

Ekspresi Protein HPV16 E6/18 E6 dan Protein P53 pada Adenokarsinoma Serviks

Rahmi Alia, Gondo Mastutik, Faroek Hoesin

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Kejadian kanker serviks di Indonesia masih tinggi, 90% kanker serviks jenis sel skuamosa disebabkan Human Papillomavirus (HPV), dan selain itu infeksi HPV juga menimbulkan adenokarsinoma serviks. Protein *Early 6* (E6) HPV memicu karsinogenesis. E6 mengikat protein 53 (p53) *wild type* dan mendegradasinya. Inaktivasi p53 menyebabkan gangguan mekanisme pengaturan apoptosis. E6 juga merusak DNA menimbulkan p53 mutan. Di sisi lain adenokarsinoma serviks dapat berkembang menjadi tumor berdiferensiasi baik, diferensiasi sedang, dan diferensiasi buruk. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara ekspresi E6 dan p53 pada adenokarsinoma serviks berdiferensiasi baik, diferensiasi sedang, dan diferensiasi buruk, serta menganalisa korelasi antara ekspresi E6 dan p53 pada adenokarsinoma leher rahim.

Metode

Rancangan penelitian menggunakan *cross sectional*. Sampel dibagi adenokarsinoma serviks diferensiasi baik, sedang, dan buruk, yang telah didiagnosis di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya periode Januari-Desember 2013. Sampel dilakukan pulasan imunohistokimia dengan antibody monoklonal HPV E6 dan p53. Perbedaan ekspresi HPV E6 dan p53 pada adenokarsinoma serviks dianalisa menggunakan Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi HPV E6 dan p53 pada adenokarsinoma serviks dianalisa menggunakan Spearman.

Hasil

Tidak didapatkan perbedaan ekspresi HPV E6 maupun ekspresi p53 pada derajat adenokarsinoma serviks ($p=0,626$). Terdapat hubungan yang bermakna antara HPV E6 dan p53 pada adenokarsinoma serviks ($r_s=0,429$, $p=0,018$).

Kesimpulan

Terdapat hubungan antara ekspresi HPV E6 dengan p53 pada adenokarsinoma serviks. Peningkatan ekspresi HPV E6 seiring dengan peningkatan ekspresi p53. Tidak terdapat perbedaan ekspresi HPV E6 dan p53 pada derajat adenokarsinoma serviks.

Kata kunci: adenokarsinoma serviks, E6, HPV16, p53.

ABSTRACT

Background

The incidence of cervical cancer in Indonesia is still high, 90% of squamous cervical cancer type caused by Human Papilloma Virus (HPV), beside the HPV infections may also results in adenocarcinoma. Early Protein 6 (E6) triggers HPV carcinogenesis because E6 is bound to protein 53 (p53) wild-type result in inactivation of p53 that also cause disturbance of the apoptotic regulation mechanism. E6 also damages the DNA cause p53 mutants. To analyze the difference expression of HPV E6 and p53 in cervical well differentiated adenocarcinoma, moderately differentiated, and poorly differentiated, and analyzing the correlation between HPV E6 and p53 expressions with histopathological grading in cervical adenocarcinoma.

Methods

Study design was cross sectional. Sample were divided into: well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated adenocarcinoma cervix had been diagnosed on Dr Soetomo Hospital Surabaya from January to December 2013. The sample were stained immunohistochemically with monoclonal antibody of HPV E6 and p53. The results differences between HPV E6 and p53 expression on adenocarcinoma cervix were analyzed by Kruskal-Wallis. The correlation between HPV E6 and p53 expression were analyzed by Spearman.

Results

There were no differences in the expression of HPV E6 and p53 in cervical adenocarcinoma grade ($p=0.626$). There was a significant association between HPV E6 and p53 in cervical adenocarcinoma ($r_s=0.429$, $p=0.018$).

Conclusion

The results suggest that there were relationship between the expressions of HPV E6 with p53 in cervical adenocarcinoma, which increased expression of HPV E6 along with expression of p53. There were no differences in the expression of HPV E6 and p53 in any grade of cervical adenocarcinoma.

Key words : adenocarcinoma cervix, E6, HPV16, p53.

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan kanker yang sering diderita perempuan di seluruh dunia. Kanker serviks menempati peringkat kedua dari segi jumlah penderita namun sebagai penyebab kematian masih menempati peringkat pertama di Indonesia. *World Health Organization (WHO)* 2008 memperkirakan setiap hari terdapat 38 kasus baru kanker serviks dan 21 orang perempuan meninggal karena kanker serviks di Indonesia.^{1,2} Pasien baru didiagnosa menderita kanker serviks tercatat sekitar 500.000 dan sekitar 350.000 pasien meninggal dunia akibat kanker serviks setiap tahun.³

Kanker serviks disebabkan infeksi *human papilloma virus (HPV)* yang onkogenik.⁴ Virus ini menginfeksi serviks melalui kontak seksual,⁵ Infeksi HPV sering tanpa gejala, bahkan ketika infeksi tersebut sudah menyebabkan lesi prakanker. Kanker serviks menjadi menakutkan karena lesi prakanker timbul tanpa gejala. Penanganan menjadi lebih sulit dengan prognosis lebih buruk pada saat gejala muncul yaitu pada stadium lanjut. Lesi prekanker epitelial serviks uteri dan karsinoma invasif, terutama *squamous cell carcinoma (SCC)* dengan infeksi HPV telah jelas berhubungan.⁶ Penelitian Castellsagué *et al*, 2006 menyatakan bahwa infeksi HPV tipe resiko tinggi juga meningkatkan faktor resiko terjadinya adenokarsinoma serviks. HPV 16 dan 18 merupakan tipe yang paling utama menyebabkan terjadi karsinogenesis dan bertanggung jawab pada 70% kanker serviks.^{3,6,7}

Infeksi HPV mempunyai potensi yang dapat menyebabkan transformasi keganasan. Peningkatan ekspresi *early 6 (E6)* dan *early 7 (E7)* ini diketahui telah memicu transformasi keganasan dari sel penjamu dan terbentuknya tumor. Karsinogenesis serviks, protein E6 berikatan dengan protein p53 dan menginaktivasi supresor tumor p53, melalui mekanisme pengikatan yang disebut *ubiquitin-dependent proteolytic pathway (E6AP)*, sehingga terjadi penurunan ekspresi protein p53 *wild type*. Inaktivasi supresor tumor p53 oleh E6 dapat menjadi dasar penjelasan seberapa tinggi resiko tipe HPV dapat menyebabkan efek onkogenik pada sel serviks.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti merasa perlu meneliti hubungan ekspresi HPV 16 E6/18 E6 dan p53 pada adenokarsinoma serviks, sehingga dapat digunakan sebagai

penanda molekular untuk menentukan diagnosis dan prognosis.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian adalah *cross sectional*. Sampel penelitian adalah 30 kasus adenokarsinoma serviks di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode Januari sampai Desember 2013.

Histopatologi derajat adenokarsinoma serviks meliputi gambaran bentuk kelenjar, jumlah lapisan sel yang membentuk kelenjar, pleomorfik inti dan jumlah mitosis. Pemeriksaan yang dilakukan menggunakan pulasan hematoxililin eosin (HE) menggunakan mikroskop cahaya yang memiliki diameter lapang pandang kuat 0,44 mm atau 0,152 mm² dengan pembesaran 40x dan 200x. Didapatkan 3 kriteria yaitu adenokarsinoma berdiferensiasi baik, diferensiasi sedang dan diferensiasi buruk.⁸

Imunohistokimia dengan *antibody monoclonal mouse* klon C1P5: sc-460 (Santacruz) digunakan untuk mengamati ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6, dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler 40x dan 400x, dan dibuat skor menurut *German semiquantitative scoring system*, skor 0: tidak terpulas, skor 1: terpulas 1%-10%, skor 2: terpulas 11%-50%, skor 3: terpulas 51%-80%, skor 4: terpulas 81%-100%.⁹ Ekspresi protein p53 mutan yang diperiksa secara imunohistokimia dengan menggunakan *antibody monoclonal rabbit* terhadap *anti-human p53 clone Y5* (Biocare), dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler pembesaran 400x dan dibuat skor secara semikuantitatif, bila inti sel tumor terpulas negatif: skor 0; terpulas <5%: skor 1; terpulas 5% -25%: skor 2; terpulas 26%-50%: skor 3; terpulas 51%-75%, skor 4: terpulas >75%.¹⁰

Analisis data menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences*. Untuk menganalisa perbedaan ekspresi protein HPV E6 dan protein p53 pada adenokarsinoma serviks berdiferensiasi baik, diferensiasi sedang dan diferensiasi buruk menggunakan uji Kruskal-Wallis ($p < 0,005$), sedangkan analisa korelasi antara protein HPV E6 dengan proteih p53 menggunakan uji Spearman ($p < 0,005$).

HASIL

Penelitian terdiri atas 30 sampel, 10 diferensiasi baik, 10 diferensiasi sedang dan 10 diferensiasi

buruk dengan tipe histopatologi *adenocarcinoma* NOS 25 sampel, *muinous adenocarcinoma* 4 sampel dan *clear cell adenocarcinoma* 1 sampel.

Sampel menunjukkan bahwa rentang umur antara 30-68 tahun dengan rerata umur penderita pada kasus adenokarsinoma serviks 48,67 tahun. Usia penderita adenokarsinoma serviks paling banyak berada pada rentang 40-49 tahun (66,7%).

Tabel 1. Ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 pada adenokarsinoma serviks.

Grade	Ekspresi HPV 16 E6/18 E6					Jumlah sampel
	Skor					
	0	1	2	3	4	
Diferensiasi baik	2	3	2	2	0	9
Diferensiasi sedang	4	3	4	0	0	11
Diferensiasi buruk	2	3	4	1	0	10

Tabel 2. Ekspresi protein p53 pada adenokarsinoma serviks.

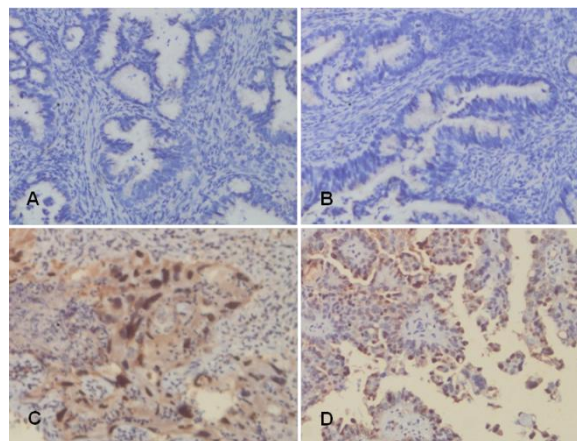
Grade	Ekspresi p53					Jumlah sampel
	Skor					
	0	1	2	3	4	
Diferensiasi baik	4	3	1	1	1	10
Diferensiasi sedang	3	4	0	1	2	10
Diferensiasi buruk	3	4	1	2	0	10

Tabel 1 menunjukkan ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 semua *grade* memiliki skor terendah adalah 0. Sedangkan skor tertinggi adenokarsinoma berdiferensiasi baik adalah 3, diferensiasi sedang 2 dan pada diferensiasi buruk adalah 3. Dengan uji Kruskal-Wallis didapatkan $p=0,626$ yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 pada *grade* tersebut.

Tabel 2 menunjukkan ekspresi protein p53 semua *grade* memiliki skor terendah 0 sedangkan skor tertinggi masing-masing 4 untuk diferensiasi rendah dan sedang, 3 untuk diferensiasi buruk.

Dengan Kruskal-Wallis didapatkan hasil $p=0,902$ yang berarti tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi protein p53 pada ketiga *grade* adenokarsinoma.

Analisa statistik Spearman menunjukkan $r_s=0,429$; $p=0,018$, yang berarti terdapat korelasi positif yang bermakna antara ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 dengan protein p53 pada adenokarsinoma serviks. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 seiring dengan peningkatan ekspresi protein p53.



Gambar 1. Adenokarsinoma. A. Ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 skor 0, inti tidak terpulas coklat; B. Ekspresi protein p53 skor 0, inti tidak terpulas coklat; C. Ekspresi protein HPV 16 E6/18 E6 skor 3, terpulas coklat pada inti; D. Ekspresi protein p53 skor 3, terpulas coklat pada inti (200x).

DISKUSI

Adenokarsinoma serviks merupakan salah satu keganasan epitelial yang sering terjadi pada serviks setelah *squamous cell carcinoma*. Pada adenokarsinoma serviks lebih sulit dilakukan skrining karena letaknya di kanal endoservikal, sehingga penderita sering didiagnosa pada stadium lanjut.

Analisa statistik dengan uji Kruskal-Wallis yang mengukur ekspresi protein HPV E6 dan derajat adenokarsinoma serviks menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0,626$) antara ekspresi protein HPV E6 dan derajat histopatologi adenokarsinoma serviks. Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian oleh Chew GK tahun 2005 yang menyatakan bahwa tidak ada perbedaan bermakna secara statistik antara derajat adenokarsinoma serviks dengan ekspresi protein HPV E6.¹¹ Penelitian yang dilakukan oleh Roncaglia MT *et al.* tahun 2003 menyatakan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara ekspresi protein HPV E6 dengan karsinoma serviks.¹²

Penelitian ini juga didapatkan hasil ekspresi protein HPV E6 skor 0, tetapi ekspresi protein p53 positif, menunjukkan bahwa tidak semua adenokarsinoma serviks disebabkan oleh infeksi HPV. Hasil ini sesuai dengan penelitian Burk (2003) yang menyatakan bahwa virus penyebab karsinoma serviks yang dominan adalah HPV tipe 16 dan ditemukan

pada 50% penderita SCC maupun penderita adenokarsinoma serviks.¹³ HPV merupakan penyebab utama terjadinya kanker serviks tipe SCC (>90% SCC disebabkan oleh infeksi HPV), sedangkan pada adenokarsinoma serviks hanya 70% kasus yang disebabkan oleh infeksi HPV.¹⁴ HPV 16 merupakan tipe yang paling umum ditemukan pada invasif SCC (50-60%) diikuti HPV 18 (15%), sedangkan pada adenokarsinoma serviks HPV 18 lebih sering ditemukan, diikuti oleh HPV 16.¹⁴ Mutasi p53 sering ditemukan pada keganasan dari serviks dan vulva yang tidak terinfeksi HPV.¹⁵

P53 tumor supresor gen memegang peranan dalam mengontrol siklus sel dan berhentinya pertumbuhan akibat kerusakan DNA. Mutasi p53 tumor supresor gen merupakan penyimpangan yang paling banyak terjadi pada keganasan manusia. Overekspresi protein p53 berhubungan dengan prognosis yang buruk pada beberapa keganasan, tetapi beberapa penelitian pada kanker serviks tidak ada perbedaan bermakna antara ekspresi protein p53 dengan derajat histopatologi kanker serviks.¹⁰

Uji analisis menunjukkan hasil yang tidak bermakna untuk ekspresi protein p53 dengan derajat adenokarsinoma serviks ($p=0,902$). Penelitian Baalbergen tahun 2007 menyatakan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara ekspresi protein p53 pada derajat adenokarsinoma serviks. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa ekspresi protein p53 tidak berhubungan dengan derajat adenokarsinoma serviks, tetapi ekspresi protein p63 (salah satu *family* dari protein p53) dan ekspresi protein Ki-67 berhubungan dengan derajat adenokarsinoma serviks.¹⁶

Hasil penelitian ini didapatkan ekspresi protein p53 dengan skor 0 pada 10 kasus dengan ekspresi protein HPV E6 positif, hal ini dapat disebabkan proses terjadinya karsinogenesis pada kasus ini karena protein E6 berikatan dengan protein p53 (*wild type*) melalui *ubiquitin ligase*, sehingga protein p53 terdegradasi, apoptosis dihambat dan terjadi proliferasi sel yang berlebihan. Protein p53 (*wild type*) tidak terekspresi pada penelitian ini karena mempunyai waktu paruh yang pendek yaitu 5-20 menit. Thomas *et al*, 1998 juga menyatakan bahwa degradasi protein p53 oleh protein E6 mengakibatkan protein p53 tidak terekspresi pada inti sel tumor, karena waktu paruhnya yang pendek.

Hasil analisis korelasi Spearman antara protein HPV E6 dengan protein p53 didapatkan $r_s=0,429$ dengan nilai $p=0,018$ ($p<0,05$), hal ini membuktikan bahwa terdapat korelasi antara ekspresi protein HPV E6 dengan protein p53 pada adenokarsinoma serviks. Peningkatan ekspresi protein HPV E6 seiring dengan peningkatan ekspresi protein p53. Penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi protein HPV E6 diikuti oleh peningkatan ekspresi protein p53, dan tidak didapatkan peningkatan ekspresi protein p53 pada sel tumor yang tidak menampilkan protein ekspresi HPV E6.¹⁷

KESIMPULAN

Terdapat hubungan antara ekspresi HPV E6 dengan p53 pada adenokarsinoma serviks. Ekspresi E6 pada adenokarsinoma serviks menunjukkan adanya infeksi HPV dan hal ini seiring dengan adanya peningkatan ekspresi p53. Tidak terdapat perbedaan ekspresi HPV E6 dan p53 pada derajat adenokarsinoma serviks.

DAFTAR PUSTAKA

1. Globocan. Cervical cancer incidence and mortality world wide in 2008. Cancer Fact Street. Lyon: IARC; 2008.
2. WHO/ICO. Information centre on HPV and cervical cancer. Human papilloma virus and related cancers in world. Summary Report Update 2010.
3. Skiba D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of serum antibodies to HPV-16 L1 virus-like particles in patient with invasive cervical cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26: 4921-6.
4. Muñoz N, Bosch F, de Sanjosé S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med.* 2003; 348: 518-27.
5. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, *et al*. Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol.* 2008; 19: 162-8.
6. Amalinei C, Balan R, Stanoiu B, Crauciuc E, Toma O, Caruntu ID. Immuno-histochemical identification of human papilloma virus high-risk type L1 major capsid proteins in atypical

- glandular cells. *SecŃiunea Genetică si Biologie Moleculară*, 2009; 10: 103-8.
7. Castellsagué X, Diaz M, de Sanjosé S. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Nat Cancer Inst*. 2006; 98: 303-15.
 8. Wei JJ. Pathology of Cervical Carcinoma. Department of Pathology. Northwestern University. USA. 2009.
 9. Agrawal GP, Joshi PS, Agrawal A. Role of HPV-16 in pathogenesis of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma and correlation of p16INK4A expression in HPV-16 positive cases: An immunohistochemical study. Hindawi Pub Co. 2007: 1-7.
 10. Baalbergen A, Patricia C, Ewing-Graham, Marinus J. Eijkemans, Theo JM, Helmerhorst. Prognosis of adenocarcinoma of the uterine cervix: p53 expression correlates with higher incidence of mortality. *Int J Cancer*, 2007; 121: 106-10.
 11. Chew GK, Cruickshank ME, Rooney PH, Miller ID, Parkin DE, Murray GI. Human papillomavirus 16 infection in adenocarcinoma of the cervix. *British J Cancer* 2005; 93: 1301-4.
 12. Roncaglia MT, Fregnani TG, Tacla M, De Campos SVG, Callava HH, *et al*. Characterization of p16 and HPV-related proteins in uterine cervix high-grade lesion of patients treated by conization with large loop excision. *Oncol Lett*. 2013; 6: 63-8.
 13. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton L A, Kurman RJ, Barnes WA, *et al*. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*. 2003 ;63: 7215-20.
 14. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvärd C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2001; 37: 246-50.
 15. Zekri AR, Bahnassy AA, Seif-Eldin WM, El-Din HMA, Madbouly MS, Zidan AZ, *et al*. Role of human papilloma virus (HPV) in common and genital warts and its relation to p53 expression. *J Egyp Nat Cancer Inst*. 2005; 17: 117-24.
 16. Vasilescu F, Ceausu M, Tanase C, Stansulescu R, Vladescu T, Ceausu Z, 2009. P53, p63 and Ki-67 assessment in HPV-induced cervical neoplasia. *Romanian J Morphol Embryol*. 2009; 50: 357-61.
 17. Talis AL, Huibregtse JM, Howley MP. The role of E6 in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV) positive and HPV negative cells. *J Biol Chem*. 1998; 273: 6439-45.