blocks are stained with COX-2 immunohistochemistry. Subjects are documented from the medical record in Head and Neck Division, Department of Surgery Dr. Soetomo Hospital Surabaya.

Results : From the 30 samples, 28 (93,3%) showed positive COX-2 expression and 2 (6,7%) without COX-2 expression in immunohistochemistry stained. Regarding the histopathologic grading, well differentiated showed positive immunostained in 80% with

weak intensity (1+), moderately differentiated showed 66,7% positive immunostained with moderate intensity (2+), and poorly differentiated/undifferentiated showed 72,7% positive immunostained with strong intensity (3+). We found there was significant correlation between histopathological grading with intensity of COX-2 expression ($p=0.0001$) and the worse the cell differentiation, the stronger the expression of COX-2 intensity (correlation coefficient 0,855).

Conclusion : Cyclooxygenase-2 (COX-2) is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas (93,7%). And there is correlation between histopatological grading of head and neck squamous cell carcinomas with COX-2 expression intensity. The worse the cell differentiation, the stronger the expression of COX-2 intensity (85,5%).

Key words : COX-2 overexpression, histopathological grading.

KORELASI EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)* DENGAN *GRADING* HISTOPATOLOGI PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA LEHER

Kipsanang Akemah, Faroek Hoesin, Sunarto Reksoprawiro
Laboratorium Ilmu Bedah FK UNAIR RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

ABSTRAK

Latar belakang : Keganasan kepala leher merupakan keganasan keenam terbanyak pada semua kasus keganasan di dunia dan karsinoma sel skuamosa merupakan keganasan yang terbanyak (90%) pada saluran aerodigestive bagian atas.

Pada studi epidemiologik, ditemukan bahwa enzim *cyclooxygenase-2 (COX-2)* berperan dalam patogenesis terjadinya keganasan dan peningkatan *COX-2* ditemukan pada berbagai jenis keganasan.

Tujuan : Mengetahui apakah terdapat *over* ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher dan bagaimana korelasi ekspresi *COX-2* pada berbagai *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Metodologi : Penelitian ini adalah cross sectional study. Sampel adalah blok parafin penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher yang tersimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, tahun 2004-2005 dengan berbagai derajat *grading* histopatologi yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated/undifferentiated*. Sebanyak 30 blok parafin dengan berbagai derajat diferensiasi kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia *COX-2*. Data diambil dari dokumen medik yang ada di poli Bedah Kepala Leher RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Hasil : Dari 30 sampel, didapatkan sebanyak 28 (93,3%) memperlihatkan ekspresi *COX-2* positif dan 2 (6,7%) ekspresi *COX-2* negatif. Dan dari *grading* histopatologis didapatkan ekspresi *COX-2* sebesar 80% pada *well differentiated* dengan intensitas ekspresi lemah (1+), 66,7% pada *moderately differentiated* dengan intensitas ekspresi

sedang (2+), dan 72,7% pada *poorly differentiated/undifferentiated* dengan intensitas kuat (3+). Terdapat adanya korelasi bermakna antara derajat diferensiasi sel dengan intensitas ekspresi *COX-2* ($p=0,0001$) dan makin jelek diferensiasi sel, makin kuat intensitas ekspresi *COX-2*, dengan kuat hubungan yang ditunjukkan oleh koefisien korelasi sebesar 0,855.

Kesimpulan : Terdapat ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher (93,3%). Dan makin jelek diferensiasi sel, makin kuat intensitas ekspresi *COX-2* (85,5%).

Kata kunci : Ekspresi *COX-2*, *grading* histopatologi.

BAB 1

PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Masalah

Keganasan kepala leher merupakan keganasan yang keenam terbanyak pada semua kasus keganasan di dunia dengan insiden yang lebih banyak pada negara berkembang. Dan dari berbagai tipe histologik, karsinoma sel skuamosa merupakan keganasan yang terbanyak pada saluran aerodigestif bagian atas.(Espat, 2001; Watkinson, 2000). Karsinoma sel skuamosa merupakan 90% dari seluruh keganasan di kepala leher dan kira-kira 5% dari semua keganasan pada pria serta 2% dari semua keganasan pada wanita.(Vaughan, 2004).

Pada studi epidemiologik membuktikan bahwa *cyclooxygenase 2* (*COX-2*) terlibat dalam patogenesis terjadinya keganasan.(Koki, 2002).

Adanya peningkatan enzim *cyclooxygenase 2* (*COX-2*) pada berbagai jenis keganasan seperti tumor kolon, paru-paru, lambung, esofagus, meyakinkan keterlibatan *COX-2* pada karsinogenesis. Secara konsisten terjadi peningkatan ekspresi *COX-2* pada lesi pra keganasan seperti leukoplakia oral, aktinik keratosis, neoplasia prostat intraepitelial dan juga pada keganasan di kepala leher.(Chan et al, 1998 ;Koki,2002; Shamma et al, 2000)

Pengaruh peningkatan *COX-2* ini menimbulkan peningkatan pembelahan sel, menghambat apoptosis sel tumor, merubah adhesi sel, meningkatkan motilitas sel

tumor, menginduksi neovaskularisasi, menurunkan *immunosurveillance* dan meningkatkan angiogenesis. (Koki, 2002; Moore, 2003).

Pemakaian obat penghambat *COX-2* mulai digunakan pada karsinoma kolorektal dan menunjukkan hasil yang baik, dan penggunaan penghambat *COX-2* pada keganasan sel skuamosa di kepala leher menunjukkan hasil berupa penurunan kadar prostaglandin E-2 (*PGE-2*). Hal ini menimbulkan efek menurunnya sekresi faktor angiogenik, dan selanjutnya menghambat pertumbuhan sel tumor karena tidak mendapat vaskularisasi yang cukup.

Pada pemeriksaan imunohistokimia, peningkatan level *COX-2* secara primer ditemukan pada epitel neoplasma, sel-sel inflamasi dan sistim vaskuler pada sarang tumor, sebaliknya bahwa *COX-2* tidak terdeteksi pada sistim vaskuler dari jaringan normal maupun jaringan non neoplasma.(de Almeida,2001; Koki, 2002)

Berdasarkan dari hasil penelitian di atas maka pada penelitian ini akan dicari bagaimana korelasi ekspresi *COX-2* dengan berbagai *grading* karsinoma sel skuamosa kepala leher.

1.2 Rumusan masalah

1. Apakah terdapat korelasi ekspresi *COX-2* dengan karsinoma sel skuamosa kepala leher ?
2. Apakah terdapat perbedaan derajat ekspresi *COX-2* pada berbagai *grading* karsinoma sel skuamosa kepala leher ?
3. Bagaimana korelasi antara derajat ekspresi *COX-2* dengan derajat *grading* karsinoma sel skuamosa kepala leher ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Mengetahui korelasi ekspresi *COX-2* dengan karsinoma sel skuamosa kepala leher.

1.3.2 Tujuan khusus :

- a. Mengetahui derajat perbedaan ekspresi *COX-2* pada berbagai *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala leher.
- b. Mengetahui korelasi derajat ekspresi *COX-2* dan derajat *grading* karsinoma sel skuamosa kepala leher.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Mengetahui korelasi ekspresi *COX-2* dengan pertumbuhan karsinoma sel skuamosa kepala leher.

1.4.2. Manfaat klinis

- a. Derajat ekspresi *COX-2* dapat digunakan sebagai parameter nilai prognostik penderita.
- b. Dengan mengetahui adanya ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, maka dapat digunakan obat penghambat *COX-2* sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan tersebut.
- c. Dapat melakukan penelitian lanjut tentang efek obat penghambat *COX-2* terhadap penghambatan pada pertumbuhan tumor.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Keganasan pada kepala leher

Keganasan di kepala leher relatif jarang, kurang lebih 5% dari seluruh keganasan di Amerika dan merupakan keganasan yang menduduki peringkat keenam di dunia. Terminologi tentang keganasan kepala leher mencakup spektrum luas dari berbagai jenis histologi dan asal tumor termasuk perilaku biologik tumor.(Espat, 2001)

Lebih dari 90% keganasan di kepala leher adalah karsinoma sel skuamosa yang berasal dari traktus aerodigestif bagian atas (rongga mulut, orofaring, hipofaring, dan laring). Faktor resiko yang paling berperan atas timbulnya keganasan di kepala leher adalah tembakau dan alkohol. (Espat,2001; Watkinson,2000). Faktor pekerjaan yang berhubungan dengan dengan resiko timbulnya keganasan di kepala leher antara lain pekerja tambang nikel, pekerja di pabrik kayu, dan pabrik tekstil.(Espat, 2001; Vaughan,2004). Umumnya keganasan pada kepala leher lebih banyak ditemukan pada penderita di atas usia 40 tahun dan jarang yang di bawah 30 tahun. Laki-laki lebih banyak dari pada wanita dengan perbandingan 3 : 2.(Coleman, 1999;Watkinson,2000)

Terdapat bukti yang kuat tentang infeksi virus yang menyebabkan timbulnya keganasan kepala leher seperti *Human Papiloma virus (HPV)* dan *Ebstein Bar virus(EBV)*.(Vaughan,2004).

Pertumbuhan terjadinya karsinoma sel skuamosa kepala leher meliputi proses multistep. Delesi kromosom 3p dan 18q, amplifikasi dari *int-2* dan *bcl-1*, mutasi gen p53 dan ekspresi yang berlebihan dari *transforming growth factor- α* (TGF- α) serta *epidermal growth factor receptor* (EGFr) merupakan komponen penting dalam proses karsinogenik.(Beenken, 2003).

Peningkatan ekspresi *cyclooxygenase-2* (COX-2) pada karsinoma sel skuamosa kepala leher telah banyak dibicarakan dan berhubungan dengan derajat keganasan serta faktor prognostik.

Peningkatan ekspresi COX-2 pada sel neoplasma mencapai 40%-80% dan intensitas ekspresinya lebih kuat pada sel kanker dari pada sel bukan kanker.(Koki, 2002)

2.2. Staging karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Staging karsinoma sel skuamosa kepala leher penting untuk stadium kanker, merencanakan serta menilai hasil pengobatan dan menentukan prognosis. Hal yang penting dalam menentukan *staging* adalah diskripsi yang tepat mengenai ukuran dan lokasi tumor, status kelenjar getah bening regional serta ada tidaknya metastasis jauh. Sistem TNM telah berperan banyak dalam standarisasi pelaporan hasil pengobatan kanker. Pada keganasan rongga mulut, orofaring, dan kelenjar liur mayor, *stage* T berdasarkan ukuran tumor, sementara pada laring, hipofaring dan nasofaring, *stage* T berdasarkan pada keterlibatan ekstensi lokalnya.(Beenken,2003)

Status kelenjar getah bening regional serta ada tidaknya metastasis jauh merupakan faktor yang penting dalam menentukan rencana penanganan maupun evaluasi hasil pengobatan pada karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Penentuan sistim TNM dari *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* untuk menentukan stadium pada keganasan kepala leher, yaitu :(Beenken, 2003)

Stadium 0 = Tis N0M0

Stadium I = T1 N0 M0

Stadium II = T2 N0 M0

Stadium III = T3N0M0, T1N1M0, T2N1M0, T3N1M0

Stadium IV = T4N0M0, Tiap T, N2N3M0, Tiap T, Tiap N, M1

Untuk melukiskan luas invasi tumor primer (T), maka T diberi indeks angka 0,1,2,3 dan 4. Untuk keganasan rongga mulut T adalah:

T0 = tidak ditemukan tumor primer

Tis = karsinoma in situ.

T1 = tumor dengan diameter ≤ 2 cm

T2 = tumor dengan diameter 2-4 cm.

T3 = tumor dengan diameter > 4 cm.

Untuk menggambarkan ada tidaknya metastase di kelenjar getah bening regional (N), dibuat klasifikasi sebagai berikut :

Nx = kelenjar getah bening regional tak dapat ditentukan.

N0 = tidak didapatkan pembesaran kelenjar getah bening.

N1 = metastase pada KGB regional, satu nodus, ipsilateral, diameter ≤ 3 cm.

N2a = metastase KGB regional, satu nodus, ipsilateral, diameter $3 < N \leq 6$ cm.

N2b = metastase KGB regional, multiple nodus, ipsilateral, diameter < 6 cm.

N2c = metastase KGB regional, bilateral atau kontralateral, diameter < 6 cm.

N3 = metastase KGB, diameter > 6 cm.

Untuk menggambarkan ada atau tidaknya metastase jauh (M) :

Mx = adanya metastase jauh tak dapat ditentukan

M0 = tidak didapatkan metastase jauh.

M1 = ada metastase jauh.

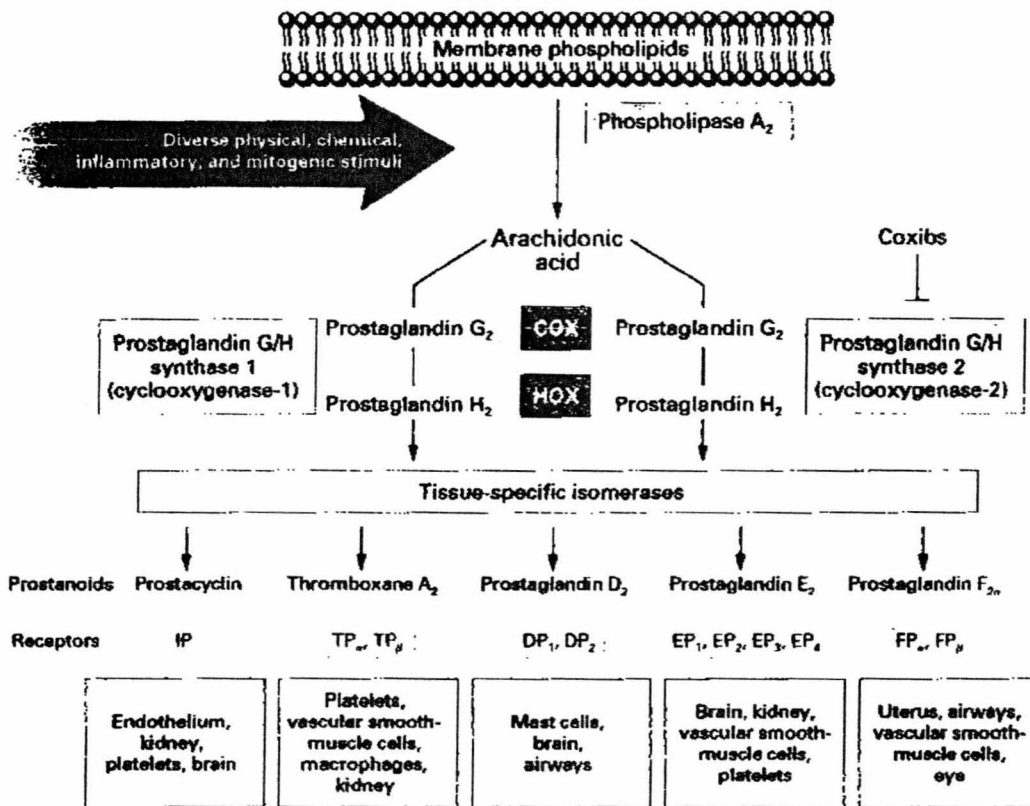
2.3. Grading histopatologis karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Karsinoma sel skuamosa kepala leher secara mikroskopik dibagi atas 2 jenis yaitu kornifikasi (*keratinizing*) dan nonkornifikasi (*nonkeratinizing*). Adanya kornifikasi menunjukkan derajat diferensiasi yang baik dan sebaliknya tidak adanya kornifikasi menunjukkan derajat diferensiasi yang jelek (Vaughan, 2004).

Derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa berdasarkan konsep Broders dibagi menjadi 4 sub tipe yaitu diferensiasi baik (*well differentiated*), diferensiasi sedang (*moderately differentiated*), diferensiasi jelek (*poorly differentiated*), dan tidak terdiferensiasi (*undifferentiated*). Dikatakan *undifferentiated* bila asal sel tidak dapat diketahui. Mengetahui derajat diferensiasi sel adalah penting karena umumnya keganasan tumor sesuai dengan derajat diferensiasi sel. Makin jelek diferensiasi selnya, makin ganas karsinoma tersebut. (Sukardja, 1996; Vaughan, 2004)

2.4. Cyclooxygenase (COX)

Cyclooxygenase(COX) disebut juga *Prostaglandin G/H synthase*, suatu enzim yang terikat di membran yang bertanggung jawab dalam oksidasi asam arakidonat menjadi prostaglandin (Pg) dan *tromboxan A2*. *Cyclooxygenase* ditemukan pada tahun 1976 dan mulai di-klon pada tahun 1988. *COX* mempunyai BM 71 kDa dan terdapat dalam jumlah besar di retikulum endoplasma.(Kulkarini,2000;Gotlieb, 2001)



Gambar 1: Biosintesa prostaglandin (FitzGerald, 2001)

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim katalisator dan mengandung dua sisi aktif yang terpisah. Sisi aktif *COX* mengkatalisasi asam arakidonat dan membentuknya menjadi bentuk siklik pentana dengan cincin endoperoksil prostaglandin G-2 (PgG-2).

Sisi aktif lain mempunyai aktifitas peroksidase merubah bentuk *hydroperoxyl PgG-2* menjadi *hydroxyl prostaglandin H-2 (PgH-2)*. Sisi aktif *COX* mempunyai sifat hidrofobik. Asam arakidonat, zat primer dalam proses ini mendekati sisi aktif melalui lubang yang banyak terdapat di lapisan *lipid bilayer* retikulum endoplasma dan kapsul inti sel yang dekat dengan sisi aktif. (Kulkarini,2000 ; Moore,2003).

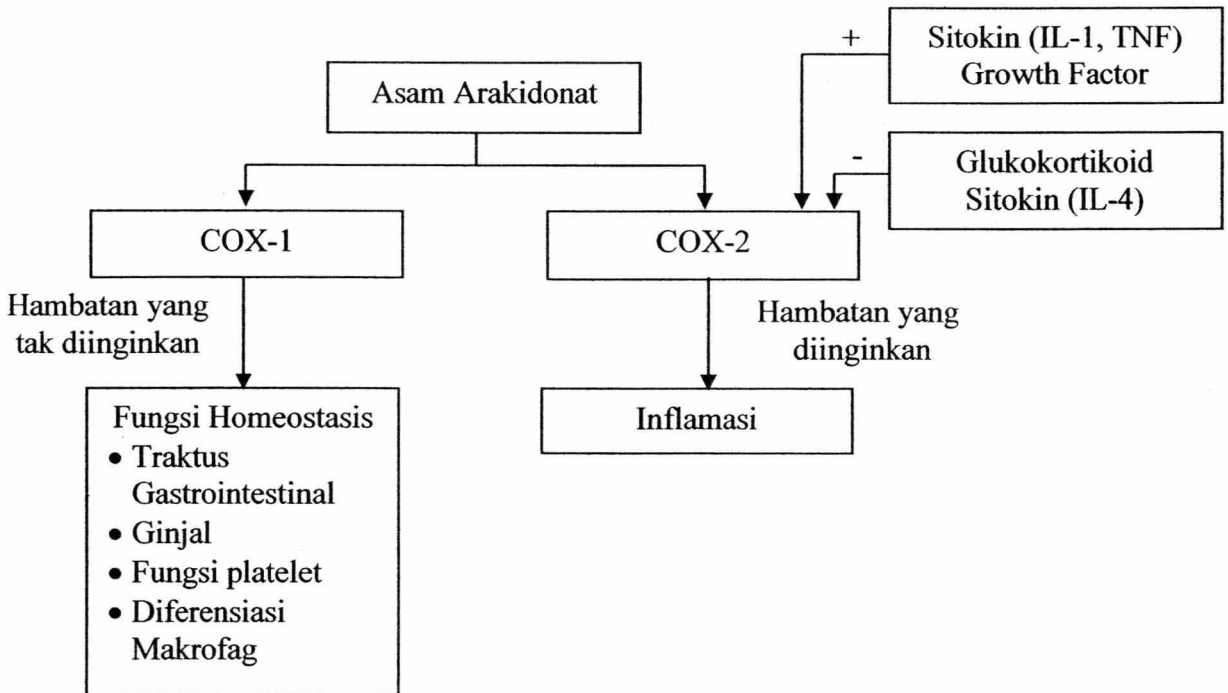
Ada dua macam bentuk *cyclooxygenase (COX)*, yaitu *COX-1* dan *COX-2*. Keduanya dibedakan berdasarkan struktur dan letaknya di dalam sel serta yang terpenting yaitu *substrate* dan *inhibitor selectivity*. (Kulkarini,2000 ; Moore, 2003)

COX-1 adalah enzim protein “penjaga rumah”, dihasilkan pada hampir semua jaringan tubuh normal terutama lambung, usus, platelet, mukosa bronkus dan ginjal. *COX-1* membentuk prostaglandin protektif (prostaglandin E₂, I₂, dan F₂) yang ada di mukosa lambung dan mempertahankan fungsi ginjal pada aktifitas tubuh yang normal. *COX-1* juga ada di platelet dan membentuk *tromboxan A₂* yang menyebabkan agregasi platelet untuk mencegah perdarahan (hemostasis vaskuler). Gen pengatur *COX-1* terletak di kromosom 9.(Kulkarini,2000)

COX-2 pertama sekali dilaporkan oleh Needleman bahwa enzim ini diinduksi oleh berbagai rangsang inflamasi, sitokin (interleukin-1, *Tumor Necrosis Factor α*). *COX-2* adalah enzim dimer dan tiap monomer mengandung bagian katalitik dan bagian yang terikat ke membran yang membentuk ujung sisi aktif.(Kulkarini,2000).

Selain berperan pada proses inflamasi, metabolit *COX-2* dikatakan berperan pada tumorigenesis antara lain hiperproliferasi lesi premaligna, transformasi, mempertahankan viabilitas, pertumbuhan, invasi dan penyebaran metastasis dari tumor. (Koki, 2002)

Gen *COX-2* terletak pada kromosom 1 (1q25.2-25.3). *COX-2* adalah respon gen akibat adanya promoter tumor, *growth factor*, zat onkogen dan karsinogen. (Tan, 2002)



Gambar 2. Konsep dasar pembentukan *COX*. (Gotlieb D, 2001)

2.5. Mekanisme *cyclooxygenase-2 (COX-2)* terhadap tumorigenesis

Peningkatan *COX-2* mempunyai banyak peran dalam sel neoplasma, yaitu meningkatkan pembelahan sel, menghambat apoptosis sel tumor, merubah adhesi sel, meningkatkan motilitas sel normal, menginduksi neovaskularisasi, menurunkan

immuno surveillance, dan merangsang faktor proangiogenik seperti *VEGF*, *inducible nitrogen oxide synthetase promoter (iNOS)*, IL-6, IL-8, dan TIE-2.(Koki,2002)

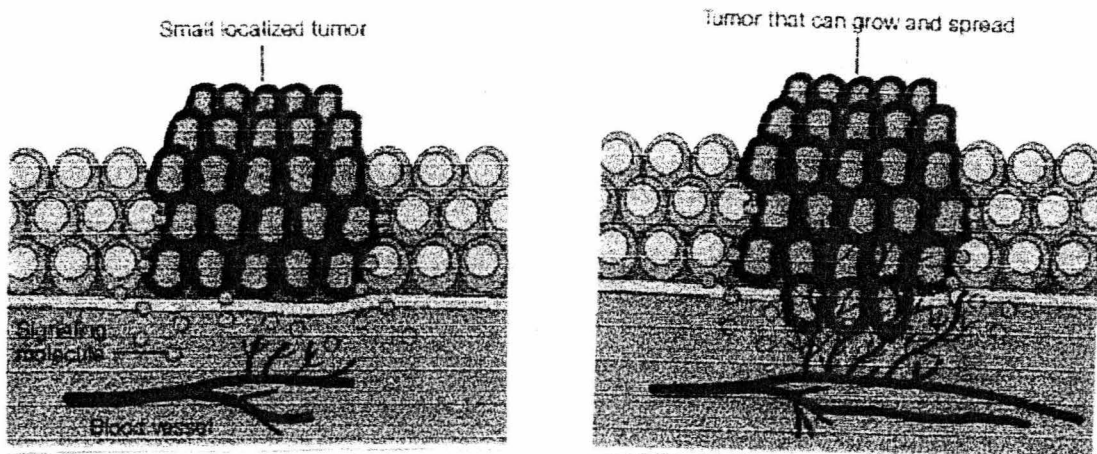
Metabolit *COX-2* yang berasal dari sel-sel inflamasi memiliki kontribusi terhadap proses tumorigenik. Seperti terpacunya sintesis prostaglandin akan memacu onkogenesis dengan merangsang mitogenesis dalam fibroblas, osteoblas dan sel epitel payudara secara langsung. Sintesis prostaglandin lokal yang berlebih juga merusak *immunesurveillance* yang berperan dalam penekanan pertumbuhan tumor.(Kulkarini,2000).

Prostaglandin H-2 (PGH_2) yang merupakan hasil langsung dari *COX-2* dapat mengalami isomerisasi baik secara enzimatik maupun nonenzimatik dan membentuk *malondialdehyde* yang merupakan mutagen yang poten. Tambahan kerusakan akibat pembentukan radikal bebas dapat terjadi melalui aktifitas peroksidasi *COX-2* yang secara efisien dapat mengoksidasi aromatik dan *amine* heterosiklik serta derivat dihidrodiol.(Koki, 2002)

Selain PGH_2 , PGE_2 yang juga merupakan hasil dari *COX-2* dapat merangsang transkripsi aromatase, dan juga merangsang angiogenesis, yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tumor dan metastasis.(Kulkarini,2000)

2.6. Angiogenesis

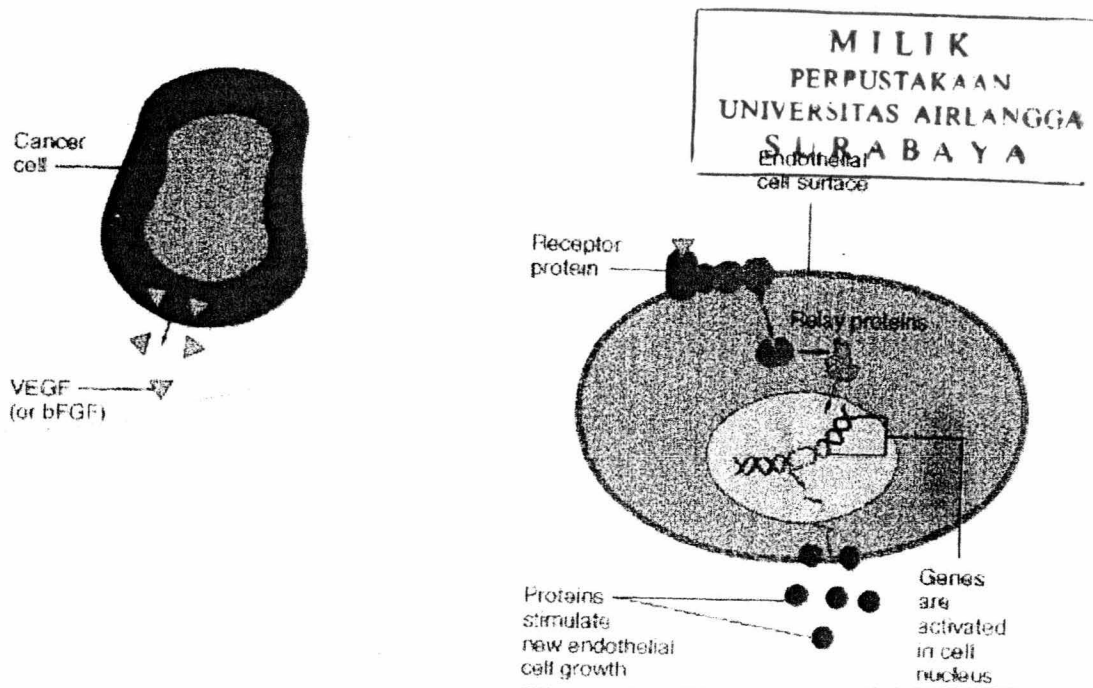
Angiogenesis tumor adalah proliferasi dari jaringan pembuluh darah yang memasuki sel tumor yang akan bertumbuh, memberikan nutrisi dan oksigen dan menampung zat sisa. Pembuluh darah ini juga menjadi prasarana yang baik bagi sel tumor untuk metastasis.



Gambar 3: Tumor Angiogenesis (www.press2.nci.nih.gov, 2003)

Angiogenesis adalah faktor penting bagi sel tumor untuk bertumbuh. Angiogenesis tumor dimulai dari sel tumor yang melepaskan molekul signal ke jaringan sehat di sekitarnya. Prostaglandin E-2 yang meningkat karena peningkatan COX-2 merupakan signal bagi autokrin dan parakrin menghasilkan sekresi faktor angiogenik.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor-alpha 1 (TGF- α 1), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), dan faktor angiogenik lain pada awalnya disintesis di dalam sel tumor dan kemudian dilepaskan ke jaringan sekitarnya. Ketika faktor angiogenik ini bertemu dengan sel endotel pembuluh darah, ia akan terikat dengan protein reseptor yang spesifik untuknya di permukaan luar sel. (Elise,2001, Moore, 2003)



Gambar 4: Pelepasan Signal Angiogenesis (www.press2.nci.nih.gov, 2003)

Ikatan antara faktor angiogenik dan reseptor akan mengaktifkan protein yang merupakan signal ke inti sel endotel. Signal ini mendorong terjadinya sekelompok gen yang membuat bahan-bahan yang diperlukan untuk membuat sel endotel baru (Elise, 2001; Moore, 2003). Pada keadaan normal sel endotel pembuluh darah hanya mengalami pembelahan satu kali dalam tiga tahun.

2.7. Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang dipicu oleh sel itu sendiri, sehingga seolah-olah sel tersebut membunuh dirinya sendiri (bunuh diri). Oleh karena itu apoptosis disebut juga *Programmed Cell Death (PCD)*. Apoptosis dapat terjadi dalam keadaan fisiologis maupun patologis. Dalam keadaan fisiologis apoptosis terjadi pada sel-sel tua yang telah rusak atau sel yang tidak diperlukan lagi. (Ashfaq, 2003 ; Moore, 2003 ; Purnomo, 2000)

Apoptosis adalah proses dua tahap mencakup kematian sel terprogram dan penyerapan dari sel-sel yang mati. Adanya peningkatan *COX-2* meningkatkan pelepasan *Bcl-2* (*B cell lymphoma-2*), suatu protein yang membuat sel resisten terhadap apoptosis. Pada keadaan ini gen *Bcl-2* mengalami ekspresi yang berlebihan, sehingga sel yang seharusnya terbunuh melalui apoptosis menjadi tetap hidup. Dalam hal ini *Bcl-2* berfungsi sebagai proto-onkogen. Jadi peningkatan *COX-2* menghambat apoptosis sel tumor. (Ashfaq, 2003 ; Moore, 2003 ; Purnomo, 2000)

Peningkatan *COX-2* juga menyebabkan apoptosis dengan cara menurunkan pelepasan *Transforming Growth Factor-beta* (*TGF-β*), suatu faktor penting untuk pelepasan signal yang menghambat pertumbuhan sel. (Moore, 2003)

2.8. Peningkatan *COX-2* pada keganasan kepala leher.

Peningkatan kadar *COX-2* telah dilaporkan pada berbagai jenis tumor, seperti tumor kolon, paru-paru, payudara, lambung dan esofagus, hal ini meyakinkan keterlibatan *COX-2* pada karsinogenesis. (Tan, 2002; Gotlieb,2001)

Tan LK pada 25 September 2002 mendapatkan peningkatan ekspresi *COX-2* pada 51% (20 orang) dari 30 pasien karsinoma nasofaring yang diperiksanya, terutama pada stadium III. (Tan, 2002)

Gallo menulis peningkatan *COX-2* pada 52 pasien karsinoma sel skuamosa kepala leher yang diperiksanya. Hal ini berhubungan dengan peningkatan kadar prostaglandin E-2 (*PgE-2*), *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*) dan vaskularisasi tumor. Menurut analisisnya, pasien dengan peningkatan *COX-2* memiliki kadar *PgE-2* lebih tinggi, metastasis ke kelenjar limfe, dan peningkatan

vaskularisasi tumor. Dibuat kesimpulan bahwa ada hubungan antara peningkatan ekspresi *COX-2*, peningkatan *VEGF*, dan angiogenesis tumor. Peningkatan ekspresi *COX-2* dan vaskularisasi tumor yang lebih tinggi membuat angka harapan hidup makin rendah. (Gallo,2002).

Elise C mendapatkan akumulasi *COX-2* dan *VEGF* pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Dengan metode *Northern blot hybridization* didapatkan jumlah *COX-2* mRNA lebih tinggi pada karsinoma sel skuamosa ini. Dengan adanya ekspresi *COX-2* lebih tinggi maka kadar prostaglandin juga lebih tinggi.(Ashfaq, 2003)

Mestre JR mendapatkan peningkatan ekspresi *COX-2* pada 15 penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher dibandingkan dengan 10 orang normal, selain itu juga mendapatkan peningkatan kadar mRNA *COX-2* dan prostaglandin.(Mestre,2002)

Murono mengemukakan *LMP-1* (onkoprotein *EBV*) dapat dideteksi pada sedikitnya 70% kasus karsinoma nasofaring. Tujuh dari sepuluh kasus karsinoma nasofaring yang diperiksanya menunjukkan hasil pemeriksaan *LMP-1* positif, dan semuanya menunjukkan peningkatan kadar *COX-2*.(Murono,2001)

2.9. Teknik Imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia adalah pemeriksaan imunologi dengan menggunakan antibodi sebagai *probe* untuk mendeteksi antigen dalam suatu potongan jaringan atau bentuk preparasi sel lainnya (Desai, 2000). Prinsip dasar pemeriksaan imunohistokimia sama dengan imunofluoresen, yakni berdasarkan terjadinya kompleks antigen antibodi yang dapat dideteksi apabila antibodi yang mengikatnya telah diberi label. Pada imunohistokimia labelisasi menggunakan aktifitas enzim, yang akan menghasilkan warna setelah pemberian kromogen. Warna tersebut akan tampak pada daerah kompleks-enzim-antibodi di dalam jaringan yang terlihat dengan pemeriksaan mikroskop cahaya. Berbagai enzim yang digunakan untuk proses labelisasi dalam teknik ini antara lain *horseradish peroxidase*, fosfatase alkali, glukosa oksidase, avidin-biotin kompleks, dan streptavidin-biotin (Desai, 2000).

Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk mengenali jenis antigen atau bahan yang terkandung dalam suatu sel atau jaringan. Manfaat pemeriksaan imunohistokimia adalah (Martoprawiro, 1990; Allsegaff, 1998):

1. Mempertajam diagnostik patologi dengan cara:
 - a. Memastikan histogenetik tumor
 - b. Menentukan subklasifikasi tumor
 - c. Menentukan lesi neoplastik atau non neoplastik
 - d. Mendeteksi petanda tumor
 - e. Mendeteksi petanda mikroba
 - f. Mendeteksi ekspresi onkogen
2. Membantu meramalkan perangai biologik dan prognosis suatu tumor

3. Menentukan pilihan pengobatan
4. Mengenali jenis mikroorganisme atau jenis infeksi

2.9.1 Metode pengecatan imunohistokimia

Terdapat berbagai metode pemeriksaan imunohistokimia, antara lain (Leong, 1993; Desai 2000):

1. Metode Langsung (*Direct Technique / Direct Labeled antibody method*)

Teknik ini menggunakan suatu *enzyme-conjugated antibody* untuk mengikat enzim dengan antigen pada potongan jaringan. Walaupun teknik ini sederhana, tetapi kurang sensitif.

2. Metode Tidak Langsung (*Indirect*)

Fakta bahwa molekul imunoglobulin dapat bertindak sebagai antibodi dimana ia akan berikatan spesifik dengan antigen, dan juga sebagai antigen dimana antibodi sekunder bisa melekat padanya, merupakan dasar dari teknik tidak langsung ini. Antigen jaringan akan berikatan dengan antibodi primer yang tidak berlabel dan divisualisasikan dengan antibodi sekunder yang berlabel. antibodi sekunder dibuat dari binatang yang berbeda dengan antibodi primer.

3. Metode Peroksidase Anti-Peroksidase (PAP)

Metode PAP adalah metode antibodi tanpa label. Reagen PAP merupakan suatu bentuk kompleks imun yang stabil yang terdiri dari antibodi anti-peroksidase dan *horseradish peroxidase*. Metode ini menjadi sangat populer karena sensitivitasnya yang tinggi.

4. Metode Avidin Biotin

Metode Avidin Botin didasarkan pada afinitas yang tinggi antara biotin dan avidin.

Biotin adalah suatu jenis vitamin dengan berat molekul rendah berikatan kovalen dengan antibodi primer dan memproduksi konjugat *biotinylated* yang bila ditambahkan pada irisan jaringan akan terlokalisasi pada tempat antigen.

Avidin adalah suatu glikoprotein dengan berat molekul tinggi yang memiliki 4 lokasi ikatan untuk biotin.

Pada metode langsung, antibodi primer akan berikatan dengan biotin, yang selanjutnya akan berikatan erat dengan avidin, yang secara kemis akan berkonjugasi dengan *horseradish peroxidase*. Pada metode tidak langsung, antibodi primer tidak terkonjugasi, tetapi *biotinylated secondary antibody* akan mendeteksi lokasinya.

Hsu dkk pada tahun 1981 mengembangkan metode *Avidin Biotin peroxidase Complex (ABC method)*, yang lebih sensitif dari metode biotin avidin sebelumnya. Pada teknik ini, penambahan antibodi primer diikuti dengan *biotinylated secondary antibody* dan selanjutnya membentuk kompleks dengan avidin-biotin *horseradish peroxidase*.

5. Metode *Labelled Streptavidin Biotin*.

Metode ini mengatasi kekurangan metode ABC, dengan mengganti avidin dengan streptavidin. Streptavidin dan enzim akan bergabung pada konsentrasi yang cukup dan bertahan paling sedikit pada suhu ruangan untuk membentuk kompleks yang terikat pada *biotinylated antibody*.

2.9.2. Pemeriksaan COX-2 dengan Teknik Imunohistokimia.

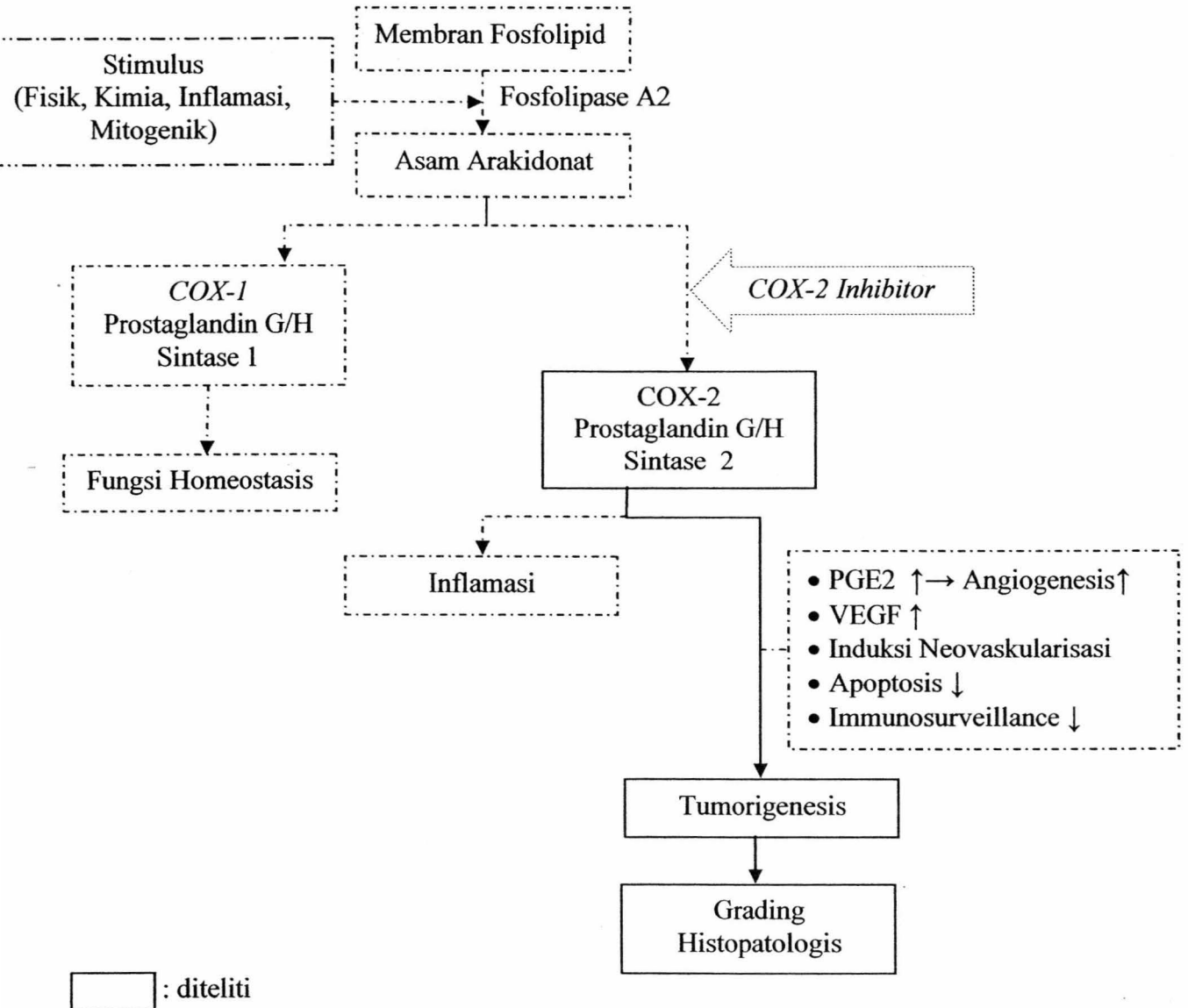
Metode pemeriksaan COX-2 pada penelitian ini adalah dengan teknik imunohistokimia yang menggunakan NCL-COX-2 mouse monoclonal antibody (Novocastra Laboratories Ltd. UK). Ekspresi COX-2 yang positif akan tampak pada sitoplasma dari sel tumor. Dan sebagai kontrol positif digunakan blok parafin dari penyakit *Chron* atau kolitis ulseratif sesuai yang direkomendasikan oleh *data sheet Cyclooxygenase-2, NCL-COX-2 mouse monoclonal antibody-Novocastra Laboratory Ltd.*

Pemeriksaan dengan metode imunohistokimia relatif lebih mudah dilakukan, karena pada prinsipnya pemeriksaan ini adalah teknik pulasan dengan dasar ikatan antigen antibodi yang diberi warna sehingga ekspresi COX-2 yang dicari pada sel tumor akan terlihat berwarna. Cara ini cepat, nonradioaktif, memerlukan sedikit jaringan, dapat mendeteksi jaringan segar maupun jaringan yang telah difiksasi dengan formalin dan ditempelkan dalam blok parafin, dan mikroskop yang dipakai cukup mikroskop cahaya biasa. Metode ini dapat akurat, bila tes dilakukan sesuai dengan protokol yang ketat.

Teknik pulasan imunohistokimia dengan antibodi COX-2 dari sediaan blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher pada penelitian ini dapat dilihat pada lembar lampiran, sesuai dengan protokol yang direkomendasikan pada *data sheet NCL-COX-2, Novocastra Laboratory Ltd.*

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL



3.1. Hipotesis

- Terdapat peningkatan ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher.
- Terdapat korelasi antara peningkatan ekspresi *COX-2* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala leher.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui peningkatan ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, serta korelasi antara peningkatan ekspresi *COX-2* dengan berbagai *grading* histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Pengamatan dilakukan dengan sesaat pada variabel-variabel yang peristiwanya telah terjadi. Rancangan penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*.

4.2 Populasi, sample, besar sample, teknik pengambilan sample, kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah semua blok parafin yang tersimpan di laboratorium Patologi Anatomi yang secara klinis dan histopatologis menunjukkan gambaran karsinoma sel skuamosa kepala leher.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah blok parafin penderita yang telah dioperasi di RSUD Dr. Soetomo Surabaya selama periode 2004-2005 yang secara histopatologis menunjukkan karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan berbagai derajat diferensiasi.

4.2.3 Besar sampel

Besarnya sampel ditentukan menurut perhitungan berdasarkan proporsi karena populasi tidak diketahui, dengan rumus sebagai berikut :

$$n = \left[\frac{Z_{1/2\alpha} + Z_{\beta}}{(1+r) \cdot 0,5 \ln \frac{1+r}{1-r}} \right]^2 + 3$$

$$Z_{1/2\alpha} 0,05 = 1,96$$

$$Z_{\beta} 0,20 = 0,842$$

$$r = 0,5$$

Rumus korelasi :

$$n = \left[\frac{1,96 + 0,842}{(1 + 0,5) \cdot 0,5 \ln \frac{1 + 0,5}{1 - 0,5}} \right]^2 + 3$$

$$n = 29,05 \text{ dibulatkan menjadi } 30$$

4.2.4 Pengambilan sampel

Sampel dipilih secara *simple random sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi kemudian diperiksa secara imunohistokimia ekspresi COX-2 sesuai dengan *grading* histopatologinya.

4.2.5 Kriteria inklusi

1. Kasus primer
2. Belum pernah radiasi dan kemoterapi preoperatif.
3. Blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher yang tersimpan dengan baik pada suhu kamar di laboratorium Patologi Anatomi FK.UNAIR.

4.2.6 Kriteria eksklusi

Didapatkan keganasan pada organ lain.

4.3. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini variable penelitian yang diteliti adalah:

1. Variabel *independent* : ekspresi *COX-2*.
2. Variabel *dependent* : *grading* histopatologis.

4.4 Definisi operasional variabel penelitian.

4.4.1 Ekspresi *COX-2*

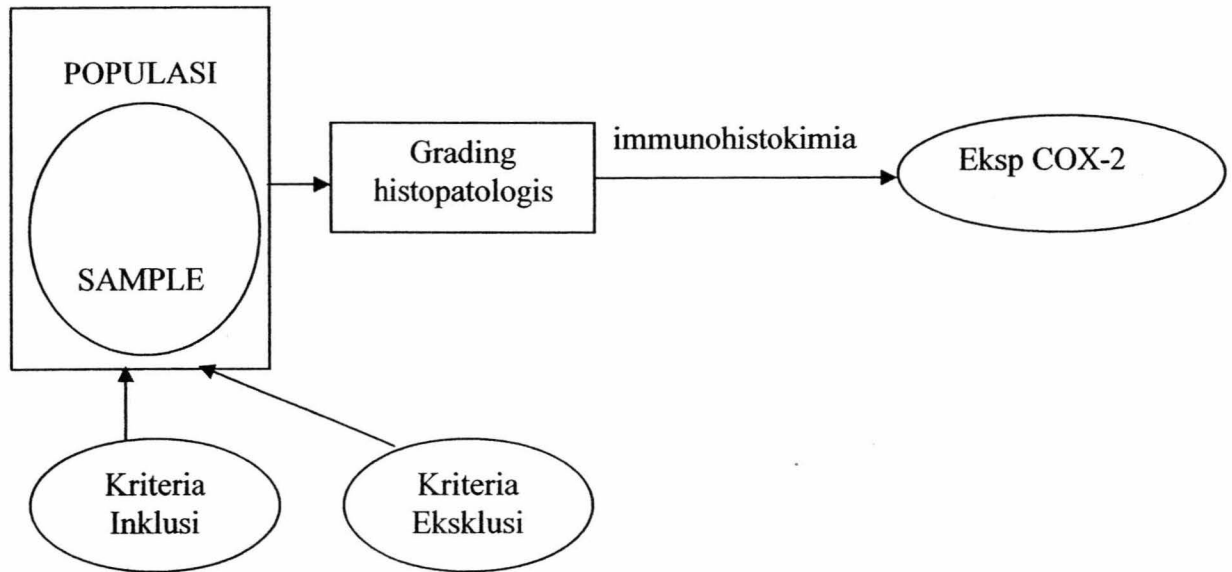
Merupakan ekspresi *COX-2* yang terjadi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, dimana perhitungannya berdasarkan prosentase tumor yang sitoplasma intinya tercat positif dengan menggunakan antibodi terhadap *COX-2* (*NCL-COX-2*). Ekspresi *COX-2* ditunjukkan dalam skala prosentase tumor positif dan dinilai secara semikuantitatif dengan skor 0 (0%-4%), 1 (5%-24%), 2 (25%-49%), 3 (50%-74%), 4 (75%-100%). Intensitas *immunostaining* ditentukan dengan nilai 0 (negatif), 1+ (lemah), 2+ (sedang), 3+(kuat). Dan bila dalam satu *slide* terdapat intensitas yang heterogen, maka setiap komponen dinilai secara tersendiri

kemudian dijumlahkan seluruhnya. Untuk menilai skor dan imunoreaktivitas dilakukan dengan cara mengalikan prosentase sel positif dengan kekuatan intensitas. Sebagai contoh, satu *slide* memberikan gambaran 25% sel tumor dengan intensitas kuat ($1 \times 3+ = 3$), 25% sel tumor intensitas lemah ($1 \times 1+ = 1$) dan 50% tanpa imunoreaksi, maka skornya adalah $3+1+0 = 4$. Pemeriksaan ini dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FK Unair Surabaya.

4.4.2 Grading histopatologi

Karsinoma sel skuamosa ditentukan *gradenya* menjadi 4 sub tipe berdasarkan diferensiasi histologinya yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated* dan *undifferentiated*. Pada penelitian ini akan diteliti intensitas ekspresi *COX-2* secara imunohistokimia pada berbagai derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa kepala leher . Pemeriksaan histopatologi ini dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

4.5 Kerangka Operasional



4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

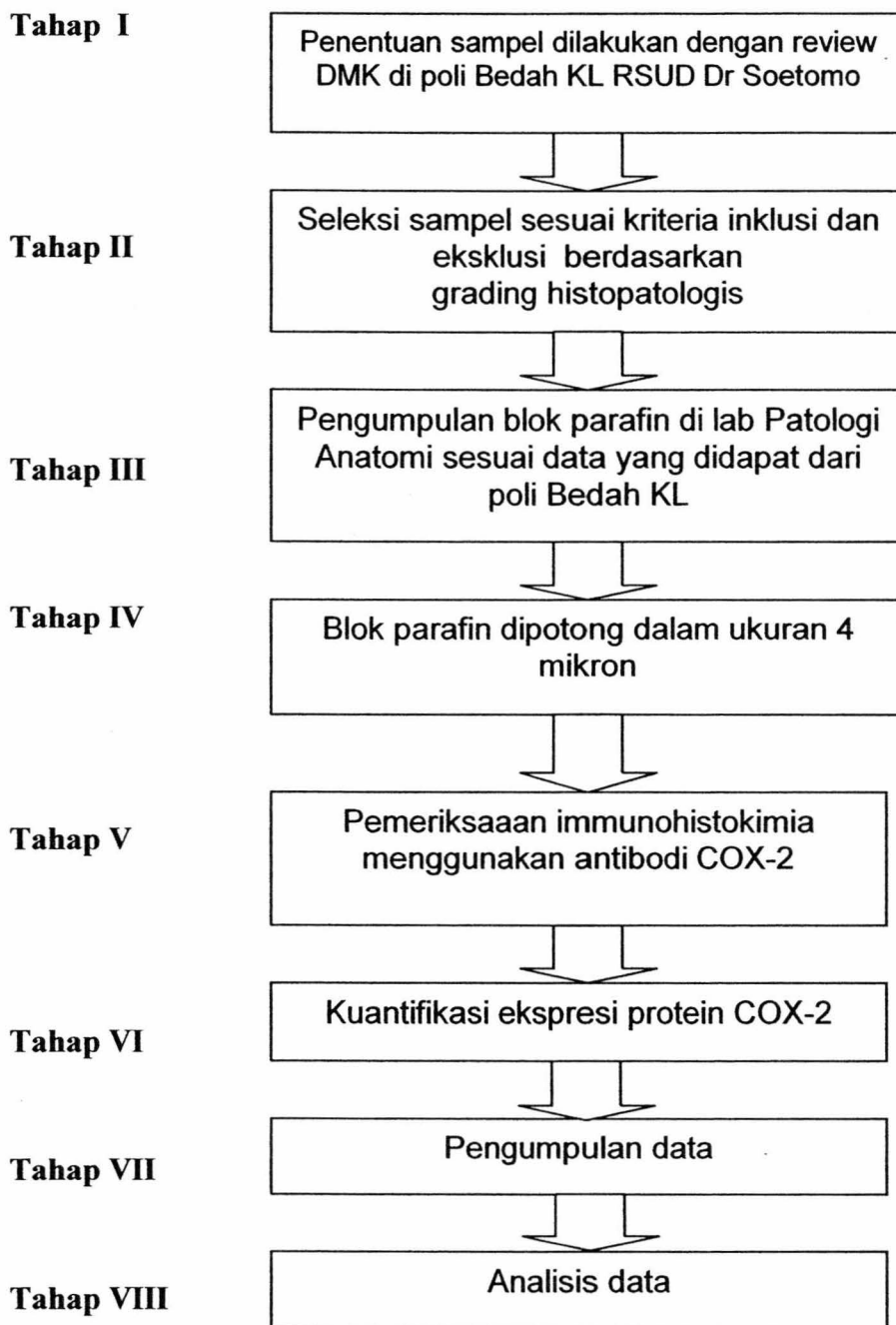
4.6.1 Lokasi

Dilakukan di poli Bedah Kepala Leher dan laboratorium Patologi Anatomi
RSUD Dr. Soetomo.

4.6.2 Waktu penelitian

Selama 3 bulan sejak pengumpulan sampel sampai analisa data.

4.7 Tahap Penelitian



4.8 Analisa Data

Untuk menganalisa korelasi ekspresi *COX-2* dengan *grading* histopatologis digunakan uji analisa *Spearman rank-order correlation*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Karakteristik penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher

DIFERENSIASI SEL									
		Well diff (n=10)		Moderately diff (n=9)		Undiff/poorly diff (n=11)		Total (n=30)	
1	Jenis kelamin								
	Laki-laki	8	80,0%	6	66,7%	7	63,6%	21	70,0%
	Perempuan	2	20,0%	3	33,3%	4	36,4%	9	30,0%
2	Umur (tahun)								
	30 – 39	-		2	22,2%	2	18,2%	4	13,3%
	40 – 49	3	30,0%	-		2	18,2%	5	16,7%
	50 – 59	5	50,0%	4	44,4%	1	9,1%	10	33,3%
	60 – 69	2	20,0%	-		5	45,5%	7	23,3%
	70 - 79	-		3	33,3%	1	9,1%	4	13,3%

Jenis kelamin terbanyak pada penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher yang menjadi subyek penelitian ini adalah laki-laki, sebanyak 21 orang (70%). Sebaran diferensiasi sel dari hasil pemeriksaan histopatologi hampir merata baik pada laki-laki maupun perempuan.

Umur penderita pada penelitian ini antara 30 tahun sampai dengan 78 tahun, dengan rata-rata 54 tahun. Kelompok yang terbanyak adalah pada umur 50-59 tahun (10 orang).

Tabel 2. Diagnosis klinis penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher

	Diagnosis klinis	Frekuensi	Prosentase (%)
1	Ca laring	8	26,7
2	Ca lidah	7	23,3
3	Ca kulit kepala	4	13,3
4	Ca palatum	3	10,0
5	Ca kavum nasi	2	6,7
6	Ca bukal	1	3,3
7	Ca gingiva	1	3,3
8	Ca mandibula	1	3,3
9	Ca orofaring	1	3,3
10	Ca parafaring	1	3,3
11	Ca maksila	1	3,3
	Total	30	100

Diagnosis klinis yang terbanyak pada penelitian ini adalah karsinoma laring (26,7%) dan karsinoma lidah (23,3%).

Tabel 3. Hubungan antara diferensiasi sel dengan intensitas ekspresi COX-2

Intensitas	Diferensiasi sel							
	Well diff		Moderately diff		Poorly diff / Undiff		Total	
0	2	20,0%	0		0		2	6,7%
1+	8	80,0%	1	11,1%	0		9	30,0%
2+	0		6	66,7%	3	27,3%	9	30,0%
3+	0		2	22,2%	8	72,7%	10	33,3%
Total	10	100,0%	9	100,0%	11	100,0%	30	100,0%

Pada penelitian ini, terdapat ekspresi COX-2 pada karsinoma sel skuamosa kepala leher sebanyak 28 penderita (93,3%). Sebanyak 2 penderita (6,7%) karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan diferensiasi sel baik (*well differentiated*) yang tidak memperlihatkan ekspresi COX-2 pada pemeriksaan imunohistokimia.

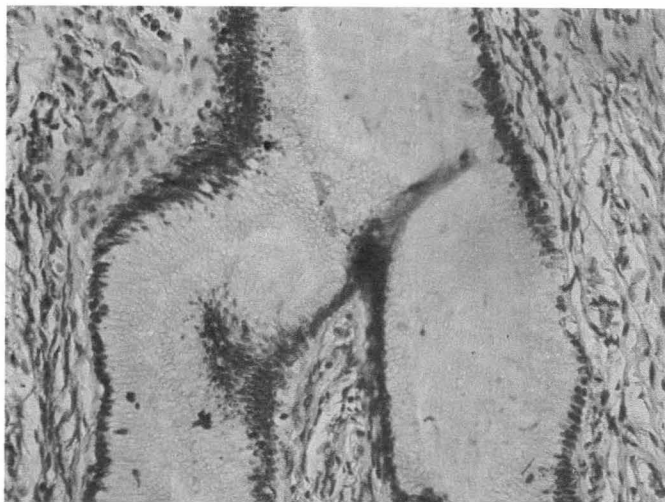
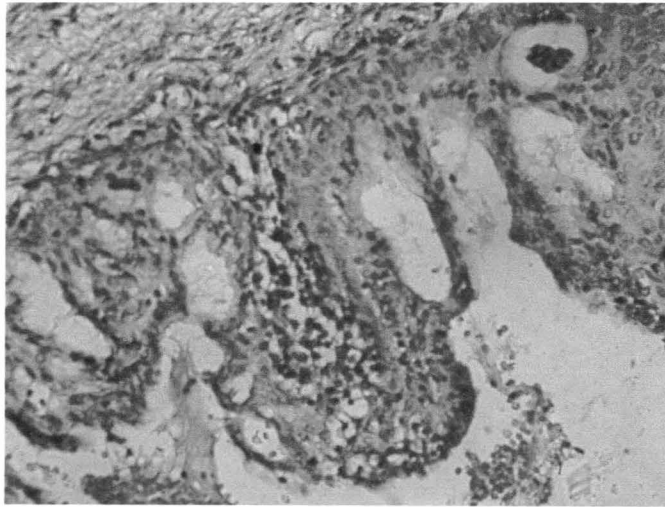
Pada karsinoma sel skuamosa kepala leher diferensiasi baik (*well differentiated*), intensitas ekspresi *COX-2* terbanyak 1+ (80.0%) dan tidak ditemukan yang intensitas ekspresi 2+ maupun 3+.

Pada karsinoma sel skuamosa kepala leher diferensiasi sedang (*moderately differentiated*) intensitas ekspresi *COX-2* terbanyak 2+ (66,7%).

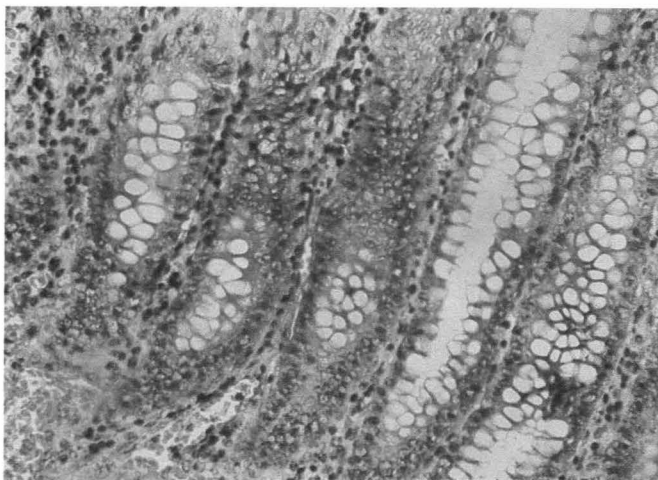
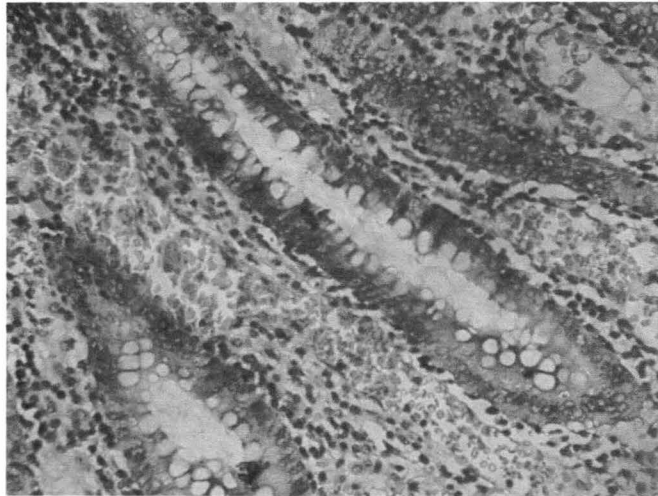
Pada karsinoma sel skuamosa kepala leher diferensiasi jelek (*poorly differentiated*) dan tidak berdiferensiasi (*undifferentiated*), intensitas ekspresi *COX-2* terbanyak 3+ (72,7%).

Hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil $p = 0,0001$ yang artinya ada korelasi yang bermakna antara derajat diferensiasi sel dengan intensitas ekspresi *COX-2*. Korelasi yang kuat tersebut ditunjukkan oleh koefisien korelasi *Spearman* sebesar 0,855 yang artinya makin jelek diferensiasi sel, makin kuat intensitas ekspresi *COX-2*.

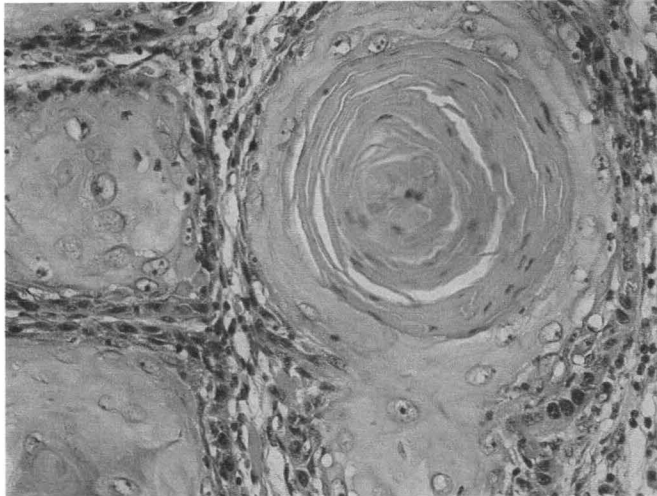
Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia *COX-2*



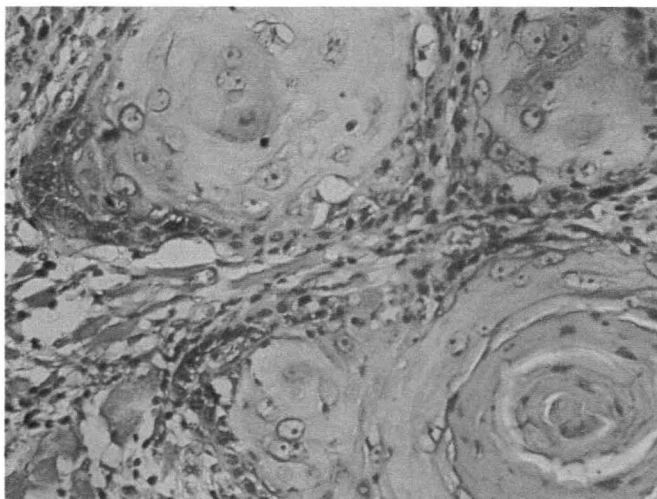
Gambar 1. Kontrol negatif. Epitel sel skuamosa serviks (Imunohistokimia, 400x)



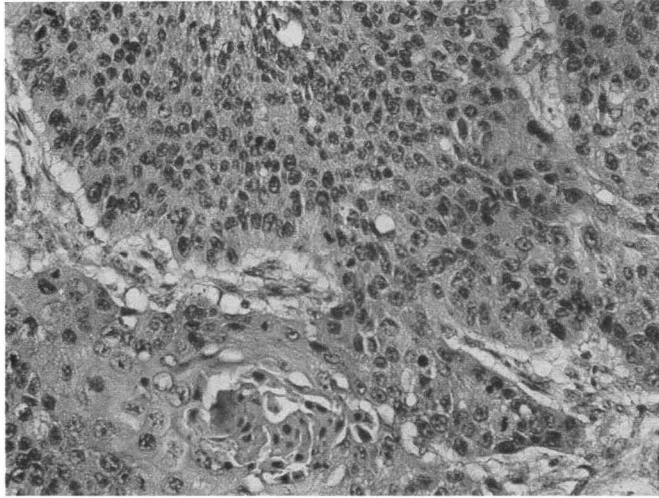
Gambar 2. Kontrol positif. Kolitis ulserativa. Ekspresi *COX-2* (3+) pada sitoplasma sel kelenjar mukosa kolon pada kolitis (Imunohistokimia, 400x)



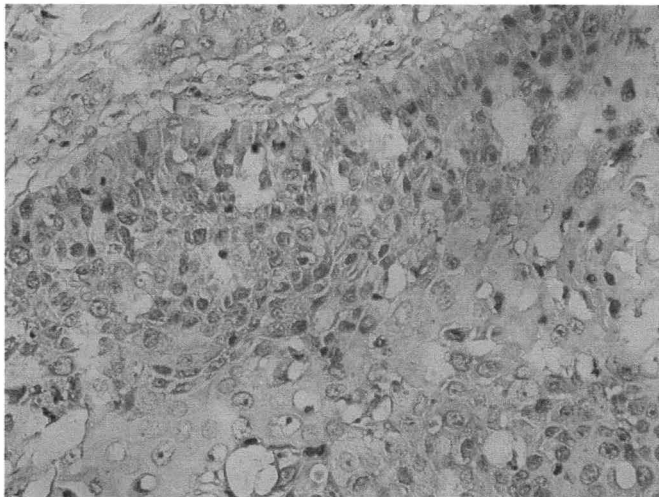
Gambar 3. Karsinoma sel skuamosa pada lidah. Well differentiated (HE, 400x)



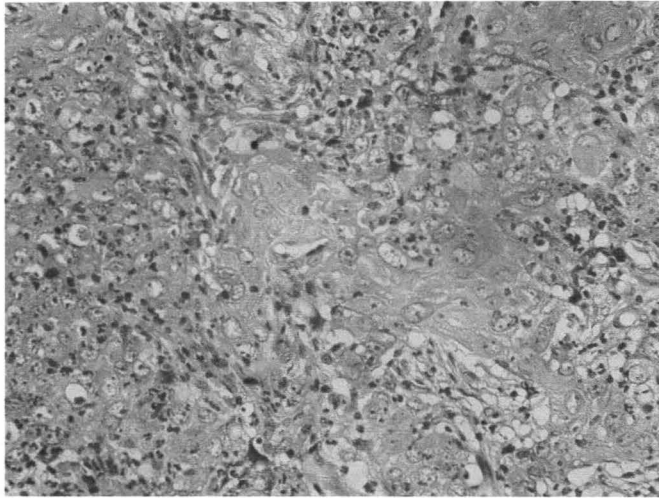
Gambar 4. Karsinoma lidah. Well differentiated. Ekspresi *COX-2* (1+)
(Imunohistokimia, 400x)



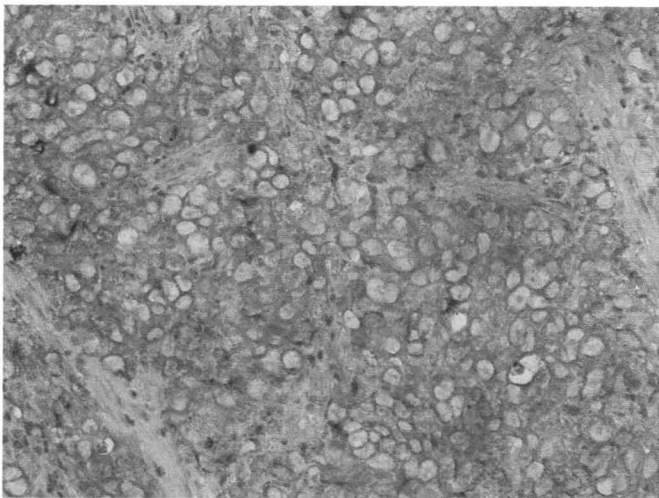
Gambar 5. Karsinoma laring. Moderately differentiated. (HE, 400x)



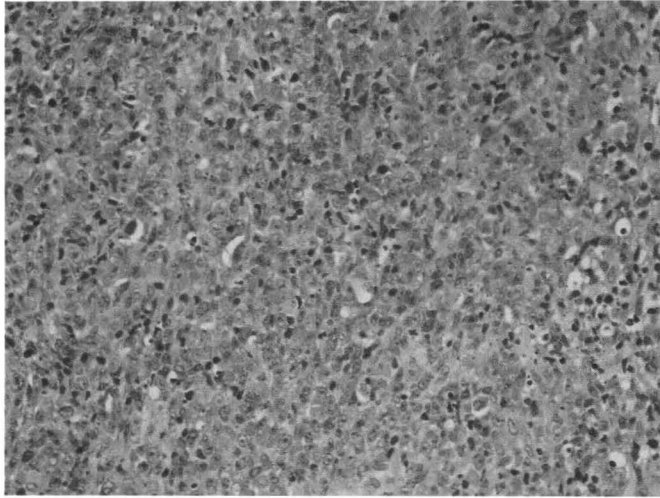
Gambar 6. Karsinoma laring. Moderately differentiated. Ekspresi *COX-2* (2+)
(Imunohistokimia, 400x)



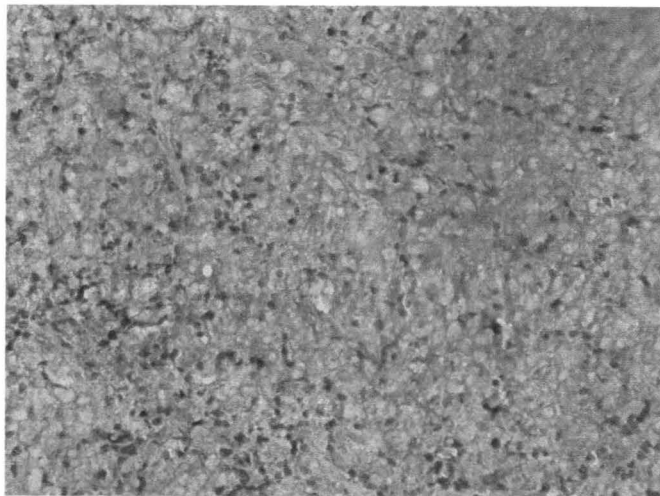
Gambar 7. Karsinoma kavum nasi. Poorly differentiated. (HE, 400x)



Gambar 8. Karsinoma kavum nasi. Poorly differentiated. Ekspresi *COX-2* (3+) (Imunohistokimia, 400x)



Gambar 9. Karsinoma palatum. Undifferentiated. (HE, 400x)



Gambar 10. Karsinoma palatum. Undifferentiated. Ekspresi *COX-2* (3+)
(Imunohistokimia, 400x)

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Gambaran umum hasil penelitian

Pada penelitian ini diperiksa 30 blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan berbagai derajat diferensiasi yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated* / *undifferentiated*, masing-masing sebanyak 10 (33,3%), 9 (30%), dan 11 (36,7%). Usia terbanyak yaitu kelompok rentang usia 50-59 tahun (33,3%) yang sesuai dengan kepustakaan bahwa insiden karsinoma sel skuamosa kepala leher lebih banyak pada usia 40 tahun ke atas.(Coleman, 1999; Watkinson, 2000).

Dari jenis kelamin, karsinoma sel skuamosa kepala leher didapatkan lebih banyak pada laki-laki (70%) dari pada wanita (30%) dan hal ini sesuai dengan kepustakaan bahwa laki-laki lebih banyak menderita keganasan di kepala leher dibanding wanita.(Coleman, 1999, Watkinson, 2000).

Seluruh blok parafin diperiksa ekspresi *COX-2* dengan teknik imunohistokimia dan didapatkan hasil ekspresi positif sebanyak 28 (93,3%) dan ekspresi negatif sebanyak 2 (6,7%). Dari berbagai lokasi tumor di kepala leher, didapatkan yang terbanyak adalah karsinoma laring (26,7%) kemudian karsinoma lidah (23,3%). Lokasi tumor tidak mempengaruhi derajat intensitas ekspresi *COX-2*, karena dimanapun lokasi tumor di kepala leher dapat memperlihatkan ekspresi *COX-2* yang intensitasnya sesuai dengan *grading* histopatologisnya.

6.2 Korelasi antara ekspresi *cyclooxygenase-2 (COX-2)* dengan *grading* histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher.

Berdasarkan hasil pemeriksaan imunohistokimia, ekspresi *COX-2* secara semikuantitatif didapatkan ekspresi *COX-2* positif pada 28 (93,3%) dan ekspresi negatif pada 2 (6,7%) penderita. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, sebagaimana pada beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa peningkatan ekspresi *COX-2* mencapai 40%-80% pada sel neoplasma dan intensitas ekspresinya lebih kuat pada sel kanker dari pada sel bukan kanker.(Koki, 2002). Gallo mendapatkan peningkatan ekspresi *COX-2* pada 52 penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher yang diperiksanya dan hal ini berhubungan dengan peningkatan kadar prostaglandin E-2 (PgE-2), *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* serta vaskularisasi tumor. Peningkatan ekspresi *COX-2* dan vaskularisasi yang lebih tinggi membuat angka harapan hidup makin rendah.(Gallo, 2002)

Dari berbagai *grading* histopatologis didapatkan ekspresi *COX-2* pada *well differentiated* dengan intensitas 1+ sebesar 80%, *moderately differentiated* dengan intensitas 2+ sebesar 66,7%, dan *poorly differentiated/undifferentiated* dengan intensitas 3+ sebesar 72,7% dengan hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil $p=0,0001$ yang artinya terdapat korelasi yang bermakna antara derajat diferensiasi sel dengan intensitas ekspresi *COX-2*. Korelasi yang kuat ditunjukkan dengan koefisien korelasi sebesar 0,855 yang artinya makin jelek diferensiasi sel, makin kuat intensitas ekspresi *COX-2*. Peningkatan *cyclooxygenase-2 (COX-2)* didapatkan pada lesi

praganas maupun sel ganas, termasuk leukoplakia oral dan karsinoma sel skuamosa kepala leher (Lin DT, et al,2002). Dan *COX-2* pada sel neoplasma berperan dalam meningkatkan pembelahan sel, menghambat apoptosis sel tumor, merubah adhesi sel, meningkatkan motilitas sel normal, menginduksi neovaskularisasi, menurunkan *immunosurveillance*, dan merangsang faktor proangiogenik seperti *VEGF*.(Koki, 2002; Moore, 2003)

6.3. Penggunaan obat penghambat *cyclooxygenase-2* (*COX-2 inhibitor*) pada keganasan.

Penelitian-penelitian epidemiologis menunjukkan bahwa pemakaian obat anti inflamasi non steroid (OAINS) jangka panjang mengurangi angka kejadian kanker. Hasil penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa penekanan resiko keganasan dengan penggunaan OAINS dapat dijumpai pada penyakit-penyakit keganasan dimana terdapat peningkatan ekspresi enzim *COX-2*. Dengan demikian tampak adanya kaitan data epidemiologik dengan ekspresi *COX-2* pada karsinoma di manusia. (Handono dkk, 2003)

Mengapa terjadi peningkatan ekspresi *COX-2* pada berbagai tumor ? Gen *COX-2* sendiri tampak tak mengalami mutasi selama karsinogenesis. Dengan demikian aktivasi onkogen atau inaktivasi anti-onkogen mungkin dapat meningkatkan ekspresi *COX-2* pada sel-sel yang berubah menjadi ganas, seperti yang telah ditunjukkan pada penelitian dengan kultur sel. Akan tetapi sampai sekarang masih belum jelas benar gen onkogen atau anti-onkogen mana yang bertanggung jawab untuk peningkatan ekspresi tersebut. Disamping regulasi ekspresi *COX-2* dalam sel sendiri,

sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan dapat merangsang ekspresi *COX-2* pada sel sel ganas melalui jalur autokrin ataupun parakrin (stromal). Pada kenyataannya, selama iritasi ataupun peradangan menahun, yang dapat mengarah pada pembentukan lesi praganas, adalah sisi stroma yang mengekspresikan *COX-2*, tapi ekspresi tersebut beralih dengan progresif pada sel epitel neoplastik pada saat lesi berkembang ke arah kanker yang invasif. (Handono dkk, 2003)

Hipotesis tumor- *COX-2* didukung lebih lanjut oleh penelitian-penelitian eksperimental dimana OAINS non spesifik, obat penghambat *COX-2* yang spesifik dan ketiadaan gen *COX-2* menekan pembentukan tumor pada berbagai hewan coba. Penelitian-penelitian tersebut juga menemukan bahwa disamping pada sel tumor, ekspresi *COX-2* dan atau *COX-1* pada sel stroma (sel jaringan penunjang, sel radang dan endotel vaskuler) dapat berperan pada pembentukan tumor. (Handono dkk, 2003). Oshima dkk, memperlihatkan bahwa dengan menghilangkan gen *COX-2* maka terjadi penurunan jumlah dan ukuran yang bermakna dari polip usus pada *familial adenomatous polyposis murine model*. (Chan G et al, 1998). Masih belum diketahui benar apakah *COX-2* berperan pada karsinogenesis dengan menekan asam arakidonat yang berlebihan, dengan menghasilkan prostaglandin atau dengan memetabolisme bahan lain. Akan tetapi telah ditunjukkan bahwa banyak efek *COX-2* dapat diperantarai oleh prostaglandin, termasuk merangsang proliferasi (mungkin melalui hambatan apoptosis), merangsang produksi metaloproteinase, merangsang angiogenesis dan imunosupresi. Saat ini mulai dipikirkan mengenai pemanfaatan aktivasi atau ekspresi *COX-2* sebagai petanda adanya keganasan, petanda untuk keberhasilan terapi dan juga pemanfaatan obat penghambat *COX-2*

yang spesifik untuk pencegahan maupun bagian dari pengobatan terhadap beberapa penyakit keganasan.(Handono dkk, 2003)

Saat ini penggunaan *COX-2 inhibitor* pada penanganan tumor sedang berkembang. Pemakaian *COX-2 inhibitor*, Celecoxib dengan dosis 30 mg/kg/hari pada model tumor *xenograft* pada kornea *rodent* menunjukkan hasil penurunan prostaglandin E-2 (78%) dan menghambat angiogenesis (78,6%). Juga terdapat peningkatan apoptosis dan penurunan proliferasi neovaskularisasi stroma (65%).(Leahy KM et al, 2002). Sung MW, membandingkan pemakaian *COX-2 inhibitor* non selektif (Indometasin) dan selektif (NS-398) pada keganasan kepala leher. Hasilnya menunjukkan NS-398 lebih efektif meningkatkan jumlah sel dalam fase G0/G1 dan penurunan jumlah sel pada fase S. *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* menghambat pertumbuhan sel tumor dan menurunkan produksi Pg E-2.(Sung MW, 2001)

Penggunaan *COX-2 inhibitor* spesifik , NS-398 pada karsinoma nasofaring dapat menurunkan produksi *VEGF* yang merupakan faktor angiogenik yang poten terjadinya pertumbuhan tumor. NS-398 juga menghambat pembentukan sintesis Pg E-2 dan kemudian menghambat produksi faktor angiogenik. Pengobatan dengan *COX-2 inhibitor* juga menghambat pelepasan *Bcl-2* menginduksi apoptosis dari vaskularisasi sel tumor.(Moore, 2003; Murono, 2001).

Selective COX-2 inhibitors juga menghambat pertumbuhan dan metastasis tumor serta meningkatkan aktifitas anti kanker dari radioterapi maupun kemoterapi pada binatang percobaan. Obat-obat penghambat *COX-2* selektif (*selective COX-2*

inhibitor) antara lain: Etodolac, Meloxicam, Nabumeton, Nimesulide, Celecoxib, Rofecoxib, NS-398, SC-58125, L-743337.(Kulkarini, 2000)

6.4. Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia adalah salah satu prosedur pemeriksaan histopatologi yang didasarkan atas deteksi epitop seluler spesifik yang ada di permukaan antigen jaringan dengan menggunakan antibodi spesifik, misalnya untuk *COX-2* menggunakan antibodi monoklonal *NCL-COX-2*.

Jaringan dapat berasal dari *fresh tissue*, sediaan sitologi, dan jaringan yang telah difiksasi dalam blok parafin.(Munson, 2001)

Fiksasi atau pengawetan jaringan bertujuan untuk :(Mulyo dkk, 1997)

- Mempertahankan struktur dan komponen sel
- Menambah afinitas protoplasma terhadap perwarnaan
- Mempertahankan sel dari larutan hipotonis dan hipertonis

Syarat-syarat bahan fiksasi yang digunakan adalah : (Mulyo dkk, 1997)

- Mempertahankan sel dalam jaringan tanpa bereaksi dengan cairan fiksasi tersebut.
- Tidak melarutkan unsur yang terdapat dalam jaringan.
- Mempertahankan unsur-unsur tersebut pada tempat asalnya.
- Memelihara susunan morfologi sel yang mendekati keadaan hidup jaringan.
- Tidak bereaksi dengan pewarna yang akan dipakai.

Cairan fiksasi yang digunakan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr.Soetomo selama ini adalah larutan formalin buffer yang terdiri atas formaldehid 38-40%, air

suling, sodium hidrogen fosfat dan disodium hidrogen fosfat. Jaringan yang akan difiksasi menggunakan formalin harus sudah dilakukan fiksasi dalam larutan formalin maksimal 20 menit dari saat jaringan itu terangkat. Waktu optimum fiksasi menggunakan formalin adalah 12 sampai 24 jam dan tidak boleh lebih dari 48 jam.

Dalam proses fiksasi jaringan masih banyak faktor yang mempengaruhi kualitas dari fiksasi itu, meliputi : pH, suhu, daya tembus cairan fiksasi, volume cairan fiksasi, konsentrasi cairan fiksasi dan lamanya proses fiksasi. (Mulyo dkk, 1997)

Cara fiksasi jaringan dengan formalin sebelum dilakukan fiksasi menggunakan blok parafin juga dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo menggunakan formaldehid 38-40% dalam waktu tidak lebih dari 24 jam.

Fiksasi menggunakan formalin dapat mengakibatkan terjadinya perubahan kimia pada antigen yang ada dalam jaringan melalui mekanisme yang sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti. Perubahan kimia yang terjadi dinamakan *cross-link*. (Shi SR et al, 2002). Teknik antigen *retrieval* digunakan untuk mempertahankan formalin sebagai bahan fiksasi standar yang dapat menjaga morfologi sel yang berguna untuk keperluan pemeriksaan imunohistokimia nantinya. (Shi SR et al, 2002)

Blok parafin merupakan salah satu cara pengawetan jaringan dimana kita dapat memperoleh jaringan untuk bahan pemeriksaan histopatologi yang ukurannya lebih besar dalam waktu yang lebih lama dan antigen yang terkandung dalam jaringan dapat diselamatkan dan penyimpanannya relatif mudah. (Shi SR et al, 2002; Wayne, 2004)

Kerugian penyimpanan jaringan menggunakan blok parafin ialah terjadinya *cross-link* antara protein jaringan (antigen) dan formalin karena jaringan yang diperiksa telah difiksasi menggunakan formalin atau bahan *formaldehyde- solution* yang lain sebelum dilakukan fiksasi menggunakan blok parafin. *Cross-link* antigen ini mengakibatkan jaringan yang telah difiksasi nantinya akan mengalami perubahan morfologi maupun unsur-unsur kimia dalam antigen sehingga bila dilakukan pengecatan atau pemeriksaan imunohistokimia akan memberikan hasil yang kurang sempurna sehingga menimbulkan kesalahan dalam interpretasi hasil pemeriksaan.(Munson, 2001; Shi SR et al, 2002).

Terjadinya *cross-link* antara protein (antigen) dengan formalin bersifat ireversibel. Untuk mencegah terjadinya *cross-link* antigen pada jaringan yang sebelumnya difiksasi dengan formalin, maka digunakan teknik *antigen retrieval* yang dikenal dengan teknik *Antigen Retrieval Immunohistochemistry* (AR-IHC) yaitu metode pemanasan *microwaving* (pemanasan menggunakan suhu tinggi 120°C dalam *citrate buffer*) dan *pressure techniques* menggunakan *pressure cooker*. Cara ini dapat mencegah atau meminimalisasi terjadinya *cross-link* antigen jaringan dengan *hydrolisis cross-link* antara formalin dan antigen.(Munson, 2001; Shi SR et al, 2002; Wayne, 2004)

Beberapa antigen dalam jaringan juga akan mengalami kerusakan pada saat dilakukan fiksasi dengan menggunakan blok parafin. Untuk itu penggunaan cara *antigen retrieval* dan pemilihan antibodi yang tepat akan mendapatkan hasil intensitas pewarnaan/ pemeriksaan imunohistokimia yang sempurna sehingga dapat

mengurangi kesalahan saat pembacaan hasil pewarnaan/pemeriksaan imunohistokimia.(Shi SR et al, 2002)

Cara *Antigen Retrieval Immunohistochemistry* (AR-IHC) juga rutin dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo pada saat proses pemeriksaan imunohistokimia *COX-2* dari bahan jaringan yang difiksasi menggunakan blok parafin dan telah dibuat dalam bentuk sediaan *slide*. Cairan *retrieval* yang dipakai disini adalah cairan *retrieval* DAKO. *Slide* dimasukkan dalam cairan *retrieval* DAKO kemudian dimasukkan dalam *microwave* bertemperatur tinggi sampai mendidih, setelah itu dilakukan proses selanjutnya yaitu pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi *NCL-COX-2* menggunakan metode *Labelled Streptavidin Biotin*.

Hal-hal penting yang perlu diperhatikan dalam standarisasi pemeriksaan imunohistokimia meliputi antibodi dan reagen yang digunakan, prosedur teknik pemeriksaan dan interpretasi hasil pewarnaan oleh pemeriksa. Teknik antigen *retrieval* adalah cara yang digunakan untuk mencapai standarisasi pemeriksaan imunohistokimia pada bahan fiksasi blok parafin.(Shi SR et al, 2002)

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

- Ekspresi *cyclooxygenase-2* (*COX-2*) didapatkan pada karsinoma sel skuamosa kepala leher.
- Ada korelasi antara ekspresi *cyclooxygenase-2* (*COX-2*) dengan *grading* histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher. Makin jelek derajat diferensiasi sel, makin kuat intensitas ekspresi *COX-2*.

SARAN

- Karena didapatkan adanya ekspresi *COX-2* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, maka dapat dianjurkan penggunaan obat penghambat *COX-2* (*COX-2 selective inhibitor*) sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan ini.
- Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut mengenai obat penghambat *COX-2* terhadap pengaruhnya pada pertumbuhan karsinoma sel skuamosa kepala leher.
- Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang ekspresi *COX-2* pada berbagai jenis keganasan lainnya seperti pada keganasan esofagus, tiroid, lambung, kolorektal, payudara, prostat dll.

KEPUSTAKAAN

- Ashfaq R. Cyclooxygenase-2. Onco diagnostic laboratory. Available on URL: <http://www.oncodx.com/markers/cox2.htm>. Feb 13, 2003.
- Alsegaff. Role of immunohistochemistry. In: The diagnosis of tumor pathology, modern pathology for service and research on cancer. Dutch Foundation for Graduate Courses in Indonesia, Airlangga University School of Medicine Dr. Soetomo Hospital. Surabaya, 1998.
- Beenken SW, Urist MM. Head and neck tumors. In: Way LW, Doherty GM (eds). Current surgical diagnosis & treatment. 11th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2003.p.282-97.
- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. Available on URL: <http://www.cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/59/5/991>. Jan 1, 1998.
- Coleman JJ, Sultan MR. Tumors of the head and neck. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, et al (eds). Principles of surgery. 7th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1999.p.606-645.
- de Almeida EMP, Piche C, Sirois J, Dore M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinoma in dogs. J Histochem Cytochem. 2001;49:867-75.
- Desai P. Immunohistochemical techniques for tissue staining. In: 2nd Course on immunology. Yogyakarta, 2000.

- Elise C, Jaeckel, Raja S, Tan J, Das SK, Dey SK, Giroid DA, Tsue TT, Sanford TR. Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127: 1253-59.
- Espat J, Carew JF, Shah JP. Cancers of the head and neck. In: Bland KI, Daly JM, Karakousis CP (eds). *Surgical oncology contemporary principles & practice.* New York: Mc Graw-Hill; 2003.p.519-44.
- Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Pathol.* 2002 ;33:708-14.
- Gallo O, Schiavone N, Papucci L, Sardi I, Magnelli L, Franchi A, Masini E, Capaccioli. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.*2003; 163:723-32.
- Gotlieb D. Non steroidal anti-inflammatory drugs. A physician guideline. Available on URL: <http://www.dr.doc./htm>. Oct 2001.
- Handono K, Kalim H . Pemanfaatan penghambat COX-2 yang spesifik untuk indikasi baru. COXIB Symposium NSAID on pain management, Focus on COX-2 spesific inhibitors. Surabaya, 2003.
- Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib: A specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control.* 2002; 9. 28-33.
- Kulkarni SK, Jain NK, Singh A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol. Prou Science,* 2000;22:291-98.

- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.*2002 Feb 1;62(3): 625-31.
- Leong A. *Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist*. Britain: Edward Arnold, 1993; 1-23.
- Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head and neck* 2002 ;24:792-9.
- Martoprawiro SS. *Prinsip-prinsip Immunomikroskopik. Kursus Teknik Immunohistokimia*. Surabaya , 1990.
- Mestre JR, Chan G, Zhang F, Yang EK, Sacks PG, Boyle JO, Shah JP, Edelstein D, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. Available on URL: <http://www.annalsnyas.org..Dec 2, 2002>.
- Moore BC, Simmons DL. COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Available on URL: <http://www.bentham.org/cmc-sample/simmons/simmons.htm.Feb 14, 2003>.
- Mulyo EH, Listyorini L. *Panduan teknik histopatologi Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr.Soetomo/ FK UNAIR .Surabaya, 1997*.
- Munson P. *Immunohistochemistry short course 2001 Introductory workshop 8th, June 2001*. Available on URL: <http://www.university of westminstr.shtml.August 28th, 2004>.

- Murono S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukuwa M, Pagano JS. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. In: Roizman E ,ed. Proc Natl Acad Sci USA. Vol.98, Issue 12. Chicago, 2001.
- Purnomo. Dasar molekuler karsinogenesis. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Jakarta: CV. Indomedika; 2000. p.102-20.
- Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M . Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. Clin Cancer Res. 2000; 6 : 1229-38.
- Shi SR, Cote JR, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. J Histochem and Cytochem. 2002;45:327-44.
- Sukardja, IDG. Terapi kanker payudara lanjut. seminar onkologi CIBA. Jakarta, 1996.
- Sung MW. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human head and neck cancers and growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Available on URL: <http://www.webmaster@cancernet.snu.ac.kr>. August, 2001..
- Tan LK, Loh WS. Cyclooxygenase-2 over-expression found in nasopharyngeal carcinoma. Available on URL: <http://www.pslgroup.com/dg/21EB22.htm>. September 25, 2002.
- Understanding angiogenesis-science. Available on URL <http://www.press2.nci.gov/science.behind/angiogenesis/angio.01.htm>. Feb 14, 2003.
- Vaughan CW. Pathology: Squamous cell carcinoma. Available on URL <http://www.emedicine.com/ent/topic671.htm>. August 19, 2004.

- Watkinson JC, Gaze MN, Wilson JA. The nature of head and neck cancer. In: Maran AGD, Stell PM (eds). Head & neck surgery. 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000.pp.1-9.
- Watkinson JC, Gaze MN, Wilson JA. Assessment. In: Maran AGD, Stell PM (eds). Head & neck surgery. 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000.pp11-28.
- Wayne S. Paraffin or frozen section for immunohistochemistry. Available on URL: <http://www.publish.uwo.ca/jkjernan/faglist.htm#parfo>. Sept 4th, 2004.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. Cancer Res.1999;59:190-204.

Lampiran 1

TEKNIK PEWARNAAN HEMATOKSILIN EOSIN CARA MEYER

- Sediaan dicelup dalam larutan silol bak I selama 5 menit
- Pindahkan dalam larutan silol bak II selama 5 menit dan ke dalam larutan silol bak III, selama 5 menit
- Masukkan dalam alkohol 96% bak I dan II masing-masing 2 menit, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 menit
- Cuci dalam air mengalir selama \pm 10 menit
- Masukkan dalam larutan meyer hematoksilin selama 15 menit
- Cuci kembali dengan air mengalir selama 20 menit
- Dimasukkan bak eosin 1% selama 1 menit
- Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 2 menit kemudian alkohol 90% bak II dan III masing-masing 2 menit
- Terakhir dimasukkan dalam silol bak I, II, dan III masing-masing 5 menit
- Ditunggalkan dengan entelan dan *cover glass*

(Prosedur Tetap Pembuatan Histopatologi Instalasi Patologi Anatomi FK Unair, Surabaya, 1997)

Lampiran 2

**TEKNIK PULASAN IMUNOHISTOKIMIA DENGAN ANTIBODI NCL-COX-2
DARI SEDIAAN BLOK PARAFIN.**

1. Blok parafin dipotong setebal 4 mikron dan ditempelkan pada *polylysine coated-slides*.
2. Dilakukan deparafinisasi, dengan silol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit.
3. Dilakukan rehidrasi dengan: alkohol absolut 100% selama 5 menit, alkohol 95% selama 5 menit, alkohol 80% selama 5 menit.
4. Cuci dengan *aquadest* selama 10 menit.
5. Sediaan dimasukkan ke dalam *hydrogen peroxide/methanol* 0,5% selama 10 menit.
6. Cuci dengan *aquadest*
7. Masukkan *slide* dalam larutan antigen *retrieval* (1500 ml 0,01M *citrate buffer* pH6), kemudian masukkan ke dalam *microwave* dengan temperatur tinggi (*high*) sampai mendidih lalu dengan temperatur *medium high*, selama 10 menit.
8. Cuci dengan *aquadest*
9. Cuci dengan larutan *TBS buffer* (pH7,6) selama 5 menit
10. Inkubasi dengan *diluted normal serum* selama 10 menit.
11. Inkubasi dengan antibodi primer NCL-COX-2 *mouse monoclonal antibody* (Novo castra, Newcastle upon Tyne, UK) selama satu malam.
12. Cuci dengan *TBS* selama 2 x 5 menit.

13. Inkubasi dengan *biotinylated secondary antibody (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent*, Neomarker, Lab. Vision Corporation) selama 10 menit.
14. Cuci dengan *TBS* 2 x 5 menit
15. Inkubasi dengan *Streptavidin Peroxidase* (Neomarker, Lab. Vision Corporation) selama 10 menit
16. Cuci dengan *TBS* 2 x 5 menit
17. Inkubasi dengan larutan *chromogen*: DAB selama 10 menit.
18. Cuci dengan air mengalir.
19. *Counter stain* dengan hematoksilin selama 2 menit
20. Cuci dengan air mengalir dan direndam sampai berwarna biru.
21. *Mounting* dengan entelan.

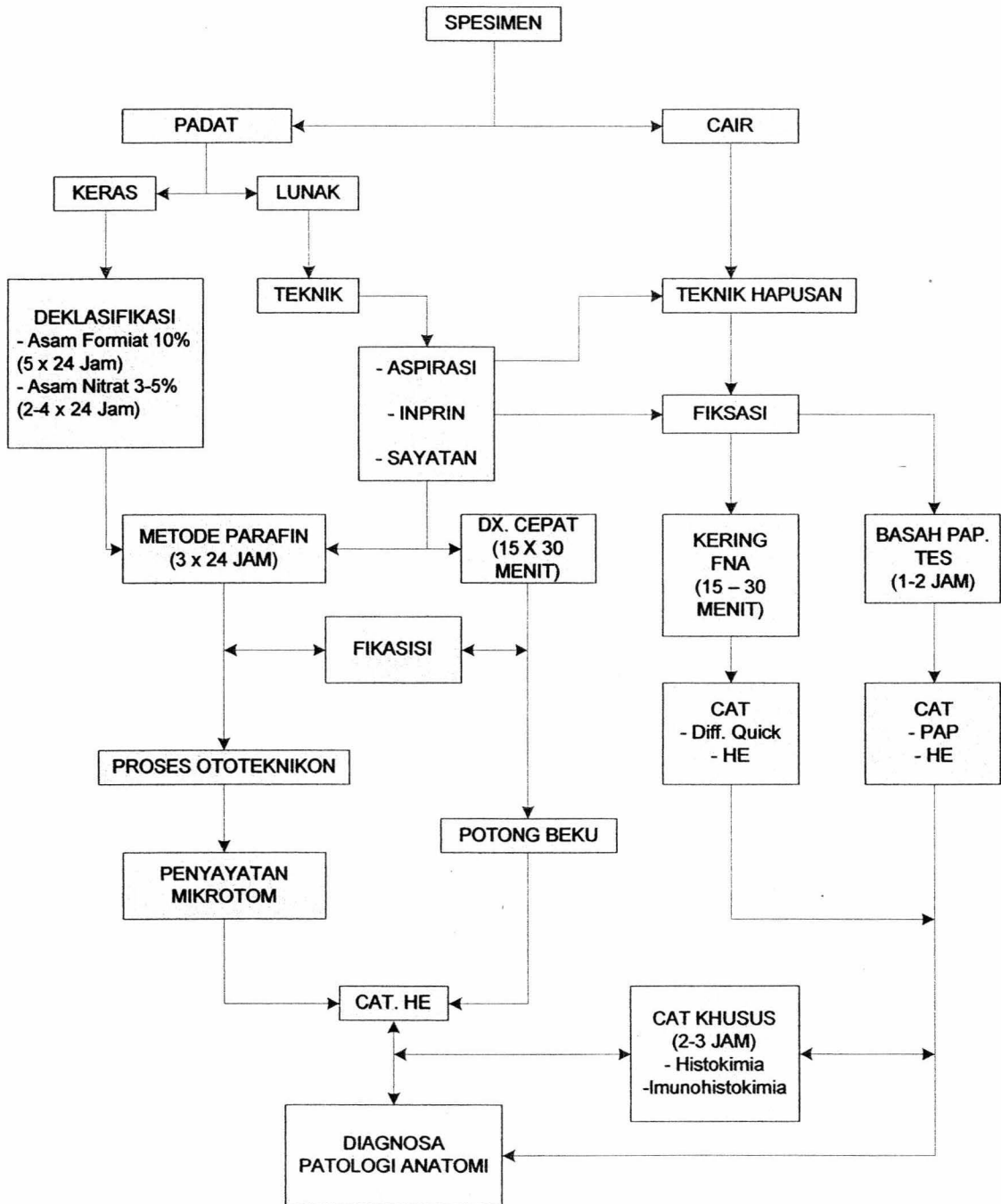
CARA MENGHITUNG JUMLAH SEL YANG TERCAT POSITIF PADA PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA EKSPRESI *COX-2*

1. Ambil *slide* hasil pengecatan hematoksin-eosin dan imunohistokimia *COX-2* pada masing-masing sampel penelitian.
2. Melihat derajat diferensiasi pada *slide* pengecatan hematoksin-eosin.
3. Melihat hasil pengecatan imunohistokimia *COX-2* yang terekspresi positif pada pembesaran mikroskop 100 x, 400 x, baik pada *slide* kontrol positif (kolitis ulseratifa atau penyakit *Chron*) maupun kontrol negatif (serviks normal).
4. Melihat intensitas ekspresi *COX-2* pada kontrol positif, kontrol negatif dan masing-masing derajat diferensiasi sel yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated* dan *poorly differentiated/undifferentiated*.
5. Intensitas yang terkuat pada kontrol positif sebagai indikator, memberikan warna coklat (3+), intensitas sedang memberikan warna kuning kecoklatan (2+), intensitas lemah memberikan warna kekuningan atau coklat muda (1+), dan tanpa ekspresi (0).
6. Menghitung jumlah 100 sel yang tercat positif pada satu lapangan pandang besar dengan pembesaran 400 x dengan menggunakan kamar hitung. Misalnya pada satu kamar hitung terdapat 10 sel yang tercat positif, maka untuk mendapatkan 100 sel, kita menghitung pada 10 kamar hitung. Lalu dihitung lagi pada 2 lapangan besar lainnya seperti di atas dan dirata-ratakan agar mendapatkan hasil yang lebih akurat dan ditetapkan dalam prosentase.

7. Bila pada satu lapangan pandang besar didapatkan berbagai intensitas ekspresi misalnya terdapat yang tanpa ekspresi, lemah, sedang dan kuat, maka kita menghitung berapa sel pada masing- masing intensitas yang tercatat positif pada masing-masing kamar hitung kemudian di *skoring* untuk mengetahui berapa persen jumlah yang tercatat positif. Contoh, satu *slide* memberikan ekspresi 25% sel tumor dengan intensitas kuat ($1 \times 3+ = 3+$), 25% intensitas lemah ($1 \times 1+ = 1$), dan 50 % tanpa ekspresi (0), maka skornya adalah $3+1+0 = 4$. Lalu kita melihat pada skala prosentase tumor positif dan dinilai secara semikuantitatif dengan skor 0 (0-4%), 1 (5-24%), 2 (25-49%), 3 (50-74%), 4 (75-100%). Jadi bila didapatkan skor 4 seperti contoh di atas, maka disimpulkan 75-100% sel yang tercatat positif dan diambil intensitas yang dominan.

Lampiran 3

PROGRAM TETAP PEMERIKSAAN
 INSTALASI / LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI
 RSUD DR. SOETOMO /FK UNAIR
 SURABAYA



REKAPITULASI DATA PENDERITA
HASIL PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA EKSPRESI COX-2 PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA LEHER

No	No DMK	Nama	Sex	Umur (thn)	No PA	Diagnosa	Diferensiasi sel	Intensitas eksp COX-2	% sel tercat positif	Skor
1	10426578	Suroso	L	54	T 120/05	Ca buccal	Well diff	0	0	0
2	10431492	Pariadi	L	53	T 132/05	Ca lidah	Well diff	1+	25%	2
3	10434599	Misdi	L	54	T 290/05	Ca gingiva	Well diff	0	0	0
4	10454000	Moh.Dalila	L	41	T 1149/05	Ca lidah	Well diff	1+	10%	1
5	10474241	Sapuan	L	50	T 2252/05	Ca kulit kepala	Well diff	1+	40%	2
6	10328033	Sudarmo	L	55	T 175/04	Ca laring	Well diff	1+	90%	4
7	...	Syamsuladin	L	41	T 1892/04	Ca lidah	Well diff	1+	60%	3
8	...	Azaini	L	68	T 2253/04	Ca laring	Well diff	1+	15%	1
9	10373105	Siem	P	60	T 2795/04	Ca lidah	Well diff	1+	10%	1
10	10433794	Mariyati	P	45	T 5528/04	Ca lidah	Well diff	1+	10%	1
11	10442327	Wagiran	L	70	T 583/05	Ca laring	Moderate diff	3+	95%	4
12	10459361	H.Naima	P	57	T 1219/05	Ca cav nasi	Moderate diff	2+	50%	3
13	10463834	Abd.Tasik	L	50	T 1597/05	Ca kulit kepala	Moderate diff	2+	75%	4
14	10377255	Suraji	L	37	T 2938/04	Ca laring	Moderate diff	2+	50%	3
15	10334036	Naji	L	70	T 1053/04	Ca laring	Moderate diff	3+	85%	4
16	10350682	Supiati	P	30	T 1551/04	Ca buccal	Moderate diff	2+	55%	3
17	10373306	Jusach M	L	56	T 2764/04	Ca laring	Moderate diff	2+	50%	3
18	10237029	Fatma S	P	58	T 2771/04	Ca lidah	Moderate diff	2+	50%	3
19	10335523	Siaman	L	78	T 457/04	Ca laring	Moderate diff	1+	5%	1
20	10278942	Markumah	P	67	T 1201/05	Ca palatum	Undiff	3+	95%	4
21	10358296	Chanim	L	54	T 2320/04	Ca palatum	Undiff	3+	95%	4
22	10369409	Rasiyam	L	60	T 2572/04	Ca palatum	Undiff	2+	60%	3
23	10378972	St Muosamah	P	33	T 3092/04	Ca mandibula	Undiff	3+	80%	4
24	10387518	Sumiati	P	42	T 3247/04	Ca orofaring	Undiff	3+	85%	4
25	10380157	Kasiyam	P	48	T 3763/04	Ca parafaring	Undiff	3+	95%	4
26	10440023	Sulaiman D	L	71	T 337/05	Ca laring	Poorly diff	3+	95%	4
27	10343109	Sakeh	L	60	T 1325/04	Ca maksila	Poorly diff	2+	20%	1
28	413438	Arman P	L	60	T 1642/04	Ca kulit kepala	Poorly diff	2+	30%	2
29	10371586	Sumaryam	L	67	T 2718/04	Ca kulit kepala	Poorly diff	3+	80%	4
30	10387518	Chotib	L	30	T 3334/04	Ca cav nasi	Poorly diff	3+	85%	4

Keterangan : Intensitas ekspresi COX-2 : 0 = negatif, 1+=lemah, 2+=sedang, 3+=kuat

Skoring skala % tumor tercat positif secara semi kuantitatif : 0 (0%-4%), 1 (5%-24%), 2 (25%-49%), 3 (50%-74%), 4 (75%-100%)

HASIL ANALISIS STATISTIK

Sex

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Laki-laki	21	70.0	70.0	70.0
	Perempuan	9	30.0	30.0	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
UMUR	30	30.00	78.00	53.9667	12.5931
Valid N (listwise)	30				

Diferensiasi sel

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Well diff	10	33.3	33.3	33.3
	Moderately diff	9	30.0	30.0	63.3
	undiff/poorly diff	11	36.7	36.7	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Diagnosis

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ca buccal	1	3.3	3.3	3.3
	Ca lidah	7	23.3	23.3	26.7
	Ca ginggiva	1	3.3	3.3	30.0
	Ca kulit kepala	4	13.3	13.3	43.3
	Ca laring	8	26.7	26.7	70.0
	Ca cavum nasi	2	6.7	6.7	76.7
	Ca palatum	3	10.0	10.0	86.7
	Ca mandibula	1	3.3	3.3	90.0
	Ca orofaring	1	3.3	3.3	93.3
	Ca parafaring	1	3.3	3.3	96.7
	Ca maksila	1	3.3	3.3	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Intensitas COX-2

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	0	2	6.7	6.7	6.7
	1+	9	30.0	30.0	36.7
	2+	9	30.0	30.0	66.7
	3+	10	33.3	33.3	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

SKOR

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid .00	2	6.7	6.7	6.7
1.00	6	20.0	20.0	26.7
2.00	3	10.0	10.0	36.7
3.00	7	23.3	23.3	60.0
4.00	12	40.0	40.0	100.0
Total	30	100.0	100.0	

Intensitas COX-2 * Diferensiasi sel Crosstabulation

		Diferensiasi sel			Total	
		Well diff	Moderately diff	undiff/poorly diff		
Intensitas COX-2	0	Count	2		2	
		% within Diferensiasi sel	20.0%		6.7%	
	1+	Count	8	1	9	
		% within Diferensiasi sel	80.0%	11.1%	30.0%	
	2+	Count		6	3	9
		% within Diferensiasi sel		66.7%	27.3%	30.0%
	3+	Count		2	8	10
		% within Diferensiasi sel		22.2%	72.7%	33.3%
Total	Count	10	9	11	30	
	% within Diferensiasi sel	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Correlations

		Diferensiasi sel	Intensitas COX-2
Spearman's rho	Diferensiasi sel	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	30
Intensitas COX-2	Diferensiasi sel	Correlation Coefficient	.855**
		Sig. (2-tailed)	.000
		N	30
UMUR	Diferensiasi sel	Correlation Coefficient	.130
		Sig. (2-tailed)	.495
		N	30

** Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Sex * Diferensiasi sel Crosstabulation

		Diferensiasi sel			Total	
		Well diff	Moderately diff	undiff/poorly diff		
Sex	Laki-laki	Count	8	6	7	21
		% within Diferensiasi sel	80.0%	66.7%	63.6%	70.0%
Perempuan	Count	2	3	4	9	
	% within Diferensiasi sel	20.0%	33.3%	36.4%	30.0%	
Total	Count	10	9	11	30	
	% within Diferensiasi sel	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Descriptives

UMUR

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Well diff	10	52.1000	8.3858	41.00	68.00
Moderately diff	9	56.2222	15.6267	30.00	78.00
undiff/poorly diff	11	53.8182	13.8983	30.00	71.00
Total	30	53.9667	12.5931	30.00	78.00

Umur * Diferensiasi sel Crosstabulation

		Diferensiasi sel			Total
		Well diff	Moderately diff	undiff/poorly diff	
Umur 30-39	Count		2	2	4
	% within Diferensiasi sel		22.2%	18.2%	13.3%
40-49	Count	3		2	5
	% within Diferensiasi sel	30.0%		18.2%	16.7%
50-59	Count	5	4	1	10
	% within Diferensiasi sel	50.0%	44.4%	9.1%	33.3%
60-69	Count	2		5	7
	% within Diferensiasi sel	20.0%		45.5%	23.3%
70-79	Count		3	1	4
	% within Diferensiasi sel		33.3%	9.1%	13.3%
Total	Count	10	9	11	30
	% within Diferensiasi sel	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Umur * Intensitas COX-2 Crosstabulation

		Intensitas COX-2				Total
		0	1+	2+	3+	
Umur 30-39	Count			2	2	4
	% within Intensitas COX-2			22.2%	20.0%	13.3%
40-49	Count		3		2	5
	% within Intensitas COX-2		33.3%		20.0%	16.7%
50-59	Count	2	3	4	1	10
	% within Intensitas COX-2	100.0%	33.3%	44.4%	10.0%	33.3%
60-69	Count		2	3	2	7
	% within Intensitas COX-2		22.2%	33.3%	20.0%	23.3%
70-79	Count		1		3	4
	% within Intensitas COX-2		11.1%		30.0%	13.3%
Total	Count	2	9	9	10	30
	% within Intensitas COX-2	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%



Data Sheet

Cyclooxygenase-2

mouse monoclonal antibody

NCL-COX-2

Intended Use	FOR RESEARCH USE ONLY.
Specificity	Human cyclooxygenase-2 (prostaglandin-endoperoxide synthase-2).
Clone	4H12
Ig Class	IgG1, kappa
Antigen used for immunisations	Prokaryotic recombinant protein corresponding to amino acids 38 to 163 of the N-terminal domain of the human cyclooxygenase-2 molecule.
Hybridoma partner	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
Preparation	Lymphilised tissue culture supernatant containing 15mM sodium azide. Reconstitute with 1ml or 0.1ml of sterile distilled water as indicated on vial label.
Effective on frozen tissue	Not fully evaluated.
Effective on paraffin wax embedded tissue	Yes (using the high temperature antigen unmasking technique: see overleaf).
Recommendations on use	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:50 - 1:100 High temperature antigen unmasking technique. 60 minutes primary antibody incubation at 25°C. Standard ABC technique. Western Blotting: Not recommended.
Positive Controls	Immunohistochemistry - Ulcerative colitis.
Staining pattern	Cytoplasmic
Storage and stability	Store unopened lyophilised antibody at 4°C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4°C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20°C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.

General Overview

Cyclooxygenase-2 is a mitogen-inducible form of cyclooxygenase (prostaglandin-endoperoxide synthase) which is expressed in response to various inflammatory stimuli, including UV radiation and by T cell receptor triggering in peripheral blood. It is an inducer of angiogenesis and plays a role in normal keratinocyte differentiation. Immunohistochemical staining for cyclooxygenase-2 increases in the more differentiated, suprabasal keratinocytes of normal skin.

General References

- van Roes B P, Saukkonen K, Ristimäki A, *et al.*. *Journal of Pathology*. 196: 171-179 (2002).
 Kömhoff M, Guan Y, Shappell H W, *et al.*. *American Journal of Pathology*. 157 (1): 29-35 (2000).
 Isoharranen K, Punnonen K, Jansen C, *et al.*. *British Journal of Dermatology*. 140 (6): 1017-1022 (1999).
 Pablos J L, Santiago B, Carreira P E, *et al.*. *Clinical Experimental Immunology*. 115 (1): 86-90 (1999).
 Zimmermann K C, Sarbia M, Weber A A, *et al.*. *Cancer Research*. 59 (1): 198-204 (1999).
 Khan K N, Venturini C M, Bunch R T, *et al.*. *Toxicol. Pathol.* 26 (5): 612-620 (1998).
 Singer I I, Kawka D W, Schoemann S, *et al.*. *Gastroenterology*. 115 (2): 297-306 (1998).
 Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N, *et al.*. *Experimental Cell Research*. 224 (1): 79-87 (1998).

Novocastra Laboratories Ltd

Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, United Kingdom
 Telephone: +44 (0) 191 215 0567 Facsimile: +44 (0) 191 215 1152

Copyright © 2002 Novocastra Laboratories Ltd. All rights reserved. Type NCL-COX-2. Registered No. 7111383 (England and Wales)