

Hubungan Ekspresi E6 Human Papillomavirus 16/18 dengan Derajat Differensiasi Karsinoma Sel Skuamosa pada Kepala dan Leher serta Korelasinya dengan Ekspresi Ki-67

Henny Mulyani*, Yanwirasti**, Salmiah Agus*

**Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas*

***Bagian Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang*

ABSTRAK

Latar Belakang

Kanker kepala dan leher sebagian besar berjenis histopatologik karsinoma sel skuamosa sehingga dikenal dengan *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC). Human Papillomavirus (HPV) dilaporkan sebagai salah satu penyebab terjadinya HNSCC. HNSCC yang positif mengekspresikan gen onkogenik HPV, karakteristiknya berbeda dengan HNSCC HPV negatif. Selain gambaran klinis yang berbeda, juga berbeda dalam derajat histopatologik serta biologi molekuler yang salah satunya adalah aktifitas proliferasi sel. Hal ini berdampak pada respon terapi dan prognosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi E6 HPV 16/18 dengan derajat histopatologik HNSCC serta korelasinya dengan ekspresi Ki-67.

Cara Kerja

Penelitian potong lintang observasional dengan sampel HNSCC dari laboratorium PA RSUD DR.M. Djamil Padang, RSUD Achmad Muchtar Bukittinggi dan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang. Arsip penderita, slaid Hematoksilin Eosin, dan blok parafin pasien dengan diagnosis PA: SCC pada kepala dan leher, dikumpulkan dan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan antibodi E6 HPV 16/18 dan Ki-67. Penilaian ekspresi E6 HPV 16/18 dan Ki-67 berdasarkan skoring yang dilihat pada 100 sel tumor dalam 5 lapangan pandang besar. Hasil dianalisis dengan uji chi square dan uji korelasi.

Hasil

Jumlah kasus yang dianalisis adalah 72 kasus sebagian besar laki-laki (73,6%), umur rata-rata 55,81. Lokasi tersering kavum oral dan orofaring, derajat diferensiasi baik dan sedang adalah yang terbanyak. Diantara 14 kasus (5,6%) yang positif mengekspresikan E6 HPV 16/18 paling banyak terletak pada kavum nasi. Sedangkan ekspresi Ki-67 positif pada 21 kasus (29,2%).

Kesimpulan

Pada penelitian ini sebanyak 18,1% HNSCC positif mengekspresikan E6 HPV 16/18. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara derajat histopatologi HNSCC dengan berbagai tingkat ekspresi Ki-67. Terdapat korelasi positif lemah antara ekspresi E6 HPV16/18 dengan ekspresi Ki-67.

Kata kunci: kanker kepala dan leher, karsinoma sel skuamosa, HPV, Ki-67

ABSTRACT

Background

Most of the head and neck cancers are squamous cell carcinoma, therefore named Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Human papillomavirus has been reported play an important role as the causal of HNSCC. HNSCC which positif harboured oncogenic HPV differs from the counterpart in clinical, histopathological grading and molecular biology which seen by proliferation activity which affect respon for therapy and prognosis. The aim of this study was to determining the association between E6 HPV 16/18 expression and HNSCC histopathological grading and the correlation with ki-67 expression.

Method

This cross-sectional study used HNSCC sample from Anatomic Pathology Departement of Dr. M. Djamil Hospital, Achmad Muchtar Hospital in Bukittinggi and of Medical Faculty of Andalas University. The Pathological record, Hematoxylin Eosin staining slide, paraffin embedded tissue were collected and immunohistochemical examination were made from 72 samples using E6 HPV 16/18 antibody and Ki-67. The expression of E6 HPV 16/18 and Ki-67 observed in 100 tumour cells at 5 HPF. The result was analyzed by Chi-square and correlation test.

Result

Most of the patient were male (73,6%), avarage age is 55,81 years. Most HNSCC located in oral cavity and oropharyng, and mostly consist of well and moderately differentiated. Most of the patient having positive expression of E6 HPV 16/18 HNSCC found on nasal cavity (5,6%). Ki-67 expression was positive in 21 sample(29,2%).

Conclusion

18,1% of HNSCC sample, expressing E6 HPV 16/18. There are no signifikan difference between HNSCC grading and expression of Ki-67, but there was weakly positive correlation between E6 HPV 16/18 expression and Ki-67 expression.

Key word: Head and neck cancer, squamous cell carcinoma, HPV, Ki-67

PENDAHULUAN

Kanker kepala dan leher merupakan salah satu masalah kesehatan utama, karena merupakan salah satu penyebab kesakitan dan kematian utama di seluruh dunia. Lebih dari 500.000 orang didiagnosis kanker kepala dan leher setiap tahun di seluruh dunia¹. Di Indonesia, tumor ganas ini menempati urutan keempat dari sepuluh besar keganasan pada laki-laki dan wanita, dan urutan kedua dari sepuluh besar keganasan pada laki-laki².

Kanker ini sebagian besar berjenis histopatologik karsinoma sel skuamosa sehingga lebih dikenal dengan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher atau *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC)³. Faktor risiko terbesar HNSCC adalah penggunaan tembakau dan alkohol.^{1,3,4} Penderita sebagian besar pria, dengan usia rata-rata 63 tahun dan lokasi primer di laring, hipofaring dan dasar mulut³. Beberapa penelitian juga melaporkan HNSCC terjadi pada penderita yang bukan perokok dan bukan peminum alkohol. Dalam penelitian tersebut diketahui sebagian besar penderita adalah dewasa muda dan wanita dengan lokasi primer di lidah dan kavum oral³, serta menunjukkan kandungan Human Papillomavirus (HPV) risiko tinggi yang positif^{3,5}.

HPV adalah virus DNA yang menginfeksi dan bereplikasi dalam epitel kulit dan mukosa. Beberapa genotipe HPV risiko tinggi dihubungkan sebagai penyebab berbagai squamous cell carcinoma (KSS) anogenital⁶. Lebih dari 99 % kanker leher rahim di seluruh dunia mengandung HPV subtipe 16, 18 dan 33⁷.

Genotipe HPV risiko tinggi juga ditemukan dalam rongga mulut dan orofaring orang dewasa yang bukan penderita kanker dan juga dalam sediaan biopsi penderita HNSCC. Selama lebih dari 20 tahun terakhir, berbagai penelitian klinis dan molekuler menunjukkan keterlibatan HPV pada sebagian HNSCC⁸ (Kreimer *et al.*, 2005). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa keberadaan HPV terdeteksi pada 2-76% HNSCC⁶.

Dari berbagai penelitian ternyata HNSCC yang positif mengekspresikan gen onkogenik HPV, mempunyai karakteristik yang berbeda dengan HNSCC yang diakibatkan oleh faktor risiko utama seperti tembakau dan alkohol. Selain gambaran klinis yang berbeda, tumor ini juga berbeda dalam derajat histo-

patologis serta biologi molekuler yang berdampak pada respon terapi dan prognosis^{9,10}.

Terkait dengan prognosis, sebagian besar penelitian menunjukkan bahwa pasien dengan HNSCC yang positif mengandung HPV mempunyai prognosis yang lebih baik dibandingkan dengan HNSCC yang tidak mengandung HPV. Pasien tersebut mempunyai risiko kematian 60% sampai 80% lebih kecil dibandingkan dengan pasien penderita HNSCC HPV negatif. Selama ini belum ada yang meneliti kemungkinan adanya gen E6 HPV risiko tinggi pada HNSCC di Sumatera Barat serta hubungannya dengan derajat histopatologis dan proliferasi sel.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian potong lintang observasional dengan menggunakan sampel penderita HNSCC dari tiga laboratorium Patologi Anatomi (PA) di Sumatera Barat, yaitu laboratorium PA RSUP DR.M. Djamil Padang, Laboratorium PA RSUD Achmad Muchtar Bukittinggi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang. Arsip penderita, slaid Hematoksin Eosin, dan blok parafin dikumpulkan dan 72 sampel yang memenuhi syarat dilakukan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan antibodi E6 HPV 16/18 dan Ki-67 bersama dengan sediaan kontrol positif. Hasil diamati secara visual pada daerah yang imunoreaktif (inti atau sitoplasma terwarnai coklat) dengan mikroskop cahaya binokuler pembesaran 400x. Penilaian ekspresi E6HPV 16/18 berdasarkan skoring yang dilihat pada 100 sel tumor dalam 5 lapangan pandang. Kriteria positivitas pewarnaan dilaporkan menurut metode yang digunakan oleh Qi *et al.* (2006). Hasil yang dilaporkan: Negatif bila <10% atau tidak ada sama sekali yang terwarnai coklat. Positif ringan bila 10%-24% sel tumor terwarnai coklat. Positif sedang (+) bila 25%-50 % sel tumor terwarnai coklat. Positif kuat (++) bila >50% sel tumor mengandung bercak coklat.

HASIL

Penderita sebagian besar adalah laki-laki (73,6%) dengan rasio 1:3. Sebagian besar penderita berusia >55 tahun (56,9%). Rentang umur HNSCC yang diteliti adalah 23-83 tahun dengan rerata umur 55,81±13,929. Lokasi

tersering adalah kavum oral dan orofaring yaitu masing-masing 23,6% (Tabel1).

Tabel 1. Frekuensi HNSCC berdasarkan jenis kelamin, umur dan lokasi

Variabel	Katagori	Jumlah Kasus	Persentase
Jenis Kelamin	Laki-laki	53	73,6%
	Perempuan	19	26,4%
Umur	<25 tahun	1	1,4%
	25-55 tahun	30	41,7%
	>55 tahun	41	56,9%
Lokasi	Kavum nasi	11	15,3%
	Nasofaring	12	16,7%
	Kavum oral	17	23,6%
	Orofaring	17	23,6%
	Laring	15	20,8%

Berdasarkan derajat diferensiasi, sebagian besar HNSCC mempunyai derajat diferensiasi baik dan sedang yaitu masing-masing 24 kasus (33,3%). Sedangkan yang berderajat diferensiasi buruk berjumlah 9 kasus (12,5%) serta anaplastik 15 kasus (15%) (Tabel 2).

Tabel 2. Distribusi frekuensi HNSCC berdasarkan derajat diferensiasi histopatologi

Derajat Diferensiasi HNSCC	Frekuensi	Persentase
Baik	24	33.3
Sedang	24	33.3
Buruk	9	12.5
Anaplastik	15	20.8
Total	72	100.0

Ekspresi E6 HPV 16/18 positif pada 14 kasus HNSCC (18,1%). Jumlah ini terdistribusi pada ekspresi positif lemah 8 kasus (11,1), positif sedang 4 kasus (5,6%) dan positif kuat 2 kasus (2,8%) (Tabel 3). Hasil analisis statistik hubungan antara ekspresi E6 HPV 16/18 dengan derajat diferensiasi HNSCC berdasarkan uji chi square menunjukkan tidak terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi E6 HPV 16/18 dengan derajat diferensiasi HNSCC ($p=0,127$). Berdasarkan lokasi HNSCC, kasus yang positif mengekspresikan E6 HPV 16/18 lebih banyak terletak pada kavum nasi yaitu 5,6 %, namun berdasarkan uji Chi square hal ini tidak bermakna secara statistik ($p=0,473$)

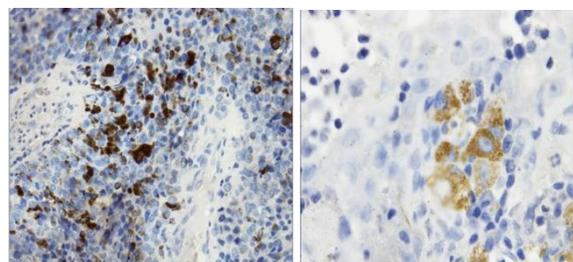
Tabel 3. Distribusi frekuensi HNSCC berdasarkan ekspresi E6 HPV 16/18

Ekspresi E6 HPV 16/18	Frekuensi	Persentase
Negatif	59	81.9
Positif lemah	8	11.1
Positif sedang	4	5.6
Positif Kuat	2	2.8
Total	72	100.0

Tabel 4. Distribusi frekuensi HNSCC berdasarkan ekspresi Ki-67

Ekspresi Ki-67	Frekuensi	Persentase
Negatif	51	70.8
Positif Lemah	10	13.9
Positif	8	11.1
Positif Kuat	3	4.2
Total	72	100.0

Ekspresi Ki-67 positif pada 21 kasus HNSCC (29,2%). Ekspresi ini terdistribusi pada positif lemah 10 kasus (13,9%), positif sedang 8 kasus (11,1%) dan positif kuat 3 kasus (4,2%) (Tabel 4). Hasil analisis statistik hubungan antara ekspresi Ki-67 dengan derajat diferensiasi HNSCC berdasarkan uji chi square menyatakan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi Ki-67 dengan derajat diferensiasi HNSCC ($p=0,454$).

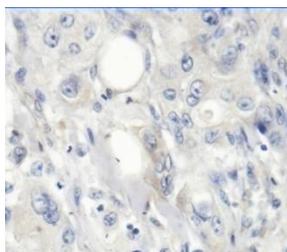


Gambar 1. Ekspresi E6 HPV 16/18 dengan kriteria positif kuat. Ekspresi tampak pada sitoplasma sel. Pembesaran 400x.

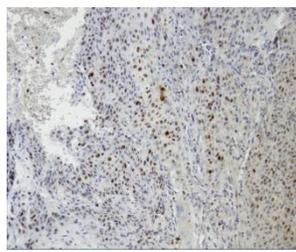
Gambar 2. Ekspresi E6 HPV 16/18 dengan kriteria positif. Ekspresi tampak pada sitoplasma sel. Pembesaran 1000x

Tabel 5. Distribusi Frekuensi Kasus dengan Ekspresi E6 HPV 16/18 Berdasarkan Lokasi HNSCC

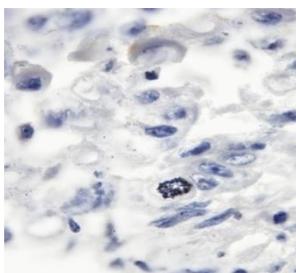
Ekspresi E6 HPV 16/18	Lokasi HNSCC					Total
	Kavum nasi	Nasofaring	Kavum oral	Orofaring	Laring	
Negatif	7 (9.7%)	9 (12.5%)	15 (20.8%)	15 (20.8%)	12 (16.7%)	58 (80.6%)
Positif	4 (5.6%)	3 (4.2%)	2 (2.8%)	2 (2.8%)	3 (4.2%)	14 (19.4%)
Total	11 (15.3%)	12 (16.7)	17 (23.6%)	17 (23.6%)	15 (20.8%)	72 (100%)



Gambar 3. Ekspresi E6 HPV 16/18 dengan kriteria positif lemah. Pembesaran 400x.



Gambar 4. Ekspresi Ki-67 dengan kriteria positif kuat. Ekspresi tampak pada inti sel. Pembesaran 400x.



Gambar 5. Ekspresi Ki-67 dengan kriteria negatif. Ekspresi hanya terlihat pada sel yang mengalami mitosis. Pembesaran 1000x.

Analisis statistik uji T independen untuk mengetahui hubungan jenis kelamin dengan ekspresi E6 HPV 16/18 menunjukkan tidak ada perbedaan antara ekspresi E6 HPV 16/18 pada laki-laki dan perempuan ($p=0,769$). Bagitupula hubungan umur (≤ 55 dan >55 tahun) dengan ekspresi E6 HPV 16/18, tidak menunjukkan adanya perbedaan antara ekspresi E6 HPV 16/18 pada umur ≤ 55 dan umur >55 tahun ($p=0,111$).

Analisis statistik uji chi square bertingkat menyatakan tidak terdapatnya hubungan yang bermakna antara derajat diferensiasi HNSCC dengan ekspresi protein E6 HPV 16/18 berdasarkan ekspresi Ki-67 ($p=0,5$). Hasil uji korelasi nonparametrik Spearman antara ekspresi E6 HPV 16/18 dengan ekspresi Ki-67 menunjukkan korelasi yang lemah dengan nilai $r=0,015$ dan nilai $p=0,9$.

DISKUSI

Lokasi terbanyak kasus HNSCC pada penelitian ini terletak pada kavum oral dan orofaring dengan persentase sama banyak yaitu 23,6%. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Ringstrom, 2002 di Boston, MA, namun sedikit berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Mork, 2001 di Oslo Norwegia dan Kreimer, 2005 yang melakukan penelitian sistematis dari seluruh dunia menggunakan studi literatur.^{7,8}

Berdasarkan karakteristik penderita, HNSCC pada penelitian ini lebih banyak pada laki-laki dan umur rerata penderita adalah 55,81 tahun hal ini sesuai dengan literatur dengan sedikit variasi pada umur rerata penderita.⁷ Derajat diferensiasi HNSCC pada penelitian ini terutama diferensiasi baik dan sedang yaitu masing-masing 33,3%, Ringstrom mendapatkan derajat diferensiasi HNSCC terutama diferensiasi sedang (50,6%) dan diferensiasi baik (27,0%).⁷ Ekspresi E6 HPV 16/18 positif pada 14 kasus (18,1%) dengan lokasi terbanyak pada kavum nasi (5,6%). Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Ringstrom yang melakukan penelitian dengan metode PCR terhadap jaringan tumor HNSCC segar. Ringstrom mendapatkan kandungan HPV 16 positif sebanyak 20,9% dan terutama pada orofaring (83% dari 18 tumor HPV 16 positif).⁷

Pada penelitian ini tidak terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara ekspresi E6 HPV 16/18 dengan derajat histopatologik HNSCC. Literatur menyatakan adanya HPV berhubungan dengan derajat histopatologik yang lebih buruk.^{9,10,11} Namun penelitian yang dilakukan Strome 2002 juga menunjukkan hubungan yang tidak signifikan antara HPV resiko tinggi dengan derajat diferensiasi HNSCC¹². Penelitian ini tidak menemukan adanya perbedaan ekspresi E6 HPV 16/18 yang signifikan secara statistik pada kelompok umur maupun jenis kelamin. Beberapa literatur mengemukakan kecenderungan HNSCC dengan HPV positif terjadi pada usia yang lebih muda 5 tahun dari HNSCC HPV negatif¹².

Berdasarkan ekspresi ki-67, HNSCC pada penelitian ini sebagian besar negatif (70,8%). Seharusnya ekspresi ki-67 meningkat pada sel-sel tumor ganas. Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa hal, seperti fiksasi dan prosesi jaringan yang kurang adekuat mengingat sampel didapat dari beberapa laboratorium yang berbeda. Hasil uji korelasi nonparametrik Spearman menunjukkan korelasi positif lemah antara ekspresi E6 HPV 16/18 dengan Ki-67.

KESIMPULAN

Karakteristik penderita HNSCC pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian lain, dan sebagian HNSCC positif mengekspresikan E6 HPV 16/18. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara HNSCC yang positif mengekspresikan E6 HPV 16/18 dengan HNSCC yang tidak mengekspresikan E6 HPV 16/18 pada kelompok umur dan jenis kelamin. Juga tidak terdapat perbedaan derajat histopatologi HNSCC pada berbagai tingkat ekspresi Ki-67. Pada penelitian ini terdapat korelasi positif lemah antara ekspresi E6 HPV16/18 dengan ekspresi Ki-67.

DAFTAR PUSTAKA

- Haddad R and Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:1143-54.
- Kuhuwael FG. Penatalaksanaan keganasan kepala dan leher. *Dexa Media* No.3 vol 19, Juli-September 2006
- Ragin CCR, Modugno F, and Gollin SM,. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on Human Papilloma Virus. *J Dent Res* 2007 86:104-14
- Pilch BZ, Bouquot J, and Thompson LDR. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky, editors, *WHO Pathology & Genetics: Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press,2005; pp 15-17
- Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, and Benazzo M. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2009;29:119-26.
- Hafkamp HC, Speel EJM, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers FCS, *et al*. Subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of hpv 16/18 DNA and overexpression of p16ink4a and P53 in the absence of mutations in p53 exons 5–8. *Int. J. Cancer* 2003; 107, 394-400
- Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, and Kelsey KT, Human Papillomavirus Type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Canc Res* 2002;Vol. 8, 3187-92
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S, Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2)
- Chocolatewala NM and Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian Perspective. *J Can Res Ther* 2009;5:71-7
- Fakhry C and Gillison ML. Clinical implications of Human Papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24:2606-11.
- Strome SE, Savva A, Brisset AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, *et al*. Squamous cell carcinoma of the tonsils : a molecular analysis of HPV associations. *Clinical Cancer Research*.2002;8:1093-100
- Qi ZL, Huo X, Xu XJ, Zhang B, Du MG, Yang HW, *et al*. Relationship between HPV16/18 E6 and p53, p21waf1, MDM2, Ki67 and cyclin D1 expression in esophageal squamous cell carcinoma: Comparative study by using tissue microarray technology. *Exp Oncol* 2006 (28) 3: 235-40