

## Eksresi p16 dan CDK4 pada Berbagai Stadium T Karsinoma Laring

**Diana Purnamasari, Dyah Fauziah**Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga  
Surabaya

Penulis korespondensi: dr. Dyah Fauziah, SpPA(K).

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya 60131.

e-mail: dyah\_fauziah@yahoo.com

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Kegagalan kontrol siklus sel mempengaruhi proliferasi sel dan berperan penting dalam patogenesis kanker. Beberapa protein memiliki pengaruh pada siklus sel. Protein p16 dan CDK4 diduga mempunyai pengaruh pada karsinoma laring. P16, suatu *tumor suppressor protein*, dapat mencegah terbentuknya kompleks cyclin D1-CDK4 sehingga menghambat proliferasi sel. CDK4, suatu onkogen, dapat membentuk kompleks cyclin D1-CDK4 dan menginaktivkan pRB sehingga siklus sel berjalan dari fase G1 ke fase S dan meningkatkan proliferasi sel.

#### Metode

Penelitian ini merupakan studi analitik observasional yang dilakukan pada 3 sampel karsinoma laring stadium T1 dan masing-masing 10 sampel karsinoma laring stadium T2, T3 dan T4 di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo yang dikumpulkan sejak tahun 2013-2015, dan dilakukan pulasan imunohistokimia dengan antibodi p16 dan CDK4. Ekspresi p16 dan CDK4 dinilai berdasarkan prosentase sel tumor yang terpulsa dan intensitasnya. Perbedaan ekspresi dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis. Korelasi antara variabel dianalisis dengan uji statistik Spearman.

#### Hasil

Ekspresi p16 pada karsinoma laring stadium T1 (88,33±7,64), T2 (85,00±5,27), T3 (61,00±21,83) dan T4 (62,00±25,30), sedangkan ekspresi CDK4 pada karsinoma laring stadium T1 (43,33±15,28), T2 (47,00±14,18), T3 (75,00±8,50) dan T4 (70,00±9,43). Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan antara ekspresi p16 dan CDK4 pada berbagai stadium karsinoma laring ( $p=0,017$  dan  $p=0,000$ ) juga terdapat hubungan antara ekspresi p16 dan CDK4 pada berbagai stadium karsinoma laring ( $p=0,005$  dan  $p=0,000$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi p16 yang rendah dan ekspresi CDK4 yang tinggi menunjukkan stadium karsinoma laring yang tinggi.

**Kata kunci:** CDK4, karsinoma laring, p16.

## Expression of p16 and CDK4 at Various Stages of T Laryngeal Carcinoma

### ABSTRACT

#### Background

Defect in cell cycle control affect cell proliferation and play an important role in pathogenesis of cancer. Recently, some proteins are known to have an influence in cell cycle proliferation. P16 and CDK4 may have influenced in laryngeal carcinoma. CDK4, an oncogene, can form cyclin D1-CDK4 complex that inactivates pRb so that the cell cycle goes from G1 phase to S phase. P16, a tumor suppressor protein, can prevent cyclin D1-CDK4 complex so that inhibit cell proliferation.

#### Methods

This research was an observational analysis study with paraffin block samples, consists of 3 samples of stage T1 and each 10 samples of stage T2, T3 and T4 in Laboratory of Anatomical Pathology of RSUD dr. Soetomo that was collected from 2013-2015. Samples were stained with antibody of p16 and CDK4. P16 and CDK4 expression were assessed based on the percentage and intensity of tumor cells that were stained. The differences between variables were analyzed by Kruskal-Wallis. The correlation between variables was analyzed by Spearman correlation test.

#### Results

P16 expression of carcinoma larynx T1 (88.33±7.64), T2 (85.00±5.27), T3 (61.00±21.83), and T4 (62.00±25.30). Besides CDK4 expression of carcinoma larynx T1 (43.33±15.28), T2 (47.00±14.18), T3 (75.00±8.50), and T4 (70.00±9.43). Statistic analysis showed significant differences between p16 and CDK4 expression on each stage of carcinoma larynx ( $p=0.017$  and  $p=0.000$ ). And there were correlation between p16 and CDK4 expression on each stage of carcinoma larynx ( $p=0.000$  and  $p=0.000$ ).

#### Conclusion

The lower p16 expression and the higher CDK4 expression showed the higher stage of carcinoma larynx.

**Key words:** CDK4, laryngeal carcinoma, p16.

**PENDAHULUAN**

Di negara maju rata-rata 1 dari 4 orang meninggal karena kanker laring. Di Indonesia kanker laring menempati urutan ke-2 dan ke-3 dari keganasan THT.<sup>1</sup> Angka kejadian karsinoma laring adalah 5,8 per 100.000 pria dan 1,2 per 100.000 wanita per tahun berdasarkan kasus yang didiagnosis dari tahun 2008-2012 dari 18 wilayah geografis *Surveillance Epidemiology and Result (SIER)*.<sup>2</sup>

Lebih dari separuh pasien kanker kepala leher ditemukan pada stadium yang lebih lanjut. Pada saat stadium lanjut angka harapan hidup pasien (*5-years survival rates*) menjadi 10-40%. *Overall long time survival* pasien juga rendah karena ditemukan banyak kejadian kekambuhan. Walaupun banyak progresivitas dalam bidang teknik operasi, radioterapi dan kemoterapi, prognosis pasien hanya meningkat sedikit lebih baik selama 3 dekade terakhir. Kemoterapi memberikan hasil yang belum memuaskan pada kebanyakan kanker kepala dan leher. Gambaran klinikopatologi seperti stadium TNM dan derajat (*grade*) histologi juga sepertinya tidak cukup untuk memprediksi prognosis dari pasien kanker laring. Kekurangan efektivitas dalam bidang terapi merefleksikan kurangnya pengetahuan tentang pengaruh abnormalitas molekular dalam keberhasilan terapi dan pengaruhnya pada angka harapan hidup pasien.<sup>3</sup>

Kegagalan dalam kontrol siklus sel mempunyai peranan penting dalam patogenesis kanker karena dapat menyebabkan peningkatan proliferasi sel.<sup>4</sup> p16 adalah protein yang dikode oleh *tumor suppressor gen (CDKN2A)*, yang berfungsi untuk menghambat proliferasi sel pada fase G1-S dengan cara menginaktivasi faktor transkripsi E2F.<sup>4,5</sup> Inaktivasi gen CDKN2A telah diteliti pada beberapa kanker dan menyebabkan menurunnya ekspresi p16 sehingga mempengaruhi progresivitas sel kanker.<sup>4</sup> CDK4 harus berikatan dengan *cyclin* untuk aktivasinya.<sup>6,7</sup> Kompleks CDK4 dengan *cyclin D* akan menginisiasi fosforilasi protein retinoblastoma (pRb), menyebabkan pelepasan faktor transkripsi E2F dan mengarahkan siklus sel melewati *restriction point* pada batas fase G1/S dan menginisiasi fase S.<sup>7</sup> Peningkatan ekspresi CDK4 yang tinggi menyebabkan pertumbuhan tidak terkontrol pada beberapa neoplasma.<sup>5,7</sup>

Terapi karsinoma laring dapat berupa surgical, kemoterapi maupun radiasi.<sup>8</sup> Bahan biopsi laring dapat digunakan untuk mengetahui

ekspresi p16 dan CDK4, sehingga dapat menentukan jenis terapi yang berupa radiasi sebagai terapi utama dan harus laringektomi.<sup>5,8</sup>

Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya perbedaan antara ekspresi p16 dan CDK4 pada berbagai stadium T karsinoma laring.

**METODE PENELITIAN**

Pada penelitian ini dilakukan pengumpulan blok parafin dari arsip Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo Surabaya, selama periode Januari 2013 sampai dengan Desember 2016. Sampel diambil secara random dan diperoleh 33 blok parafin penderita karsinoma laring, terbagi menjadi 3 sampel stadium T1 dan masing-masing 10 sampel pada stadium T2, T3 dan T4.

Eksresi p16 diperiksa secara imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal mouse anti human dari LsBio dengan dilusi 1:200, dan antibodi poliklonal CDK4 rabbit anti human dari Bioss dengan dilusi 1:250. Ekspresi p16 dan CDK4 dikatakan positif jika terpulsa pada inti dan/atau sitoplasma. Sel tumor yang terpulsa positif dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler pembesaran 400x selanjutnya dilakukan penilaian berdasarkan persentase jumlah sel yang terpulsa positif. Data ekspresi p16 dan CDK4 yang terkumpul dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan Spearman ( $p < 0,05$ ).

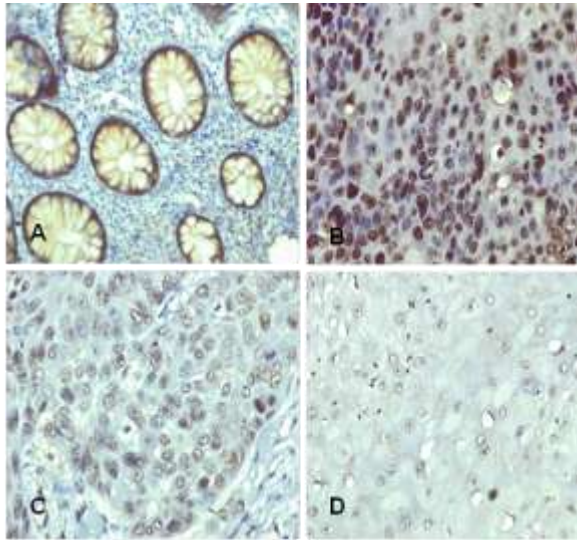
**HASIL**

Hasil penelitian berupa data rerata usia penderita 59,52±9,56 tahun. Penderita termuda berusia 35 tahun dan tertua 76 tahun. Usia penderita karsinoma laring paling banyak berada pada rentang 51-60 tahun yaitu sebanyak 45%. Secara epidemiologi karsinoma laring paling banyak menyerang pria pada dekade ke-5, 6, dan <5% kasus terdiagnosis pada usia <45 tahun.<sup>8,9</sup>

Hasil perhitungan ekspresi p16 pada masing-masing kelompok sampel, menunjukkan rerata median kelompok stadium T1 adalah 88,33±7,64, kelompok stadium T2 adalah 85,00±5,27, kelompok stadium T3 adalah 61,00±21,83 dan kelompok stadium T4 adalah 62,00±25,30 (Tabel 1). Hasil uji komparasi Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan ekspresi p16 antar berbagai stadium karsinoma laring ( $p < 0,05$ ).

Tabel 1. Distribusi ekspresi p16 pada KSS berbagai stadium T.

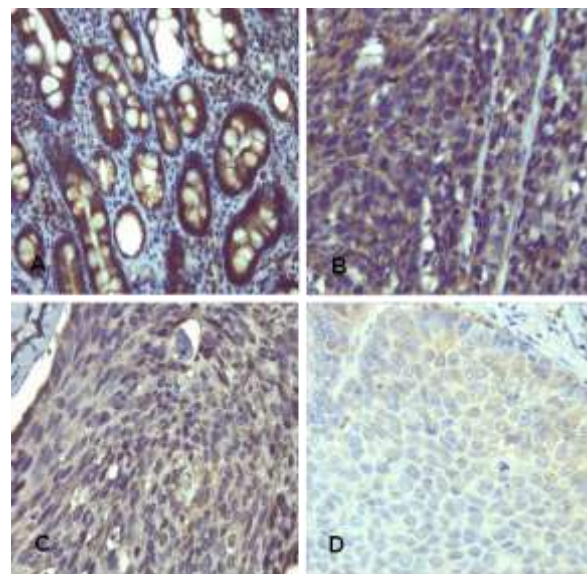
Ekspresi p16	Statistik/kategori	Stadium				P*
		T1	T2	T3	T4	
Jumlah sel	$\bar{x}\pm SD$ (Min-Maks)	88,33±7,64 (80-95)	85,00±5,27 (80-90)	61,00±21,83 (30-90)	62,00±25,30 (20-90)	0,017
	≤5%	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)	0,010
	>5-25%	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (50,0%)	4 (40,0%)	
	>25-50%	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)	1 (10,0%)	
	>50-75%	3 (100,0%)	10 (100,0%)	4 (40,0%)	4 (40,0%)	



Gambar 1. Ekspresi p16 hasil pulasan IHK pada karsinoma laring dengan pembesaran 400x. A. Kontrol; B. Skor 2; C. Skor 1; D. Skor 0.

Hasil perhitungan ekspresi CDK4 pada masing-masing kelompok sampel menunjukkan ekspresi CDK4 pada stadium T3 75,00±8,50; T4 70,00±9,43; stadium T2 47,00±14,18; stadium T1 43,33±15,28 (Tabel 2). Hasil uji komparasi

Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan ekspresi CDK4 antar stadium karsinoma laring ( $p < 0,05$ ).



Gambar 2. Ekspresi CDK4 hasil pulasan IHK pada karsinoma laring dengan pembesaran 400x. A. Kontrol; B. Skor 2; C. Skor 1; D. Skor 0.

Tabel 2. Distribusi ekspresi CDK4 pada KSS berbagai stadium T.

Ekspresi CDK4	Statistik/kategori	Stadium				P*
		T1	T2	T3	T4	
Jumlah sel	$\bar{x}\pm SD$ (Min-Maks)	43,33±15,28 (30-60)	47,00±14,18 (20-60)	75,00±8,50 (60-80)	70,00±9,43 (60-80)	0,000
	≤5%	0 (0,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,000
	>5-25%	2 (0,0%)	5 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	>25-50%	1 (0,0%)	4 (40,0%)	3 (30,0%)	6 (60,0%)	
	>50-75%	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (70,0%)	4 (40,0%)	

Tabel 3. Hubungan ekspresi p16 dan CDK4 dengan stadium t karsinoma laring.

Variabel	Stadium karsinoma laring	
	$r_s$	$p$
Eksresi p16		
Jumlah sel	-0,475	0,005
Intensitas ekspresi	-0,596	0,000
Skor IRS	-0,801	0,000
Eksresi CD4		
Jumlah sel	0,632	0,000
Intensitas ekspresi	0,726	0,000
Skor IRS	0,838	0,000

**DISKUSI**

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi p16 meningkat pada stadium T awal dan menurun pada stadium yang lebih lanjut. Pada penelitian terdahulu dilaporkan bahwa karsinoma sel skuamous kepala dan leher, mengidentifikasi 3 mekanisme utama yang menyebabkan gen p16 diinaktifkan yaitu delesi homozigot, mutasi inaktif dan metilasi promoter aberan. Penurunan p16 dalam regulasi siklus sel, menyebabkan sel kanker berproliferasi tanpa kontrol, yang akan menghambat siklus sel fase S. p16 mengikat CDK4/6, sehingga menghambat terbentuknya kompleks cyclin D-CDK4/6 dan menghambat fosforilasi anggota Rb. Ekspresi p16<sup>ink4a</sup> mempertahankan anggota Rb tetap dalam keadaan terhipofosforilasi, yang menyebabkan pengikatan Rb dengan E2F1, sehingga siklus sel G1 berhenti.<sup>5,7,10</sup> Sedangkan penelitian lain menyatakan bahwa pada karsinoma sel skuamous kepala dan leher, ekspresi p16 yang berkurang berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel yang meningkat sehingga tumor dengan ekspresi p16 yang menurun cenderung mempunyai ukuran tumor yang lebih besar dan stadium T yang lebih tinggi.<sup>11</sup>

Cdks merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan cyclin untuk aktivasinya. Peneliti terdahulu menyatakan Cdks dalam keadaan normal adalah inaktif karena catalytic site, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengeblokan tersebut.<sup>6</sup> Kompleks CDK4/6 dengan cyclin D akan menginisiasi fosforilasi dari keluarga protein retinoblastoma (pRb). Fosforilasi Rb menyebabkan pelepasan faktor transkripsi E2F yang kemudian menghasilkan aktivasi dan transkripsi gen-gen, yang mengarahkan untuk melewati *restriction point* pada batas fase G1/S dan menginisiasi fase S. Meningkatnya aktivitas CDK4 karena menurunnya fungsi p16 akan

merangsang fosforilasi pRb dan pembelahan sel. Sedangkan peneliti lainnya menyatakan overekspresi Cdk, khususnya CDK4, yang terletak pada kromosom 12q13, menyebabkan pertumbuhan yang tidak terkontrol pada beberapa neoplasma, salah satunya pada kanker laring.<sup>6,7</sup>

Pada penelitian ini korelasi antara ekspresi p16 dan CDK4 pada berbagai stadium karsinoma laring dianalisis secara statistik menggunakan uji korelasi Spearman. Hasil analisis menunjukkan adanya hubungan antara ekspresi p16 dan stadium karsinoma laring ( $p < 0,05$ ), semakin tinggi stadium karsinoma laring, semakin rendah ekspresi p16. Demikian juga dengan CDK4, hasil analisis menunjukkan adanya hubungan antara ekspresi CDK4 dan stadium karsinoma laring ( $p < 0,05$ ), semakin tinggi stadium karsinoma laring, semakin tinggi ekspresi CDK4. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mencari nilai *cut off* ekspresi p16 dan CDK4 untuk masing-masing stadium, sehingga diharapkan dapat digunakan untuk acuan terapi pasien karsinoma laring.

**KESIMPULAN**

Eksresi p16 yang rendah dan ekspresi CDK4 yang tinggi menunjukkan stadium karsinoma laring yang tinggi.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Hermani B. Karakteristik penderita tumor ganas laring di RSUP; 2007. Available from: [http://www.majalahfarmacia.com/rubrik/one\\_news.asp?IDNews=593](http://www.majalahfarmacia.com/rubrik/one_news.asp?IDNews=593). [Accessed 27 May 2012].
2. Akdeniz O, Akduman D, Haksever M, Ozkarakas H, Muezzinoglu B. Relationship between clinical behavior of laryngeal squamous cell carcinoma and expression of VEGF, MMP-9 and E-cadherin. *As Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 5301-10.
3. Thomas G, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Path*. 2005; 86: 347-63.
4. Krecicki T, Smigiel T, Fraczek M, Kowalczyk M, Asiadek, M. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *J Laryngol Otol*. 2004; 118: 676-80.

5. Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer (Pred. Onco)*. 2001; 95: 209-15.
6. Vermeulen K, Berneman Z, Van Bockstaele D. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003; 36: 165-75.
7. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: Several Cdks, numerous cyclins, and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009; 28: 2925-39.
8. American Cancer Society, 2016. Laryngeal and hypopharyngeal cancer. Available at: <http://www.cancer.org/cancer/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/detailed-guide/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer-key-statistics>. [updates 17 Feb 2016; accessed 23 May 2016 ], pp.1-56.
9. Stelo E. *Head and Neck; The Larynx in Mills*, ed. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 5th Ed. Charlottesville: Walter Kluwers; 2010.pp.911-3.
10. Romagosa C, Simonetti S, Lo'pez-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, *et al*. p16 Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011; 30: 2087-97.
11. Yuen W, Man M, Lam K, Kwong Y. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 58-60.