

CARLINOMA

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

**KORELASI EKSPRESI CYCLIN D1 DENGAN GRADING HISTOPATOLOGI
KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA DAN LEHER**



PPDS.IB. 11/10

lrw
r



Oleh:

Humphrey Irwantono, dr.

Pembimbing:

Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr.SpB(K)Onk.

Willy Sandhika, dr.MSi, SpPA

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-I
LABORATORIUM ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA / RUMAH SAKIT UMUM DR.SOETOMO
SURABAYA
2008**

LEMBAR PENGESAHAN

**KORELASI EKSPRESI *CYCLIN D1* DENGAN *GRADING* HISTOPATOLOGI
KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA DAN LEHER**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

Disetujui oleh :

Pembimbing I :



Prof. Dr. Sunarto Reksoprawiro, Sp.B(K)Onk.

Pembimbing II :







Dr. Willy Sandhika,MSi , Sp.PA

**KORELASI EKSPRESI *CYCLIN D1* DENGAN *GRADING* HISTOPATOLOGI
KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA DAN LEHER**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

Telah disetujui oleh
Panitia Penguji pada tanggal 18 Juni 2008
Sebagai persyaratan dalam Program Pendidikan Ilmu Bedah
FK Unair / RSU. Dr. Soetomo Surabaya

Tim penguji karya akhir

- | | |
|--|--|
| 1. Prof. Dr.Sunarto Reksoprawiro, Sp.B(K)Onk,
(Pembimbing I) | 1.  |
| 2. Dr. Willy Sandhika, MSi.SpPA
(Pembimbing II) | 2.  |
| 3. Dr. Heru Purwanto, MKes. SpB(K)Onk
(Biro Penelitian) | 3.  |
| 4. Dr.Yoga Wijayahadi, SpB(K)KL
(Divisi Bedah Kepala dan Leher) | 4.  |

Mengetahui

KPS Ilmu Bedah



(Dr.Yoga Wijayahadi, SpB(K)KL)

Korelasi Ekspresi *Cyclin D1* Dengan *Grading* Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala Dan Leher

Humphrey Irwantono*, Sunarto Reksoprawiro*, Willy Sandhika**

* Bagian Ilmu Bedah, FK Unair – RSU Dr. Soetomo, Surabaya

** Bagian Patologi Anatomi, FK Unair – RSU Dr. Soetomo, Surabaya

ABSTRAK

Latar Belakang:

Keganasan kepala leher merupakan keganasan yang keenam terbanyak pada semua kasus keganasan di dunia dengan insiden yang lebih banyak pada negara berkembang. Dari berbagai tipe histologik, karsinoma sel skuamosa merupakan keganasan yang terbanyak pada saluran aerodigestif bagian atas. *Grading* histopatologi adalah salah satu faktor prognostik pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Pada karsinoma sel skuamosa terjadi deregulasi *Cyclin D1*, hal tersebut menyebabkan perubahan memendeknya fase G1 sehingga terjadi percepatan pertumbuhan sel. Overekspresi *Cyclin D1* tidak hanya berhubungan dengan terjadinya rekurensi tetapi juga berhubungan dengan stadium kanker, metastase regional dan menurunkan angka *survival* secara keseluruhan.

Tujuan:

Mengetahui apakah peningkatan ekspresi *Cyclin D1* mempunyai korelasi dengan *grading* histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Bahan dan Metodologi:

Rancangan penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian adalah blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala dan leher yang tersimpan di laboratorium Patologi Anatomi RSU Dr. Soetomo selama tahun 2006-2007. Subyek penelitian tercatat dalam dokumen medis di rekam medis RSU Dr. Soetomo Surabaya. Tiga puluh blok parafin akan dicat dengan hematoksilin eosin dan diperiksa imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi *Cyclin D1* untuk melihat *grading* dan ekspresi *Cyclin D1*. Gradasi intensitas dan jumlah sel yang tercatat dinyatakan secara semikuantitatif. Hasil yang didapat dianalisis dengan uji korelasi *Spearman Rank-Order Correlation Test* dan koefisien kontingensi.

Hasil :

Dari 30 sampel karsinoma sel skuamosa kepala dan leher seluruhnya ekspresi *Cyclin D1* didapatkan pada seluruh sample dengan ekspresi dan intensitas imunostaining yang berbeda-beda. Dengan nilai *cut off* 5 % dari sampel yang diteliti menunjukkan ekspresi *Cyclin D1* yang positif sebesar 73,3%. Didapatkan 14(46,7%) sampel dengan *grading* histopatologis *well differentiated*, 7(23,3%) *moderately differentiated* dan 9 (30,0%) *poorly differentiated/ undifferentiated*. Skor ekspresi *Cyclin D1* terendah pada penelitian ini adalah 3 sebanyak dua (6,67%) sampel untuk *grading* histopatologis *well differentiated* dan skor tertinggi adalah 14 sebanyak satu (3,33%) sampel. Hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan ekspresi *Cyclin D1* mempunyai korelasi yang signifikan dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,84.

Kesimpulan:

Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi. Hal ini berarti bahwa semakin kuat intensitas ekspresi *Cyclin D1* maka semakin jelek derajat diferensiasi sel.

Kata kunci:

Karsinoma sel skuamosa Kepala dan Leher, *Cyclin D1*

Correlation Between Cyclin D1 Expression with Histopatological Grading of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Humphrey Irwantono*, Sunarto Reksoprawiro*, Willy Sandhika**

- * Dept. of Surgery, Faculty of Medicine Airlangga University - Dr. Soetomo Hospital Surabaya
- ** Dept. of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine Airlangga University – Dr. Soetomo Hospital Surabaya

ABSTRACT

Background:

Head and neck cancer was the sixth of all malignancies in worldwide, and mostly in the developing country. Squamous cell carcinoma was the most histopathological type that occurs in the upper aerodigestive tract. Histopathological grading is one of the prognostic factor of head and neck squamous cell carcinoma. Previous study had been reported that deregulation of Cyclin D1 could shorten G1 phase in cell cycle. Overexpression of Cyclin D1 can cause acceleration of cell growth. Overexpression of Cyclin D1 in head and neck squamous cell carcinoma not only related with recurrence but also with cancer staging, regional spreading and decrease overall survival rate.

Objective:

To find weather the increasing expressions of Cyclin D1 have correlation with histopathological grading of head and neck squamous cell carcinoma.

Method:

The design of this study is case control. The samples are paraffin blocks of head and neck squamous cell carcinoma patients stored in Department of Pathology Dr. Soetomo Hospital in the period of 2006-2007. Subject are documented from medical document in the medical record Dr. Soetomo Hospital Surabaya. Thirty paraffin blocks will be stained with haematoxyllin eosin and immunohistochemistry technique using monoclonal antibody Cyclin D1 to know the histopathological grading and Cyclin D1 expression. The grade of staining intensity and number of stained cell will be determined semiquantitatively respectively. The result will be analyzed statistically using Spearman Rank Order Correlation Test and Contingency Coeficient.

Result:

Cyclin D1 is expressed in all 30 samples of head and neck squamous cell carcinoma and with cut off point 5% only 73,3% samples have positive expression. Fourteen samples (46.7%) was well differentiated, 7(23.3%) moderately differentiated and 9 (30%) poorly or undifferentiated. The lowest score for expression Cyclin D1 was 3, found in 2 samples (6.67%) and stand for well differentiated. The highest score was 14 in one sample (3.3%) for undifferentiated carcinoma. The results were analyzed statistically using Spearman Rank

Order Correlation Test and there is a significant correlation between overexpression with histopathological grading of head and neck squamous cell carcinoma.

Conclusion :

There was a significant correlation between intensity of Cyclin D1 expression with histopathological grading that means the stronger expression of Cyclin d1 the poorer histopathological grading.

Keyword:

Head and neck squamous cell carcinoma, Cyclin D1.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan YME yang senantiasa melimpahkan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah akhir **Korelasi Ekspresi *Cyclin D1* dengan *Grading* Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan 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 ilmiah akhir ini secara garis besar berisi latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian dan manfaat penelitian. Dibahas juga secara singkat landasan teori yang berkaitan dengan ekspresi *Cyclin D1* pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Pada laporan ini juga dipaparkan tentang kerangka konseptual yang merupakan ringkasan dari konsep yang berhubungan dengan variabel-variabel yang diteliti beserta metodologi penelitiannya.

Saya menyadari bahwa dalam penulisan laporan karya tulis ilmiah akhir ini masih jauh dari sempurna, untuk itu dengan rendah hati saya mengharapkan kritik dan saran agar laporan karya tulis ilmiah akhir ini menjadi lebih baik dan lebih sempurna.

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

Dalam kesempatan ini, saya menyatakan rasa terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi ilmu bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi ilmu bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
3. Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya sehingga dapat bekerja sekaligus menimba ilmu di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya.

4. Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr, SpB(K)Onk selaku Kepala Departemen Ilmu Bedah sekaligus sebagai pembimbing dalam karya tulis ilmiah akhir saya , yang atas ketekunan, ketelitian dan kesabaran beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya serta menanamkan disiplin yang tinggi selama saya menempuh pendidikan.
5. Prof. Dr. Paul Tahalele, dr, SpB(K)TKV, selaku Kepala SMF Ilmu Bedah RSUD Dr Soetomo Surabaya yang selalu memberikan motivasi dan bimbingan selama saya menjalani pendidikan.
6. Yoga Wijayahadi, dr. SpB(K)KL selaku Ketua Program Studi Ilmu Bedah dan juga sebagai penguji karya tulis ilmiah akhir saya, yang atas ketekunan, kesabaran dan ketelitian beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya.
7. Willy Sandhika, dr. SpPA MS, selaku pembimbing dan penguji dibidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam membimbing saya serta memberi masukan dalam penelitian saya.
8. Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr MS,SpPA(K), FIAC, selaku pembimbing dibidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam melakukan pemeriksaan dan pembacaan imunohistokimia serta memberikan masukan dalam penelitian saya ini.
9. Heru Purwanto, dr. SpB(K)Onk MKes, selaku penguji pada penelitian ini yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan serta perbaikan dalam penelitian saya ini.
10. Budiono, dr. Mkes, yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing saya khususnya dalam bidang statistik dan metodologi penelitian.
11. Ary Wahyudiono, AMd, beserta karyawan di lingkungan laboratorium/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo telah banyak membantu selama menyelesaikan penelitian ini.
12. Seluruh teman sejawat / rekan residen, paramedis dan karyawan di lingkungan Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah banyak membantu dan jalinan kerjasama yang baik selama masa pendidikan maupun selama menyelesaikan penelitian ini.

13. 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.
14. Istri saya tercinta Tricia , kedua anakku tersayang Adrian dan Amanda, terima kasih untuk seluruh cinta, kasih sayang, pengorbanan, kesabaran, pengertian dan dorongan yang terus menerus diberikan selama pendidikan

Surabaya, Maret 2008

Penulis

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR i

DAFTAR ISI iv

DAFTAR GAMBAR DAN TABEL vi

DAFTAR LAMPIRAN ix

DAFTAR SINGKATAN x

BAB 1 PENDAHULUAN 1

 1.1 Latar Belakang 1

 1.2 Rumusan masalah 2

BAB 2 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN 3

 2.1 Tujuan penelitian 3

 2.1.1 Tujuan umum 3

 2.1.2 Tujuan khusus 3

 2.2 Manfaat penelitian 3

 2.2.1 Manfaat teoritis 3

 2.2.2 Manfaat klinis 3

BAB 3 TINJAUAN KEPUSTAKAAN 4

 3.1 Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher 4

 3.1.1 Epidemiologi 4

 3.1.2 Etiologi 4

 3.1.3 Gambaran Klinis 5

 3.1.4 Prognosis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher 7

3.2	Biologi Sel	8
3.2.1	Siklus Sel	8
3.2.2	<i>Cyclin D1</i> dan Regulasi Siklus Sel	9
3.3	<i>Cyclin D1</i> dan Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher	13
3.4	Pemeriksaan Ekspresi <i>Cyclin D1</i> dengan Imunohistokimia	13
3.4.1	Penerapan dan aplikasi.....	14
3.4.2	Reagen	14
3.4.3	Persiapan spesimen	15
3.4.4	Prosedur pengecatan	15
3.4.5	Interpretasi pengecatan	15
BAB 4	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
4.1	Kerangka konseptual	17
4.2	Hipotesis penelitian	17
BAB 5	METODE PENELITIAN	18
5.1	Jenis dan rancangan penelitian	18
5.2	Populasi	18
5.3	Sampling	18
5.4	Kriteria Bahan Penelitian	19
5.5	Variabel penelitian	19
5.6	Definisi Operasional	19
5.7	Kerangka Operasional	22
5.8	Lokasi dan Waktu Penelitian	22
5.9	Tahap Penelitian	23
5.10	Analisa data	24
BAB 6	HASIL PENELITIAN	
6.1	Karakteristik Sampel Penelitian	25
6.2	Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi <i>Cyclin D1</i> pada Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher	26
6.3	Analisis hasil penelitian	30

7.1	Gambaran Umum Hasil Penelitian	33
7.2	Korelasi antara ekspresi <i>Cyclin D1</i> dengan <i>grading</i> histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa kepala dan Leher	35
7.3	Manfaat pemeriksaan <i>Cyclin D1</i> dalam penentuan prognostik	39
	penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	
7.4	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CDK inhibitor)</i> untuk pengobatan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	41
BAB 8 KESIMPULAN DAN SARAN		43
DAFTAR PUSTAKA		44
LAMPIRAN		49

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1 Regulasi *Cyclin Dependent Kinase* pada siklus sel. 9
- Gambar 2 Pengendalian Siklus sel 12
- Gambar 3 Karsinoma Laring (T.4629/07) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Strong Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 100 kali. 28
- Gambar 4 Karsinoma Nasofaring (T.5475/07) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Strong Positive* dan 10% dengan intensitas *Medium Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali 28
- Gambar 5 Karsinoma Maksila (T.3886/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 20% dengan intensitas *Medium Positive* dan 60% dengan intensitas *Low Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali. 29
- Gambar 6 Karsinoma Maksila (T.3886/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Low Positive* dan 20% dengan intensitas *Negative* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali. 29
- Gambar 7 Karsinoma Lidah (T.6098/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 90% dengan intensitas *Negative* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali. 30
- Gambar 8 Grafik hubungan antara median skor ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher 31

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Petunjuk prosedur pengecetaan imunohistokimia	15
Tabel 2	<i>Grading</i> histopatologis karsinoma sel skuamosa menurut sistem Broder	22
Tabel 3	Karakteristik sampel penelitian	25
Tabel 4	Distribusi jenis kelamin dan umur pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	25
Tabel 5	Diagnosis klinis dan <i>grading</i> histopatologis penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher	26
Tabel 6	Skor pemeriksaan imunohistokimia dan <i>grading</i> histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	26
Tabel 7	Uji Korelasi Spearman ekspresi <i>Cyclin D1</i> dengan <i>grading</i> histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	30
Tabel 8	Tabulasi silang ekspresi <i>Cyclin D1</i> dengan nilai <i>cut off</i> 5% dengan <i>grading</i> Histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	31
Tabel 9	Uji korelasi koefisien kontingensi ekspresi <i>Cyclin D1</i> dengan nilai <i>cut off</i> 5% dengan <i>grading</i> histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara pemeriksaan histopatologis dengan pengecatan Hematoksilin Eosin cara Meyer untuk menentukan <i>grading</i> karsinoma sel skuamosa	49
Lampiran 2	Cara pemeriksaan imunohistokimia untuk medeteksi <i>Cyclin D1</i>	51
Lampiran 3	Hasil pemeriksaan imunohistokimia <i>Cyclin D1</i> dari Laboratorium PA-FK Unair- RSU Dr.Soetomo Surabaya	52
Lampiran 4	Sampel Penelitian Korelasi Ekspresi <i>Cyclin D1</i> Dengan <i>Grading</i> Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala Dan Leher	53
Lampiran 5	Analisis Hasil Statistik	55
Lampiran 6	Datasheet N1619, Antibodi monoklonal Human <i>Cyclin D1</i> dari DakoCytomation, DCS-6	60

DAFTAR SINGKATAN

CDK	: Cyclin Dependent Kinase
Cip	: Cyclin interacting protein
HPV	: Human Pappiloma Virus
INK	: Inhibitor of Cyclin Dependent Kinase
Kip	: Kinase inhibitory protein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pRb	: Retinoblastoma gene product
RND	: Radical Neck Dissection
TGF	: Transforming Growth Factor

BAB 1
PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Keganasan kepala leher merupakan keganasan yang keenam terbanyak pada semua kasus keganasan di dunia dengan insiden yang lebih banyak pada negara berkembang. Dari berbagai tipe histologik, karsinoma sel skuamosa merupakan keganasan yang terbanyak pada saluran aerodigestif bagian atas. Hampir separuh dari penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher sudah mengalami stadium lanjut pada saat mereka pertama kali didiagnosis, dengan angka harapan hidup 5 tahun berkisar 10-40%. (Espat, 2003; Concus 2001) Penatalaksanaan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher meliputi pembedahan, radioterapi dan kemoterapi. Secara umum prognosis penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher kurang baik, hal ini berhubungan dengan tidak terkontrolnya faktor lokoregional dan terjadinya rekurensi tumor. Rendahnya angka harapan hidup penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher ini mendasari masih diperlukannya pendekatan-pendekatan baru dalam mendiagnosis dan menerapi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Masih diperlukan pemahaman yang lebih mendalam tentang proses di tingkat seluler yang menyebabkan transformasi dan progresifitas karsinoma sel skuamosa kepala dan leher sehingga didapatkan metoda diagnostik dan pengobatan yang lebih efektif.

Penelitian terakhir menunjukkan bahwa hampir semua sel kanker menunjukkan adanya gangguan pengaturan fase G1 ke fase S pada siklus sel. Gangguan pengaturan ini bisa disebabkan karena adanya mutasi (*point mutation, missense mutation, frame shape mutation*) maupun hiperaktivitas satu dari empat gen yang mengatur fosforilasi pRb. Gen ini adalah Rb, CDK4, *Cyclin D1* dan p16. (Kastan, 2001; Andreef,2003) Pada karsinoma sel skuamosa terjadi deregulasi *Cyclin D1*. Berbagai penelitian menunjukkan adanya overekspresi *Cyclin D1* pada 35% sampai 64% karisnoma sel skuamosa kepala leher. Hal tersebut menyebabkan perubahan memendeknya fase G1 sehingga terjadi percepatan pertumbuhan sel.

Biomarker jaringan mempunyai potensi yang menawarkan modalitas baru dalam diagnosis dini, monitoring dan penatalaksanaan penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Biomarker jaringan memberikan informasi yang diperlukan dalam memprediksi *outcome* klinis penderita-penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher .(Yu,2005; Thomas, 2005). Beberapa biomarker yang merupakan faktor prognostik karsinoma sel skuamosa adalah p53, marker yang berhubungan dengan *Angiogenesis, Cyclin D1, Epidermal Growth Factor Receptor* dan *Transforming Growth Factor α , DNA Ploidy*, marker proliferasi dan kinetik seluler. Overekspresi *Cyclin D1* berhubungan dengan terjadinya rekurens, stadium kanker, metastase regional dan menurunkan angka *survival* secara keseluruhan. Penelitian lain juga menunjukkan adanya hubungan antara overekspresi *Cyclin D1* dengan buruknya prognosis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.(Donellan, 1998; Jeannon 1998; Pinilla, 2004). Sebaliknya, Muller et al. dan Fortin et al. gagal membuktikan hubungan antara overekspresi *Cyclin D1* dengan *outcome* penderita-penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini akan dicari bagaimana hubungan overekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat korelasi antara ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher?

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan Umum

Mengetahui ekspresi *Cyclin D1* pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

2.1.2 Tujuan Khusus

2.1.2.1 Mengetahui perbedaan derajat ekspresi *Cyclin D1* pada berbagai *grading* karsinoma sel skuamosa kepala leher.

2.1.2.2 Mengetahui korelasi antara ekspresi *Cyclin D1* dan *grading* histopatologis pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

2.2 Manfaat Penelitian

2.2.1 Manfaat teoritis

Pemeriksaan ekspresi *Cyclin D1* dapat digunakan sebagai prediktor molekuler dari *outcome* klinis penderita dengan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher .

2.2.2 Manfaat klinis

2.2.2.1 Derajat ekspresi *Cyclin D1* dapat digunakan sebagai faktor prognosis.

2.2.2.2 Dengan mengetahui adanya hubungan antara ekspresi *Cyclin D1* dengan agresifitas karsinoma sel skuamosa kepala dan leher maka akan mendorong penelitian lebih lanjut untuk penemuan obat anti *Cyclin D1* sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan tersebut.

BAB 3

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

3.1 Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher

Lebih dari 90% dari seluruh keganasan di kepala dan leher adalah karsinoma sel skuamosa. Karsinoma sel skuamosa adalah tumor ganas yang berasal dari epitel mukosa. Karsinoma ini mempunyai perilaku biologis tergantung dari tempat tumor tersebut berasal. Setiap lokasi anatomis mempunyai pola penyebaran dan prognosis sendiri-sendiri. (Beenken, 2003)

3.1.1 Epidemiologi

Di Amerika Serikat, angka kejadian karsinoma sel skuamosa kepala dan leher adalah 4% dari seluruh keganasan dengan perkiraan 17 kasus baru per 100.000 penduduk setiap tahunnya. Rasio laki-laki dibandingkan perempuan lebih dari 2:1. Perbedaan rasio laki-laki dibanding perempuan lebih besar 4 sampai 5 kali pada laki-laki pada tumor-tumor laring. Rasio ini berkurang dalam 20 tahun terakhir, kemungkinan disebabkan makin meningkatnya perempuan yang merokok. Karsinoma laring umumnya terjadi pada usia tua dengan puncaknya pada dekade 5 dan 6. Di bagian tertentu di India dan Asia Tenggara karsinoma sel skuamosa berkaitan dengan kebiasaan menginang dengan menggunakan campuran tembakau dan kapur sirih. Lebih dari 200.000 orang di seluruh dunia diperkirakan mempunyai kebiasaan ini. Resiko relatif untuk terjadinya kanker 2,8 kali lebih tinggi pada orang tersebut dan hal ini akan meningkat lebih dari 10 kali jika orang tersebut merokok. Di Brazilia dan negara berkembang lainnya, karsinoma sel skuamosa kepala dan leher menempati 35% dari seluruh keganasan. (Wein, 2005; Vokes, 1993)

3.1.2 Etiologi

Karsinoma sel skuamosa kepala dan leher pada umumnya berkaitan dengan penggunaan alkohol dan tembakau. Risiko terjadinya karsinoma ini 15 kali lebih besar pada orang yang merokok dan peminum alkohol. Pada karsinoma ini terjadi mutasi gen p53 yang berhubungan dengan kebiasaan merokok dan minum

alkohol. Lima belas persen dari pasien berhubungan dengan infeksi virus. Virus *Epstein Barr* merupakan penyebab berkembangnya karsinoma nasofaring. Infeksi virus *Human papilloma* merupakan faktor lain pada karsinogenesis keganasan pada traktus aerodigestivus atas. (Vokes,1993)

Faktor risiko lingkungan penyebab karsinoma sel skuamosa kepala dan leher adalah uap cat, plastik, debu kayu, asbes dan uap bahan bakar gas. Penyakit refluks gastroesofageal saat ini dikatakan sebagai faktor risiko yang cukup bermakna pada karsinoma laring khususnya dua pertiga anterior pita suara. Iritasi yang disebabkan susunan gigi yang tidak baik juga merupakan faktor risiko terjadinya karsinoma rongga mulut. (Vokes, 1993)

3.1.3 Gambaran Klinis

Karsinoma sel skuamosa biasanya dimulai dari lesi di permukaan dengan eritema dan sedikit peninggian. Lesi ini disebut eritroplasia. Eritroplasia dini biasanya asimtomatis dan dapat merupakan karsinoma in situ ataupun karsinoma invasif. Sepertiga dari lesi permukaan dapat merupakan bercak keputihan yang disebut leukoplakia. Hanya 10% dari leukoplakia yang merupakan karsinoma in situ atau karsinoma invasif. Tempat paling sering dari karsinoma sel skuamosa adalah pada dasar mulut, lidah, palatum mole, arkus faringus anterior dan trigonum retromolar. Lesi yang terasa nyeri menunjukkan terjadinya invasi ke perineural. Ketika lesi sudah menjadi massa yang teraba maka akan timbul gejala sakit tenggorokan atau infeksi telinga. (Wein, 2005)

Pada kasus lanjut, penyebaran ke kelenjar getah bening submandibula ipsilateral dan jugulodigastrikus sering dijumpai. Pasien biasanya mengeluh adanya benjolan di leher. Gejala lain timbul akibat metastasis jauh karsinoma tersebut ke tulang dan organ lainnya.

Staging karsinoma sel skuamosa kepala leher penting untuk , 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.

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 : (Greene,2002)

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, dan 3. 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.

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 subtipe 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. (Vaughan, 2004)

3.1.4 Prognosis karsinoma sel skuamosa kepala leher

Smith BD (2004) menyatakan bahwa prognosis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher ditentukan oleh beberapa faktor yang dapat dikelompokkan sebagai berikut:

- a. Faktor prognostik yang berhubungan dengan tumor primer (dimensi ukuran tumor, status margin tumor, *grading* histopatologis, invasi ke vaskuler dan invasi ke perineural).
- b. Faktor prognostik yang berhubungan dengan kelenjar getah bening leher, (jumlah kelenjar leher yang positif, ekstensi ekstra kapsular, lokasi kelenjar, dan ukuran kelenjar).
- c. Faktor prognostik yang berhubungan dengan demografi pasien (usia, jenis kelamin, ras, dan paparan terhadap tembakau dan alkohol).
- d. Faktor prognostik yang berhubungan dengan keadaan umum pasien (penyakit penyerta, status nutrisi dan anemia)
- e. Faktor prognostik molekuler (p53, marker yang berkaitan dengan angiogenesis, *Cyclin D1*, Epidermal Growth Factor Receptor dan Transforming Growth Factor α , DNA ploidi, marker proliferasi dan kinetik seluler).

3.2 Biologi sel

Homeostasis jaringan terjadi karena adanya keseimbangan antara proliferasi sel dan kematian sel. Proliferasi sel yang berlebihan dan kegagalan eliminasi sel menjadi dasar dari semua penyakit hiperplasia dan neoplasia.

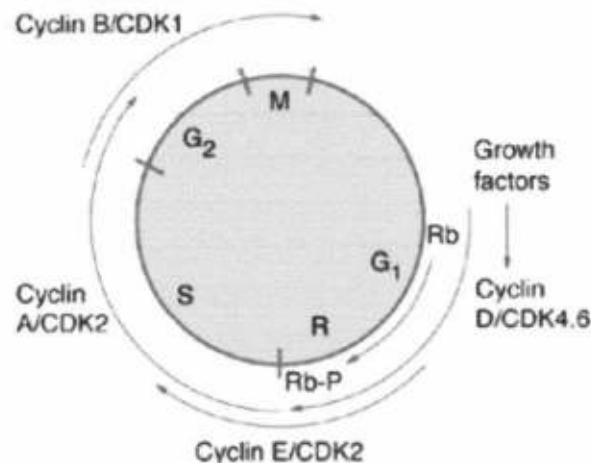
Biologi pembelahan sel, diferensiasi dan apoptosis pada sel normal dan sel kanker tidak berbeda. Yang membedakan sel kanker dari sel normal adalah regulasinya yang mengalami penyimpangan. Sel kanker secara umum memiliki komplemen biomolekuler yang diperlukan untuk proliferasi, diferensiasi, kematian sel terprogram dan ekspresi fungsi spesifik seperti kebanyakan tipe sel. Kegagalan pengaturan fungsi-fungsi tersebut akan menyebabkan perubahan fenotip dan keganasan. (William, 1997; Andreef, 2003)

Ada empat fungsi seluler akan mengalami kegagalan regulasi pada neoplasma. Pertama, fungsi pembatasan proliferasi sel menjadi tidak efektif. Kedua, program diferensiasi sel mengalami penyimpangan. Diferensiasi sel tumor dapat terhenti pada stadium diferensiasi tertentu atau dapat terjadi diferensiasi ke tipe sel yang abnormal. Ketiga, kromosom dan organisasi genetik menjadi tidak stabil sehingga muncul varian sel dengan frekuensi tinggi. Beberapa varian sel dapat mempunyai motilitas yang tinggi atau memproduksi enzim yang menyebabkan invasi dan metastasis. Keempat, terjadi gangguan apoptosis sel. (Andreef, 2003)

3.2.1 Siklus Sel

Siklus pembelahan sel dapat dibagi menjadi dua fase fungsional, fase S dan M, dan dua fase persiapan G1 dan G2 (gambar 1). Fase S didefinisikan sebagai fase saat DNA mengalami replikasi. Untuk menyelesaikan fase S pada sel manusia diperlukan waktu sekitar antara 8 jam. Replikasi penuh kromosom akan menghasilkan dua anak nukleus pada saat proses mitosis selama fase M. Panjang fase M sekitar satu jam. Fase G1 mendahului fase S sedangkan fase G2 mendahului fase M. Fase G1 dan G2 memerlukan sintesis unsur seluler yang diperlukan untuk mendukung fase berikutnya dan pada akhirnya untuk menyelesaikan pembelahan sel. Pada mamalia lama fase G2 sekitar dua jam. Fase G1 sangat bervariasi dan dapat berkisar antara enam jam sampai beberapa hari atau lebih. Pada sel manusia, variasi waktu fase G1 menentukan perbedaan waktu

siklus pembelahan sel pada tipe sel yang berbeda dan pada kondisi pertumbuhan sel yang berbeda pula. Sel yang menetap pada fase G1 untuk periode waktu yang panjang memasuki fase terpisah yang disebut fase G0. Meskipun metabolisme sel-sel pada fase ini aktif akan tetapi sel-sel tersebut tidak aktif berproliferasi. Sel pada fase G0 dapat kembali memasuki siklus pembelahan sel atau menetap pada fase G0 untuk waktu yang tak terbatas.



Gambar 1. Regulasi *Cyclin Dependent Kinase* pada siklus sel. Transisi dari satu fase ke fase berikutnya memerlukan transit ke sebuah cekpoin seperti titik restriksi (titik R) selama transisi G₀/G₁ ke fase S. Transit di titik tersebut dimediasi oleh aktifasi *Cyclin Dependent Kinase*(CDK). Waktu aktifasi masing-masing CDK selama siklus sel ditunjukkan oleh panah. Aktifasi *Cyclin D/ CDK4 dan -6* merupakan koinsiden dengan fosforilasi protein reinoblastoma tumor supresor (Rb) dan transit pada cekpoin R. (Dikutip dari Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. Cell proliferation and differentiation. In Donald W, Raphael E, Pollock, editors. Holland Frei: Cancer Medicine. 6th ed. London: BC Decker Inc. 2003.p.129)

3.2.2 *Cyclin D1* dan Regulasi Siklus Sel

Cyclin adalah kelompok protein yang memegang peranan penting dalam mengatur pembelahan sel. *Cyclin* adalah enzim yang merangsang sel, tahap demi tahap dari fase istirahat ke fase pembelahan sel. Pada fase G₀ *cyclin* berada dalam bentuk inaktif. *Cyclin* akan menjadi aktif jika berikatan dengan protein CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). Kompleks *Cyclin-CDK* akan menstimulasi sel untuk mengalami mitosis. Untuk setiap tahapan siklus sel berbagai macam kompleks *Cyclin-CDK* yang berbeda memegang peranan. Oleh karena itu sepanjang siklus sel, peningkatan dan penurunan konsentrasi kompleks *Cyclin-CDK* dapat terlihat

dalam pola tertentu karena aktivasi dan inaktivasi kompleks tersebut. (William,1997)

Senyawa yang penting untuk kompleks *Cyclin-CDK* adalah pRB (*retinoblastoma gene product*). Protein ini bekerja sebagai inhibitor universal siklus sel dan mencegah sel masuk ke dalam fase S. *Cyclin* tipe D memfosforilasi pRB sehingga pRB kehilangan aktifitasnya dalam menghambat siklus sel. Hilangnya gen pRB berhubungan dengan progresifitas tumor. (William,1997; Jeannon 1998; Andreef, 2003)

Ada banyak faktor yang dapat mempengaruhi siklus sel, baik yang bersifat proliferasif maupun yang bersifat anti-proliferasif. Faktor ekstraseluler seperti hormon, faktor pertumbuhan dan lingkungan dapat mempengaruhi sel. Demikian halnya aktivasi onkogen dan gen supresi tumor dalam sel akan berefek positif maupun negatif. Semua faktor tersebut mempunyai kesamaan dalam mempengaruhi siklus sel dengan cara mengaktifasi ataupun menginaktivasi *Cyclin* dan CDK. Sebagai contoh, *epidermal growth factor* adalah faktor proliferasif positif yang poten yang bekerja melalui pengaktifan *Cyclin D1*. (William,1997; Jeannon 1998; Andreef, 2003)

Ada banyak protein yang tergolong inhibitor CDK yang dapat menghambat aktifitas kompleks *Cyclin-CDK* sehingga menghentikan siklus sel. Ada dua golongan protein tersebut yaitu golongan Cip (*Cyclin interacting protein*) /Kip (*Kinase inhibitory protein*) dan golongan INK 4 (*Inhibitor of Cyclin Dependent Kinase4*).

Yang termasuk golongan Cip adalah p21 (Cip1WAF1), p27 (Kip1) dan p57 (Kip2). Prefiks 'p' menunjukkan senyawa protein dan angka adalah berat molekul dalam kilo Dalton. p21 adalah protein yang disandi pada lengan pendek kromosom 6 dan diaktifasi oleh p53, gen supresor tumor universal. Sama halnya dengan penghambat siklus sel lainnya golongan Cip juga menginduksi terjadinya apoptosis. Ekspresi gen p53 dikenali pada kerusakan DNA dan protein p53 yang diproduksi kemudian akan berikatan dengan gen p21 yang bekerja mengaktifasi transkripsi protein p21. Protein p21 akan menghentikan siklus sel. Kaskade reaksi biokimia ini mempunyai nilai protektif yang besar yaitu dengan mencegah sel yang mengandung DNA yang mengalami mutasi untuk membelah. Hal ini

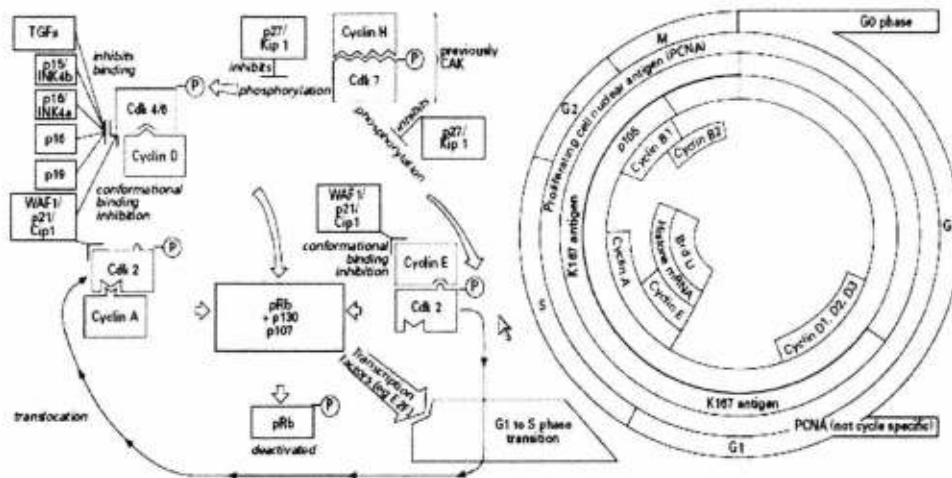
memungkinkan sel untuk memperbaiki dirinya sendiri. Jika hal ini tidak memungkinkan maka sel akan dihancurkan. (Jeannon, 1998)

p27 (Kip1) disandikan oleh lengan pendek kromosom 12 dan merupakan inhibitor siklus sel yang kuat yang bekerja pada beberapa tempat pada siklus sel. p27 diaktifasi oleh inhibisi kontak dengan b-TGF (*transforming growth factor beta*). p27 berhubungan dengan *Cyclin E-CDK2*, *Cyclin A-CDK2* dan *Cyclin D-CDK4* yang menghambat aktifitas mereka pada fase istirahat G1. Pemeriksaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hibridisasi insitu menunjukkan adanya mutasi pada lokus p27 di sel kanker. (Jeannon, 1998)

Penelitian imunohistokimia terakhir menunjukkan ekspresi p27 merupakan indikator faktor prognostik yang dapat diandalkan pada karsinoma kolorektal dan payudara. p57 (Kip2) nampaknya lebih mempunyai spesifisitas jaringan karena diidentifikasi pada kadar yang lebih tinggi di jaringan plasenta dan muskuloskeletal. p57 disandi pada kromosom 1 pada 11p15, sebuah regio yang sering mengalami delesi pada sel kanker. Mutasi pada lokus ini berhubungan dengan rhabdomyosarkoma dan tumor Wilm. (Jeannon, 1998)

p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4c) dan p19 (INK4D) termasuk golongan inhibitor CDK. Protein-protein tersebut akan berikatan dengan enzim CDK4 dan menginaktivasi *Cyclin B* dan *Cyclin D1* sampai *D3* sehingga sel beristirahat pada fase G1. Protein-protein ini disandi oleh kromosom 9p21 dimana kehilangan dari heterozigositas adalah satu dari kebanyakan mutasi genetik sel kanker manusia. (Jeannon, 1998)

Saling keterkaitan antara *Cylin* aktif dan CDK inhibitor selama siklus sel ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Pengendalian siklus sel sangat kompleks. Pada fase manapun di cekpoin tersebut bisa terjadi kegagalan yang akhirnya bisa menuju ke karsinogenesis. (Dikutip dari Jeannon JP, Wilson JA. Cyclins, cyclin-dependent kinases, cyclin dependent kinase inhibitors and their role in head and neck cancer. Clin.Otolaryngol. 1998; 23: 421)

Gen supresor tumor dan kanker

Gen supresor tumor adalah gen yang disandi untuk menghasilkan faktor yang mengendalikan siklus sel dan mencegah terjadinya karsinogenesis. Kehilangan atau mutasi dari gen ini akan mengacaukan kendali siklus sel. Banyak gen supresi tumor tetapi p53 adalah yang terpenting karena berperan pada lebih dari separuh kanker yang ada. Hubungan antara p53 dan inhibitor CDK yang mengendalikan siklus sel sangat penting pada terjadinya kanker. Mutasi p53 dapat merupakan hasil dari berbagai macam faktor. Radiasi pengion merusak DNA melalui pembebasan radikal bebas. Virus menginduksi kanker melalui penyatuan protein virus ke dalam sel. Protein virus HPV (*Human Pappiloma Virus*) V6 akan berikatan dengan gen p53, sehingga menginaktivasi gen p53 setelah terjadinya infeksi virus tersebut. Karsinogen kimia seperti *benzopyrene* pada asap rokok mengakibatkan mutasi substitusi basa G menjadi T pada kanker paru, esofagus dan kanker kepala dan leher. Hal tersebut di atas merupakan hasil perubahan struktur gen supresi tumor sehingga menyebabkan gangguan fungsi supresinya. (William,1997; Jeannon 1998; Andreef, 2003)

3.3 *Cyclin D1* dan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Karsinogenesis terjadi akibat serangkaian mutasi genetik yang menyebabkan pertumbuhan klon sel yang tidak teregulasi dan perkembangan lesi ganas tersebut kebanyakan monoklonal. Kerusakan kromosom akan mempengaruhi proses regulasi ini melalui transkripsi protein. Pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut dan kebanyakan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher timbul sebagai akibat perubahan di tingkat molekuler yang diinduksi oleh efek karsinogenik dari kebiasaan merokok, pengaruh lingkungan, dan infeksi virus. Akibat kerusakan genetik ini akan mempengaruhi beberapa kromosom dan gen. Akumulasi perubahan-perubahan genetik ini mengakibatkan timbulnya karsinoma yang secara klinis melalui tahapan lesi praganas atau lesi yang berpotensi menjadi ganas.

Dengan berkembangnya kemajuan teknologi kedokteran, khususnya teknologi DNA, pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher terjadi perubahan-perubahan kromosom tertentu, yaitu terjadi ketidakseimbangan alelik atau kehilangan heterozigositas. Beberapa protoonkogen yang berperan pada tumorigenesis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher adalah H-ras, EGFR, c-myc, PRAD-1, Her2/neu, hst 1 dan Int 2, Bcl-2.

PRAD-1 adalah gen yang terletak pada kromosom 11q13. Pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dilaporkan gen ini mengalami kehilangan heterozigositasnya dari 60% dan 50% pada karsinoma rongga mulut. Terjadinya kehilangan heterozigositas akan menyebabkan amplifikasi *Cyclin D1*. Sehingga terjadi disregulasi siklus sel yang akhirnya terjadi akselerasi siklus sel seperti yang telah dijelaskan di atas.

3.4 Pemeriksaan Ekspresi *Cyclin D1* dengan Imunohistokimia

Cyclin D1 adalah protoonkogen (PRAD-1/CCND-1/ bcl-2) yang terletak pada kromosom 11q13. Protein ini berukuran 36kD dengan ekspresi maksimum terjadi pada titik kritis pertengahan sampai akhir fase G1 siklus sel. *Cyclin D1* termasuk dalam golongan protein cylin yang memegang peranan pada pertumbuhan sel melalui aktifasi oleh *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Aktifitas *Cyclin D1* bersama-sama CDK diperlukan untuk menyelesaikan fase G1 pada siklus sel normal mamalia. Kompleks *Cyclin D1* dan

CDK4 atau CDK6 akan memfosforilasi protein retinoblastoma sehingga terjadi hambatan fungsi inhibitor pertumbuhan sel dan akhirnya mendorong sel masuk kedalam fase S. Pada jaringan normal, ekspresi *Cyclin D1* terbatas pada zona proliferasi jaringan epitel dan tidak terdapat pada jaringan kelenjar getah bening, lien dan tonsil.

Regulasi abnormal kromosom 11q13 akan menyebabkan overekspresi *Cyclin D1*. Beberapa regulasi yang abnormal itu adalah amplifikasi gen pada beberapa karsinoma, translokasi kromosom resiprokal pada limfoma sel Mantle dan inversi perisentrik kromosom 11 pada adenoma paratiroid. Lebih jauh *Cyclin D1* akan menghambat fungsi inhibitor pertumbuhan sel oleh protein retinoblastoma.

3.4.1 Penerapan dan Aplikasi

Banyak neoplasma menunjukkan overekspresi *Cyclin D1* pada pemeriksaan blok parafinnya antara lain karsinoma mamma, karsinoma sel skuamosa, limfoma sel Mantle, adenoma paratiroid dan karsinoma sel transisional pada buli-buli. Secara imunohistokimia protein inti *Cyclin D1* didapatkan 75% limfoma sel Mantle dan tidak ditemukan pada sel B normal dan limfoma sel B lainnya.

Pemeriksaan ekspresi *Cyclin D1* menggunakan antibodi monoklonal mencit *Anti Human Cyclin D1*. Antibodi ini digunakan secara laboratoris untuk menilai kuantitatif *Cyclin D1* pada sel normal dan sel kanker dengan menggunakan metode imunohistokimia.

3.4.2 Reagen

Reagen yang digunakan adalah N1619, yaitu Antibodi monoklonal mencit terhadap *Human Cyclin D1* dari *DakoCytomation* dengan kode klon:DCS-6. Anti *Cyclin D1* tersedia dalam volume 11ml sebagai kultur jaringan supernatan dalam 0,05 mol/L Tris-HCl dengan pH 7,6, mengandung protein penstabil dan 0,015 mol/L natrium azida. Klon DCS-6 dengan isotop IgG2a, kappa. Produk ini telah dioptimalkan untuk penggunaan dengan sistem deteksi yang sangat sensitif *DakoCytomation*.

3.4.3 Persiapan Spesimen

Pemeriksaan anti *Cyclin D1* dapat digunakan pada spesimen yang difiksasi formalin dan blok parafin. Prosedur deparafinisasi blok dengan pemanasan harus dikerjakan sebelum pengecatan imunohistokimia. Waktu dan temperatur sangat memegang peranan penting dalam pengecatan *Cyclin D1*. Untuk mendapatkan kembali jaringan dari blok parafin diperlukan pencelupan potongan jaringan ke dalam larutan bufer yang sudah dipanaskan sebelumnya bisa dengan *waterbath* (95-99°C), *steamer* (95-99°C) atau *pressure cooker* (121°C). Larutan untuk mendapatkan kembali jaringan adalah larutan dengan pH tinggi (kode S3308) atau 10x konsentrat (Kode S3307) yang direkomendasikan untuk dipanaskan 20-40 menit dengan *waterbath* dengan temperatur 95-99°C. Untuk mendapatkan hasil yang baik digunakan gelas objek yang disilanisasi (Kode S3003).

3.4.4 Prosedur pengecatan

Antibodi primer harus diberikan seperti yang dianjurkan pada petunjuk prosedur pengecatan termasuk dengan masing-masing sistem pendeteksi. Semua langkah inkubasi dikerjakan pada suhu kamar. Waktu inkubasi yang dianjurkan untuk antibodi ini adalah sebagai berikut

Tabel 1. Petunjuk prosedur pengecatan imunohistokimia

	Antibodi Primer		Sistem Deteksi		Kromogen
N1619	30 menit	K4063/K4065	30 menit	DAB+	10 menit
	30 menit	K5007	30 menit	DAB +	10 menit
	20 menit	K5355	15/15 menit	LPR	10 menit
	20 menit	K5005	15/15 menit	LPR	10 menit

3.4.5 Interpretasi Pengecatan

Pola pengecatan seluler *Cyclin D1* adalah inti sel. Jika sitoplasma tercat sedangkan inti sel tidak tercat maka pembacaan dianggap negatif.

a. Jaringan normal

Cyclin D1, imunoreaktivitas DCS-6 pada jaringan normal bervariasi dan lemah. Ekspresi normal dibagi menjadi jaringan positif heterogen (epitel skuamosa bertatah), jaringan negatif (jaringan limfoid, otot, ginjal, hati dan

kelenjar ekrin maupun apokrin), dan jaringan positif tersebar (jaringan kelenjar seperti payudara, gaster dan mukosa usus, endometrium, endocerviks, ovarium, tuba falopii, prostat dan testis)

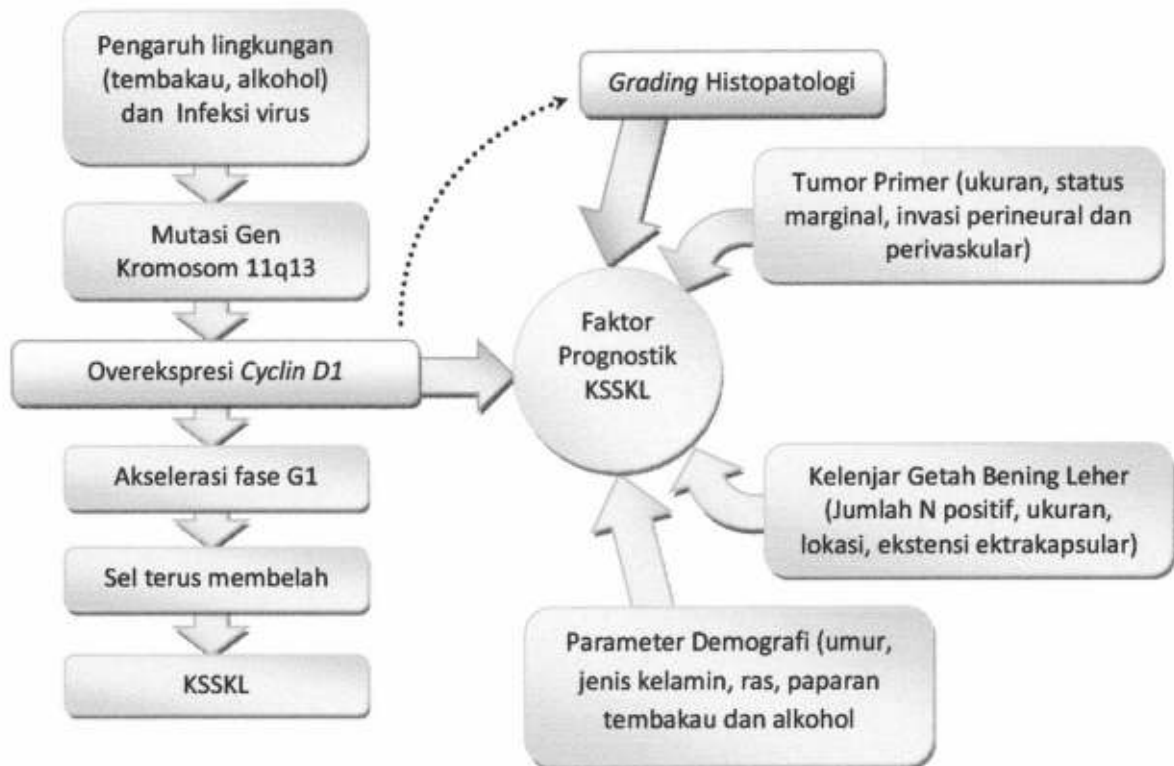
b. Jaringan abnormal

Beberapa penelitian imunohistokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *Cyclin D1* terekpresi berlebihan pada inti sel pada berbagai keganasan dengan berbagai macam histogenesis. Dari 212 tumor primer yang diteliti, karsinoma mamma, kolorektal, uterus, sarkoma jaringan lunak dan melanoma maligna 46% menunjukkan peningkatan sedang imunoreaktivitas *Cyclin D1*. Pada limfoma sel Mantle menunjukkan peningkatan ekspresi *Cyclin D1* diatas 80% pada sumsum tulang. Pemeriksaan imunohistokimia *Cyclin D1* bersama-sama dengan marker yang lain sangat berguna untuk mendiferensiasi berbagai neoplasma.


BAB 4

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

4.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

 Subyek yang diteliti

KSSKL = Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher

4.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat korelasi antara ekspresi *Cyclin D1* dan *grading* histopatologis pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

BAB 5

METODE PENELITIAN

5.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui peningkatan ekspresi *Cyclin D1* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, serta korelasi antara peningkatan ekspresi *Cyclin D1* 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*.

5.2 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.

5.3. Sampling

Sampel penelitian adalah blok parafin penderita yang telah dioperasi atau dibiopsi di RSUD Dr. Soetomo Surabaya selama periode 2006-2007 yang secara histopatologis menunjukkan karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan berbagai derajat diferensiasi.

5.3.1 Besar sampel

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

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

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

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

$$r = 0,5$$

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

$n = 29,05$ dibulatkan menjadi 30

5.3.2 Pengambilan sampel

Sampel dipilih secara *systematic random sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi kemudian diperiksa secara imunohistokimia ekspresi *Cyclin D1*.

5.4 Kriteria Bahan Penelitian

5.4.1 Kriteria inklusi

5.4.1.1 Kasus primer

5.4.1.2 Belum pernah radiasi dan kemoterapi preoperatif.

Kemoterapi dan radiasi akan berpengaruh menyebabkan perubahan pada tingkat molekuler sel sehingga akan mempengaruhi siklus sel baik secara langsung maupun melalui perubahan/ mutasi genetik.

5.4.1.3 Blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher yang tersimpan dengan baik pada suhu kamar di laboratorium Patologi Anatomi FK.UNAIR.

5.4.2 Kriteria eksklusi

Didapatkan keganasan pada organ lain.

5.5. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini variable penelitian yang diteliti adalah:

5.5.1 Variabel *independent* : ekspresi *Cyclin D1*.

5.5.2 Variabel *dependent* : *grading* histopatologis

5.6 Definisi operasional

5.6.1 Ekspresi *Cyclin D1*

Merupakan ekspresi protein *Cyclin D1*, dimana ekspresinya dapat dilihat dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia metode *Labelled Avidin Biotin (LAB)*.

Cara pengecatan: preparat setebal 3 mikron di-*dewaxed* dengan toluen dan direhidrasi secara bertahap dengan gradasi alkohol ke air. Dilakukan blok peroksidase endogen dengan H₂O₂ 3%, antigen diketahui dengan bufer sitrat 10mM (pH6,0), blokade biotin endogen dilakukan dengan menggunakan *avidin-*

biotin blocking kit. Inkubasi antibodi primer dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal *Cyclin D1* mencit dengan dilusi 1:50, kemudian preparat dibilas dengan PBS. Inkubasi antibodi sekunder dilakukan dengan IgG biotin diikuti streptavidin-HRP. Inkubasi imunoreaktivitas dalam *3-amino-9-ethylcarbazol* dan setelah itu dilakukan pengecatan ulang dengan hematoksilin eosin. (lihat lampiran 1 dan 2). Kemudian dihitung berdasarkan prosentase sel tumor yang intinya tercat positif (berwarna coklat homogen) dari 100 sel tumor. Digunakan kontrol internal sebagai pembandingan, dimana untuk kontrol positif digunakan warna eritrosit, dan untuk kontrol negatif digunakan sel jaringan limfoid. (Pinilla, 2004)

Ekspresi ini digolongkan menjadi 4 bagian yaitu (Lam,2005)

- 0 : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tidak tampak atau tampak kurang dari 5% pada rata-rata presentase dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x.
- 1+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip antara 5%-20% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 2+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip antara 20%-50% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 3+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip lebih dari 50% pada 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x

Intensitas immunostaining juga ditentukan secara semikuantitatif dengan nilai (Kouraklis, 2006):

- 0 : negatif
- 1+ : lemah
- 2+ : sedang
- 3+ : kuat

Cara penilaian skor dan imunoreaktivitas dengan mengalikan persentase sel positif dengan kekuatan intensitas.

Contoh:

Satu slide memberikan gambaran

- 25% sel tumor dengan intensitas kuat ($2 \times 3 = 6$)
- 25% sel tumor intensitas lemah ($2 \times 1 = 2$)
- 50% tanpa imunoreaksi ($0 \times 0 = 0$)

Skornya adalah $6 + 2 + 0 = 8$ (Kouraklis, 2006). Pemeriksaan ini dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FK Unair Surabaya.

Cara penilaian lain untuk ekspresi *Cyclin D1* adalah:

- Positif: Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* lebih dari 5% dengan intensitas imunostaining kuat pada rata-rata presentase dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- Negatif: Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tidak tampak atau tampak kurang dari 5% dengan intensitas imunostaining kuat pada rata-rata presentase dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x.

Pada penilaian ini digunakan nilai *cut off* sebesar 5% untuk menentukan ekspresi *Cyclin D1*, bila intensitas imunostaining sel yang tercatat sedang atau lemah maka akan dikelompokkan menjadi negatif. (Pinilla, 2004)

5.6.2 Grading histopatologi (Vaughan, 2004)

Karsinoma sel skuamosa ditentukan *gradenya* menurut sistem Broder menjadi 4 sub tipe berdasarkan diferensiasi histologinya yaitu

5.6.2.1 *Well Differentiated*

5.6.2.2 *Moderately Differentiated*

5.6.2.3 *Poorly Differentiated*

5.6.2.4 *Undifferentiated*.

Tabel 2. Grading histopatologis karsinoma sel skuamosa menurut sistem Broder

	<i>Well Differentiated</i>	<i>Moderately Differentiated</i>	<i>Poorly Differentiated</i>	<i>Undifferentiated</i>
Diferensiasi sitoplasmik	>50% mengalami keratinisasi	20-50% mengalami keratinisasi	5-20% mengalami keratinisasi	<5% mengalami keratinisasi
Polimorfisme inti sel	>75% Sel matur	50-75% Sel matur	25-50% Sel matur	<25% Sel matur
Jumlah mitosis	Tunggal (0-1)	Sedang (2-3)	Banyak (4-5)	Sangat banyak (>5)

Dikutip dari Starska K, Kulig A. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastase in patients with laryngeal carcinoma. *Advances in medical sciences*, 2006,51:201.

Pada penelitian ini akan diteliti intensitas ekspresi *Cyclin D1* secara imunohistokimia pada berbagai derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa kepala leher . Pemeriksaan histopatologi ini dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

5.7 Kerangka Operasional



5.8 Lokasi dan Waktu Penelitian

5.8.1 Lokasi

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

5.8.2 Waktu penelitian

Selama 3 bulan sejak pengumpulan sampel sampai analisa data.

	Jul 2007	Ags 2007	Sep 2007	Okt 2007	Nop 2007	Des 2007	Jan 2008	Feb 2008	Mar 2007
Penelusuran Pustaka									
Penyusunan Proposal									
Penelusuran DMK									
Pengecatan Preparat									
Analisis Data									
Penyusunan Karya Akhir									

5.9 Tahap Penelitian



5.10 Analisa Data

Untuk menganalisa korelasi antara ekspresi *Cyclin D1* dan *grading* histopatologis digunakan uji analisa *Spearman rank-order correlation* dan koefisien kontingensi.

BAB 6

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

6.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Sampel diambil secara *systematic random sampling* pada seluruh blok parafin beserta catatan medik penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher di RSUD Dr. Soetomo Surabaya bulan Januari 2006 – Desember 2007. Sampel yang memenuhi syarat terkumpul sebanyak 30 buah blok parafin.

Tabel 3. Karakteristik sampel penelitian

	Grading			Total n=30
	Well Differentiated n=14	Moderately Differentiated n=7	Poorly/ Undifferentiated n=9	
Umur	57,3 ± 11,4	54,3±11,1	4,4±15,4	53,3±12,9
Jenis Kelamin				
- Laki-laki	11(42,3)	7(26,9)	8(30,8)	26(86,7)
- Perempuan	3(75,0)	0(0,0)	1(25,0)	4(13,3)

Tabel 4. Distribusi jenis kelamin dan umur pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Umur (tahun)	Jenis Kelamin				Jumlah (%)	
	Laki-laki (%)		Perempuan (%)			
0-9	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)
10-19	0	(0.00)	0	(0.00)	0	(0.00)
20-29	1	(3.3)	0	(0.00)	1	(3.3)
30-39	1	(3.3)	1	(3.3)	2	(6.7)
40-49	8	(26.7)	2	(6.7)	10	(33.3)
50-59	6	(20.00)	1	(3.3)	7	(23.3)
60-69	6	(20.00)	0	(0.00)	6	(20.00)
>70	4	(13.3)	0	(0.00)	4	(13.3)
Jumlah (%)	26	(86.7)	4	(13.3)	30	(100.00)

Jenis kelamin terbanyak pada penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher yang menjadi subyek penelitian ini adalah laki-laki, sebanyak 26 orang (86,67%). Umur penderita

pada penelitian ini antara 26 tahun sampai dengan 79 tahun, dengan rata-rata 53 tahun. Kelompok yang terbanyak adalah pada umur 40-49 tahun yaitu 10 orang (33,3%).

Tabel 5. Diagnosis klinis dan *grading* histopatologis penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher

No	Diagnosis Klinis	Grading Histopatologi			Total (%)
		Well Differentiated (%)	Moderately Differentiated (%)	Poorly/ Undifferentiated (%)	
1	Ca Gingiva	4 (100,0)			4 (100,0)
2	Ca Laring	6 (50,0)	5 (41,7)	1 (8,3)	12 (100,0)
3	Ca Lidah	3 (75,0)	1 (25,0)		4 (100,0)
4	Ca Maksila	1 (100,0)			1 (100,0)
5	Ca Nasal			3 (100,0)	3 (100,0)
6	Ca Nasofaring		1 (20,0)	4 (80,0)	5 (100,0)
7	Ca Tonsil			1 (100,0)	1 (100,0)
Total (%)		14 (46.7)	7 (23.3)	9 (30.0)	30 (100.0)

Diagnosis klinis yang terbanyak pada penelitian ini adalah karsinoma laring yaitu 12 orang dengan diferensiasi yang tersebar pada semua *grading* histopatologis. Empat sampel karsinoma gingiva, empat sampel karsinoma lidah dan satu sampel karsinoma maksila sebagian besar menunjukkan diferensiasi baik. Berbeda dengan lima sampel karsinoma nasofaring, tiga karsinoma nasal dan satu karsinoma tonsil yang menunjukkan diferensiasi yang buruk.

6.2. Hasil Pemeriksaan Immunohistokimia Ekspresi *Cyclin D1* pada Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher.

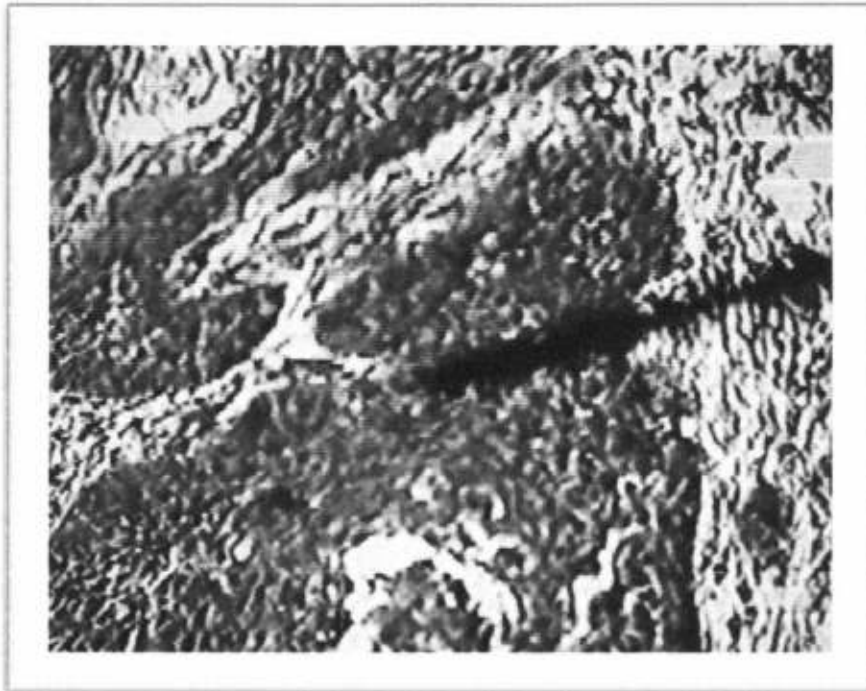
Hasil pemeriksaan ekspresi *Cyclin D1* dikelompokkan berdasar skor yang didapat dari penjumlahan hasil perkalian persentase ekspresi *Cyclin D1* pada sel karsinoma sel skuamosa kepala dan leher pada setiap intensitas imunoreaktif dengan skala terendah nol dan skala tertinggi 15. Pada penelitian ini tidak didapatkan hasil negatif pada ekspresi *Cyclin D1*. Skor ekspresi *Cyclin D1* terendah pada penelitian ini adalah tiga sebanyak dua (6,67%) sampel untuk *grading* histopatologis *well differentiated* dan skor tertinggi adalah 14 sebanyak satu (3,33%) sampel dengan *grading* histopatologis *undifferentiated*. Untuk *grading* histopatologis *well differentiated* pada penelitian ini mempunyai rentang skor terendah tiga

dan tertinggi delapan. Sedangkan untuk *grading* histopatologis *moderately differentiated* mempunyai rentang skor enam sampai dengan 11 dan untuk *poorly/ undifferentiated* rentang skornya adalah 10 sampai dengan 14. (lihat lampiran 4)

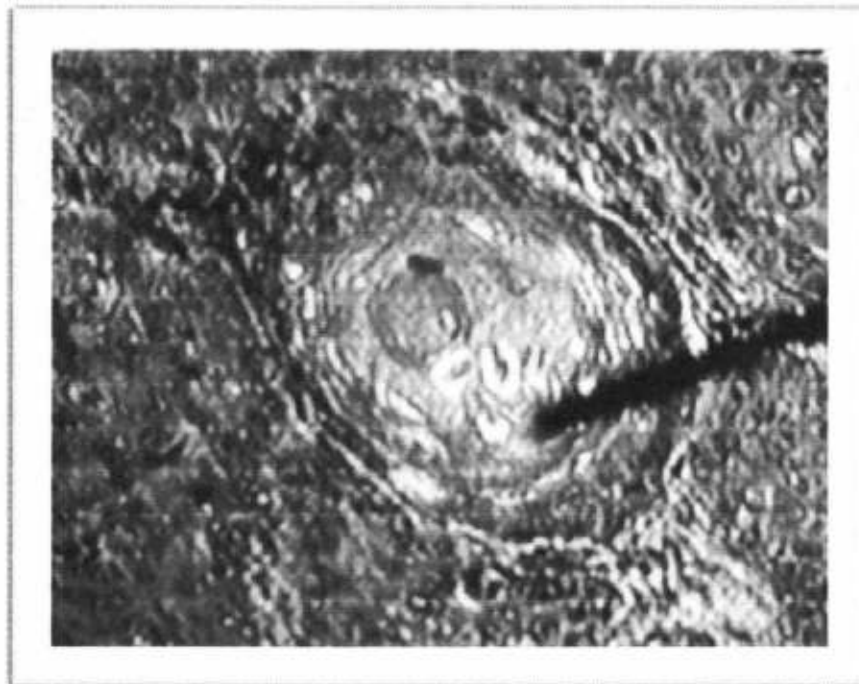
Tabel 6. Skor pemeriksaan imunohistokimia *Cyclin D1* dan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Skor	Grading histopatologi				Jumlah (%)			
	Well Differentiated (%)	Moderately Differentiated (%)	Poorly/ Undifferentiated (%)					
0								
1								
2								
3	2	(6.67)			2	(6.67)		
4								
5	5	(16.67)			5	(16.67)		
6	3	(10.00)	1	(3.33)	4	(13.33)		
7	2	(6.67)	2	(6.67)	4	(13.33)		
8	2	(6.67)	1	(3.33)	3	(10.00)		
9								
10			1	(3.33)	2	(6.67)		
11			2	(6.67)	3	(10.00)		
12					2	(6.67)		
13					1	(3.33)		
14					1	(3.33)		
15								
	14	(46.67)	7	(23.33)	9	(30.00)	30	(100.00)

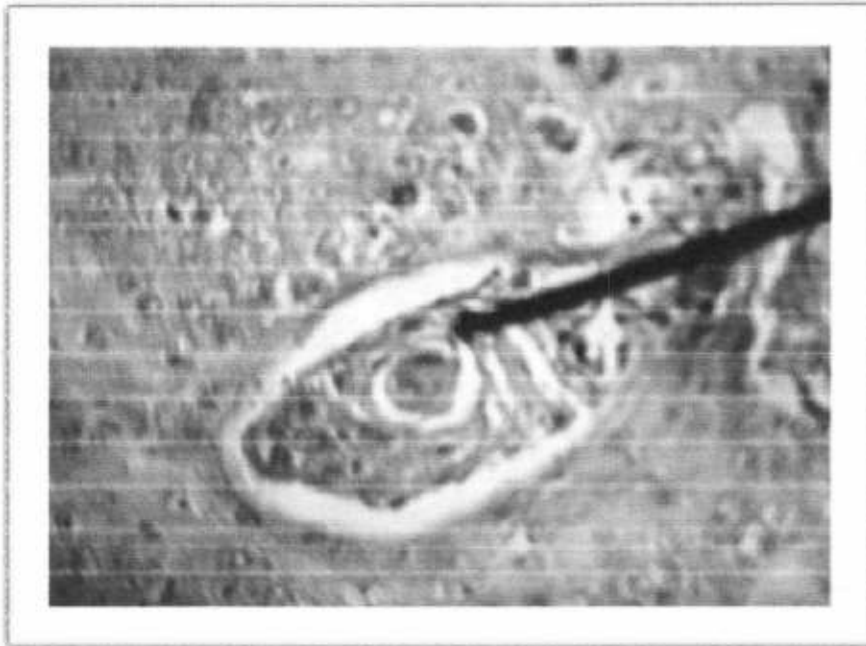
Gambar-gambar berikut adalah contoh pemeriksaan ekspresi *Cyclin D1* pada berbagai jenis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher pada *grading* histopatologis yang berbeda dengan intensitas imunoreaktif yang berbeda-beda pula.



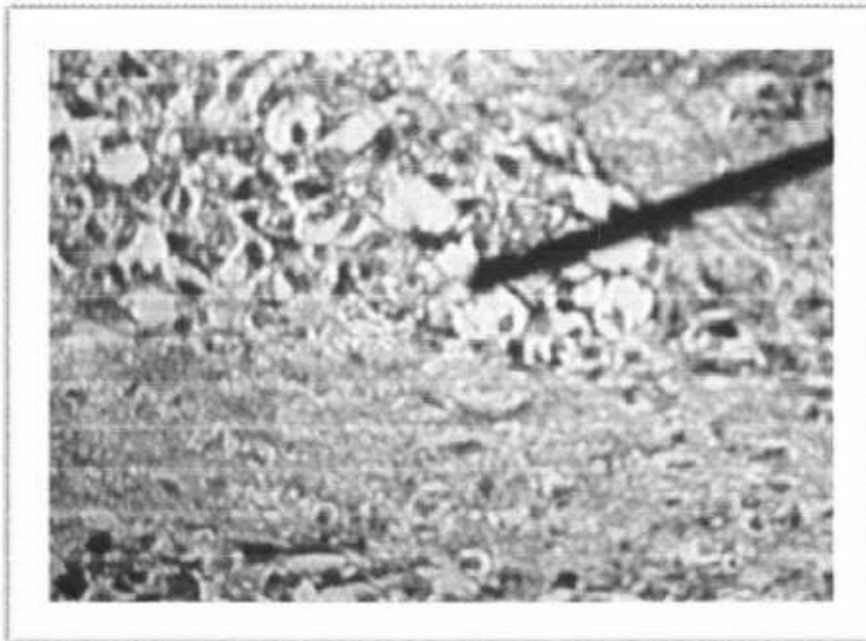
Gambar 3. Karsinoma Laring (T.4629/07) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Strong Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 100 kali.



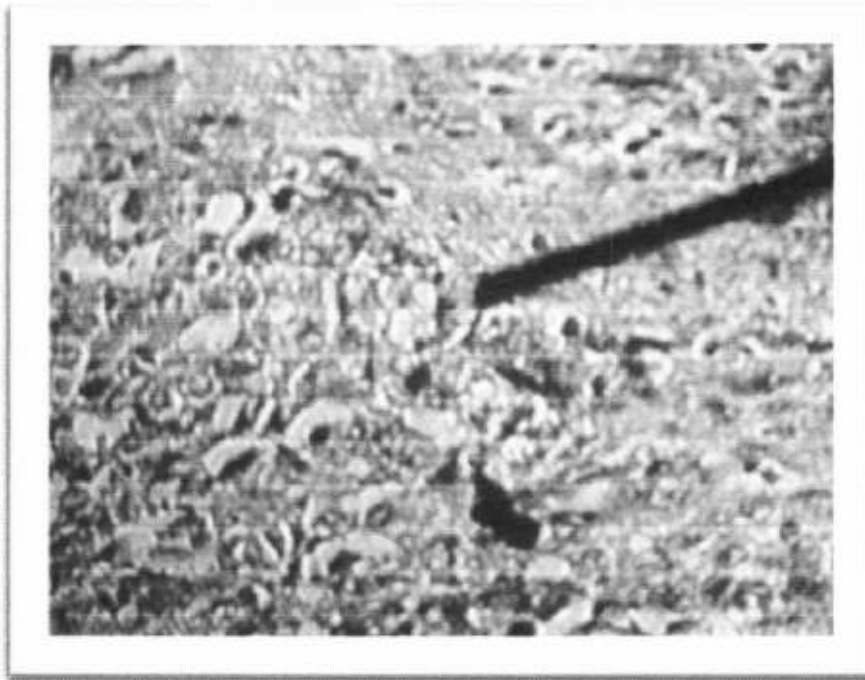
Gambar 4. Karsinoma Nasofaring (T.5475/07) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Strong Positive* dan 10% dengan intensitas *Medium Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali.



Gambar 5. Karsinoma Maksila (T.3886/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 20% dengan intensitas *Medium Positive* dan 60% dengan intensitas *Low Positive* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali.



Gambar 6. Karsinoma Maksila (T.3886/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 60% dengan intensitas *Low Positive* dan 20% dengan intensitas *Negative* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali.



Gambar 7. Karsinoma Lidah (T.6098/06) yang menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* 90% dengan intensitas *Negative* dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 200 kali.

6.3 Analisis hasil penelitian

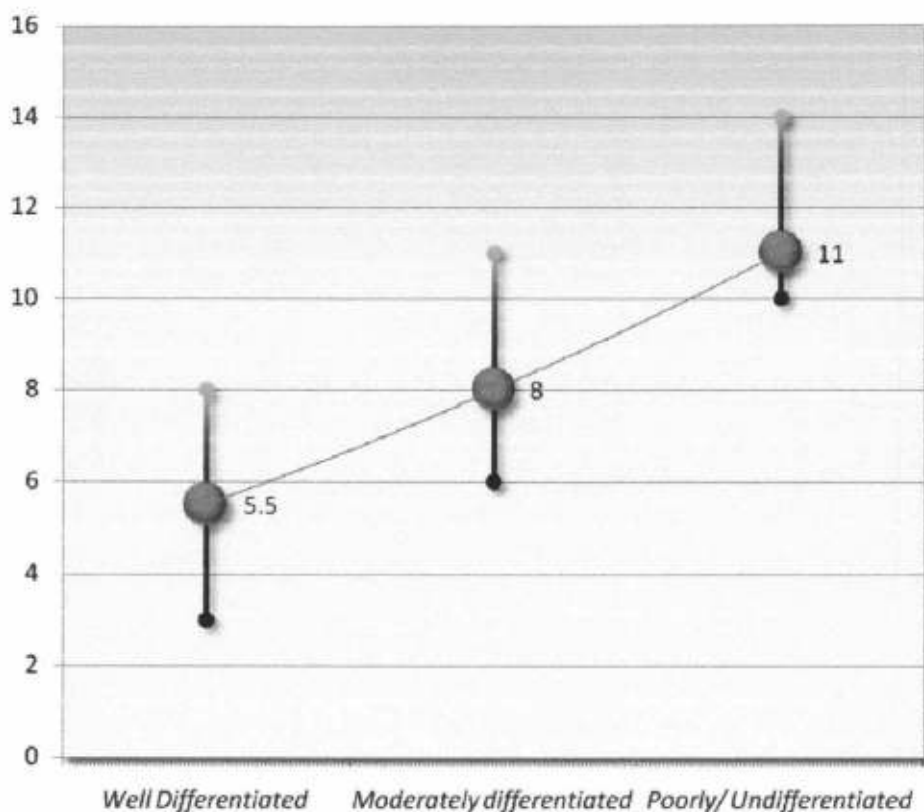
Hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan ekspresi *Cyclin D1* mempunyai korelasi yang signifikan dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,84 (lihat lampiran 5). Hal ini berarti bahwa semakin kuat intensitas ekspresi *Cyclin D1* maka semakin jelek derajat diferensiasi sel (gambar 8).

Tabel 7. Uji Korelasi Spearman ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

			<i>Grading</i>	Ekspresi <i>Cyclin D1</i>
Spearman's rho	<i>Grading</i>	Corelation Coefficient	1.000	0.840**
		Sig. (2- tailed)	.	0.000
		N	30	30
	Ekspresi <i>Cyclin D1</i>	Corelation Coefficient	0.840**	1.000
		Sig. (2- tailed)	0.000	.
		N	30	30

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Ekspresi Cyclin D1



Gambar 8 Grafik hubungan antara median skor ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Dengan menggunakan penilaian ekspresi menurut Pinilla, 2004 maka dapat dibuat tabulasi silang dari hasil penelitian ini.

Tabel 8. Tabulasi silang ekspresi *Cyclin D1* dengan nilai *cut off* 5% dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

		Ekspresi Cylin D1		Total
		Positif	Negatif	
Grading Histopatologi	Well Differentiated (%)	9 (64.3)	5 (37.5)	14 (100.0)
	Moderately Differentiated (%)	4 (57.1)	3 (42.9)	7 (100.0)
	Poorly/ undiferentiated (%)	9 (100)	0 (0,0)	9 (100.0)
Total (%)		22 (73.3)	8 (26,7)	30 (100,0)

BAB 7 PEMBAHASAN

7.1 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 14 (46,7%), 7(23,3%) dan 9 (30,0%). Usia terbanyak yaitu kelompok rentang usia 40-49 tahun (33,3%) yang sesuai dengan kepustakaan bahwa insiden karsinoma sel skuamosa kepala leher lebih banyak pada usia 40 tahun ke atas dengan puncaknya pada dekade kelima dan keenam. 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. Rasio laki-laki dibandingkan perempuan lebih dari 2:1. Perbedaan rasio laki-laki dibanding perempuan lebih besar 4 sampai 5 kali pada laki-laki pada tumor-tumor laring. Rasio ini berkurang dalam 20 tahun terakhir, kemungkinan disebabkan makin meningkatnya perempuan yang merokok.(Wein, 2005; Vokes, 1993).

Karsinoma sel skuamosa adalah jenis kanker terbanyak yang ditemukan pada keganasan rongga mulut. Seperti pada karsinoma sel skuamosa lainnya keganasan rongga mulut berdasarkan perubahan intra epitelialnya dapat digolongkan ke dalam tingkatan ringan, sedang dan berat. Karsinoma yang invasif mempunyai derajat diferensiasi baik, sedang dan buruk. Meskipun pemeriksaan derajat diferensiasi pada karsinoma sel skuamous sangat subjektif tetapi hampir kebanyakan ahli patologi menggunakan cara ini. Sistem yang digunakan secara luas dalam penentuan derajat diferensiasi mencakup tiga kategori: (1)derajat diferensiasi baik, bila tumor tersebut terdiri dari sekumpulan besar sel-sel skuamosa dan sering kali terdapat fokus-fokus keratin yang berbentuk seperti mutiara, (2) derajat diferensiasi sedang, bila tumor terdiri dari sekumpulan sel-sel skuamosa yang lebih kecil dengan sel-sel yang pleomorfis dan aktifitas mitosis sedang, dan (3) derajat diferensiasi buruk, bila tumor terdiri dari sel-sel yang anaplastik dengan gambaran pleomorfisme dan mitosis yang prominen. Batas tumor pada derajat diferensiasi buruk biasanya tidak tegas dan menunjukkan invasi ke stroma. (Tawfik, 2007). Alternatif lain yang digunakan adalah dengan

menggunakan sistem Broders seperti yang telah dijelaskan pada bab tinjauan pustaka. (Reichart, 2006).

Dari 30 sampel yang diteliti, pada karsinoma rongga mulut, termasuk di dalamnya karsinoma lidah 4(100%) dan karsinoma gingiva 3(75%) menunjukkan derajat diferensiasi baik (tabel 5). Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Tawfik (2007) yang menyebutkan bahwa memang sebagian besar karsinoma di rongga mulut menunjukkan derajat diferensiasi yang baik. Sedangkan untuk karsinoma laring dan hipofaring, Gale (2007) menyatakan sebagian besar karsinoma laring mempunyai derajat diferensiasi baik sampai sedang dan karsinoma di hipofaring mempunyai derajat diferensiasi sedang sampai buruk. Variasi derajat diferensiasi sering kali didapatkan dalam satu tumor, tetapi dalam penentuan derajat diferensiasi harus didasarkan pada daerah yang mempunyai diferensiasi terburuk. Pada penelitian ini didapatkan karsinoma laring berdiferensiasi baik 6(50%), sedang (41,7%) dan buruk 1 (8,3%).

Karsinoma sino nasal adalah tumor yang terletak di vestibulum nasi dan sinus-sinus paranasalis. Karsinoma ini dapat berasal dari berbagai jenis sel. Karsinoma sel skuamosa adalah yang paling sering didapatkan dan biasanya mempunyai derajat diferensiasi buruk dan tidak berdiferensiasi (*undifferentiated*). Karsinoma sino nasal yang tidak berdiferensiasi mempunyai derajat keganasan yang tinggi. Dari namanya menunjukkan bahwa tumor ini tidak menunjukkan gambaran epitel skuamosa. Pada pemeriksaan histopatologi hanya didapatkan sel-sel yang anaplastik dengan rasio inti sel yang lebih besar dan aktifitas mitosis yang tinggi.(Tawfik,2007) Pada penelitian ini didapatkan 3 (100%) kasus karsinoma sinonasal dan semuanya mempunyai diferensiasi yang buruk atau tidak berdiferensiasi.

Karsinoma nasofaring adalah karsinoma sel skuamosa yang sering terjadi pada usia dekade keempat sampai dengan dekade keenam. Karsinoma ini mempunyai tiga varian yaitu: (1) *Keratinizing*, karsinoma sel skuamosa konvensional, (2) *Non keratinizing*, karsinoma sel skuamosa yang berdiferensiasi, dan (3) *Non keratinizing*, karsinoma sel skuamosa yang tidak berdiferensiasi. Enam puluh persen bentuk karsinoma nasofaring adalah bentuk *Non Keratinizing*, karsinoma sel skuamosa yang tidak berdiferensiasi.

(Tawfik,2007) Pada penelitian ini didapatkan 4(80%) kasus karsinoma nasofaring dengan derajat diferensiasi buruk/ tidak berdiferensiasi dan 1 (20%) berdiferensiasi sedang.

Derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa sebagai faktor prognostik kebermaknaannya masih merupakan kontroversi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa derajat diferensiasi mempunyai pengaruh yang cukup bermakna pada prognosis, sedangkan pendapat lain tidak sepenuhnya setuju pada pengamatan ini. (Chiesa,1999).

7.2 Korelasi antara Ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Berdasarkan hasil pemeriksaan imunohistokimia, ekspresi *Cyclin D1* secara semikuantitatif didapatkan ekspresi *Cyclin D1* pada seluruh penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan ekspresi dan intensitas imunostaining yang berbeda-beda sesuai dengan derajat diferensiasinya. Dengan menggunakan nilai *cut off* 5% maka dari sampel yang diteliti menunjukkan hasil ekspresi *Cyclin D1* yang positif sebesar 73,3% sementara penelitian lain menunjukkan hasil 35% sampai 64%. (Donellan, 1998).

Pada jaringan normal antibodi DCS-6 yang digunakan untuk memeriksa ekspresi *Cyclin D1* akan melabel sel-sel fibroblas, endotel, epitel dari regio kepala dan leher, epidermis, folikel rambut, serviks, vagina, rektum dan sel epitel transisional buli-buli secara heterogen. Sel dendrit dilaporkan menunjukkan imunoreaktivitas baik di inti sel maupun pada sitoplasma. Secara umum, semua jaringan epitel normal akan menunjukkan ekspresi yang rendah terhadap antibodi *Cyclin D1* dan terbatas pada zona proliferasi. Jaringan normal yang menunjukkan hasil negatif pada pemeriksaan *Cyclin D1* adalah otot, ginjal, liver, kelenjar ekrin dan apokrin adneksa kulit. Jaringan limfoid normal tidak akan terlabel oleh antibodi ini.

Pada penelitian ini untuk karsinoma sel skuamosa yang berdiferensiasi baik sebagian besar menunjukkan intensitas imunoreaktivitas rendah dan negatif sedangkan untuk derajat diferensiasi buruk menunjukkan imunoreaktivitas sedang sampai kuat. (lihat lampiran 3). Dari hasil pemeriksaan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada derajat diferensiasi yang buruk intensitas imunostaining akan semakin kuat.

Beberapa penelitian imunohistokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa anti *Cyclin D1* terekspresi berlebihan pada inti sel pada berbagai keganasan dengan berbagai macam histogenesis. Dari 212 tumor primer yang pernah diteliti termasuk di dalamnya limfoma sel Mantle, adenoma paratiroid dan karsinoma lainnya seperti karsinoma payudara, karsinoma sel skuamosa, karsinoma ovarium dan karsinoma sel transisional buli-buli menunjukkan peningkatan imunoreaktivitas *Cyclin D1*. Pada limfoma sel Mantle ekspresi *Cyclin D1* meningkat diatas 80% pada sumsum tulang dan ekspresi ini tidak ditemukan pada sel B normal dan limfoma sel B lainnya. Pemeriksaan imunohistokimia *Cyclin D1* bersama-sama dengan marker yang lain sangat berguna untuk mendiferensiasi berbagai neoplasma. (Leong, 1999)

Pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini menunjukkan korelasi yang bermakna antara ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,84. Secara jelas korelasi ini dapat dilihat pada grafik hubungan antara median skor ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher (gambar 8). Dari grafik tersebut terlihat jelas bahwa semakin kuat ekspresi *Cyclin D1* maka semakin jelek derajat diferensiasi sel.

Dengan uji koefisien kontingensi tidak didapatkan korelasi antara ekspresi *Cyclin D1* dengan derajat diferensiasi sel dengan nilai koefisien kontingensi sebesar 0,091 pada α 0,05. Perhitungan ini menunjukkan hasil yang berbeda dengan koefisien korelasi Spearman. Hal ini dapat disebabkan karena pada uji koefisien kontingensi digunakan data nilai *cut off* 5% untuk ekspresi *Cyclin D1* yang dikategorikan menjadi positif dan negatif. Sedangkan uji korelasi Spearman menggunakan data skoring seperti pada lampiran 4. Penilaian ekspresi *Cyclin D1* menjadi dua kategori ini memberikan hasil uji statistik yang berbeda karena bila dibandingkan dengan cara skoring perbedaaan ekspresi dan intensitas imunostaining antar kelompok *grading* histopatologi menjadi semakin lebih nyata.

Ekspresi berlebihan *Cyclin D1* akan mengakibatkan siklus pembelahan sel kanker menjadi lebih cepat dan singkat karena *Cyclin D1* sangat memegang peranan penting dalam mengendalikan siklus sel pada transisi dari fase G1 ke fase S siklus sel. Aktifitas *Cyclin D1* bersama-sama CDK akan segera menyelesaikan fase G1 pada siklus sel. Kompleks *Cyclin D1* dan CDK4 atau CDK6 akan memfosforilasi protein retinoblastoma

sehingga menghambat fungsi inhibitor pertumbuhan sel dan akhirnya mendorong sel masuk kedalam fase S dan seterusnya percepatan dalam mitosis sel kanker. Percepatan fase G1 ini menyebabkan sel tidak masuk ke dalam fase G0, di mana pada fase ini sel akan tumbuh menjadi sel yang dewasa dan mengalami diferensiasi. Mitosis yang prominen ini yang menyebabkan derajat diferensiasi menjadi buruk karena salah satu penentu dari *grading* histopatologi adalah gambaran aktifitas mitosis sel-sel kanker. Semakin prominen aktifitas mitosis semakin buruk derajat diferensiasi suatu kanker. (Angadi et al. 2007)

Ada beberapa hal yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan imunohistokimia antara lain adalah proses preparasi jaringan sampai pengecatan imunohistokimia yang kurang sempurna. Pemeriksaan imunohistokimia adalah salah satu prosedur pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi adanya antigen tertentu pada potongan jaringan. Dasar pemeriksaan ini adalah adanya reaksi antigen antibodi dengan menggunakan antibodi yang sudah diberi label.

Preparasi jaringan memegang peranan penting dalam pemeriksaan imunohistokimia ini. Proses preparasi jaringan meliputi : fiksasi jaringan, dehidrasi, pembuatan parafin blok, pemotongan jaringan dengan mikrotom, deparafinisasi, *antigen retrieval*, dan pengecatan imunohistokimia. Kesalahan salah satu dari langkah ini akan memberikan hasil pemeriksaan yang kurang baik.

Fiksasi yang kurang adekuat akan menyebabkan interpretasi yang salah pada pengecatan. Sebagai contoh adalah terjadinya elusi, yaitu proses perpindahan reseptor protein yang berasal dari inti sel larut ke dalam sitoplasma. Pada keadaan ini antigen dapat terdeteksi di dalam sitoplasma sehingga pembacaan pewarnaan akan menghasilkan positif palsu. Yang pada kenyataannya antigen tersebut seharusnya berada terlokalisir di dalam inti sel. (Farmilio, 2006)

Fiksasi jaringan dengan segera dan adekuat sangat esensial untuk mempertahankan morfologi jaringan. 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. Fiksasi yang tidak adekuat atau terlalu lama akan menurunkan kemampuan antigen dalam mengikat antibodi. Fiksasi atau pengawetan jaringan bertujuan untuk

menghentikan dengan segera proses biokimia yang terjadi didalam sel. Jaringan yang masih segar dari operasi harus segera dimasukkan ke bahan fiksasi, keterlambatan fiksasi jaringan akan menyebabkan dekomposisi jaringan sehingga merusak morfologi jaringan dan antigen sel. Selain itu fiksasi jaringan juga berfungsi untuk menambah afinitas protoplasma terhadap pewarnaan, dan mempertahankan sel dari larutan hipotonis dan hipertonis. (Farmilio, 2006)

Fiksasi formalin umumnya lebih baik dalam mempertahankan antigen dibandingkan dengan bahan fiksasi yang lain. 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. Waktu optimum fiksasi menggunakan formalin tergantung ukuran blok jaringan dan jenis jaringan. Fiksasi antara 18 sampai 24 jam cukup optimal untuk mempertahankan jaringan. Fiksasi yang terlalu singkat menyebabkan timbulnya perubahan warna ditepi jaringan dan tidak ada sinyal warna ditengah jaringan. Fiksasi yang terlalu lama akan menyebabkan penutupan seluruh epitop antigen sehingga antigen tidak terdeteksi dengan antibodi, walaupun menggunakan tehnik *antigen retrieval*.

Setelah dilakukan fiksasi, perlu dilakukan dehidrasi. Dehidrasi bertujuan membuang air dan menggantinya dengan larutan organik. Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan kedalam alkohol dengan beberapa konsentrasi. Alkohol bersifat hidrofobik, sehingga dapat menyerap cairan di dalam jaringan tanpa merusak struktur jaringan. Proses dehidrasi yang tidak adekuat dapat menyebabkan denaturasi protein oleh air, sehingga akan merusak struktur jaringan. (Farmilio, 2006)

Blok parafin merupakan salah satu cara pengawetan jaringan dimana kita dapat memperoleh jaringan untuk bahan pemeriksaan histopatologi yang ukurannya lebih besar, dapat bertahan lama, antigen yang terkandung dalam jaringan dapat diselamatkan, dan penyimpanannya relatif mudah. Pembuatan blok parafin juga bertujuan agar pembedahan jaringan dengan mikrotom menjadi lebih mudah. Beberapa antigen tertentu tidak dapat bertahan dengan proses fiksasi dan pembuatan parafin blok. Dalam hal ini dapat digunakan tehnik potong beku (*frozen section*) untuk pengecatan imunohistokimia. Pemeriksaan potong beku lebih baik dalam mempertahankan fungsi enzim dan antigen jaringan dibandingkan dengan pembuatan

parafin blok. Kerugian dari teknik potong beku adalah : morfologi jaringan yang kurang baik, resolusi yang buruk pada pembesaran yang tinggi dari mikroskop, dibutuhkan penyimpanan yang khusus, teknik pemotongan yang lebih sulit dan lebih tebal dengan mikrotom karena kristal es tidak terpotong, dan keterbatasan preparat untuk disimpan lebih lama. (Farmilio, 2006)

Deparafinisasi dilakukan setelah pemotongan jaringan. Deparafinisasi bertujuan untuk membuang seluruh parafin yang ada pada jaringan. Deparafinisasi yang kurang baik akan menghasilkan pengecatan yang kurang baik.

Inkubasi pengecatan imnohistokimia ini memerlukan waktu satu malam, inkubasi ini memberikan kesempatan seluruh antigen dapat berikatan dengan antibodi. Pemberian peroksidase (H_2O_2) bertujuan menekan aktivitas peroksidase endogen, dengan demikian akan mengurangi pewarnaan pada latar belakang jaringan. Kualitas peroksidase yang kurang baik akan menyebabkan hasil pewarnaan menjadi kurang sempurna. Pemilihan bahan *chromogen* untuk memberikan perubahan warna harus sesuai dengan label *enzym* yang dipakai. Pada penelitian ini dipakai *enzym Horseradish peroksidase (HRP)* dan substrat *diaminobenzidine (DAB)*, karena bahan ini memberikan intensitas pewarnaan yang baik dan permanen. Kerugian dari bahan *chromogen* ini adalah adanya aktivitas *peroksidase* endogen menyebabkan hasil pewarnaan menjadi *false positif*. Teknik pengecatan imunohistokomia pada penelitian ini menggunakan metode tidak langsung, yang lebih baik dalam mengidentifikasi antigen dibandingkan dengan metode langsung. (Farmilio, 2006)

Dari pembahasan mengenai proses peaparsi jaringan sampai pengecatan, terlihat bahwa banyak sekali faktor-faktor yang dapat menyebabkan hasil pengecatan imunohistokimia menjadi kurang sempurna. Untuk mendapatkan hasil pengecatan imunohistokimia yang baik maka diperlukan bahan preparat jaringan yang baik, bahan-bahan pengecatan yang baik, standarisasi kerja, dan tenaga yang terampil dan khusus dibidang ini.

7.3 Manfaat pemeriksaan *Cyclin D1* dalam penentuan prognostik penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Cyclin D1, atau yang dikenal juga dengan PRAD1, adalah protoonkogen yang terletak pada kromosom 11q13 yang berfungsi untuk mengendalikan siklus sel pada fase G1. Pada respon mitogen ekstraseluler, kadar *Cyclin D1* meningkat dan bersama sama CDK akan memediasi fase G1 melalui fosforilasi pRb. Overekspresi *Cyclin D1* akan memperpendek fase G1 dan menurunkan ketergantungan proliferasi sel terhadap mitogen. Zwijsen et al. (1996) menyatakan bahwa overekspresi *Cyclin D1* pada sel epitel karsinoma payudara akan mengalami pengurangan memasuki fase G0 pada kondisi *growth factor* yang terbatas sehingga hasil akhirnya terjadi akselerasi pertumbuhan sel. Penelitian lainnya mengatakan bahwa deregulasi *Cyclin D1* akan meningkatkan agresivitas secara keseluruhan pada beberapa kanker tertentu dengan cara desensitisasi proliferasi sel terhadap signal-signal inhibitor. (Zwijsen et al. 1996)

Pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, deregulasi *Cyclin D1* telah diukur dengan berbagai macam metode. Pada tingkat protein, beberapa penelitian telah menilai ekspresi *Cyclin D1* dengan pemeriksaan imunohistokimia. Pada tingkat DNA dengan menggunakan teknik sitogenetik, analisa *Southern blot*, PCR dan FISH telah digunakan untuk mengukur amplifikasi gen *Cyclin D1*. (Alavi et al. 1999)

Meskipun secara pasti *Cyclin D1* sebagai faktor prognostik belum dikatakan signifikan, tetapi beberapa bukti telah menunjukkan hubungan antara overekspresi *Cyclin D1* dengan prognostik yang buruk. Pada pasien-pasien yang secara klinis tidak didapatkan kelenjar leher yang positif, ekspresi *Cyclin D1* pada tumor primer mempunyai risiko empat kali lebih besar ditemukannya kelenjar yang positif pada pemeriksaan histopatologi kelenjar getah bening leher yang dilakukan RND. (Cappacio et al. 2000). Bova et al. (1999) menyatakan bahwa overekspresi *Cyclin D1* dapat meramalkan jeleknya interval bebas penyakit dan *survival* secara keseluruhan pada 148 pasien karsinoma lidah stadium I sampai IV yang dilakukan operasi (42 pasien mendapatkan radioterapi post operatif). Sama halnya, Michalides et al. (1997) mengemukakan bahwa overekspresi *Cyclin D1* berhubungan dengan memendeknya interval bebas penyakit pada 115 pasien karsinoma sel skuamosa kepala dan leher yang dioperasi (73 pasien mendapatkan radioterapi post operatif). Pignataro et al. (1998)

menyatakan bahwa overekspresi *Cyclin D1* akan meningkatkan risiko kekambuhan dua kali lipat pada 149 pasien karsinoma laring stadium I sampai IV yang dilakukan operasi (63 pasien mendapatkan radioterapi post operatif). Setidaknya masih ada lima penelitian lain yang mendapatkan pada pengamatan kohort dari 45 sampai 95 pasien menunjukkan hubungan antara deregulasi *Cyclin D1* dengan jeleknya prognosis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. (Nogueira, 1998; Kyomoto, 1997; Bellacosa, 1996; Meridith, 1995; Lazar, 1998) Akhirnya, Yoo et al. (2000) mengemukakan bahwa overekspresi *Cyclin D1* pada 60 pasien karsinoma laring T1 dan T2N0 yang hanya dilakukan eksternal radiasi pada penelitian kasus kontrol mempunyai risiko untuk mengalami rekurensi lokal yang lebih besar.

Penelitian-penelitian di atas membuktikan bahwa deregulasi *Cyclin D1* mempunyai nilai prognostik yang penting dalam menilai interval bebas penyakit dan *survival* secara keseluruhan pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher yang dilakukan operasi dengan atau tanpa adjuvan radiasi.

7.4 *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor* (CDK inhibitor) untuk pengobatan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang menyatakan bahwa pada kanker terjadi kegagalan sel dalam meregulasi siklusnya maka berkembang suatu pemikiran bahwa dalam mengobati kanker selain pendekatan yang sudah ada, maka perlu dicari suatu agen/ obat anti kanker yang berkerja pada regulasi siklus sel. Terapi ini ditujukan langsung kepada *Cyclin Dependent Kinase*. Pada kanker terjadi pemendekan fase G1-S dan terjadi amplifikasi gen *Cyclin D1* pada karsinoma sel skuamosa, payudara, esofagus, buli-buli dan paru. *Cyclin D2* dan *D3* juga mengalami overekspresi pada beberapa karsinoma kolorektal. *Cyclin D* ini sangat berubungan dengan kinase-kinase CDK4 dan CDK6 yang juga mengalami overekspresi pada beberapa kanker. Mutasi atau delesi CDK4 dan CDK6 inhibitor INK4 ditemukan pada *familial melanoma*, kanker traktus biliari, esofagus, kepala dan leher, kanker paru *non small cell*, dan karsinoma ovarium. Inaktifasi mutasi CDK4 inhibitor modulator p15,p16 dan p18 juga telah diamati secara luas pada

berbagai jenis kanker pada manusia. *Cyclin E* juga mengalami amplifikasi dan overekspresi pada beberapa karsinoma payudara dan leukemia.

Sejak 30 tahun terakhir, banyak penelitian yang berusaha mengendalikan dan meregulasi siklus sel mulai pada sel jamur sampai akhirnya berkembang ke sel manusia. Dari penemuan-penemuan ini, intervensi farmakologi terhadap siklus sel menjadi topik yang menarik dalam membuat strategi melawan kanker karena kebanyakan sel kanker menunjukkan penyimpangan dalam siklus selnya. Kunci utama siklus sel adalah protein Retinoblastoma (pRb) yang akan terfosforilasi oleh CDK. CDK sendiri diaktifasi oleh berbagai macam *Cyclin* dan secara alami akan diinaktivasi oleh Inhibitor of Cyclin Dependent Kinase (INK) dan Kinase inhibitory protein (Kip). Maka dari itu penelitian peran CDK dalam proliferasi sel kanker mengalami perkembangan dan sangat menarik perhatian dalam dekade terakhir. Beberapa CDK inhibitor saat ini telah diteliti dan dievaluasi melalui uji-uji klinis, termasuk golongan ini adalah *flavopiridol*, *UCN-01* (*7-hydroxystaurosporine*), *R-roscovitine* (*CYC202*, *seliciclib*), *BMS-387032*, *Ro31-7453*, dan *E7070*. Saat ini penelitian klinis difokuskan pada kegunaan obat-obat tersebut sebagai obat kombinasi dengan berbagai macam obat sitotoksik lainnya. (Sridhar, 2007)

Aktifasi faktor-faktor yang menghambat CDK seperti p15(INK4) atau p27(Kip1) dan inhibisi CDK merupakan cara yang potensial untuk menghambat jalur proliferasi sel yang berlebihan pada sel-sel kanker. Dengan kata lain inhibisi *Cyclin D1*, *Cyclin E*, dan CDK khususnya CDK4 dan CDK6 dapat menjadi sasaran terapi untuk menghambat pertumbuhan kanker.

BAB 8

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

- Ekspresi *Cyclin D1* didapatkan pada semua karsinoma sel skuamosa kepala leher yang diteliti dengan ekspresi dan intensitas imunostaining yang berbeda-beda sesuai dengan derajat diferensiasinya.
- Dengan nilai *cut off* 5% dari karsinoma sel skuamosa kepala leher yang diteliti menunjukkan ekspresi *Cyclin D1* yang positif sebesar 73,3%.
- Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi *Cyclin D1* dengan *grading* histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher. Semakin jelek derajat diferensiasi sel, makin kuat ekspresi *Cyclin D1*.

SARAN

- Diharapkan adanya penelitian prospektif lebih lanjut mengenai *Cyclin D1* sebagai salah satu faktor prognostik karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan faktor-faktor lain yang mempengaruhi prognostik penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, misalnya dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening leher dan sebagainya.
- Dengan didaptkannya ekspresi *Cyclin D1* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, maka diharapkan dapat mendorong penelitian-penelitian lebih lanjut tentang penggunaan inhibitor CDK sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan ini.
- Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang ekspresi *Cyclin D1* pada berbagai jenis keganasan lainnya seperti pada keganasan kolorektal, payudara, prostat dan lain-lain.

Daftar Pustaka

1. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. Cell proliferation and differentiation. In Donald W, Raphael E, Pollock, editors. *Holland Frei: Cancer Medicine*. 6th ed. London: BC Decker Inc; 2003.p.126-34.
2. Alavi S, Namazie A, Calcaterra TC, et al. Clinical application of fluorescence in situ hybridization for chromosome 11q13 analysis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1999; 16: 874-79.
3. Angadi PV, Krishnapillai R, Karnataka D. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: Correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e30-5.
4. Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23:4215-24.
5. Beenken SW, Urist MM. Head and Neck Tumors. In: Way LW, Doherty GM, editors. *Current Surgical Diagnosis and Treatment*. 11th ed. New York: McGraw Hill; 2003.p.282-97.
6. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, et al. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: Prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 1996;2:175-80.
7. Bova RJ, Quin DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK41 expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999;5:2810-9.
8. Bratthauer GL, Adam LR. Immunohistochemistry: Antigen detection in tissue in advanced laboratory methods in histology and pathology. *Armed Forces Institute of Pathology* 1994; 1: 1-40.
9. Buffa FM, Bentzen SM, Daley FM. Molecular marker profiles predict locoregional control of head and neck squamous cell carcinoma in randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3745-54.
10. Cappacio P, Pruneri G, Carboni N, et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patient with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck* 2000;22:234-40.
11. Cell cycle: A brief overview. Available from URL:http://www.emdbioscience.com/print/CBC/cell_cycle_info.html

12. Chan JKC, Miller KD, Munson P, Isaacson PG. Immunostaining for Cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? *Histopathology* 1999;34:266-70.
13. Chiesa F, Mauri S, Tradati N, et al. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the Millennium. *Oral Oncol.* 1999;35:257-65.
14. Concus AP, Benninger MS. Genetics. In Byron J, Bailey, Karen H, editors. *Head and Neck Surgery – Otolaryngology*. 3rd ed. New York: Lippincot Williams and Wilkins Publisher; 2001.p.80-102.
15. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robins: *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999.p.117-28.
16. Cyclin D1, another molecule of the year [editorial]. *Ann Oncol* 1996; 7: 223-5.
17. Donellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol : Mol Pathol* 1998;51:1-7.
18. Espat J, Carew JF, Shah JP. Cancers of the head and neck. In: Bland KI, Daly JM, Karakousis CP, editors. *Surgical Oncology Contemporary Principles and Practice*. New York: Mc Graw-Hill; 2003.p.519-44
19. Farnilo AJ. Fixation and Processing, In: Key M., editors. *Immunohistochemical Staining Methods*. 4th ed. California: Dako; 2006.p.27-35.
20. Fortin A, Guerry R, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: No correlation with subclinical lymphnode invasion and disease recurrence. *Clin Cancer Res* 1997;3:1909-14.
21. Fu M, Wang C, Li Z. Minireview: Cyclin D1 normal and abnormal functions. *Endocrinol* 2004; 145: 5439-47.
22. Greene FL, Page DL, Fleming. *AJCC cancer staging handbook*. 6th ed. New York: Springer – Verlag; 2002.p.88-92.
23. Hu G, Lee H, Price SM et al. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of Cyclin D1. *Development* 2001; 128: 2373-84.
24. IDG Sukardja. *Onkologi Klinik*. Surabaya: Airlangga University Press; 1996.p. 13-45.
25. Izzo JG, Pappadimitrakopoulou VA, Liu DD. Cyclin D1 genotype, respons to biochemoprevention and progression rate to uper aerodigestive track cancer. *J Nat Cancer Inst* 2003; 95: 198-204.

26. Jeannon JP, Wilson JA. Cyclins, cyclin dependent kinases, cyclin dependent kinase inhibitors and their role in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol* 1998; 23: 420-4.
27. Kastan MB, Skapek SX. Molecular biology of cancer: The cell cycle. In Devita VT, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. New York: Lippincot Williams and Wilkins; 2001.p.130-42.
28. Kohmura T, Hasegawa Y, Ogawa T. Cyclin D1 and p53 overexpression predict multiple primary malignant neoplasm of the hypopharynx and esophagus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1351-4.
29. Kouraklis G, Theocharis S, Vamvakas P. Cyclin D1 and Rb protein expression and their correlation with prognosis in patient with colon cancer. *World J Surgical Oncol* 2006; 4:5.
30. Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, et al. Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factors than its protein overexpression in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74: 576-81.
31. Lam KY, Ng IOL, Yuen AP. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: Clinicopathological relevance and corelation with p53 expression. *J Oral Pathol Med* 1999; 29:167-72.
32. Lamb J, Ramaswamy S, Ford HL. A Mechanismm of Cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 2003; 114: 323-34.
33. Lazar AD, Winter MR, Nogueira CP et al. Loss of heterozygosity at 11q23 in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with recurrent disease. *Clin Cancer Res* 1998;4:2787-93.
34. Leong AS, Cooper K, Leong FJ. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. London: Oxford University Press; 1999. p.127-8.
35. Liu SC, Zhang SY, Babb JS. Image cytometri of Cyclin D1: A prognostic marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention* 2001; 10: 455-9.
36. Masuda M, Suzui M, Yasumato R. Constitutive activation of signal transducer and activators of transcription 3 correlates with Cyclin D1 overexpression and may provide novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3351-5.

37. Mechalides Rj, van Veelen NM, Kristel PM et al. Overexpression of Cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502.
38. Meridith SD, Levine PA, Burns JA, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:790-94.
39. Mineta H, Miura K, Takebayashi S. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Oncol* 2000; 36:194-8.
40. Muller D, Millon R, Velten M et al. Amplification of 11q13 DNA markers in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 1997; 33:2203-10.
41. Nogueira CP, Dolan RW, Gooley J, et al. Inactivation of p53 and amplification of Cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1998;108:345-50.
42. Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L. Cyclin D1 and p16 alteration in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: Role in response to chemoprevention and cancer development. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3127-34.
43. Patei V, Sanderowicz AM, Pinto DJ. Flavopiridol, a novel CDK inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinoma by introducing apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 102:1674-81.
44. Pignataro L, Pruneri G G, Carboni N et al. Clinical relevance of Cyclin D1 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3069-77.
45. Pinilla MR, Peralto JLR, Hitt R. Cyclin A as a predictive factor for chemotherapy response in advanced head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8486-92.
46. Reichrath J, Quering K. Histology of epithelial skin tumor. In: Reichrath J, editor. *Molecular Mechanisms of Basal Cell And Squamous Cell Carcinoma*. New York: Springer; 2006. p.10-7.
47. Ruddon WR. *The Biochemistry and Cell Biology of Cancer*. New York: Oxford University Press; 2007: 117-156.
48. Simpson DJ, Fryer AA, Grossman AB. Cyclin D1 (CCND1) genotype is isolated with tumor grade in sporadic pituitary gland. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1801-7.

49. Smith BD, Haffty BG. Prognostic factors in patients with head and neck cancer. In Harrison LB, Sessions RB, Waung KH editors. Head and neck cancer: A multidisciplinary approach. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins; 2004.p.49-71.
50. Sridhar J, Pattabiraman N, Rosen EM. CDK inhibitors as anticancer agent: Perspectives for the future. In: Smith PJ, Yue EW, editors. Inhibitors Of Cyclin-Dependent Kinase as Anti Tumor Agents. New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007.p.389-408.
51. Starska K, Kulig A. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastase in patients with laryngeal carcinoma. Advances in medical sciences 2006; 51:200-4.
52. Tawfik O, Namiq A. Tumors of the mouth, pharynx, nose, and paranasal sinuses. In: Damjanov I, Fan F, editors. Cancer Grading Manual. New York: Springer; 2007. p. 6-12.
53. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictor of clinical outcome in patient with head and neck squamous cell carcinoma. Int J Exp Path 2005; 86: 347-63.
54. Vaughan CW. Pathology: Squamous cell carcinoma. Available on URL <http://www.emedicine.com/ent/topic671.htm>. August 19, 2004.
55. Vokes EE, Weichselbaum R, Lippman SM. Head and neck cancer. New England J Med 1993; 328: 184-94.
56. Wein RO, Chandra RK, Weber RS. Disorders of the head and neck. In: Brunnicardi FC, Andersen DK, editors. Schwartz's Principles of Surgery. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2005.p.515-42.
57. Williams JA, Dawson DC. Cell structure and function. In Lazar J, Greenfield, Mulholland MW, editors. Essential of Surgery: Scientific Principles and Practice. 2nd ed. New York: Lippincott William and Wilkins; 1997.p. 476-81.
58. Yoo SS, Carter D, Turner BC, et al. Prognostic significance of Cyclin D1 protein levels in early stage treated with primary radiation. Int J cancaer 2000;90:22-8.
59. Yu Z, Winberger PM, Haffty BG. Cyclin D1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2005; 11: 1160-6.
60. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: A case control study. Carcinogenesis 2001; 22: 1195-9.
61. Zwijsen RM, Klompmaker R, Wientjens , et al. Cyclin D1 triggers autonomous growth of breast cancer cells by governing cell cycle exit. Mol. Cell. Biol1996; 6: 2554-60.

Lampiran 1. Cara pemeriksaan histopatologis dengan pengecatan Hematoksilin Eosin cara Meyer untuk menentukan *grading* karsinoma sel skuamosa

1. Spesimen hasil operasi segera difiksasi dalam larutan bufer formalin (kurang dari 1 jam) dan segera dikirim ke laboratorium PA.
2. Jaringan dipotong untuk difiksasi dengan ketebalan 0,5-1 cm agar penetrasi fiksatif merata dan sempurna
3. Proses fiksasi
 - Jaringan dimasukkan ke dalam cairan fiksatif minimal 5-10 kali volume jaringan dengan larutan formalin netral bufer 10%, dengan komposisi sebagai berikut:

• Formaldehid 37-40%	100ml
• Aquades	900ml
• Natrium Fosfat Monobasik	4gr
• Natrium Fostat dibasik (Anhidrous)	6,5gr
 - minimal selama 6-36 jam.
 - Kemudian jaringan ditiriskan dengan diletakkan pada kertas merang (*tissue*) atau dibilas dengan air kran.
4. Proses dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi parafin.
 - pengolahan jaringan yang sudah difiksasi sempurna untuk dibuat blok parafin dilakukan secara manual dengan cara memasukkan jaringan yang telah difiksasi tersebut ke dalam larutan alkohol 70% selama 30 menit, alkohol 70% selama 30 menit, alkohol 80% selama 30 menit, , alkohol 96% selama 30 menit, alkohol 96% selama 30 menit, alkohol 100% selama 30 menit, alkohol 100% selama 30 menit, dan alkohol 100% selama 30 menit.
 - Kemudian dilakukan *clearing* dengan menggunakan *xylol* 1 selama 30 menit dan *xylol* 2 selama 30 menit.
 - Jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair kemudian diinkubator/ dimasukkan kedalam oven dengan suhu 55°C-57°C mulai jam 18.00-06.00.
5. Pembuatan blok parafin (*embedded block*)
6. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom 3-5 mikron dan ditempelkan pada gelas objek.
7. Sediaan dicelup dalam larutan *xylol* bak I selama 5 menit

8. Pindahkan dalam larutan *xylol* bak II selama 5 menit dan ke dalam larutan *xylol* bak III, selama 5 menit
9. Masukkan dalam alkohol 96% bak I dan II masing-masing 2 menit, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 menit
10. Cuci dalam air mengalir selama \pm 10 menit
11. Masukkan dalam larutan meyer hematoksilin selama 15 menit
12. Cuci kembali dengan air mengalir selama 20 menit
13. Dimasukkan bak eosin 1% selama 1 menit
14. Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 2 menit kemudian alkohol 90% bak II dan III masing-masing 2 menit
15. Terakhir dimasukkan dalam *xylol* bak I, II, dan III masing-masing 5 menit
16. Ditungkup dengan *cover glass*
17. Pembacaan

Lampiran 2. Cara pemeriksaan imunohistokimia untuk medeteksi *Cyclin D1*

1. Slide ditempatkan dalam rak pengecatan dan dilakukan *dewax* (deparanifikasi) dengan *xylol* sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit.
2. Hidrasi dengan:
 - a. Alkohol absolut 100% selama 3 menit
 - b. Alkohol 96% selama 3 menit
 - c. Alkohol 70% selama 3 menit
3. Cuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
4. Dilakukan tahap mikrowave selama 10 menit dengan buffer sitrat pH 6.
5. Dilakukan blok peroksidase endogen dengan H₂O₂ 3%. Bilas dengan buffer sitrat 10mM, pH 6,0.
6. Dilakukan blokade biotin Endogen dengan menggunakan *Avidin-Biotin blocking kit* (*Dako Corp.*), inkubasi selama 5 sampai 10 menit, dicuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
7. Ditetesi *primary antibody* menggunakan antibodi monoklonal *Cyclin D1* mencit (*Dako Cytomation*) dengan dilusi 1:50, inkubasi selama 1 jam, dibilas dengan *Phosphate Buffered Saline* sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
8. Ditetesi IgG *Biotin* diikuti *Streptavidin-HRP*, inkubasi selama 30 menit, dicuci dengan buffer sitrat pH 6,0 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
9. Inkubasi dalam *3-amino-9-ethylcarbazol* selama 5 sampai 10 menit, dicuci dengan aquades sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
10. Dilakukan *counterstain* dengan *Meyer Hematoxyllin* sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit, dicuci *aquadest*, kemudian dilanjutkan ke air mengalir sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.
11. Ekspresi *Cyclin D1* tampak sebagai warna merah di daerah sitoplasma sel.
12. Sediaan diinterpretasikan oleh ahli imunohistokimia dan peneliti yang sebelumnya telah dibimbing oleh senior ahli imunohistokimia
13. Dilakukan pemeriksaan sebanyak 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x dan dihitung secara semi kuantitatif berapa persen jumlah inti sel yang menunjukkan ekspresi protein *Cyclin D1* serta intensitasnya yang tampak pada setiap lapangan pandang.

PENELITIAN IMUNOHISTOKIMIA
dr.IGNATIUS HUMPHREY (CYCLIN D1)

NO.	NO.PA	BLOK	DIFF	PEMERIKSAAN IHC				KETERANGAN
				S	M	L	N	
1	T.4629/07	V	MD	60	10		30	Foto
2	T.444/07	III	MD	-	60	10	30	-
3	T.2228/06	VII	MD	-	60	20	20	-
4	T.5177/06	II	MD	-	60	-	40	Foto
5	T.4728/06	IV	MD	40	50		10	-
6	T.3495/07	-	PD	20	60	10	10	-
7	T.1242/07	II	UD	40	50		10	-
8	T.3084/07	II	UD	70	20		10	Foto
9	T.5475/07	II	UD	60	10	10	20	Foto
10	T.5080/07	II	UD	70	10	-	20	Foto
11	T.5081/07	I	UD	70	20	-	10	Foto
12	T.5076/06	VII	WD	50	10	-	40	-
13	T.3886/06	I	WD	-	20	60	20	Foto
14	T.3923/06	I	WD	-	10	80	10	-
15	T.2178/06	I	WD	-	30	70	0	Foto
16	T.1162/06	IV	WD	-	40	40	20	-
17	T.3462/07	IV	WD	-	20	60	20	-
18	T.3778/07	SVC 1	WD	20	20	-	60	-
19	T.461/07	IV	WD	20	20	-	60	-
20	T.056/07	IV	WD	40	10	-	50	Foto
21	T.4329/07	II	WD	20	40	-	40	Foto
22	T.1507/07	II	WD	20	20	10	50	Foto
23	T.4331/07	I	WD	20	20	10	50	-
24	T.2798/07	III	WD	10	-	-	90	-
25	T.6098/06	III	WD	10	-	-	90	-
26	T.4728/07	II	MD	30	50	10	10	-
27	T.3726/07	III	MD	20	30	20	30	-
28	T.766/07	I	UD	60	30	10	-	-
29	T.5081/07	I	UD	60	40	-	-	-
30	T.4279/07	II	UD	70	20	10	-	-

Surabaya, 18 Februari 2006

Ketua Divisi Imunohistokimia Departemen Patologi Anatomi
FK Unair/ RSU Dr. Soetomo Surabaya

DIVISI IMUNOHISTOKIMIA
LAB PA FK UNAIR

Jl. Prof. Dr. Juanda No. 49, Surabaya
Prof. Dr. Ignatius Hood A., dr., MS, SpPA(K), FIAC
SURABAYA

Lampiran 4. Sampel Penelitian Korelasi Ekspresi *Cyclin D1* Dengan *Grading* Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala Dan Leher

No	Gender	Umur (thn)	No.DMK	No.PA	Diagnosis	Grading	Pemeriksaan Imunohistokimia <i>Cyclin D1</i>					
							Kuat (%)	Sedang (%)	Lemah (%)	Negatif (%)	Skor	
1	Laki-laki	71	10735640	T.4629/07	Ca Laring	Moderately Diff.	60	10	-	30	(3x3)+(2x1)	11
2	Laki-laki	57	10556777	T.444/07	Ca Laring	Moderately Diff.	-	60	10	30	(3x2)+(2x1)+(2x0)	7
3	Laki-laki	57	10593274	T.2228/06	Ca Lidah	Moderately Diff.	-	60	20	20	(3x2)+(2x1)+(1x0)	7
4	Laki-laki	47	10759141	T.5177/06	Ca Nasofaring	Moderately Diff.	-	60	-	40	(3x2)+(1x0)	6
5	Laki-laki	42	10632731	T.4728/06	Ca Laring	Moderately Diff.	40	50	-	10	(2x3)+(2x2)+(1x0)	10
6	Laki-laki	65	10714354	T.3495/07	Ca Nasal	Poorly Diff.	20	60	10	10	(1x3)+(3x2)+(1x1)+(0x0)	10
7	Laki-laki	30	10491760	T.1242/07	Ca Nasal	Undifferentiated	40	50	-	10	(2x3)+(2x2)+(1x0)	10
8	Laki-laki	26	10712495	T.3084/07	Ca Nasal	Undifferentiated	70	20	-	10	(3x3)+(1x2)+(1x0)	11
9	Laki-laki	71	10760861	T.5475/07	Ca Nasofaring	Undifferentiated	60	10	10	20	(3x3)+(1x2)+(1x1)+(1x0)	12
10	Laki-laki	40	10757804	T.5080/07	Ca Nasofaring	Undifferentiated	70	10	-	20	(3x3)+(1x2)+(1x0)	11
11	Laki-laki	44	10757081	T.5081/07	Ca Nasofaring	Undifferentiated	70	20	-	10	(3x3)+(1x2)+(1x0)	11
12	Laki-laki	55	10638285	T.5076/06	Ca Laring	Well Diff.	50	10	-	40	(2x3)+(1x2)+(2x0)	8
13	Laki-laki	46	10606454	T.3886/06	Ca Maksila	Well Diff.	-	20	60	20	(1x2)+(3x1)+(1x0)	5
14	Laki-laki	57	10623118	T.3923/06	Ca Gingiva	Well Diff.	-	10	80	10	(1x2)+(3x1)+(1x0)	5
15	Laki-laki	58	10586608	T.2178/06	Ca Laring	Well Diff.	-	30	70	-	(2x2)+(3x1)	7
16	Laki-laki	79	-	T.1162/07	Ca Gingiva	Well Diff.	-	40	40	20	(2x2)+(2x1)+(1x0)	6
17	Laki-laki	57	-	T.3462/07	Ca Gingiva	Well Diff.	-	20	60	20	(1x2)+(3x1)+(1x0)	5
18	Wanita	49	10733541	T.3778/07	Ca Lidah	Well Diff.	20	20	-	60	(1x3)+(1x2)+(3x0)	5
19	Wanita	37	10679235	T.461/07	Ca Lidah	Well Diff.	20	20	-	60	(1x3)+(1x2)+(3x0)	5
20	Laki-laki	65	10667892	T.056/07	Ca Laring	Well Diff.	40	10	-	50	(3x3)+(2x1)	8
21	Laki-laki	41	10733808	T.4329/07	Ca Laring	Well Diff.	20	40	-	40	(1x3)+(2x2)+(2x0)	7
22	Laki-laki	65	10672824	T.1507/07	Ca Laring	Well Diff.	20	20	10	50	(1x3)+(1x2)+(1x1)+(2x0)	6
23	Laki-laki	71	10740606	T.4331/07	Ca Gingiva	Well Diff.	20	20	10	50	(1x3)+(1x2)+(1x1)+(2x0)	6

No	Gender	Umur (thn)	No.DMK	No.PA	Diagnosis	Grading	Pemeriksaan Imunohistokimia <i>Cyclin D1</i>					
							Kuat (%)	Sedang (%)	Lemah (%)	Negatif (%)	Skor	
24	Laki-laki	63	10595244	T.2798/07	Ca Laring	Well Diff.	10	-	-	90	(1x3)+(3x0)	3
25	Wanita	59	10662862	T.6098/06	Ca Lidah	Well Diff.	10	-	-	90	(1x3)+(3x0)	3
26	Laki-laki	42	10632731	T.4728/07	Ca Laring	Moderately Diff.	30	50	10	10	(2x3)+(2x2)+(1x1)+(1x0)	11
27	Laki-laki	64	10620828	T.3726/07	Ca Laring	Moderately Diff.	20	30	20	30	(1x3)+(2x2)+(1x1)+(2x0)	8
28	Wanita	46	10655252	T.766/07	Ca Tonsil	Undifferentiated	60	30	10	0	(3x3)+(2x2)+(1x1)	14
29	Laki-laki	44	10757081	T.5081/07	Ca Nasofaring	Undifferentiated	60	40	0	0	(3x3)+(2x2)	13
30	Laki-laki	61	10684563	T.4279/07	Ca Laring	Undifferentiated	70	20	10	0	(3x3)+(1x2)+(1x1)	12
20	Laki-laki	65	10667892	T.056/07	Ca Laring	Well Diff.	40	10	-	50	(2x3)+(1x2)+(2x0)	8
21	Laki-laki	41	10733808	T.4329/07	Ca Laring	Well Diff.	20	40	-	40	(1x3)+(2x2)+(2x0)	7
22	Laki-laki	65	10672824	T.1507/07	Ca Laring	Well Diff.	20	20	10	50	(1x3)+(1x2)+(1x1)+(2x0)	6

Keterangan:

Eksresi ini digolongkan menjadi 4 bagian yaitu (Lam,2005)

- 0 : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tidak tampak atau tampak positif kurang dari 5% pada rata-rata presentase dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x.
- 1+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positif antara 5%-20% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 2+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positif antara 20%-50% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 3+ : Bila pengecatan terhadap *Cyclin D1* tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positif lebih dari 50% pada 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x

Intensitas immunostaining juga ditentukan secara semikuantitatif dengan nilai (Kouraklis, 2006):

- 0 : negatif
- 1+ : lemah
- 2+ : sedang
- 3+ : kuat

Cara penilaian skor dan imunoreaktivitas dengan mengalikan persentase sel positif dengan kekuatan intensitas.

Lampiran 5. Hasil Analisis Statistik

Statistics

		UMUR	Cyclin D1
N	Valid	30	30
	Missing	0	0
Mean		53.6333	8.1000
Median		57.0000	7.5000
Std. Deviation		12.9495	3.0212
Minimum		26.00	3.00
Maximum		79.00	14.00

SEX

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Laki-laki	26	86.7	86.7	86.7
	Perempuan	4	13.3	13.3	100.0
Total		30	100.0	100.0	

PA

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ca Gingiva	4	13.3	13.3	13.3
	Ca Laring	12	40.0	40.0	53.3
	Ca Lidah	4	13.3	13.3	66.7
	Ca Maksila	1	3.3	3.3	70.0
	Ca Nasal	3	10.0	10.0	80.0
	Ca Nasofaring	5	16.7	16.7	96.7
	Ca Tonsil	1	3.3	3.3	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Grading

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Well-diff	14	46.7	46.7	46.7
	Moderately diff	7	23.3	23.3	70.0
	poortly/undiff	9	30.0	30.0	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

Cyclin D1

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	3.00	2	6.7	6.7	6.7
	5.00	5	16.7	16.7	23.3
	6.00	4	13.3	13.3	36.7
	7.00	4	13.3	13.3	50.0
	8.00	3	10.0	10.0	60.0
	10.00	3	10.0	10.0	70.0
	11.00	5	16.7	16.7	86.7
	12.00	2	6.7	6.7	93.3
	13.00	1	3.3	3.3	96.7
	14.00	1	3.3	3.3	100.0
	Total	30	100.0	100.0	

PA * Grading Crosstabulation

			Grading			Total
			Well-diff	Moderately diff	poorly/undiff	
PA	Ca Gingiva	Count	4			4
		% within PA	100.0%			100.0%
	Ca Laring	Count	6	5	1	12
		% within PA	50.0%	41.7%	8.3%	100.0%
	Ca Lidah	Count	3	1		4
		% within PA	75.0%	25.0%		100.0%
	Ca Maksila	Count	1			1
		% within PA	100.0%			100.0%
	Ca Nasal	Count			3	3
		% within PA			100.0%	100.0%
	Ca Nasofaring	Count		1	4	5
		% within PA		20.0%	80.0%	100.0%
	Ca Tonsil	Count			1	1
		% within PA			100.0%	100.0%
Total		Count	14	7	9	30
		% within PA	46.7%	23.3%	30.0%	100.0%

SEX * Grading Crosstabulation

			Grading			Total
			Well-diff	Moderately diff	poorly/undiff	
SEX	Laki-laki	Count	11	7	8	26
		% within SEX	42.3%	26.9%	30.8%	100.0%
	Perempuan	Count	3		1	4
		% within SEX	75.0%		25.0%	100.0%
Total		Count	14	7	9	30
		% within SEX	46.7%	23.3%	30.0%	100.0%

Descriptives

UMUR

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Well-diff	14	57.2857	11.4114	3.0498	37.00	79.00
Moderately diff	7	54.2857	11.1313	4.2072	42.00	71.00
poorly/undiff	9	47.4444	15.3795	5.1265	26.00	71.00
Total	30	53.6333	12.9495	2.3642	26.00	79.00

Descriptives

Grading		Statistic	
Cyclin D1	Well-diff	Mean	5.6429
		Median	5.5000
		Std. Deviation	1.5495
		Minimum	3.00
		Maximum	8.00
	Moderately diff	Mean	8.5714
		Median	8.0000
		Std. Deviation	2.0702
		Minimum	6.00
		Maximum	11.00
	poorly/undiff	Mean	11.5556
		Median	11.0000
		Std. Deviation	1.3333
		Minimum	10.00
		Maximum	14.00

Nonparametric Correlations

Correlations

			Grading	Cyclin D1	UMUR
Spearman's rho	Grading	Correlation Coefficient	1.000	.840**	-.273
		Sig. (2-tailed)	.	.000	.144
		N	30	30	30
	Cyclin D1	Correlation Coefficient	.840**	1.000	-.175
		Sig. (2-tailed)	.000	.	.354
		N	30	30	30
	UMUR	Correlation Coefficient	-.273	-.175	1.000
		Sig. (2-tailed)	.144	.354	.
		N	30	30	30

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

Descriptives

SEX			Statistic
Cyclin D1	Laki-laki	Mean	8.3077
		Median	8.0000
		Std. Deviation	2.7095
		Minimum	3.00
		Maximum	13.00
Perempuan		Mean	6.7500
		Median	5.0000
		Std. Deviation	4.9244
		Minimum	3.00
		Maximum	14.00

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

SEX	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cyclin D1 Laki-laki	26	16.29	423.50
Perempuan	4	10.38	41.50
Total	30		

Test Statistics^b

	Cyclin D1
Mann-Whitney U	31.500
Wilcoxon W	41.500
Z	-1.261
Asymp. Sig. (2-tailed)	.207
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.220 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: SEX

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Grading * Cyclin_D1	30	100.0%	0	.0%	30	100.0%

Grading * Cyclin_D1 Crosstabulation

Count

		Cyclin_D1		Total
		-	+	
Grading	well diff	5	9	14
	mod diff	3	4	7
	poor/undiff	0	9	9
Total		8	22	30

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.797 ^a	2	.091
Likelihood Ratio	6.985	2	.030
Linear-by-Linear Association	2.998	1	.083
N of Valid Cases	30		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.87.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	.371			.091
Interval by Interval	Pearson's R	.322	.127	1.797	.083 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.305	.141	1.696	.101 ^c
N of Valid Cases		30			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

**Monoclonal Mouse
Anti-Human
Cyclin D1
Clone DCS-6
Code M7155**

ENGLISH

Intended use

For *in vitro* diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human Cyclin D1, Clone DCS-6, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels mantle cell lymphomas, and is a useful tool for identifying overexpression of cyclin D1 in breast and colorectal carcinomas (3, 4). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

PRAD-1, BCL-1, CCND-1 (2, 5).

Summary and explanation

Cyclin D1 is a 35 kDa protein (6), encoded by the *CCND1* (BCL-1) gene located on chromosome 11q13 (7). Cyclin D1 participates in the regulation of transitions through various phases of the cell cycle by associating with, and activating the cyclin-dependent kinases (CDKs). D-type cyclins bind to and activate CDK4 and CDK6, which in turn phosphorylate their downstream targets, the retinoblastoma protein Rb. Expression of cyclin D1 is growth factor dependent, and it appears in early G1 before cyclin E. Following its increased expression, cyclin D1 initiates cell cycle progression towards the S phase. Cyclin D may also have a CDK-independent activity as a transcriptional regulator, thus cyclin D1 is not only involved in cell cycle progression but also in cell growth (7).

The (11;14) (q13, q32) translocation, an anomaly often found in mantle cell lymphoma and occasionally in other B-cell neoplasms, juxtaposes the *CCND1* locus to an immunoglobulin enhancer sequence on chromosome 14 causing overexpression of cyclin D1 (7).

Reagent provided

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L TrisHCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaH₂PO₄.

Clone: DCS-6 (5). **Isotype:** IgG2a, kappa.

Mouse IgG concentration: See label on vial.

Immunogen

Full-length recombinant human cyclin D1 protein (5).

Specificity

In Western blotting of recombinant human cyclin D1, the antibody labels a single band of 35 kDa corresponding to the cyclin D1 protein. No cross-reactivity with recombinant human cyclin D2 or D3 protein can be detected (5).

SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between the antibody and extracts of cyclin D1-positive cell line cells shows reaction with a 35 kDa protein, corresponding to cyclin D1 (5).

As demonstrated by Western blot, the antibody recognizes the cyclin D-equivalent protein in mouse (6, 8) and rat (6).

Precautions

1. For professional users.

2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. All product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. Optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3306, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0. The following solutions Dako Target Retrieval Solution, code S1700 and 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0 or pre-treatment of tissues with proteinase K were found destructive of the epitope. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, code S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens.

Frozen sections and cell preparations: The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections, although the labelling has been reported to be weaker, and the morphology less defined than on paraffin sections (5). The antibody is also well-suited for cell preparations (5, 8).

Staining procedure

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Cyclin D1, code M7155, may be used at a dilution range of 1:20-1:40 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of human mammary carcinoma using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval Solution, High pH, code S3306, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Dako Mouse IgG2a, code X0843, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody.

Visualization: Dako LSAB™+HRP kit, code K0679, and Dako EnVision™+HRP kits, codes K4004 and K4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit.

Automation: The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms (2).

Performance characteristics

Cells labelled by the antibody display a nuclear staining pattern.

Normal tissues: The antibody heterogeneously labels normal fibroblasts (1, 5), endothelial cells (3), the epithelia of the head and neck region, epidermis, hair follicles, cervix, vagina, testis and the transitional epithelia of the urinary tract (5). Dendritic cells have been reported to show both nuclear and cytoplasmic staining by the antibody (2). In general, normal epithelial tissues reveal low expression of cyclin D1 restricted to the proliferative zone (5).

Normal cyclin D1 negative tissues include muscle, kidney, liver, eccrine and apocrine glands of the skin (5). Normal lymphoid tissues including tonsil, spleen and lymph nodes are not labelled by the antibody (2, 5). However, weak labelling of B cells in the tonsils and sporadic positive cells in the mantle zone has been observed (1).

Abnormal tissues: The antibody labelled 18/19 cases of mantle cell lymphoma (1). According to an expert opinion (2), positive labelling of cyclin D1 in all well documented cases of mantle cell lymphoma, and not in other lymphoma types, has been obtained with the antibody. In colorectal carcinoma, 2/148 cases showed moderate or strong expression of cyclin D1 (1). Overexpression of cyclin D1 was found in 73/173 cases in breast carcinoma labelled by the antibody (3). Cyclin D1 has also been reported overexpressed in carcinomas of the head and neck, lung, liver, oesophagus, urinary bladder and in parathyroid adenomas (4, 5). Among the B-cell non-Hodgkin's lymphomas (NHL), only mantle cell lymphomas are labelled by the antibody. All other lymphomas show no labelling by the antibody, except very rare cases of B-cell chronic lymphocytic leukaemia, hairy cell leukaemia, lymphoplasmacytic lymphoma and some cases of plasma cell neoplasms (2).

FRANÇAIS

Intérêt

Pour diagnostic *in vitro*.

Monoclonal Mouse Anti-Human Cyclin D1, Clone DCS-6, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les lymphomes à cellules du manteau et constitue un instrument pratique pour l'identification de la surexpression de la cycline D1 dans les cancers du sein et les cancers colorectaux (3, 4). L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être entreprise dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostiques par un professionnel certifié.

Synonymes de l'antigène

PRAD-1, BCL-1, CCND-1 (2, 5).

Résumé et explication

Le cycline D1 est une protéine de 35 kDa (6), codée par le gène *CCND1* (BCL-1) situé sur le chromosome 11q13 (7). Les cyclines participent à la régulation des transitions entre les diverses phases du cycle cellulaire en s'associant et en activant les kinases cyclines-dépendantes (CDK). Les cyclines de type D se lient et activent la CDK4 et la CDK6, qui à leur tour phosphorylent leur cible en aval, la protéine Rb des rétinoblastomes. L'expression de la cycline D1 dépend d'un facteur de croissance, et apparaît au cours de la phase G1 précède avant le cycline E. Par suite de cette expression accrue, le cycline D1 déclenche la progression du cycle cellulaire vers la phase S. La cycline D peut également avoir une activité indépendante des CDK, elle agit alors en tant que régulateur transcriptionnel, ainsi la cycline D1 est non seulement impliquée dans la progression du cycle cellulaire, mais également dans la croissance cellulaire (7).

La translocation (11;14) (q13 ; q32), une anomalie souvent observée lors de lymphomes à cellules du manteau et parfois au cours d'autres néoplasmes à lymphocytes B, conduit à la juxtaposition sur le chromosome 14 du locus *CCND1* et d'une séquence accélétricienne des immunoglobulines, ce qui se traduit par une surexpression de la cycline D1 (7).

Réactif fourni

Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L TrisHCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaH₂PO₄.

Clone: DCS-6 (5). **Isotype:** IgG2a, kappa.

Concentration IgG de souris: Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.

Immunogène

Cyclin D1 humaine recombinante de longueur totale (5).

Spécificité

Lors de transfert de type Western de la cycline D1 humaine recombinante, l'anticorps marque une seule bande de 35 kDa qui correspond à la cycline D1. Aucune réactivité croisée avec les cyclines D2 ou D3 humaines recombinantes n'a été détectée (5).

L'analyse SDS-PAGE des immunoprecipitates formés entre l'anticorps et des extraits de lignées cellulaires cycline D1 positives a montré une réaction à une protéine de 35 kDa qui correspond à la cycline D1 (5).

Comme le montre le transfert de type Western, l'anticorps reconnaît les protéines équivalentes à la cycline D chez la souris (6, 8) et le rat (6).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant toxique, l'azide de sodium peut réagir avec le barytène et le plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'acides métallés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'acides métallés dans la tuyauterie.

3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précaution s'impose.

4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Stocké entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.

Préparation de l'échantillon

Coupe en paraffine: L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus par restauration de l'épitope par la chaleur est requis. Des résultats optimaux sont obtenus avec Dako Target Retrieval Solution, à pH élevé, code S3306, ou en tampon Tris 10 mmol/L, 1 mmol/L EDTA, à 9,0 de pH. Les solutions suivantes, Dako Target Retrieval Solution, code S1700, ou un tampon citrate 10 mmol/L, à 6,0 de pH, ou le prétraitement des tissus par la protéinase K détruisent l'épitope. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi, ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.

Coupe congelée et préparations cellulaires: L'anticorps peut être utilisé pour marquer les coupes congelées, fixées par fixation, bien qu'il ait été signalé que le marquage était plus faible et la morphologie moins définie que sur les coupes incluses en paraffine (5). L'anticorps est également bien adapté aux préparations cellulaires (5, 8).

Procédure d'immunomarquage

Dilution: Monoclonal Mouse Anti-Human Cyclin D1, code M7155, peut être dilué entre 1 : 20 à 1 : 40 pour application sur des coupes incluses en paraffine, fixées au formol de carcinoma mammaire humains par démasquage de l'épitope induit par la chaleur pendant 20 minutes dans Dako Target Retrieval Solution, à pH élevé, code S3306, pendant 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est Dako Mouse IgG2a, code X0843, dilué à la même concentration d'IgG de souris que l'anticorps primaire.

Visualisation: Dako LSAB™+HRP kit, code K0679, et Dako EnVision™+HRP kits, codes K4004 et K4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K0670, est une alternative valable si le marquage endogène peroxydase est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.

Automatisation: L'anticorps est bien adapté au marquage immunocytochimique sur plates-formes automatisées (2).

Performances

Les cellules marquées par l'anticorps présentent un modèle de marquage nucléaire.

Tissus normaux: L'anticorps marque de façon hétérogène les fibroblastes normaux (1, 5), les cellules endothéliales (3), les épithéliums de la tête et du cou, de l'épiderme, des follicules pileux, du col de l'utérus, du vagin, du rectum, et les épithéliums transitionnels du système urinaire (5). Il a été rapporté que des cellules dendritiques montraient un marquage nucléaire et cytoplasmique à cet anticorps (2). En général, les tissus épithéliaux normaux montrent une faible expression de la cycline D1 qui se limite à la zone postmitotique (5).

Les tissus cycline D1 négatifs normaux sont les muscles, le rein, le foie et les glandes endocrines et apocrines de la peau (5). Les tissus lymphoïdes normaux, parmi lesquels les amygdales, la rate, et les ganglions lymphatiques, ne sont pas marqués par l'anticorps (2, 5). Cependant, un faible marquage des lymphocytes B dans les amygdales, et des cellules sporadiquement positives dans la région du manteau ont été observées (1).

Tissus anormaux: L'anticorps a marqué 15 cas de lymphome à cellules du manteau sur 19 (1). Selon un expert (2), un marquage positif de la cycline D1 a été obtenu avec l'anticorps dans tous les cas bien documentés de lymphome à cellules du manteau et n'a pas pu être obtenu dans 21 cas de carcinomes colorectaux sur 48 ont présenté une expression modérée ou forte de la cycline D1 (1). Une surexpression de la cycline D1 a été observée dans 73 cas de carcinomes du sein, marqués par l'anticorps, sur 173 (3). Une surexpression de la cycline D1 a été également observée dans les carcinomes de la tête et du cou, du poulmon, du foie, de l'œsophage, de la vessie et des adénomes de la parathyroïde (4, 5).

Parmi les lymphomes non Hodgkiniens à lymphocytes B (NHL), seuls les lymphomes à cellules du manteau sont marqués par l'anticorps. Tous les autres lymphomes ne présentent aucun marquage par l'anticorps à l'exception de très rares cas de leucémies lymphoïdes chroniques à lymphocytes B, de leucémies à tricholeucocytes, de lymphomes lymphoplasmocytaires et de certains cas de néoplasmes plasmocytaires (2).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen.

Monoklonale Mouse Anti-Human Cyclin D1, Clone DCS-4, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert Mantelzellerlymphome und ist nützlich für die Identifikation einer Überspression von Cyclin D1 bei Mammakarzinomen sowie Rektum- bzw. Kolonkarzinom der (3, 4). Die differenzielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panell überprüften Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.

Synonyme Bezeichnungen des Antigens

PRAD-1, BCL-1, CCND-1 (2, 5).

Zusammenfassung und Erklärung

Cyclin D1 ist ein 36 kDa-Protein (6), das von dem auf dem Chromosom 11q13 lokalisierten Gen CCND1 (BCL-1) kodiert wird (7). Cycline sind an der Regulation der Übergänge zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen beteiligt und zwar durch Verbindung mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und deren Aktivierung. Cycline von D-Typ binden an CDK4 und CDK6 und aktivieren diese. CDK4 und CDK6 wiederum phosphorylieren ihr "downstream target", das Retinoblastom-Protein (Rb). Die Expression von Cyclin D1 ist weichenstärkenabhängig und erfolgt in der frühen G1-Phase vor Cyclin E. Im Anschluss an seine Überspression leitet Cyclin D1 die Zellzyklusprogression in die S-Phase ein. Darüber hinaus kann Cyclin D auch CDK-unabhängig als Transkriptionsregulator aktiv werden. Demnach kommt Cyclin D1 nicht nur eine Rolle bei der Progression durch den Zellzyklus sondern auch beim Zellwachstum zu (7).

Die (11:14) (q12; q32) Translokation, eine häufig bei Mantelzellerlymphomen und gelegentlich bei anderen B-Zell-Neoplasmen auftretende Anomalie, juxtapostioniert den CCND1-Locus an eine Immunoglobulin-aktive Sequenz auf dem Chromosom 14 an und löst damit eine Überspression von Cyclin D1 aus (7).

Geliefertes Reagenz

Der monoklonale Mausantikörper wird in löslicher Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol TrisHCl pH 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/l NaCl.

Konz. DCS-4 (5). **Isotyp:** IgG2a, kappa.

Maus-IgG-Konzentration: Siehe Produktkett.

Immunogen

Rekombinantes humanes Cyclin D1-Protein voller Länge (5).

Spezifität

Beim Westernblot von rekombinanten humanem Cyclin D1 markiert der Antikörper eine einzige 36 kDa-Bande, die dem Cyclin D1-Protein entspricht. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit rekombinanten humanem Cyclin D2- oder D3-Protein beobachtet werden (5). Die SDS-PAGE-Analyse von zwischen dem Antikörper und Extrakt aus Cyclin D1-positiven Zelllinien erzeugten Immurpräzipitaten zeigt eine Reaktion mit einem 36 kDa-Protein, das Cyclin D1 entspricht (5).

Wie anhand von Westernblot nachgewiesen erkennt der Antikörper das Cyclin D1-Äquivalente Protein bei Maus (6, 8) und Ratte (8).

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Für geschultes Fachpersonal.
- Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN₃), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserlösungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgesprült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden.
- Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
- Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.

Probenvorbereitung

Fixationsprotokoll: Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, formalinfarbenen histologischen Schnitten genutzt werden. Eine Vorbehandlung der Gewebe mit histozytopäthologischer Epitopdemaskierung ist erforderlich. Optimale Resultate werden erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, pH 8,0, Code-Nr. S3308, oder mit 10 mmol/l Tris-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0, Dako Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S1700, 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0, oder die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K. Führt demgegenüber zur Zerstörung des Epitops. Während der Gewebepreparierung oder während der sich anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0808, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden.

Gefäßerschnitte und zytologische Präparate: Der Antikörper für die Markierung automatisierter Gefäßerschnitte verwendet werden, wenn die Markierung Bereichen zufolge schwächer ausfällt und eine weniger definierte Morphologie aufweist als bei paraffineingebetteten Schnitten (5). Der Antikörper eignet sich auch gut für Zellpräparate (5, 8).

Färbeprotokoll

Verdünnung: Monoklonale Mouse Anti-Human Cyclin D1, Code-Nr. M7155, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:20-1:40 eingesetzt werden, wenn es für formalinfarbierte, paraffineingebettete Schnitte des menschlichen Mammarkarzinoms genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die histozytopäthologische Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval Solution, pH 8,0, Code-Nr. S3308, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist Dako Mouse IgG2a, Code-Nr. X0943, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde.

(102468-002)

M7155/EFGU/PC/15.05.06 p. 3/4

Visualisierung: Folgende Kits werden empfohlen: Dako LSAB™+HRP-Kit, Code-Nr. K0679 und Dako EnVision™+HRP-Kits, Code-Nr. K4004 und K4006. Falls bei Geläufigkeiten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidaseaktivität auftreten, bietet der Dako APath Kit, Code-Nr. K0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genannten Kits für die Visualisierung erläutert wird.

Automatisierung: Der Antikörper ist gut für die immunzytochemische Färbung unter Nutzung automatisierter Plattformen geeignet (2).

Lebteigenschaften

Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster.

Normalgewebe: Der Antikörper markiert heterogen normale Fibroblasten (1, 5), Endothelzellen (3), Epithelzellen von Kopf- und Halsregion, Epidermis, Herzmuskel, Zervix, Vagina, Rektum sowie Übergangsepithelien der Harnwege (5). Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen durch den Antikörper sowohl eine Färbung des Zellkerns als auch des Zytoplasmas aufweisen (2). In Allgemeinen tritt in normalen Epithelgewebe eine geringe Expression von Cyclin D1 auf, die auf die Wachstumszone begrenzt ist (5).

Zu den gesunden Cyclin D1-negativen Geweben gehören Muskel, Nieren und Leber sowie die sekretin- und apokrinen Herzdrüsen (5). Gesundes lymphoïdes Gewebe, wie Tonsillen, Milz und Lymphknoten, wird vom Antikörper nicht markiert (2, 5). Hingegen wurde eine schwache Färbung der B-Zellen von Tonsillen und sporadische positive Zellen der Mantelzone beobachtet (1).








Anormales Gewebe: Der Antikörper markierte 15/19 Fälle eines Mantelzellerlymphoms (1). Einem Fachgutachten zufolge (2) wurde mit dem Antikörper eine positive Markierung durch Cyclin D1 in gut belegten Fällen von Mantelzellerlymphom nicht jedoch in anderen Lymphomtypen erreicht. Bei den Kolon- bzw. Rektumkarzinomen zeigten 2/48 Fälle eine mäßige oder starke Expression von Cyclin D1 (1). Eine Überspression von Cyclin D1 wurde in 73/173 Fällen eines Mammarkarzinoms nach Markierung mit dem Antikörper beobachtet (3). Darüber hinaus konnte eine Cyclin D1-Hochaufregung auch in Karzinomen im Kopf- und Halsbereich, sowie in Lunge, Leber, Speiseröhre, Harnblase und bei Nebenschilddrüsenadenomen nachgewiesen werden (4, 5).

Von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) des B-Zelltyps werden nur die Mantelzellerlymphome durch den Antikörper markiert. Bei allen anderen Lymphomen tritt keine Markierung durch den Antikörper auf, außer bei sehr seltenen Fällen von chronischer lymphozytärer Leukämie vom B-Zelltyp, Herzmuskel-Leukämie, lymphoplasmazytären Lymphomen und manchen Fällen von Plasmazellen-Neoplasmen (2).

References/Références/Literatur

- de Boer CJ, Schuurig E, Drost E, Peters G, Bartek J, Khan PM, et al. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995;86:2715-23.
- Chan JKC, Miller KD, Munson P, Isaacson PG. Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? [Expert opinion] *Histopathology* 1999;34:295-70.
- Urnika Y, Oh Y, Sagawa Y, Yoshida H. Overexpression of CyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 2002;98:415-8.
- Barkovs J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1994;58:568-73.
- Bartovs J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of human cyclin D1 protein. *J Pathol* 1994;172:237-45.
- Lukas J, Pagano M, Stasikova Z, Draetta G, Bartek J. Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 1994;9:707-18.
- Coquerel G. Linking cyclin to transcriptional control [review]. *Gene* 2002;299:35-65.
- Lukas J, Bartovs J, Rohde M, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* 1995;15:2600-11.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erklärung der Symbole

 Catalogue number Références du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Unités de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Batch code Code de lot Chargenbezeichnung	
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Use by Utiliser jusqu' Verwendbar bis	

(102468-002)

M7155/EFGU/PC/15.05.06 p. 4/4