

Hubungan Imunoekspresi NF-kB dengan Sinus Rokitansky Aschoff pada Kolesistitis Kronik

Herry Yulianti, Bethy S. Hernowo

Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung
Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung

Abstrak

Karsinoma kandung empedu relatif jarang, tetapi merupakan penyakit yang sangat mematikan. Keganasan kandung empedu merupakan 3–4% dari seluruh lesi ganas dan menempati urutan ke-5 di antara tumor sistem pencernaan. Karsinoma kandung empedu sulit dideteksi dan didiagnosis pada stadium awal, karena biasanya gejalanya sangat sedikit atau tanpa gejala. Oleh karena itu sangat penting menegakkan diagnosis secara dini dan mendeteksi pasien risiko tinggi, termasuk batu dan riwayat kolesistitis kronik. Kolesistitis kronik merupakan peradangan kronik pada kandung empedu dan disertai kolelitiasis pada lebih dari 90% kasus. Batu empedu merupakan faktor etiologi yang penting pada karsinoma kandung empedu. Pada gambaran histopatologi kolesistitis kronik ditemukan sinus Rokitansky Aschoff. Pendekatan genetik telah membuktikan komponen inflamasi berperan dalam karsinogenesis, seperti *primary inflammatory cytokines*, *interleukin-1* (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF), IL-6, dan *nuclear factor-kappaB* (NF-kB). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan imunoekspresi NF-kB dengan sinus Rokitansky Aschoff pada kolesistitis kronik. Metode penelitian adalah potong lintang terhadap 30 kasus kolesistitis kronik yang berasal dari Departemen Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung/Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran tahun 2010–2011. Potongan blok parafin dari jaringan kolesistitis kronik setebal 4 µm diwarnai dengan hematoxilin eosin untuk evaluasi gambaran histopatologi dan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan *polyclonal NF-kB antibody*. Perhitungan sel yang imunoreaktif dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, dihitung rata-rata pada 5 tempat. Hasil penelitian menunjukkan hubungan yang signifikan antara imunoekspresi NFkB dan sinus Rokitansky Aschoff ($p=0,000$). Simpulan, terdapat hubungan imunoekspresi NFkB dengan sinus Rokitanski Aschoff, semakin tinggi imunoekspresi NFkB semakin banyak sinus Rokitansky Aschoff. [MKB. 2014;46(2):106–11]

Kata kunci: Kolesistitis kronik, NFkB, sinus Rokitansky Aschoff

Correlation between Immunoexpression of NF-kB and Rokitansky Aschoff Sinuses in Chronic Cholecystitis

Abstract

Carcinoma of the gallbladder is relatively uncommon but it is a very lethal disease. Gallbladder cancer constitutes 3–4% of all malignant lesions and ranks 5th among the digestive system tumors. Gallbladder carcinoma is difficult to detect and diagnose in early stage because it usually has very slight symptoms or asymptomatic. It becomes increasingly necessary to make early diagnosis and identification of high-risk patient, as well as gallstone and history of chronic cholecystitis. Chronic cholecystitis is a chronic inflammation of gallbladder associated with cholelithiasis in more than 90% of cases. Cholelithiasis is one of the important etiological factors in carcinoma of the gallbladder. The histological examination of chronic cholecystitis shows the presence of Rokitansky Aschoff sinuses. Genetic approaches have proven that the components of inflammation such as primary inflammatory cytokines, interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), IL-6 and nuclear factor-kB (NF-kB) play the key roles in carcinogenesis. The purpose of this study was to understand the correlation between the immunoexpression of NF-kB and Rokitansky Aschoff sinuses in chronic cholecystitis. The method was cross sectional of 30 cases of chronic cholecystitis from Department of Pathology Anatomy of Dr. Hasan Sadikin General Hospital Bandung/Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran in 2010–2011. A section from 4 µm-thick paraffin embedded tissue of chronic cholecystitis was stained with hematoxylin eosin for histopathological evaluation and immunohistochemical using polyclonal NF-kB antibody. Immunoreactive cells was counted in five tumor areas of 400x field by light microscopy. The result showed a significant correlation between the immunoexpression of NFkB and Rokitansky Aschoff sinuses ($p=0.000$). In conclusion, there is a correlation between immunoexpression of NFkB and Rokitansky Aschoff sinuses because as the immunoexpression of NFkB increase, more Rokitansky Aschoff sinuses will be formed. [MKB. 2014;46(2):106–11]

Key words: Chronic cholecystitis, NFkB, Rokitansky Aschoff sinuses

Korespondensi: Herry Yulianti, dr., Sp.PA, Jalan Guntursari III No 21 Buah Batu Bandung 40264, mobile 0811223103, e-mail herryyulianti@yahoo.com

Pendahuluan

Kolesistitis kronik adalah peradangan kronik pada kandung empedu, dan 90% disertai kolesistiasis. Kolesistitis kronik jarang ditemukan tanpa disertai batu empedu, walaupun batu murni kolesterol dan *calcium bilirubinate* dapat ditemukan juga tanpa disertai dengan inflamasi.^{1,2} Mikroskopis kolesistitis yang kronik memperlihatkan berbagai tingkat infiltrasi sel-sel limfosit dan fibrosis pada mukosa dan sinus Rokitansky Aschoff akibat peninggatan tekanan di dalam lumen.¹ Batu dan inflamasi kronik merupakan faktor risiko terjadi karsinoma kandung empedu.³ Penelitian mutakhir membuktikan hubungan erat antara inflamasi dan neoplasia, termasuk *inflammatory bowel disease* pada kolon, gastritis yang disertai *Helicobacter pylori*, dan *gallbladder carcinoma* yang sering dilatarbelakangi oleh inflamasi kronik.⁴ *Chronic cholecystitis-carcinoma sequence* merupakan *pathway* yang paling penting pada *gallbladder carcinogenesis*.^{4,9}

Gallbladder carcinoma (GBC) merupakan keganasan traktus biliaris yang paling banyak, terdapat lk. 3% dari seluruh tumor. *Gallbladder carcinoma* (GBC) sulit dideteksi pada stadium dini oleh karena biasanya bersifat asimtomatik dan gejalanya sama dengan kolesistitis kronik. *Gallbladder carcinoma* adalah salah satu tumor sangat mematikan dengan angka kelangsungan hidup 5 tahun <2,1% dan tidak sensitif terhadap radioterapi dan kemoterapi, sehingga diperlukan diagnosis dini dengan mengidentifikasi pasien yang berisiko tinggi sehingga dapat dilakukan kolesistektomi sebagai profilaksis.^{10,11}

Pendekatan secara genetik telah membuktikan komponen inflamasi mempunyai peranan dalam karsinogenesis, seperti *primary inflammatory cytokines interleukin-1* (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF), IL-6, dan *nuclear factor-kappaB* (NF-kB). *Nuclear factor-kappaB* (NF-kB) mengatur ekspresi gen yang terlibat pada berbagai proses yang mempunyai peran dalam perkembangan serta progresivitas kanker seperti proliferasi, migrasi, dan apoptosis. *Nuclear factor-kappaB* bukan suatu *single gen*, tetapi famili yang erat hubungannya dengan faktor transkripsi, termasuk 5 gen *NF-kB1* (p50/p105), *NF-kB2* (p52/p100), *RelA* (p65), *c-Rel*, dan *RelB*.^{12,13} *Nuclear factor-kappaB* terlihat pada semua sel yang teraktivasi, yang mengatur ekspresi dari bermacam target gen yang mempromosi proliferasi sel, pengaturan imun, respons inflamasi, dan juga berkontribusi dalam patogenesis berbagai penyakit termasuk juga keganasan. *Nuclear factor-kappaB signaling pathway* diregulasi oleh *inhibitor kappaB* (IkB) *family*. *Nuclear factor-kappaB* banyak terdapat dalam sitoplasma, NF-kB akan berikatan dengan

IkB yang akan menahan NF-kB tetap berada dalam sitoplasma. Aktivasi NF-kB *pathway* merupakan salah satu kunci mekanisme kelangsungan hidup pada berbagai tipe keganasan. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa NF-kB dapat memblokir apoptosis dengan mengatur protein anti-apoptosis seperti *inhibitor of apoptosis protein* (IAPs).⁵

Metode

Bentuk penelitian adalah potong lintang terhadap 30 kasus kolesistitis kronik yang terpilih dari pemeriksaan *hematoxylin-eosin* yang berasal dari Departemen Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin/Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, mulai Januari 2010 sampai Desember 2011.

Dilakukan pengumpulan blok parafin dari 30 sediaan tersebut dan dilakukan pewarnaan HE dan imunohistokimia NF-kB. Imunoekspresi NF-kB memberikan hasil positif berdasarkan warna coklat pada sitoplasma dan inti dari sel tumor.¹³ Perhitungan sel imunoreaktif dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, dihitungkan sel rata-rata yang terwarnai pada 5 tempat. Pewarnaan imunohistokimia NF-kB dengan menggunakan *rabbit polyclonal to NF-kB p65-CHIP Grade* (ab7970) (abcam), masing-masing dengan prosedur manual dilanjutkan menggunakan mesin InteliPATH FLX *automated slide stainer*. Blok parafin yang telah dikumpulkan dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 4 µm dan kemudian diletakkan pada *object glass* yang telah dilakukan *coating*, kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan metode *avidin-biotin*. Dilakukan deparafinisasi dengan *xylol* selama 3x5 menit, rehidrasi dengan etanol selama 3x5 menit, kemudian dengan alkohol 90%, 80%, 70% selama 5 menit, bilas dengan air yang mengalir, rendam dalam larutan *hydrogen peroxidase* 3% selama masing-masing 5 menit. Bilas dengan akuades, lakukan antigen *unmasking retrieval* dengan bufer sitrat yang mendidih selama 2x5 menit. Dinginkan dalam suhu ruangan selama 15 menit. Inkubasi dengan H₂O₂ 0,3% dalam metanol selama 10 menit. Bilas dengan *phosphat buffered saline* (PBS). Setelah ditetaskan *blocking serum* sebesar 1,5% kemudian diinkubasi selama 5 sampai 10 menit. Selanjutnya ditetaskan antibodi primer *rabbit polyclonal to NF-kB p65 antibody-CHIP Grade* (ab 7970) dengan pengenceran 1:200, kemudian di inkubasi selama 60 menit. Bilas dengan PBS selama 3x5 menit, kemudian ditetaskan antibodi sekunder *TrekAvidin universal link* (Biocare Medical), dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 20 menit, selanjutnya ditetaskan *chromogen*, kemudian

di inkubasi selama 5–10 menit. Setelah dibilas dengan air mengalir selama 5 menit, dilakukan *counterstain* dengan *mayer hematoxylin* selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah dilaksanakan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, dan juga etanol selama 3 menit, kemudian dimasukkan dalam *xylol*, dan terakhir dilakukan *mounting*

Penilaian imunoekspresi NFkB dikategorikan berdasarkan persentase sel-sel mukosa kandung empedu yang berwarna coklat pada inti dengan berbagai intensitas.

Hasil

Selama periode Januari 2010–Desember 2011 di Departemen Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung terkumpul 35 kasus yang didiagnosis sebagai kolesistitis kronik, dan hanya 30 kasus yang memenuhi kriteria inklusi penelitian ini. Dari hasil pemeriksaan dengan pewarnaan hematoksilin eosin, terdapat sinus Rokitansky Aschoff 0–35 sebanyak 17 kasus dan 36–70 sebanyak 13 kasus. Dari pemeriksaan secara makroskopis terdapat kolesistitis kronik disertai dengan batu sebanyak 27 kasus dan tidak disertai dengan batu 3 kasus. Pada penelitian ini, imunoekspresi NFkB 0–30 sebanyak 17 kasus dan 3–60 sebanyak 13 kasus.

Analisis statistik mempergunakan program SPSS 16 dan hasil pengujian statistik dengan Uji Sommers'd diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Terdapat korelasi yang sangat bermakna antara

Tabel 1 Karakteristik Penderita

Karakteristik	n
Usia rata-rata	47 (26–65)
Jenis kelamin	
Laki-laki	9
Perempuan	21
Sinus Rokitansky Aschoff	
0–35	17
36–70	13
Kolesistitis kronik	
Tanpa batu	3
Dengan batu	27
Imunoekspresi NFkB	
0–30	17
31–60	13

Tabel 2 Hubungan Imunoekspresi NFkB dengan Sinus Rokitansky Aschoff

Imunoekspresi NFkB	Sinus Rokitansky Aschoff	
	0–35	36–70
0–30	15	2
31–60	2	11

imunoekspresi NFkB dan jumlah sinus Rokitansky Aschoff, semakin tinggi imunoekspresi NFkB akan semakin banyak sinus Rokitansky Aschoff.

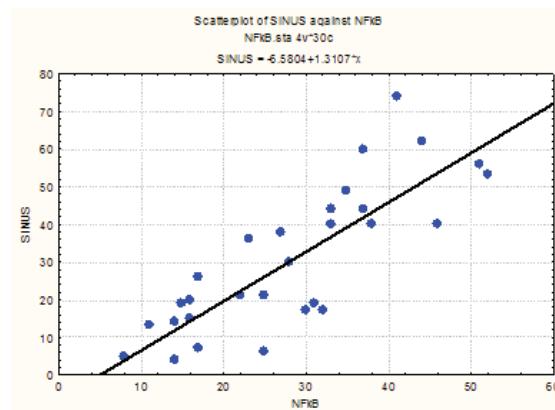
Tabel 3 Hubungan Batu Empedu dengan Imunoekspresi NFkB dan Sinus Rokitansky Aschoff

Batu Empedu	Imunoekspresi NFkB		Sinus Rokitansky Aschoff	
	0–30	31–60	0–35	36–70
Positif	16	11	16	11
Negatif	1	2	1	2

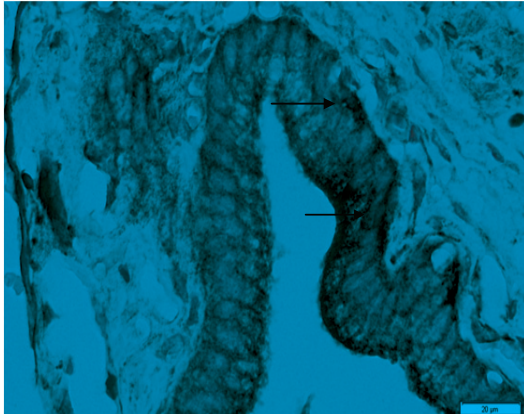
Keterangan: imunoekspresi NFkB berdasarkan persentase sel yang berwarna coklat dengan berbagai intensitas

Pembahasan

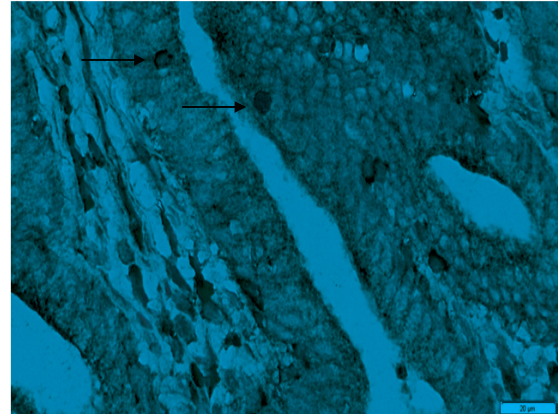
Pada penelitian ini karakteristik klinikopatologi dari kasus kolesistitis kronik diperoleh gambaran sebagai berikut: penderita laki-laki 9 orang dan wanita 21 orang, rentang usia penderita 26–65 tahun. Kolesistitis kronik tanpa batu sebanyak 3 kasus dan dengan batu sebanyak 27 kasus. Hal



Gambar 1 Hubungan Imunoekspresi NFkB dengan Sinus Rokitansky Aschoff



Gambar 2 Imunoekspresi NF κ B pada Kolesistitis Kronik. Sitoplasma sel mukosa kandung empedu sebagian besar berwarna coklat dengan intensitas sedang dan sebagian kecil intensitas kuat, beberapa inti sel berwarna dengan intensitas kuat (tanda panah). Pembesaran 400x



Gambar 3 Imunoekspresi NF κ B pada Kolesistitis Kronik. Sitoplasma sel mukosa kandung empedu berwarna coklat dengan intensitas sedang dan inti terwarnai dengan intensitas kuat. Pembesaran 400x

ini sesuai dengan penelitian Kumar dkk.² bahwa lebih dari 90% kasus kolesistitis kronik disertai kolelitiasis.

Pada penelitian hasil imunoekspresi NF κ B terlihat pada hampir seluruh sitoplasma dengan intensitas pulasan sedang sampai kuat dan pada sebagian inti sel. Intensitas warna pada inti sel sangat bervariasi dari lemah sampai kuat. Pada penelitian ini yang dikatakan memberikan hasil positif adalah NF κ B yang terekspresi pada inti sel. Faktor transkripsi NF κ B di dalam sitoplasma dalam keadaan inaktif karena berikatan dengan *inhibitor kappa B* (I κ B). Apabila terjadi aktivasi NF κ B oleh enzim *I κ B kinase* (IKK), ikatan tersebut akan terlepas dan juga faktor transkripsi NF κ B menjadi aktif dan bertranslokasi ke dalam inti.¹⁴

Gambaran histopatologi kolesistitis kronik menunjukkan sinus Rokitansky Aschoff sebagai akibat peningkatan tekanan di dalam lumen. Pada penelitian ini, hasil analisis regresi dan korelasi antara variabel imunoekspresi NF κ B dan sinus Rokitansky Aschoff memperlihatkan hubungan sangat signifikan, dengan nilai korelasi antara keduanya sangat tinggi, yaitu 0,82 ($p=0,000$).

Hubungan imunoekspresi NF κ B dengan batu empedu dan hubungan sinus Rokitansky Aschoff dengan batu empedu pada penelitian ini tidak dapat dianalisis karena jumlah kolesistitis kronik tanpa batu empedu hanya 3 kasus dari 30 kasus, sehingga tidak diketahui hubungan NF κ B dengan batu empedu dan hubungan sinus Rokitansky Aschoff dengan batu empedu. Dengan demikian, perlu penelitian lebih lanjut dengan jumlah kasus

yang lebih besar.

Simpulan, terdapat hubungan imunoekspresi NF κ B dengan sinus Rokitansky Aschoff, semakin tinggi imunoekspresi NF κ B akan semakin banyak sinus Rokitansky Aschoff.

Daftar Pustaka

1. Rosai J. Gallbladder and extrahepatic bile duct. Dalam: Houston M, penyunting. Rosai and Ackerman's surgical pathology. Edisi ke-10. Edinburgh: Elsevier Mosby; 2011. hlm. 981-97.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The biliary tract. Dalam: Schmitt W, penyunting. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Edisi ke-8. Philadelphia: Elsevier Saunder; 2010. hlm. 882-9.
3. Naqvi SQH, Mangi IH, Dahri FJ, Khaskheli QA, Akhund AA. Frequency of carcinoma of gallbladder in patients with cholelithiasis. GJMS. 2005;3(2):41-3.
4. Yanagisawa N, Yamashita K, Kuba T, Okayasu I. Sporadic TP53 transition mutations in chronic cholecystitis are possibly linked to gallbladder carcinogenesis. Anti Cancer Res. 2010;30(11):4443-9.
5. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. Cell Mol Immunol. 2009;6(5):327-34.
6. Aggarwal B, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? Biochem Pharmacol. 2006;72(11):1605-21.

7. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–81.
8. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):15–30.
9. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;1(5):a000141.
10. Vijayakusumar A, Vijayakusumar A, Patil V, Mallikarjuna MN, Shivaswamy BS. Early diagnosis of gallbladder carcinoma: an algorithm approach. *ISRN Radiology*. 2012;2013(2013):1–6.
11. Wasim B, Kafil N, Hadi NI, Afshan G. Age and gender related frequency of cancer in chronic cholelithiasis. *Surg Pak*. 2010;15(1):48–51.
12. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005;446(5):475–82.
13. Meteoglu I, Erdogdu H, Meydan N, Erkus M, Barutca S. NF-kappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell. *Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:53.
14. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogen*. 2006;25(51):6680–4.