



THE EXPRESSION OF p53 AND p16 IN LOW GRADE AND HIGH GRADE SEROUS CARCINOMA OF OVARY

Yuliawaty¹, Siti Amarwati,² Ika Pawitra Miranti²

¹Resident of the Departement of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Dr Kariadi Hospital, Semarang, Indonesia

²Lecturer of the Departement of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Dr Kariadi Hospital, Semarang, Indonesia

Correspondence writer : yuliahuger@gmail.com

ABSTRACT

Background Ovarian serous carcinoma is a common ovarian epithelial malignancy, divided into low grade serous carcinoma (LGSC) and high grade serous carcinoma (HGSC). HGSC accounts for 60-80% of ovarian carcinomas and is the most aggressive type and has a poor prognosis. The literature has described various genetic mutations involved in the occurrence of HGSC, one of which is p53 and p16 mutations. Diagnostic and prognostic value of LGSC and HGSC related to its targeted therapy.

Objective This study aimed to analyze the differences in the expression of p53 and p16 in LGSC and HGSC at anatomical pathology of laboratory dr. Kariadi Hospital.

Methods : This study was an observational analytic study with a cross sectional design involving 65 patients with ovarian serous carcinoma diagnosed between January 2017 and December 2021. The data collected were age, LGSC and HGSC subtypes as well as p53 and p16 expressions were observed by a pathologists and a resident. Compatibility between observers were tested using Kappa test. Data analysis used Chi square test and Fisher's exact test.

Results This study included 65 patients aged between 30-68 years, consist of 50 patients with HGSC and 15 patients with LGSC (P <0,001). Kappa test results between two observers showed a score of k = 0,88.

Conclusion There is a significant difference between the expression of p53 and p16 in HGSC, as the expression of p53 and p16 is much stronger and diffuse in high grade serous carcinoma compared to LGSC.

Key word Ovarian serous carcinoma, p53, p16.



EKSPRESI p53 DAN p16 PADA LOW GRADE DAN HIGH GRADE SEROUS CARCINOMA OF OVARIUM

Yuliaty¹, Siti Amarwati,² Ika Pawitra Miranti²

¹Residen Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

Alamat email koresponden : yuliahuger@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang Karsinoma serosa ovarium merupakan keganasan epitelial ovarium yang terbagi menjadi *low grade serous carcinoma* (LGSC) dan *high grade serous carcinoma* (HGSC). HGSC menyumbang 60-80% dari karsinoma ovarium dan merupakan jenis yang paling agresif dan memiliki prognosis yang buruk. Literatur telah menjelaskan berbagai mutasi genetik yang terlibat dalam terjadinya HGSC, salah satunya yaitu mutasi p53 dan p16.

Objektif Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan ekspresi p53 dan p16 pada LGSC dan HGSC.

Metode Penelitian berjenis analitik observasional dengan desain cross sectional melibatkan 65 pasien karsinoma serosa ovarium yang didiagnosis antara Januari 2017 sampai Desember 2021. Data yang dikumpulkan berupa usia, subtype HGSC dan LGSC serta ekspresi p53 dan p16 yang dibaca oleh seorang patolog dan seorang residen. Kesesuaian antara pengamat diuji menggunakan uji Kappa. Analisis data menggunakan uji Chi square dan uji Fisher's exact.

Hasil Penelitian mengikutsertakan 65 pasien berusia antara 30-68 tahun, dengan HGSC sebanyak 50 pasien dan LGSC sebanyak 15 pasien, didapatkan hasil ekspresi p53 dan p16 pada HGSC menunjukkan skor yang lebih tinggi dibandingkan ekspresinya pada LGSC ($P < 0.001$). Hasil uji Kappa antara dua pengamat menunjukkan skor $k = 0,88$.

Kesimpulan : Terdapat signifikansi perbedaan antara ekspresi p53 dan p16 pada HGSC dengan LGSC, dimana ekspresi p53 dan p16 jauh lebih kuat dan difus pada HGSC dibandingkan dengan LGSC.

Kata kunci Karsinoma serosa ovarium, ekspresi p53, p16.



PENDAHULUAN

Kanker ovarium merupakan salah satu penyebab kematian utama pada wanita dan mempunyai agresifitas yang tinggi.¹ Kanker ovarium merupakan kanker terbanyak keenam yang paling sering ditemukan (18,4%) pada wanita diseluruh dunia setelah kanker payudara, colorectal, cervix uteri, paru, dan tiroid. Penyebab kanker ovarium sangat kompleks, beberapa faktor yang berperan antara lain genetik, usia, paritas, hormonal, reproduksi, pil kontrasepsi, terapi hormon pengganti pada massa menopause.^{2,3}

Karsinoma serosa ovarii merupakan keganasan yang paling sering ditemukan. Secara histologi terbagi menjadi *low grade serous carcinoma* (LGSC) dan *high grade serous carcinoma* (HGSC). HGSC menyumbang sekitar 75% dari seluruh kanker ovarium dan 90% menyebabkan kematian. Salah satu penyebab yang paling utama adalah mutasi genetik. Berbagai macam mutasi genetik ditemukan pada karsinoma serosa ovarium, seperti WT1, p53, p16, PAX 8, dan ER. Namun diantara antibodi tersebut, terdapat pola imunoreaktivitas antara LGSC dan HGSC, yaitu pada ekspresi p53 dan p16.^{2,3}

p53 dan p16 merupakan salah satu gen penekan tumor yang berfungsi melindungi individu dari kanker, yaitu dengan menghentikan siklus sel, memperbaiki DNA yang rusak serta mengarahkan pada apoptosis / kematian sel bila DNA yang rusak tidak dapat diperbaiki.^{4,5}

Perbedaan ekspresi p53 dan p16 terhadap LGSC dan HGSC belum pernah dilakukan di RSUP Dr Kariadi, menimbang pentingnya hasil penelitian ini terhadap target terapi dan prognosis bagi pasien karsinoma serosa ovarium.

METODE DAN BAHAN

Pasien dan metode penelitian

Penelitian ini berjenis analitik observasional yang dilakukan menggunakan desain *cross sectional*. Sebanyak 65 sampel yang telah didiagnosis karsinoma serosa ovarium, terdiri dari 50 sampel HGSC dan 15 sampel, antara Januari 2017 sampai Desember 2021 oleh dokter spesialis patologi anatomi Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang. Pengambilan data dilakukan melalui rekam medis. Data yang dikumpulkan meliputi usia, riwayat paritas dan pola ekspresi pulasan p53 dan p16 yang dinilai oleh 2 pengamat. Analisis data menggunakan uji parametric chi-square dan uji alternatif fisher's exact. Kesesuaian penilaian antara 2 pengamat dilakukan uji Kappa. Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan ethical clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) RSUP Dr. Kariadi (Nomor izin : No.1049/EC/KEPK-RSDK/2022).

Metode pulasan imunohistokimia

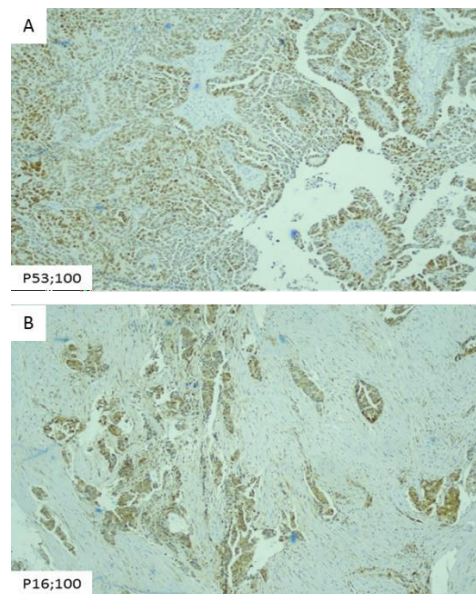
Blok paraffin dari setiap pasien dikumpulkan, kemudian dipotong menggunakan mikrotom hingga menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan 3-4 μ m. Selanjutnya pita paraffin dideparafinisasi menggunakan xylol dan rehidrasi.

Antigen retrieval dengan pH 6 selama 40 menit dalam microwave bersuhu 96°C. Slide kemudian dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS).

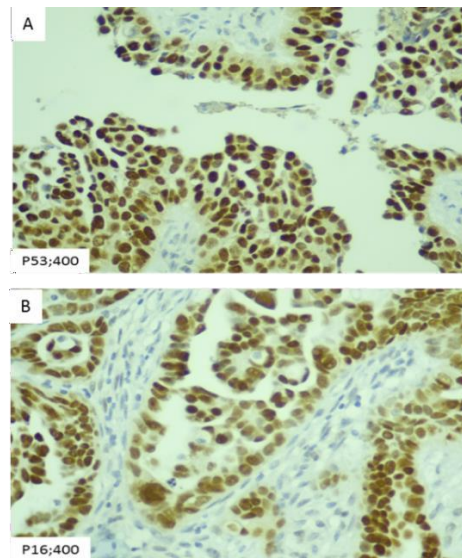
Eliminasi peroksidase endogen menggunakan H₂O₂ peroksidase selama 20 – 30 menit. Bilas air mengalir selama 10 menit dan cuci dengan PBS. Slide ditetesi *background sniper* selama 10 menit. Setelah itu slide ditetesi antibodi p53 atau p16 dengan pengenceran 1:100 dalam suhu 2-8°C.

Semua slide yang sudah diwarnai akan dinilai di bawah mikroskop pada pembesaran 100x dan 400x. Proporsi sel yang positif dan intensitas pulasan dari p53 dan p16 dinilai berdasarkan sistem skoring Allred, yaitu proporsi sel-sel tumor yang positif (dalam persentase) dijumlah dengan intensitas pewarnaan.

Persentase sel tumor (0 untuk tidak ada sel yang terpulas; 1 untuk < 1%; 2 untuk 1 – 10%; 3 untuk 11 – 33%; 4 untuk 34-66%; dan 5 untuk 67 – 100%, sedangkan intensitas pulasan (0 untuk tidak berwarna; 1 untuk lemah; 2 untuk sedang; 3 untuk kuat) (Gambar 1).



Gambar 1. Ekspresi p53 dan p16 pada LGSC (100x). A) p53 dan B) p16, keduanya menunjukkan skor proporsi 1 (jumlah sel yang berwarna < 5%) dan skor intensitas pulasan 1 (lemah), sehingga Allred score total 2 (positif lemah).



Gambar 2. Ekspresi p53 dan p16 pada HGSC (400x). A) p53 menunjukkan skor proporsi 5 (jumlah sel yang terpulas 67-100%) dan skor intensitas pulasan 3 (kuat), sehingga Allred score total 8 (positif kuat). B) p16 menunjukkan skor proporsi 5 (jumlah sel yang terpulas 67-100%) dan skor intensitas pulasan 2 (sedang), sehingga Allred score total 7 (positif sedang).

Analisis statistik

Karakteristik klinis setiap pasien dikumpulkan, meliputi usia saat diagnosis, derajat karsinoma serosa (HGSC atau LGSC) dan skor ekspresi p53 dan p16 (skor 2 – 8). Analisis data secara statistik menggunakan program *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 21 (IBM Chicago, IL).

Hubungan antara variabel penelitian, dilakukan uji Chi square dan uji alternatif Fisher's exact, dengan derajat kemaknaan $p < 0.05$, serta kesesuaian antara kedua pengamat dilakukan uji Kappa dengan nilai kemaknaan sebesar $k > 0.75$.

HASIL

Karakteristik usia subjek penelitian

Sebanyak 65 sampel karsinoma serosa ovarium di RS Dokter Kariadi Semarang diikutsertakan dalam penelitian ini. Sebagian besar pasien terdiagnosis sebagai HGSC (50 sampel), berusia antara 51 tahun hingga 68 tahun dengan rerata usia $52,40 \pm 8,79$ untuk HGSC dan $50,67 \pm 13,90$ untuk LGSC.

Pola ekspresi p53 terhadap karsinoma serosa ovarium

Hasil pengamatan terhadap ekspresi p53 pada HGSC menunjukkan skor yang bervariasi dengan kisaran antara skor 4 sampai 8. Skor yang paling banyak adalah skor 7 dan 8, sedangkan pengamatan ekspresi p53 pada LGSC menunjukkan skor antara 2 hingga 4 dengan skor terbanyak adalah skor 2.

Hasil uji hubungan ekspresi p53 terhadap karsinoma serosa ovarium menunjukkan



signifikansi $p < 0.001$, yang menyimpulkan bahwa ekspresi p53 lebih kuat dan difus pada HGSC dibandingkan LGSC (Tabel 1). Hasil uji Kappa $k = 0,88$, sehingga disimpulkan kesesuaian antara 2 pengamat sangat baik.

Tabel 1. Hubungan ekspresi p53 terhadap karsinoma serosa ovarium

p53	Lesi ganas ovarium		Total	p
	High grade	Low grade		
10% – 50%	1 (6,3%)	15 (93,8%)	16 (100%)	<0,001*
>50%	49 (100%)	0 (0%)	49 (100%)	
Total	50 (76,9%)	15 (23,1%)	65 (100%)	

Pola ekspresi p16 terhadap Karsinoma serosa ovarium

Hasil pengamatan terhadap ekspresi p16 pada HGSC menunjukkan skor yang bervariasi dengan kisaran antara skor 4 sampai 7. Skor yang paling banyak adalah skor 6, sedangkan pengamatan ekspresi p16 pada LGSC menunjukkan skor antara 2 hingga 4 dengan skor terbanyak adalah skor 3 dan 4.

Hasil uji hubungan ekspresi p16 terhadap karsinoma serosa ovarium menunjukkan signifikansi $p < 0.001$, yang menyimpulkan bahwa ekspresi p16 lebih kuat dan difus pada HGSC dibandingkan LGSC (Tabel 2). Hasil uji Kappa $k = 0,88$, sehingga disimpulkan kesesuaian antara 2 pengamat sangat baik.

Tabel 2. Hubungan ekspresi p16 terhadap karsinoma serosa ovarium

p16	Lesi ganas ovarium		Total	p
	High grade	Low grade		
10% – 50%	1 (5,9%)	16 (94,1%)	17 (100%)	<0,001*
>50%	48 (100%)	0 (0%)	48 (100%)	
Total	49 (75,4%)	16 (24,6%)	65 (100%)	

DISKUSI

Pada penelitian ini sebanyak 65 pasien yang didiagnosis karsinoma serosa ovarium di RS Dokter Kariadi periode Januari 2017 hingga Desember 2021, dilakukan penilaian oleh dua pengamat untuk menilai pola ekspresi p53 dan p16 pada HGSC dan LGSC menggunakan pemeriksaan imunohistokimia.

Protein 53 (p53) berfungsi sebagai gen penekan tumor, yaitu gen yang menghentikan siklus sel, memperbaiki DNA yang rusak, dan menginduksi apoptosis bila kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki.^{6,7} Mutasi TP53 menyebabkan protein 53 menjadi inaktif dan terakumulasi dalam inti sehingga terdeteksi oleh pengecatan imunohistokimia. Mutasi Gen TP53 ditemukan pada serous tubal intraepithelial carcinoma (STICs) yang merupakan lesi prekursor dari karsinoma serosa ovarium.⁸

Penelitian ini melaporkan bahwa ekspresi p53 pada HGSC menunjukkan skor 7 hingga 8, sedangkan ekspresi p53 pada LGSC menunjukkan skor 2, sehingga disimpulkan bahwa ekspresi p53 lebih kuat dan difus pada HGSC dibanding LGSC. Temuan ini sejalan dengan literatur yang melaporkan bahwa mutasi TP53 ditemukan



pada sebanyak 96% kasus HGSC.⁸ Studi lain juga melaporkan ekspresi p53 difus pada sebanyak 68.2% kasus HGSC sedangkan pada LGSC tidak terekspresi sebanyak 81% kasus.⁶ Penelitian lainnya juga ikut menyokong hasil pengamatan ini dengan melaporkan ekspresi p53 berwarna kuat dan difus pada 64% kasus HGSC sebaliknya ekspresi p53 lemah dan fokal pada 18% kasus LGSC.⁹

p16 adalah gen supressor tumor yang berfungsi sebagai inhibitor cyclin -dependent kinase inhibitor CDK4 yang menghentikan siklus sel. Delesi pada gen ini dapat membuat penurunan fungsi atau inaktivasi p16, mempercepat siklus sel dan dapat menyebabkan proliferasi neoplastik pada sel hingga berkembang menjadi berbagai jenis kanker, salah satunya karsinoma serosa ovarium.^{6,8-10}

Penelitian ini melaporkan bahwa ekspresi p16 pada HGSC menunjukkan skor 6, sedangkan pada LGSC menunjukkan skor 2 hingga 4, sehingga disimpulkan ekspresi p16 jauh lebih kuat dan difus pada HGSC dibandingkan LGSC. Temuan ini sejalan dengan literatur yang melaporkan bahwa ekspresi p16 negatif pada 90.5% LGSC berbeda dengan ekspresi p16 yang kuat pada 88.1% HGSC.⁸ Literatur lain menambahkan hasil penelitian mereka menunjukkan ekspresi p16 pada HGSC difus dan intens pada 60-80% kasus HGSC.⁶

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut :

- Tidak ada signifikansi karakteristik usia terhadap HGSC dan LGSC
- Terdapat perbedaan ekspresi p53 dan p16 pada HGSC dan LGSC, ekspresi p53 dan p16 jauh lebih kuat dan difus pada HGSC dibandingkan LGSC
- Hasil penelitian pada ekspresi p53 dan p16 sebagai salah satu penanda yang baik dalam membantu menegaskan diagnosis LGSC dan HGSC untuk klinisi yang berkaitan dengan target terapi dan prognosis bagi pasien karsinoma serosa ovarium

DAFTAR PUSTAKA

1. Kobel M, Kalloger SE, Lee S, Duggan MA, Kallman LE, Prentice L, et al. -Biomarker-based Ovarian Carcinoma typing : A Histological Investigation in the Ovarian Tumor Analysis Consortium. 2013 October, 22(10):1677-86
2. Lax SF, Cheung An, Oliva E. WHO Classification of Tumours of Female. 5 edition. 2020, 31-45.
3. Kumar V, Abbas A.K, Aster, J.C. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015.
4. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks M, Shih L, Kurman R. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma : an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. Mod Pathol 2011 March, 10(24) : 1248-53.
5. Manu V, Tin Aung Hein, Boruah D, Srinivas V. Serous ovarian tumors : Immunohistochemical profiling as an aid to grading and understanding tumorigenesis.



- Med J Armed Forces India. 2020 Jan, 76(1):30-36.
6. Luis F, Liliana A, Susana R et. al. WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low and high grade serous ovarian carcinomas and their
 7. relation to prognosis. Oncotarget. 2018. Feb 19, 9(22): 15818-27.
 8. Robboy SJ, Mutter GL, Pratt J. Robboy's Pathology of Female Reproductive Tracts. Elsevier. 2014, 608-617
 9. Jie li, Oluwole Fadarre, Li Xiang, Beihua Kong, Wenxin Zheng. Ovarian serous carcinoma recent concepts on its origin and carcinogenesis. China: Journal of hematology and oncology; 2012, 5(1) : 8
 10. Freddie B et.al. Global Cancer Statistic 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. ACS Journal. A cancer journal for clinicians; 2018, 68(6).
 11. Asmuddin. Peran Gen p16 pada siklus sel terhadap pembentukan kanker. 2011