

Hubungan Ekspresi p53 dan hMLH1 dengan Karakteristik Kliniko-patologik Kanker Kolorektal

Pieri Kumaladewi, Indrawati, FX Ediati Triningsih, Soeripto
*Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
 Yogyakarta*

ABSTRAK

Latar belakang

Ekspresi protein p53 sudah banyak dibahas dalam proses keganasan dan menunjukkan prognosis yang buruk. Gen hMLH1 adalah suatu gen repair yang salah berpasangan/mismatch-repair (MMR) dan hipermetilasi hMLH1 diikuti mikrosatelit yang tidak stabil dan sering ditemukan pada kanker kolon nonpoliposis herediter. Namun, hubungan dengan karakteristik klinikopatologik masih sangat kontroversial.

Tujuan

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari hubungan ekspresi p53, dan hMLH1 dengan karakteristik klinikopatologik (umur, jenis kelamin, lokasi tumor, *grading dan staging*) pada kanker kolorektal.

Metode

Sampel blok parafin yang berasal dari 45 kasus adenokarsinoma kolorektal yang mengalami pengangkatan tumor dikumpulkan sejak Januari 2007 sampai Desember 2008 di RS Sardjito, RS Bethesda dan RS Panti Rapih, Yogyakarta, Indonesia. Ekspresi protein p53 diteliti menggunakan antibodi monoklonal (clone DO-7; Novocastra) dan ekspresi hMLH1 diteliti menggunakan antibodi monoklonal (Biocare Medical; USA). Kriteria pewarnaan sel diklasifikasikan sbb: negatif, bila <10 sel positif; positif, bila > 10 sel positif. Data-data klinikopatologik yang dikumpulkan meliputi usia, jenis kelamin, lokasi tumor, tipe histologik dan stadium penyakit. Uji Chi-square dan Fisher test digunakan untuk melakukan evaluasi antara ekspresi p53 dan hMLH1.

Hasil

Pewarnaan p53 menunjukkan hasil positif (53.3%); pewarnaan hMLH1 menunjukkan hasil negatif (33.3%). Uji statistik antara p53 dan usia (p:0.459); jenis kelamin (p:0.764); lokasi tumor (p: 0.769); *grading* (p: 0.664) menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna. Uji statistik antara hMLH1 dan usia (p:1); jenis kelamin (p:0.352); lokasi tumor (p: 352); *grading* (p: 0.280) menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna.

Kesimpulan

Tidak ditemukan perbedaan bermakna antara ekspresi p53 dan hMLH1 dengan karakteristik klinikopatologik (usia, jenis kelamin, lokasi, *grading dan staging*) pada kanker kolorektal.

Kata kunci: kanker kolorektal, p53, hMLH1, karakteristik klinikopatologik.

ABSTRACT

Background

Over expression of p53 protein has been documented in a number of human malignancies and shown to be associated with poor prognosis. hMLH1 is a mismatch repair gene and hypermethylation of hMLH1 follows microsatellite instability that usually found in hereditary nonpolyposis colon cancer in colorectal cancer. The relation with clinicopathologic characteristic is still controversial.

Aim

To study relationship p53 and hMLH1 with clinicopathologic characteristics (age, gender, site of tumor, grading and staging) of cancer colorectal.

Method

Paraffin-preserved adenocarcinoma colorectal samples of 45 cases were collected from patients undergoing tumor resection from January 2007 through December 2008 in Sardjito Hospital, Bethesda Hospital and Panti Rapih Hospital, Yogyakarta, Indonesia. Expression of p53 protein using monoclonal antibody (clone DO-7; Novocastra) and expression of hMLH1 were studied using monoclonal antibody (Biocare Medical:USA). The number of cells stained were classified as negative: <10% positive cells, and positive: >10% positive cells. Clinicopathologic data including gender, age, tumor location, histologic type and stage of disease were collected. Statistic analysis of Chi-square and Fisher's Exact Test is used to differentiated between p53 and hMLH1 expression.

Result

p53 staining was positive (53.3%) and hMLH1 was negative (33.3%). Statistic test between between p53 and age (p:0.459); gender (p:0.764); site of tumor (p:0.769); and grading (p:0.664) showed no significant correlation. Statistic test between of hMLH1 and age (p:1), gender (p:0.352), site of tumor(p:0.352) and grading(p:0.280) showed no significant correlation.

Conclusion

There is no significant differences between expression of p53 and hMLH1 with clinicopathologic characteristics (age, gender, site of tumor, grading and staging) of cancer colorectal.

Key words : colorectal cancer, p53, hMLH1, clinicopathologic characteristics

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal merupakan kanker yang menempati urutan empat besar di dunia. Sejak 1975 telah ditemukan 783.000 kasus baru¹. Laporan insiden di Amerika Utara penderita laki laki 40.6 dan perempuan 30.6; di Eropa Utara penderita laki laki 34.7, perempuan 25.2; serta di Asia Tenggara penderita laki laki 12.6 dan perempuan 10². Sedang di Indonesia, insiden hampir sama di tiap pusat diagnosis patologi. Di Yogyakarta, frekuensi kanker kolon yang relatif banyak adalah kanker rektum, dengan tipe adenokarsinoma differensiasi baik.³

Patogenesis kanker kolorektal melibatkan sedikitnya dua teori karsinogenesis, yaitu adanya akumulasi mutasi bertahap (*chromosomal instability*) dan mekanisme perubahan morfologi yang berbeda (*microsatellite instability*). Pada *Chromosomal instability* (jalur APC/ β -katenin/sequence adenoma-karsinoma) terjadi akumulasi mutasi bertahap pada serangkaian onkogen dan tumor supressor gen. Pada jalur ini terjadi proliferasi lokal epitel kolon menjadi adenoma progresif yang akan menjadi lesi displastik dan invasif. Teori karsinogenesis kolorektal, dimulai dari point mutation K-ras yang kehilangan allele pada kromosom 5q (pada kasus kelainan APC), ju18 q (DCC), dan kromosom 17 p (p53).^{4,5} Pada *microsatellite instability* (lesi genetik) terjadi perubahan morfologik yang tidak menyolok pada gen *DNA mismatch repair (MMR)* akibat gangguan perbaikan/inaktivasi DNA. Mutasi herediter gen *DNA MMR yaitu hMSH2, hMSH6, hMLH1, PMS1, dan PMS2* dijumpai pada karsinoma non poliposis herediter; di mana hMLH1 paling sering ditemukan pada karsinoma kolon sporadik. Hilangnya gen *DNA MMR* menyebabkan terjadinya *hypermutable* repetitif sekuensi DNA sehingga replikasi tidak stabilan.¹

Pada manusia, mutasi gen p53 ditemukan pada 50% kasus keganasan, yang dihubungkan dengan derajat keganasan dan kanker.⁶ Penentuan abnormalitas p53 berperan dalam diagnostik, prognostik, dan terapi, serta berhubungan dengan *clinical outcome* yang buruk dan *surviva* yang menurun.^{7,8} Penelitian ekspresi p53 pada penderita kanker kolorektal antara usia dan jenis kelamin menyatakan tidak ada perbedaan bermakna.^{9,10,11} Juga ekspresi p53 antara lokasi kanan atau kiri dan^{10,12}, dan derajat histologik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna.⁹ Namun, ekspresi p53 pada

adenokarsinoma antara yang berdifferensiasi sedang dan buruk menunjukkan perbedaan bermakna.^{13,14} Selain itu, penelitian ekspresi hMLH1 negatif kanker kolorektal tipe adenokarsinoma differensiasi buruk dijumpai pada penderita usia 45.9 th dengan lokasi kanan lebih dominan,^{15,16,17} Perbedaan hasil berbagai penelitian menyatakan peran p53 dan hMLH1 kanker kolorektal masih kontroversial. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan ekspresi p53 dan ekspresi hMLH1 dengan karakteristik klinikopatologik kanker kolorektal.

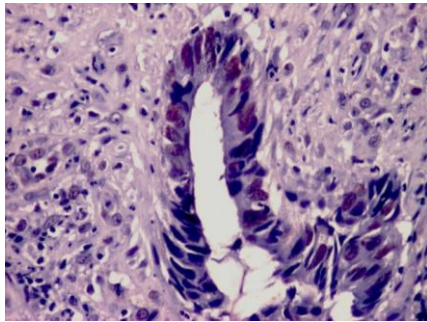
METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada sampel blok parafin yang berasal dari 45 kasus adenokarsinoma kolorektal yang mengalami pengangkatan tumor pada Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Sardjito, RS. Panti Rapih dan RS. Bethesda Yogyakarta mulai 1 Januari 2007 sampai 31 Desember 2008. Data jenis kelamin, usia, dan lokasi didapatkan dari rekam medik. Pewarnaan HE dilakukan untuk menentukan diagnosa dan derajat histologik.

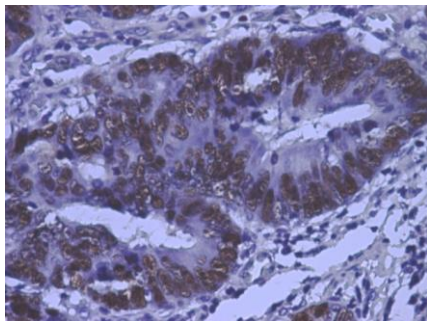
Pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mengetahui ekspresi p53 dan ekspresi hMLH1 digunakan metode streptavidin-biotin-peroxidase complex dengan monoclonal antibody anti p53 (DO7; Novocastra;UK) dan monoclonal antibody anti hMLH1 (Biocare Medical, USA). Antigen retrieval digunakan larutan buffer citrate, dan untuk chromogen digunakan DAB, counterstain yang dipakai hematoxyllin Mayer. Interpretasi imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi p53: dinyatakan positif jika >10% tumor mengandung granula coklat pada inti sel, sedangkan ekspresi negatif hMLH1: jika tidak didapatkan tumor yang mengekspresikan hMLH1 pada inti sel, dengan kontrol positif hMLH1 jaringan tonsil.¹⁸

Analisa statistik hubungan antara ekspresi p53 dan hMLH1 dengan jenis kelamin, usia, lokasi, derajat histologik dilakukan dengan *Pearson Chi-Square* dan *Fisher's Exact Test (cut of point* untuk *p-value* sebesar 0.05).

HASIL



Gambar 1. Ekspresi positif hMLH1 pada kanker kolorektal



Gambar 2. Ekspresi positif p53 pada kanker kolorektal

Tabel 1. Karakteristik penderita berdasarkan ekspresi p53 ,ekspresi negatif hMLH1, dan klinikopatologik

Karakteristik penderita karsinoma kolorektal berdasarkan ekspresi p53, hMLH1 dan klinikopatologik	
p53 (+)	24 (53.3%)
hMLH1(-)	15 (33.3%)
Lokasi	
Kiri	39 (86.7)
Kanan	6 (13.3)
Derajat histologik	
Baik	33(73%)
Sedang	9(20%)
Buruk	3(7%)
Stadium (24 pasien)	
Dukes A	1 (4.1)
Dukes B	14 (58.3)
Dukes C	9 (37.5)
Dukes D	

Tabel 2. Hubungan antara ekspresi positif p53 dan ekspresi negatif hMLH1 dengan usia, jenis kelamin, lokasi dan derajat histologik kanker kolorektal di Jogjakarta

	p 53+	p 53-	p	hMLH1+	hMLH-	P
Jenis kelamin						
Laki-laki	13(52.0%)	12(48.0%)	0.764	110(40.0%)	15(60.0%)	0.352
wanita	12(60.0%)	8(40.0%)		5(25.0%)	15(75.0%)	
Umur						
< 40	4(44.4%)	5(55.6%)	0.453	3(33.3%)	6(66.7%)	1
> 40	21(58.3%)	15(41.7%)		12(33.3%)	24(66.7%)	
Lokasi						
Kiri	22(56.4%)	17(43.6%)	0.769	4(35.9%)	25(64.1%)	0.352
Kanan	3(50.0%)	3(50.0%)		1(16.7%)	5(83.3%)	
Derajat histologik						
Baik	17(51.5%)	16(48.5%)	0.664	13(39.4%)	20(60.6%)	0.280
Sedang	6(66.7%)	3(33.3%)		2(22.2%)	7(77.8%)	
Buruk	2(66.7%)	1(33.3%)		0	3(100%)	

DISKUSI

Tabel 1 menunjukkan bahwa ekspresi positif p53 adalah 53.3% dan ekspresi negatif hMLH1 adalah 33.3%. Hal ini diduga bahwa pada proses keganasan lebih sering terjadi mutasi gen p53 daripada kerusakan gen MMR. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa ekspresi p53 berkisar 52.5% sampai 61.4%.^{9,10,19}

Tabel 2 menunjukkan adanya hubungan antara ekspresi p53 dan usia (p:0.453), jenis

kelamin (p:0.764), lokasi (p:0.769) dan derajat histologik (0.664). Juga tampak hubungan antara ekspresi negatif hMLH1 dan usia (p:1), jenis kelamin (p:0.352), lokasi (0.352) dan derajat histologik(p:0.280). Hal ini diduga karena ekspresi p53 dan hMLH1 berkaitan dengan usia, jenis kelamin, lokasi tumor dan derajat histologik, serta adanya akumulasi gen repetitif. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa mutasi p53 meningkat dengan bertambahnya usia,^{9,10,15,16}

walaupun lokasi sebelah kiri lebih dominan.^{10,12,20,21} Juga peneliti lain menyatakan bahwa ekspresi negatif hMLH1 keganasan gaster lebih sering dijumpai sesuai dengan peningkatan usia.¹⁷ Namun, peneliti lain menyatakan bahwa ekspresi negatif hMLH1 lebih sering dijumpai pada perempuan, dan *Microsatellite instability* lebih dominan pada kolon kanan¹⁵, dan tipe karsinoma differensiasi buruk.¹⁸

KESIMPULAN

Ekspresi p53 dan hMLH1 dengan karakteristik klinikopatologik (usia, jenis kelamin, lokasi, dan derajat histologik) pada kanker kolorektal tidak menunjukkan perbedaan bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

- Peter B, Langman JS. ABC Of Colorectal Cancer Epidemiology, 2001, BMJ Books, BMA House, Tavistock Square, London WC1H 9JR
- Stewart M, Bernard W., ed. World Cancer Burden, 2003, IARC Press; Lyon.16-17
- Soeripto, Indrawati, Indrayanti. Gastrointestinal Cancer in Indonesia, Asian Pacific. J Canc Prev 2003; 4: 289-96
- Kumar V, Robbin S and Cotran. Pathologic Basis of Disease.7 ed.W.B. and Saunders; Philadelphia; 2010
- Stanley H, Aaltonen R, .Lauri A.Tumours of The Colon and Rectum, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, 2000, WHO, IARC
- Gangopadhyay SB, Abraham J,YunPL, and Benchimol S. The Tumour Suppressor Gene p53, Oncogenes and Tumor Suppressor. 1997, IRL Press, Oxford University Press.
- James DJ., Ye Yunrong, Colangelo L, Smith R, Mamounas E, Wieand HE, and Wolmark N. Prognosis After Rectal Cancer in Blacks and Whites Participating in Adjuvant Therapy Randomized Trials. J Clin Oncol 2003; 21:413-20.
- Levine A.J., Perry ME., Chang, A. Silver, D. Dittmer, M. Wu & D. Welsh, The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis, Br. J. Cancer, 1994; 69:409-16.
- Nasiri M, Rezaei E, Ghafarzadegan K, Toosi M, Malekifard H. Expression of p53 in Colorectal Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Features, Arch Iranian Med, 2007;10:38-42
- Rambau, Peter F, Odida M, Wabinga H. p53 expression in Colorectal Carcinoma in Relation to Histopathological features in Ugandan Patients. African Health Sci. 2008;8:234-38.
- Slattery ML, Ballard-Barbash R, Potter JD, Ma KN, Caan BJ, Anderson K, Samowitz W. Sex specific differences in colon cancer associated with p53 mutation Nutr Cancer 2004;49:41-8.
- de Jong KP, Gouw ASH, Peters PM, Bulthuis M, Menkema L, Porte R, Slooff M, Van Goor H, Van Den Berg A. p53 Mutation Analysis of Colorectal Liver Metastases ; Relation to Actual Survival, Angiogenic Status, and p53 Overexpression. Clin Cancer Res. 2005;11:4067-73
- Mehta, KU, Goldfarb MA, Zinterhofer. Absent p53 Protein in Colorectal Tumor Cells Reflects Poor Survival. J App Res 2010;14: 4023-28.
- Torsello A., Garuffi C., Cosimelli M., Diodoro MG., Campanella C., Sperduti I., Donnorso RP., Cognetti F., Terzoli E., Mottolese M.p53 and bcl-2 in Colorectal Cancer Arising in Patients Under 40 Years of Age; Distribution and Prognostic Relevance. Eur J Cancer. 2008;13:1217-22
- Shen X., Zhao B., and Wang Z. Clinical Features and hMSH2/hMLH1 Germ-line mutation in Chinese Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. Chin Med J. 2008;121:1265-68
- Kakar S., Burgart LJ., Thibodeau SN., Rabe GK., Petersen GM., Goldberg RM. Lindor NM., Frequency of Loss of hMLH1 Expression in Colorectal Carcinoma Increases with Advancing Age. Amer Cancer Soc 2003;97:1421-27.
- Kwon J., Lee J., Jee Y., Park D., Kim H., Lee H., Yang H., Lee K., Lee H. Over expression of p53, Mutation of hMLH1 and Microsatellite Instability in Gastric Carcinomas; Clinicopathologic Implications and Prognosis. J Korean Surg Soc 2010; 79: 94-102.
- Arai T., Sungai T., Kasahara I., Sawabe M., Honma N., Aida J., Nakamura S., Takubo K. Age Related Alteration in the association of Microsatellite Instability with Absent hMLH1 expression and Histological Types of Colorectal Carcinoma. Pathol Intern. 2006; 56:597-603.

19. Paluszkiwicz P., Berbeae H., Pawlowska Wakowicz B., Cybusk M., Paszkowska A, p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left sided colon tumors. *Cancer detect and prev* 2004;28:252-59.
20. Rosati G., Chiacchio R., Reggiardo G., De Sanctis D., Manzione L. Thymidylase synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer; Relationship with tumour recurrence and survival. *Tumor Biol* 2004; 25:258-63.
21. Smyth EF, Shamma A, Sivarajasingham N, Hartley J, Monson J, Prognostic implication of hMLH1 and p53 immunohistochemical status in right sided colon cancer. *Dis Colon rectum* 2004; 24: 2086-92
22. Curtis C., Hollstein M., Clinical implication of the p53 tumor suppressor gene. *New Eng J Med* 1993; 329:1318-27.