

**Bcl-2 DAN INDEKS APOPTOSIS PADA  
HIPERPLASIA ENDOMETRIUM NON-ATIPIK  
SIMPLEKS DAN KOMPLEKS**

*Bcl-2 AND APOPTOTIC INDEX IN SIMPLE AND COMPLEX  
NON-ATYPICAL ENDOMETRIAL HYPERPLASIA*



**Tesis**  
**untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2**  
**dan memperoleh keahlian dalam bidang Obstetri dan Ginekologi**

**Ratnasari Dwi Cahyanti**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
DAN  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
OBSTETRI GINEKOLOGI  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2008**

## DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Permasalahan penelitian	4
1.3 Keaslian penelitian	4
1.4 Tujuan penelitian	6
1.4.1 Tujuan umum	6
1.4.2 Tujuan khusus	6
1.5 Manfaat penelitian	7
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Definisi dan diagnosis	8
2.2 Histopatologi	10
2.2.1 Hiperplasia non atipik	11
2.2.1.1. Hiperplasia simpleks	11
2.2.1.2 Hiperplasia kompleks	12
2.2.2 Hiperplasia atipik	13
2.3 Etiologi dan faktor risiko	15

2.4	Patogenesis hiperplasia endometrium	18
2.5	Peranan Bcl-2 dalam proses apoptosis	23
2.6	Apoptosis pada hiperplasia endometrium	27
2.7	Patofisiologi	33
<b>BAB 3.</b>	<b>KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b>	
3.1	Kerangka teori	34
3.2	Kerangka konsep	35
3.3	Hipotesis	35
<b>BAB 4.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b>	
4.1	Ruang lingkup penelitian	36
4.2	Waktu dan tempat penelitian	36
4.3	Jenis dan rancangan penelitian	36
4.4	Populasi dan sampel penelitian	36
4.4.1	Populasi target	36
4.4.2	Populasi terjangkau	36
4.4.3	Sampel	37
4.4.3.1	Kriteria inklusi	37
4.4.3.2	Kriteria eksklusi	37
4.4.4	Besar sampel	37
4.4.5	Cara pengambilan sampel	39
4.5	Variabel penelitian	39
4.6	Bahan dan cara kerja	40
4.6.1	Pengambilan data	40
4.6.2	Pembuatan preparat	40
4.6.3	Pemeriksaan ekspresi Bcl-2 endometrium	41
4.6.4	Pemeriksaan apoptosis	42
4.7	Batasan Operasional	43
4.8	Alur penelitian	45
4.9	Analisis data	46
4.10	Etika penelitian	47

BAB 5. HASIL PENELITIAN	
5.1 Karakteristik subyek penelitian	48
5.2 Ekspresi Bcl-2 dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik	50
5.3 Indeks apoptosis dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik	53
5.4 Hubungan ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis	55
BAB 6. PEMBAHASAN	56
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	65

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Penelitian Bcl-2 dan apoptosis pada hiperplasia endometrium	5
2. Klasifikasi hiperplasia endometrium (WHO)	10
3. Karakteristik subyek penelitian	49
4. Intensitas <i>staining</i> Bcl-2	50
5. Kategori Bcl-2 berdasarkan jenis histopatologi hiperplasia endometrium non-atipik	52
6. Kategori indeks apoptosis berdasarkan jenis histopatologi hiperplasia endometrium non-atipik	54

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. a Hiperplasia non-atipik simpleks	12
b Hiperplasia non-atipik simpleks dengan pembesaran	12
2. Hiperplasia non-atipik kompleks	12
3. Hiperplasia non-atipik kompleks dengan pembesaran	13
4. Hiperplasia atipik kompleks	14
5. Hiperplasia atipik kompleks dengan pembesaran	14
6. Jalur terjadinya estrogen sebagai karsinogenesis	19
7. Metabolisme oksidatif estrogen melalui jalur katekol	20
8. Jalur signal reseptor estrogen	21
9. Dua jalur mekanisme terjadinya apoptosis	25
10. <i>Staining</i> imunohistokimia Bcl-2	51
11. Ekspresi Bcl-2 dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik	51
12. <i>Cut off point</i> ekspresi Bcl-2	52
13. Gambaran sel apoptosis hiperplasia endometrium non-atipik	53
14. Indeks apoptosis dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik	53
15. <i>Cut off point</i> indeks apoptosis	54
16. Diagram sebar hubungan antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis	55

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Persetujuan penelitian dari RSUP Dr. Kariadi Semarang

2. Lembar penelitian
3. Prosedur pemeriksaan TUNNEL
4. Data penelitian dan analisis statistik

## **ABSTRACT**

**Background :** Apoptosis controls cell hemostasis in the endometrium during normal menstrual cycles, and morphologic studies have suggested its association with the pathology of endometrium. Apoptosis is regulated by several genes, especially those of the Bcl-2 family, but their significance in endometrium pathologies is not well understood.

**Objective :** To assess the difference and correlation of Bcl-2 expression and apoptotic index in simple and complex non-atypical endometrial hyperplasia

**Design :** Paraffin-embedded non-atypical endometrial hyperplasia tissues composed of each 28 cases simple and complex endometrial hyperplasia. Expression of Bcl-2 was examined by immunohistochemistry for calculation percentage of stained cells and intensity of the staining. Apoptotic activity was assessed using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay and apoptotic index was determined.

**Result :** The patient's characteristics were the same between two groups. There was no difference of intensily positive intensity of the staining in endometrial gland epithelial of simple and complex hyperplasia. Expression of Bcl-2 in complex endometrial hyperplasia was higher than simple ( $p=0.013$ ). Within cut off point 0.92 of Bcl-2 expression, the endometrium with  $Bcl-2 \geq 0.92$  had a risk 2.6 times to be a complex hyperplasia. Apoptotic index in simple endometrial hyperplasia was greater than in complex ( $p=0.014$ ). Apoptotic index with cut off point 9 was explained that apoptotic index  $\geq 9$  had a risk to be a simple hyperplasia 3.8 times. Simple hyperplasia had a strongly negative correlation ( $r=-0.756$ ;  $p=0.000$ ) between expression of Bcl-2 and apoptotic index and there was not found a negative correlation in complex cases ( $r=-0.257$ ;  $p=0.94$ ).

**Conclusion :** Expression of Bcl-2 in complex non-atypical endometrial hyperplasia has been greater than in simple and apoptotic index is lower in complex than in simple. Negative correlation between expression of Bcl-2 and apoptotic index is only found in simple non-atypical endometrial hyperplasia.

**Keyword :** Bcl-2, apoptotic index, simple and complex non-atypical endometrial hyperplasia

## ABSTRAK

**Latar belakang :** Apoptosis mengatur hemostasis endometrium selama siklus menstruasi dan penelitian sebelumnya menunjukkan hubungannya dengan patologi dari endometrium. Apoptosis diatur oleh beberapa gen, khususnya Bcl-2 family pada patogenesis endometrium yang masih belum jelas.

**Tujuan :** Menilai perbedaan dan hubungan ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks

**Metode :** Blok parafin jaringan hiperplasia endometrium non-atipik sebanyak masing-masing 28 kasus hiperplasia simpleks dan kompleks. Ekspresi Bcl-2 dengan pengecatan imunohistokimia dan ditentukan persentase *imunostaining* serta intensitas *staining* pada kelenjar endometrium. Penilaian apoptosis dengan menggunakan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling* (TUNEL) assay dan dihitung indeks apoptosisnya.

**Hasil :** Karakteristik subyek pada kedua kelompok sama. Tidak terdapat perbedaan intensitas *staining* positif kuat pada epitel kelenjar hiperplasia simpleks dan kompleks. Ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium kompleks lebih tinggi dibandingkan yang simpleks ( $p=0,013$ ). Nilai ekspresi Bcl-2 dengan *cut off point* 0,92 didapatkan bahwa endometrium dengan Bcl-2  $\geq 0,92$  mempunyai risiko 2,6 kali untuk terjadinya hiperplasia kompleks. Indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium simpleks lebih tinggi dibandingkan yang kompleks ( $p=0,014$ ). Nilai indeks apoptosis dengan *cut off point* 9 menunjukkan bahwa pada endometrium dengan indeks apoptosis  $\geq 9$  mempunyai risiko terjadinya hiperplasia simpleks. Pada hiperplasia simpleks terdapat korelasi negatif derajat kuat antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosisnya ( $r=-0,756$ ;  $p=0,000$ ), sedangkan pada kompleks tidak ada korelasi negatif ( $r=-0,257$ ;  $p=0,94$ ).

**Kesimpulan :** Ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks lebih tinggi dibanding simpleks dan nilai indeks apoptosis lebih rendah pada hiperplasia kompleks dibandingkan simpleks. Korelasi negatif antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis hanya didapatkan pada kasus hiperplasia non-atipik simpleks.

### Kata Kunci

Bcl-2, indeks apoptosis, hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Hiperplasia endometrium dikenal sebagai lesi pra-kanker dari karsinoma endometrium tipe I (*estrogen-dependent disease*) yang ditandai secara klinis dengan adanya perdarahan uterus yang abnormal. Berkembangnya hiperplasia endometrium yang tidak mendapatkan terapi menjadi suatu karsinoma endometrium tergantung pada adanya gambaran atipia dan tingkat kompleksitas kelenjar yang terbagi menjadi simpleks dan kompleks. Hiperplasia simpleks yaitu dengan terdapatnya peningkatan rasio kelenjar terhadap stroma dengan stroma yang relatif banyak dan hiperplasia kompleks dengan kelenjar tersusun padat dengan stroma yang sedikit (rasio kelenjar : stroma > 2 : 1). Insidensinya untuk menjadi karsinoma endometrium adalah sebagai berikut hiperplasia simpleks (1%), kompleks (10%), simpleks dengan atipia (30%), dan kompleks dengan atipia (44%). Menurut penelitian Kurman menunjukkan bahwa kurang dari 10% hiperplasia non-atipik berlanjut menjadi karsinoma dengan durasi hampir 10 tahun<sup>1,2</sup>.

Hubungan patogenesis berkembangnya hiperplasia endometrium menjadi suatu karsinoma endometrium dipengaruhi oleh aktivitas paparan estrogen yang mengakibatkan proliferasi yang tidak terkontrol. Aktivitas proliferasi tersebut seharusnya dikendalikan oleh mekanisme apoptosis (kematian sel yang terprogram) yang mempunyai peranan dalam proses karsinogenesis.

Proses tersebut tidak hanya dijelaskan secara sederhana dengan adanya peningkatan stimulasi pertumbuhan sel tetapi juga disebabkan oleh hilangnya faktor supresi dan pengendali proliferasi sel serta perubahan pada proses apoptosis yang sampai saat ini masih belum jelas. Hal tersebut ditunjukkan dari penelitian Kurman dkk, dengan selain didapatkan progresi juga terdapat regresi dari hiperplasia non-atipik simpleks sebanyak 80% dan kompleks sebesar 79%<sup>3-6</sup>.

Beberapa penelitian mengenai peranan efek stimulasi estrogen terhadap pengendalian pertumbuhan endometrium menjadi suatu lesi prakanker, telah diteliti melalui pemeriksaan immunohistokimia. Didapatkan bahwa reseptor hormon steroid seks yaitu reseptor estrogen dan progesteron memegang peranan utama pada pengaturan proses apoptosis endometrium, yaitu ditandai dengan terdapat perubahan bentuk dan ukuran pada sel kelenjar dan stroma endometrium selama siklus menstruasi<sup>7-9</sup>. Proses apoptosis ini diatur melalui 2 jalur yaitu jalur ekstrinsik (sitoplasma) melalui aktifitas Fas *death receptor* dengan mengaktifasi interaksi Fas-Fas ligand (FasL) dan jalur intrinsik (mitokondria) yang memacu pelepasan sitokrom C yang tergantung pada pengaturan protein Bcl-2 (*B cell lymphoma*) sebagai protein anti-apoptosis dan Bax sebagai protein pro-apoptosis<sup>10,11</sup>. Pada fase proliferasi endometrium tampak adanya ekspresi reseptor estrogen dan protein Bcl-2 meningkat dan ekspresi reseptor ini menurun saat fase sekresi dan menstruasi. Bila kondisi ini tidak diikuti adanya peningkatan ekspresi reseptor progesteron untuk menangkap progesteron dalam memacu desidualisasi stroma maka proliferasi

endometrium menjadi tidak terkendali oleh karena itu progesteron dikatakan sebagai faktor pro-apoptosis yang ditandai dengan adanya peningkatan ekspresi protein Bax dan Fas-FasL sehingga mampu mengendalikan hiperstimulasi estrogen terhadap proliferasi endometrium<sup>7,9,12</sup>.

Pada penelitian Amezcua dkk dijelaskan bahwa *down-regulation* ekspresi Bcl-2 diperkirakan diikuti supresi kadar reseptor steroid yang akan mengendalikan proliferasi endometrium. Pada kasus yang resisten terhadap terapi progesteron didapatkan supresi reseptor estrogen yang sama dengan kasus yang berespon terhadap terapi tetapi didapatkan Bcl-2 yang persisten. Hal ini diduga bahwa pengaturan aktivitas ekspresi Bcl-2 lebih berperan daripada pengaturan reseptor steroid pada efek terapi progesteron, sehingga disregulasi onkoprotein dapat menyebabkan penurunan kemampuan respon seluler pada efek terapi ini<sup>13,14</sup>.

Pada beberapa penelitian tentang hiperplasia endometrium didapatkan ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia non-atipik simpleks lebih tinggi dibandingkan kompleks dan pada penelitian lainnya aktivitas proliferasi kelenjar dan indeks apoptosisnya lebih tinggi pada yang kompleks, hal ini tidak didapatkan kesesuaian dengan fungsi protein apoptosis dalam memacu aktivitas proliferasi sel<sup>15,16</sup>. Padahal dikemukakan bahwa Bcl-2 merupakan pengatur yang paling penting pada jalur intrinsik apoptosis dan pengaruh Bcl-2 lebih berperan daripada protein apoptosis lainnya dalam keseimbangan regulasi pertumbuhan siklik endometrium dan hiperplasia endometrium non-atipik<sup>5,15</sup>. Sehingga hubungan peranan Bcl-2 pada proses apoptosis untuk memicu

aktivitas proliferasi endometrium atau mempertahankan kelangsungan hidup sel, yang mampu menurunkan jumlah sel apoptosisnya masih belum jelas. Hal ini khususnya pada hiperplasia endometrium non-atipik yang berhubungan dengan kompleksitas kelenjarnya, yang akan menentukan untuk proses patogenesis selanjutnya dari hiperplasia endometrium non-atipik dan menentukan protein apoptosis awal yang berpengaruh dari berkembangnya hiperplasia endometrium.

## **1.2 Permasalahan penelitian**

- Apakah terdapat perbedaan ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks ?
- Apakah ada suatu korelasi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks ?
- Apakah ada suatu korelasi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks ?

## **1.3 Keaslian penelitian**

Penelitian (tabel 1) tentang pengaruh dari apoptosis dan Bcl-2 pada gambaran hiperplasia endometrium sampai saat ini lebih memfokuskan ada atau tidaknya gambaran atipia dan belum ada konsistensi pada hasil penelitian-penelitian tersebut, serta kurang diperhatikan mengenai gambaran kompleksitas kelenjarnya dan tidak dinilai hubungan antara protein apoptosis tersebut dengan indeks apoptosisnya, dengan jumlah sampel penelitian yang terbatas. Padahal kompleksitas kelenjar dan hubungan protein apoptosis tersebut juga

mempengaruhi risiko progresifitas menjadi keganasan dan resistensi terhadap terapi hormonal<sup>3,15-17</sup>.

Belum pernah dilakukan penelitian yang hanya menilai hubungan peranan protein Bcl-2 sebagai pengatur keseimbangan regulasi pertumbuhan endometrium dari hiperplasia endometrium non-atipik dengan menekankan peranan kompleksitas kelenjarnya. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan dan hubungan Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks.

**Tabel 1.** Penelitian Bcl-2 dan apoptosis pada hiperplasia endometrium

<b>Nama</b>	<b>Tahun</b>	<b>Tempat</b>	<b>Metode</b>	<b>Jumlah Kasus</b>	<b>Hasil</b>
Kokawa <sup>3</sup> dkk	2001	Jepang	Belah lintang	20 adenokarsinoma endometrium, 16 hiperplasia endometrium, 4 mioma uteri (kontrol)	Bcl-2 meningkat hiperplasia non- atipik, imunonegatif pada karsinoma. Jumlah sel apoptosis dan ekspresi Bax paling tinggi pada karsinoma diikuti atipik dan non-atipik
Niemann <sup>15</sup> dkk	1996	AS	Belah lintang	5 proliferasi, 5 sekresi, 4 hiperplasia kom- pleks, 4 hiperplasia kompleks atipik, 31 karsinoma endometrium	Ekspresi Bcl-2 paling kuat pada endometri- um fase proliferasi, kurang reaktif hiper- plasia atipik dan kar- sinoma endometrium
Ioffe dkk <sup>16</sup>	1998	AS	Belah lintang	10 proliferasi, 18 simpleks, 18 kompleks dengan 8 atipik, 18 adeno- karsinoma endometrium derajat 1	Indeks apoptosis paling tinggi adenokarsinoma endometrium diikuti hiperplasia kompleks, simpleks dan fase proliferasi.

<b>Nama</b>	<b>Tahun</b>	<b>Tempat</b>	<b>Metode</b>	<b>Jumlah Kasus</b>	<b>Hasil</b>
					Bcl-2 tinggi pada hiperplasia simpleks dan fase proliferasi. p-53 dan c-erb-2 hanya pada adenokarsinoma endometrium
Vasvivo <sup>17</sup> dkk	2001	Finlandia	Belah lintang	10 endometrium atrofi, 21 proliferasi, 17 hiperplasia simpleks, 12 kompleks, 23 atipik, 16 adenokarsinoma endometrium derajat 1, 6 derajat 2, 6 derajat 3	Bcl-2 dan Bax normal pada hiperplasia endometrium, Bcl-2/Bax rendah pada karsinoma endometrium, TNF- $\alpha$ dan NF-kB terekspresi pada hiperplasia simpleks dan kompleks tetapi menurun pada atipia dan adenokarsinoma endometrium
Ratna	2008	Indonesia	Belah lintang	28 hiperplasia endometrium non atipik simpleks dan 28 kompleks	Rencana penelitian tesis ini

## 1.4 Tujuan penelitian

### 1.4.1 Tujuan Umum

Menilai peranan ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis berdasar kompleksitas kelenjar pada hiperplasia endometrium non-atipik

### 1.4.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia simpleks dan kompleks endometrium non-atipik
2. Menganalisis perbedaan nilai indeks apoptosis pada hiperplasia simpleks dan kompleks endometrium non-atipik

3. Membuktikan korelasi antara ekspresi Bcl-2 dengan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik berdasar kompleksitas kelenjar

### **1.5 Manfaat penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran peranan Bcl-2 dan apoptosis terhadap terjadinya hiperplasia simpleks dan kompleks pada endometrium sehingga dapat berguna untuk menilai hubungan onkoprotein Bcl-2 terhadap penghambatan fungsi apoptosis dan munculnya proliferasi tidak terkendali pada kelenjar endometrium yang dapat menambah teori etiologi dan patogenesis dari hiperplasia endometrium yang masih belum jelas.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **Hiperplasia endometrium**

##### **2.1 Definisi dan diagnosis**

Hiperplasia endometrium merupakan suatu keadaan patologis pada endometrium berupa peningkatan proliferasi kelenjar endometrium yang mengakibatkan adanya perubahan rasio kelenjar dan stroma, bentuk dan ukuran kelenjar, susunan kelenjar bertambah menjadi 2-3 lapis serta mempunyai potensial menjadi suatu bentuk sel yang atipik bila tidak ada suatu keseimbangan inhibitor dan inisiator dari proliferasi sel kelenjar tersebut. Kondisi ini secara klinis biasanya tidak menimbulkan suatu gejala, tetapi gejala umum pada kelainan ini adalah adanya perdarahan per vaginam yang tidak normal berupa perdarahan yang jumlahnya lebih banyak dari normal (lebih dari 80 ml/periode atau ganti pembalut lebih dari 4/hari) atau lebih lama dari normal (lebih dari 7 hari) dan perdarahan diluar fase menstruasi dalam siklus haid. Gejala ini biasanya berupa perdarahan disfungsi pre-menopause dan post-menopause. Insidensi hiperplasia endometrium terbanyak pada usia perimenopause (46-51 tahun) dengan mempunyai risiko 75% merupakan gejala awal dari karsinoma endometrium dibandingkan pada usia reproduksi. Penegakkan diagnosis dari hiperplasia endometrium dilakukan dengan pengambilan jaringan endometrium dan pemeriksaan histopatologi pada wanita risiko tinggi dengan adanya perdarahan pervaginam yang abnormal,

meliputi usia di atas 40 tahun dengan perdarahan abnormal dan usia kurang dari 40 tahun dengan adanya perdarahan yang persisten dan mempunyai faktor risiko paparan estrogen endogen dan eksogen seperti terdapat anovulasi kronis<sup>1,2,5</sup>.

Terapi yang tepat pada penderita hiperplasia endometrium sangat ditentukan oleh adanya ketepatan diagnosis histopatologi, yang tergantung pada ketepatan dalam mendapatkan sediaan endometrium. Banyak cara untuk mendapatkan sediaan endometrium, dengan diantaranya adalah sitologi, biopsi, dilatasi dan kuretase (D & C), serta biopsi dengan histeroskopi. Dari beberapa *review* cara diagnosis hiperplasia endometrium dikemukakan bahwa pengambilan sediaan dengan dilatasi dan kuretase adalah cara yang terbaik dengan mengurangi subyektifitas gambaran endometrium bila dibandingkan dengan biopsi menggunakan histeroskopi, serta lebih akurat dibandingkan dengan sitologi dan biopsi dengan akurasi 97% dan mempunyai nilai sensitivitas 98%, spesifitas 95%, *positive predictive value* 96% serta *negative predictive value* 98%<sup>1,2,18</sup>.

Pada beberapa tahun ini, penggunaan ultrasonografi transvaginal untuk menilai kelainan endometrium pada penderita dengan perdarahan pervaginam banyak dilakukan. Cara ini bukan merupakan alat prediksi yang tepat untuk menilai keadaan patologis endometrium pada pre-menopause dan perimenopause oleh karena umumnya terjadi penebalan endometrium. Tetapi, pada wanita post-menopause dengan ketebalan endometrium lebih dari 4 mm

dikatakan sebagai suatu skrining dari hiperplasia endometrium dan karsinoma endometrium<sup>20,21</sup>.

## 2.2 Histopatologi

Gambaran histopatologi yang dapat dilihat dari hiperplasia endometrium adalah terjadinya peningkatan rasio kelenjar terhadap stroma, tepi kelenjar menjadi tidak teratur dengan ukuran kelenjar yang bervariasi. Aktivitas mitosis kelenjar tampak jelas dengan derajat yang berbeda. Sering terjadi peningkatan vaskularisasi stroma di dalam epitel<sup>22</sup>.

Awalnya tidak ada standar klasifikasi hiperplasia endometrium dan digunakan terminologi seperti hiperplasia adenomatosa, hiperplasia atipia dan karsinoma in situ. Pada tahun 1994, WHO dan *International Society of Gynecologic Pathologist* membuat satu klasifikasi hiperplasia endometrium berdasarkan ada dan tidaknya gambaran sel atipik dan selanjutnya berdasarkan kompleksitas kelenjarnya yaitu menjadi simpleks dan kompleks (tabel 2)<sup>19,23</sup>.

**Tabel 2.** Klasifikasi Hiperplasia Endometrium (WHO) 1994<sup>2</sup>

---

Hiperplasia non atipik	:	-	Simpleks
		-	Kompleks
Hiperplasia atipik	:	-	Simpleks
		-	Kompleks

---

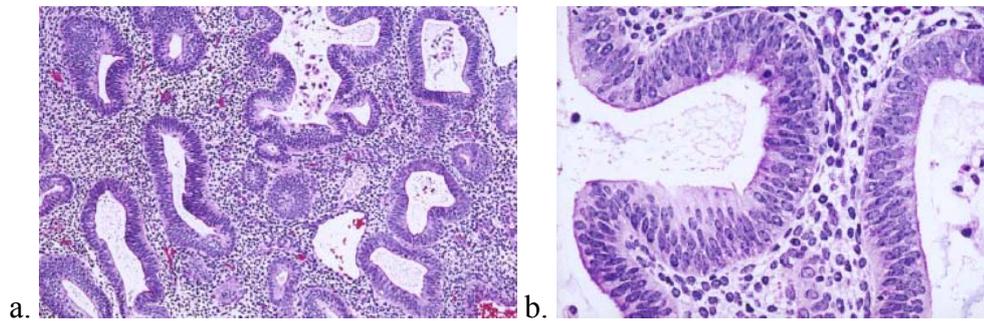
Gambaran simpleks dan kompleks dibedakan dari adanya perubahan struktur kompleksitas kelenjar dan banyaknya stroma diantara kelenjar, tanpa

melihat adanya suatu sel atipik. Terminologi adenomatosa seharusnya sudah tidak digunakan lagi karena bukan suatu klasifikasi standar. Lesi yang diklasifikasikan sebagai karsinoma in situ sekarang dimasukkan sebagai kategori hiperplasia atipik<sup>19,23</sup>.

## **2.2.1 Hiperplasia non atipik**

### **2.2.1.1 Hiperplasia simpleks**

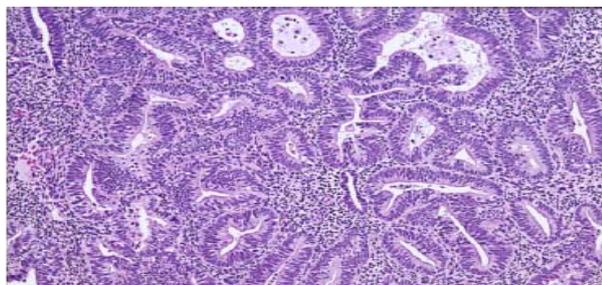
Sebelumnya disebut sebagai hiperplasia kistik atau ringan dengan gambaran yang tampak adalah banyak kelenjar yang mengalami proliferasi dan dilatasi dengan tepi yang tidak teratur dan terdapat penonjolan dan perlekukan kelenjar yang menonjol serta sering ada gambaran kistik, dan dipisahkan oleh stroma yang masih banyak (Gambar 1a). Dapat terlihat metaplasia skuamosa walau hal ini jarang terjadi. Sitologi, epitel kelenjar menyerupai gambaran endometrium fase proliferasi, berupa sel kolumnar dengan sitoplasma amfofilik dan pseudostratifikasi nukleus sampai ke membrana basalis (Gambar 1b). Nukleus bentuk oval dengan kontur halus, sering dengan kromatin yang menyebar dan nukleoli kecil yang tidak terlihat. Stroma yang banyak menyerupai dengan yang terlihat pada fase proliferasi dari siklus haid normal, terdiri atas sel yang kecil, oval dengan sitoplasma sedikit atau tampak terlihat aktifitas mitosis seperti pada kelenjar. Gambaran khas pada hiperplasia simpleks ini adalah vena yang berdilatasi pada stroma<sup>19,23</sup>.



**Gambar 1.** (a.) Hiperplasia non-atipik simpleks. Kelenjar dipisahkan oleh stroma yang masih banyak. Kelenjar dengan ukuran yang ireguler dan kadang-kadang tampak bentuk dilatasi serta kelenjar kistik. (b) Dengan pembesaran tinggi, garis epitel menyerupai endometrium fase proliferasi. Nukleus pseudostratifikasi, tampak juga pada membrana basalis. Bentuk inti sama dan oval<sup>23</sup>.

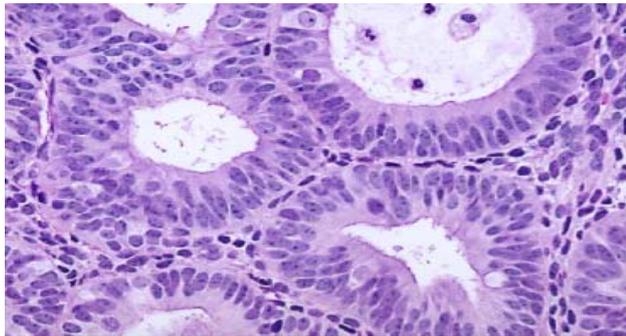
### 2.2.1.2 Hiperplasia kompleks

Hiperplasia kompleks sebelumnya dikenal sebagai hiperplasia moderat atau adenomatosa, dengan tampak suatu gambaran susunan kelenjar yang padat. Pada kelenjar terdapat gambaran ireguler, dengan ukuran bervariasi, sebagian berdilatasi bercabang dengan lekukan dan tonjolan. Lebih banyak adanya penonjolan dan perlekukan kelenjar dan kadang-kadang kelenjar saling berdekatan dan menempel karena padatnya (*back-to-back position*), dengan hanya sedikit stroma yang masih terlihat. Rasio kelenjar dan stroma lebih dari 2:1. Derajat kepadatan kelenjar inilah yang membedakan hiperplasia simpleks dan kompleks. Gambaran kelenjar kistik kadang juga ditemukan (Gambar 2).



**Gambar 2.** Hiperplasia kompleks non-atipik. Kelenjar saling bertumpukan dan ukuran serta bentuknya ireguler<sup>19</sup>.

Sering terjadi adanya bentuk campuran antara hiperplasia simpleks dan kompleks. Gambaran intinya terdapat pseudostratifikasi, *Cigar shaped* sampai berbentuk oval dengan bentuk yang halus, distribusi kromatin yang seragam, nukleolus kecil dan aktifitas mitosis yang jumlahnya bervariasi, sedangkan sitoplasmanya sering amfofilik. (Gambar 3) <sup>19,23</sup>.

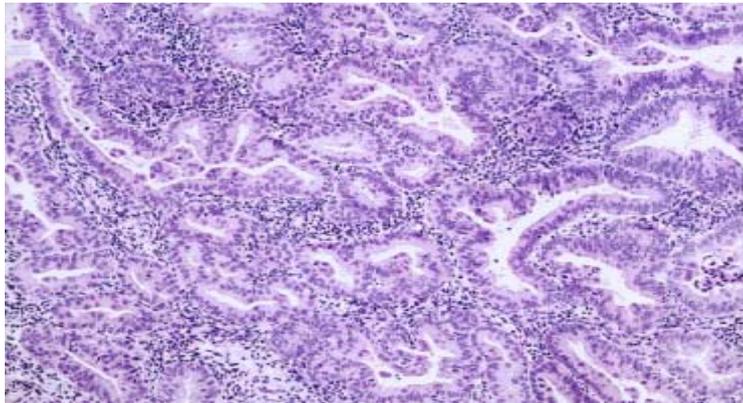


**Gambar 3.** Hiperplasia kompleks non-atipik dengan pembesaran tinggi. Nukleus sel kelenjar dengan bentuk yang halus. Kelenjar berdekatan tetapi masih dipisahkan oleh stroma <sup>19</sup>.

### 2.2.2 Hiperplasia atipik

Hiperplasia atipik dapat berbentuk simpleks dan kompleks, secara umum hiperplasia atipik berbentuk kompleks dengan kelenjar yang padat sekali. Bentuk dan ukuran kelenjar sangat tidak beraturan berbentuk papiler atau bertumpuk, dengan sedikit inti fibrovaskuler dalam lumen. Walaupun kompleks dan sangat padat, kelenjar pada hiperplasia endometrium atipik dikelilingi oleh stroma dengan adanya gambaran kelenjar yang saling menempel, tiap kelenjar mempunyai membrana basalis dengan tepi tipis (Gambar 4). Hiperplasia atipik simpleks memperlihatkan gambaran kelenjar yang kurang padat dibandingkan dengan jenis kompleks, sehingga risiko untuk berkembangnya menjadi adenokarsinoma endometrium lebih tinggi

pada yang kompleks (50%) dibanding yang simpleks dengan kemampuan regresi tumor pada yang simpleks 9 kasus dibandingkan yang kompleks 20 kasus<sup>6,23</sup>.



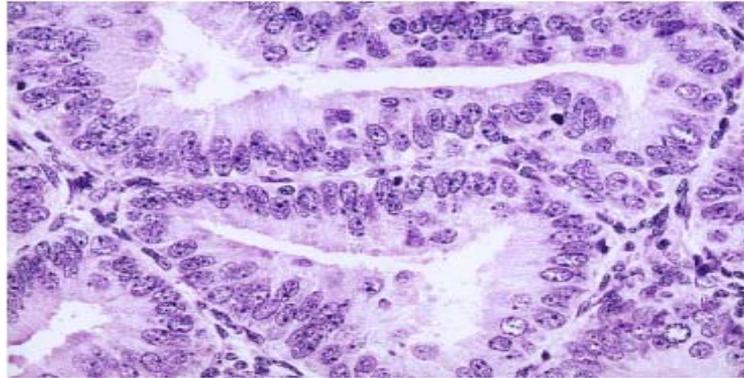
**Gambar 4.** Hiperplasia kompleks atipik. Kelenjar berdekatan dan sangat ireguler tetapi masih dipisahkan oleh stroma<sup>19</sup>.

Diagnosis hiperplasia atipik berdasarkan pada gambaran inti yang spesifik, yaitu inti yang besar dan bulat dan memiliki membran inti yang ireguler dan sering disertai stratifikasi 2-4 sel dengan hilangnya polaritas yang berhubungan dengan membrana basalis. Kromatin tersebar dan berkelompok sepanjang membran inti sehingga membentuk gambaran vesikuler tersendiri. Inti vesikuler ini merupakan ciri khas dari hiperplasia atipik<sup>22,23</sup>.

Sitoplasma dari sel kelenjar atipik eosinofilik, difus atau kadang fokal dibanding dengan non-atipik yang amfofilik. Pada hiperplasia atipik dapat pula terjadi metaplasia skuamosa secara lokal maupun difus. Kadang-kadang metaplasia skuamosa ini terjadi secara luas pada kelenjar sehingga hanya sebagian kecil kelenjar saja yang berbentuk kolumnar. Hal lain yang penting untuk penegakkan diagnosis hiperplasia atipik adalah perbandingan antara inti dan sitoplasma sel yang dapat diperkirakan untuk mengetahui risiko dan

diagnosis bandingnya dari suatu adenokarsinoma endometrium (Gambar 5)

19,22,23



**Gambar 5.** Hiperplasia kompleks atipik.dengan pembesaran tinggi, tampak sel atipik yang ireguler, stratifikasi inti dengan inti bulat. Sitoplasma eosinofilik dan pucat <sup>19</sup>.

### 2.3 Etiologi dan faktor risiko

Hiperplasia endometrium merupakan suatu kelainan yang tergantung pada estrogen (*estrogen-dependent disease*) dan mempunyai faktor risiko yang sama dengan karsinoma endometrium tipe 1, dimana stimulasi estrogen endogen dan eksogen akan memacu proliferasi endometrium secara berlebihan<sup>1</sup>.

Stimulasi estrogen endogen dapat berupa faktor menstruasi, obesitas, anovulasi, hiperplasia stroma ovarium, dan tumor yang mampu mensekresi estrogen. Faktor menstruasi, seperti halnya menarche dini (<12 tahun), menopause lambat (>52 tahun) dan nuliparitas diperkirakan terjadi peningkatan paparan kumulatif estrogen oleh karena total jumlah siklus menstruasi yang lebih banyak sepanjang hidupnya dan perlu dinilai adanya haid yang teratur berupa siklus haid sebelum adanya perdarahan (minimal 3 siklus terakhir) memiliki interval 21-35 hari dengan lama 2-8 hari dan dapat

diperkirakan untuk haid tanggal berikutnya<sup>1,2,5</sup>. Kondisi anovulasi atau oligo-ovulasi yang sering bermanifestasi klinis dengan adanya infertilitas mengakibatkan penurunan dan tidak adanya efek peranan progesteron pada endometrium. Hal ini menyebabkan endometrium tidak mengalami perubahan pada gambaran histopatologi dan fungsinya menjadi suatu fase sekresi melainkan akan terstimulasi terus oleh efek mitogenik estradiol (E2) yang menyebabkan pertumbuhan berlebihan dari endometrium. Kondisi anovulasi yang paling umum adalah pada kasus Sindroma Polikistik Ovarium (PCOS). Pada PCOS, 75% terdapat resistensi insulin dan hiperinsulinemia yang diduga akan memacu angiogenesis, ekspresi aromatase dan menghambat apoptosis serta menstimulasi proliferasi sel ovarium dan endometrium, kasus ini sering terjadi pada wanita dengan obesitas (Indeks Massa Tubuh  $\geq 30$ ). Pada obesitas, jaringan lemak dan depositnya di perifer merupakan sumber utama aromatase, sehingga pada wanita post-menopause hal ini merupakan sumber estrogen dengan adanya konversi androgen di adrenal dan ovarium<sup>24,25</sup>.

Fungsi stroma ovarium pada wanita post-menopause tetap normal, tetapi bila didapatkan penyimpangan seperti hiperplasia stroma, maka menyebabkan sintesis estrogen yang meningkat dan memacu terjadi hiperplasia endometrium sampai menjadi suatu karsinoma endometrium<sup>26</sup>. Tumor ovarium, baik itu primer maupun sekunder, dapat berhubungan dengan peningkatan fungsi ovarium dalam mensintesis estrogen, seperti tumor sel stroma, sel teka dan granulosa. Salah satu *review* mengemukakan bahwa ada hubungan antara adenokarsinoma endometrium ovarium dengan endometrium,

tetapi mekanisme ini sepertinya merupakan karsinogenesis yang spontan dengan adanya kesamaan epitel pada keduanya dibandingkan salah satu tumor menginduksi pada salah satu tumor lainnya<sup>2</sup>.

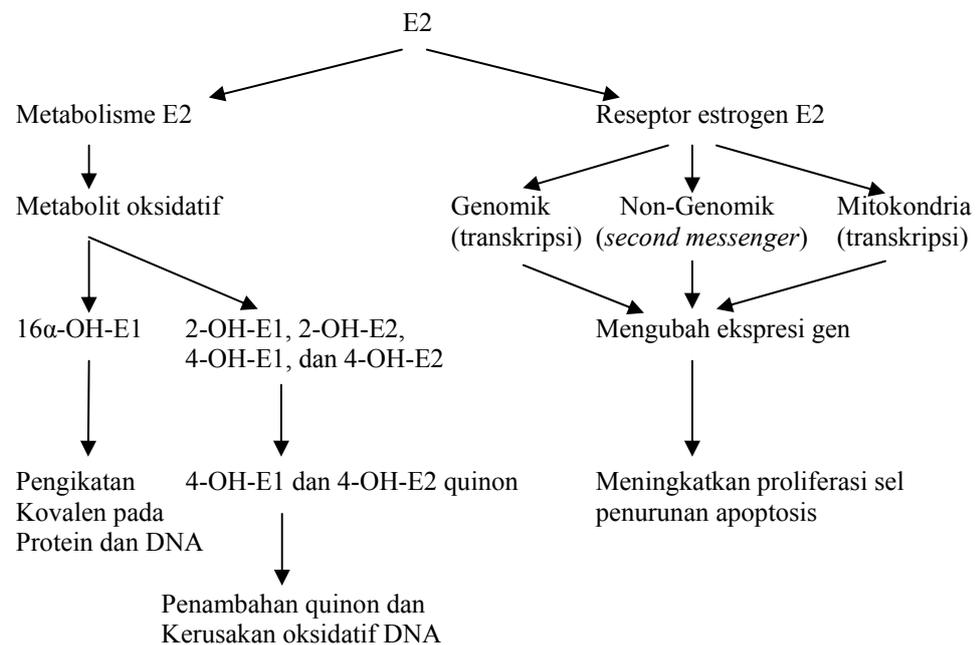
Stimulasi eksogen seperti penggunaan terapi sulih hormon dan tamoxifen<sup>2,5</sup>. Tamoxifen merupakan generasi pertama dari SERMs (*Selective Estrogen-Receptor Modulators*) yang mempunyai efek samping pada pengaturan transkripsi gen pada sel epitel endometrium, dimana signal transkripsi gen tersebut mengaktifkan PAX2 (*paired box 2*) yang mengakibatkan hilangnya metilasi sel endometrium dan memacu proliferasi sel serta transformasi onkogenik<sup>27</sup>. Terapi sulih hormon sebagai sumber estrogen eksogen merupakan estrogen yang meningkatkan mitosis sel endometrium, sedangkan untuk mengurangi efek proliferasi pada endometrium akibat penggunaan terapi sulih hormon tersebut, maka saat ini dicoba dikembangkan terapi sulih hormon dengan kombinasi tambahan progesteron. Pada kombinasi tersebut masih didapatkan aktifitas proliferasi dari endometrium, hal ini dimungkinkan oleh karena dosis relatif dari progesteron kurang adekuat untuk menekan keseluruhan stimulasi estrogen. Beberapa penelitian mengenai faktor endogen seperti obesitas, diabetes melitus, distribusi reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  begitu pula pemecahan variannya, *genetic receptor polymorphism*, dan *mismatch repair gen* pada kasus *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) *Syndrome* mempengaruhi stimulasi estrogen yang persisten. Besarnya risiko untuk terjadinya hiperplasia atipia pada terapi sulih hormon ini 2-10% tetapi hal ini juga tergantung pada dosis harian dan durasi penggunaannya, sehingga

skrining evaluasi terapi dengan ultrasonografi atau biopsi endometrium perlu dilakukan<sup>5,26,28</sup>.

#### **2.4 Patogenesis hiperplasia endometrium**

Hormon steroid pada wanita mempunyai peranan penting pada regulasi dan differensiasi endometrium. Ketidakseimbangan antara kenaikan estrogen sebagai stimulator proliferasi sel dan adanya defisiensi progesteron yang mendiferensiasikan sel endometrium menyebabkan proses apoptosis terganggu dan memacu proliferasi sel-sel endometrium serta mempengaruhi peranan *growth factor* untuk memacu aktivitas mitosis<sup>5,26</sup>. Apabila kemudian terjadi keseimbangan hormon steroid seks, maka aktivitas proliferasi dari endometrium akan menurun dan akan terjadi suatu regresi dari hiperplasia endometrium<sup>13,14</sup>.

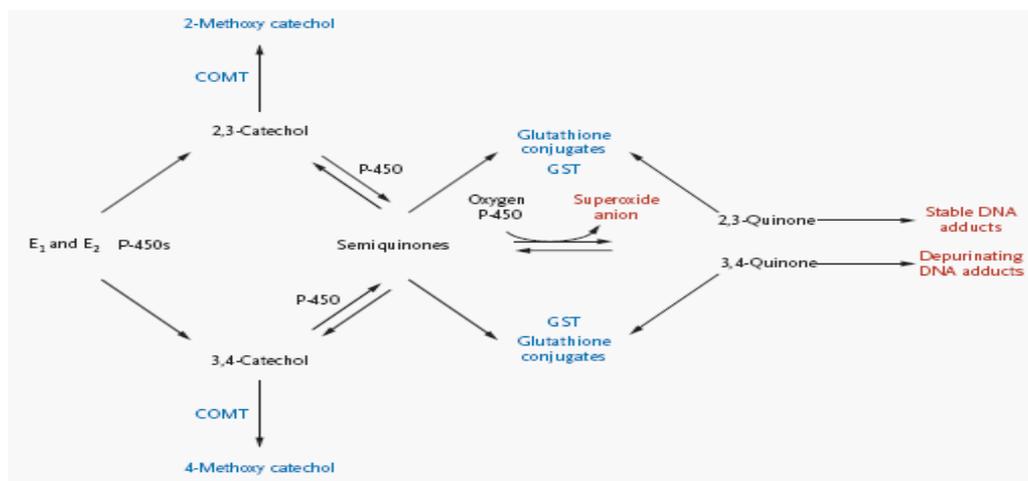
Beberapa penelitian membuktikan bahwa estrogen termasuk proses dan hasil metabolismenya merupakan karsinogen pada jaringan renal, hepar, uterus dan kelenjar mammae. Mekanisme karsinogenesis yang disebabkan estrogen dengan melalui proses metabolisme estrogen menjadi genotoksik, metabolit mutagenik dan stimulasi pertumbuhan jaringan yang menyebabkan proses inisiasi, promosi dan progresi. Ada 2 jalur mekanisme dari karsinogenesis estrogen yaitu jalur pertama melalui peranan metabolisme estradiol (E2) dan yang kedua melalui reseptor estrogen E2 (Gambar 6)<sup>29,30</sup>.



**Gambar 6.** Jalur terjadinya estrogen sebagai karsinogenesis<sup>29</sup>

Dua jalur mekanisme karsinogenesis dari estrogen dalam inisiasi, promosi atau progresi menjadi sel kanker. E1 estron, E2 estradiol, 2-OH-E1 2-hidroksiestron, 2-OH-E2 2-hidroksiestradiol, 4-OH-E1 4-hidroksiestron, 4-OH-E2 4-hidroksiestradiol, dan 16 $\alpha$ -OH-E1, 16 $\alpha$ -hidroksiestron.

Pada mekanisme dari metabolisme E2 dengan melalui jalur katekol, dimana prosesnya menggunakan enzim sitokrom P-450 yang mengkatalisis metabolisme oksidatif dari estron (E1) dan E2 menjadi 2-estrogen hidroksilkatekol (sitokrom P-450 1A1, 1A2 dan 3A) atau 4-estrogen hidroksilkatekol (sitokrom P-450 1B1). Estrogen 3,4-quinone dapat membentuk formasi tidak stabil dengan adenin dan guanin pada DNA yang, memacu depurinisasi dan mutasi. Pengurangan estrogen quinone kembali menjadi hidroquinone dan katekol akan memacu terjadinya suatu siklus redox yang menimbulkan kerusakan oksidatif pada lemak dan DNA (Gambar 7)



**Gambar 7.** Metabolisme oksidatif estrogen melalui jalur katekol<sup>31</sup>  
 E1 estron, E2 estradiol, COMT cathecol O-methyltransferase, P-450 sitokrom P-450, dan GST glutation S-transferase.

Mekanisme kedua pada reseptor estrogen, dengan melalui beberapa jalur sinyal transduksi reseptor estrogen. Sejak ditemukannya reseptor estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  yang juga terdapat pada sel endometrium, dikemukakan bahwa mekanisme sinyal pada reseptor estrogen berhubungan dengan mitokondria dan membran plasma, dimana juga terdapat mekanisme aktivasi proses apoptosis pada 2 bagian sel ini<sup>8,31</sup>.

Terdapat 3 jalur aktivasi pada reseptor estrogen (gambar 6 dan 8) yaitu melalui genomik DNA yang mengkode gen, non-genomik melalui aktivasi *second messenger* dan sinyal protein kinase, serta aktivasi mitokondria yang memfasilitasi *cross-talk* antara proses sinyal membran reseptor estrogen dan proses sinyal reseptor *insulin-like growth factor 1* (IGF-1)<sup>30</sup>. Pada stroma endometrium berhubungan langsung dengan ketergantungan estrogen pada reseptor di stroma yang bertanggung jawab terhadap proliferasi epitel pada kelenjar endometrium<sup>26</sup>. Kedua reseptor tersebut berinteraksi agonis dalam



Metabolit katekol estrogen dapat mempengaruhi pengaturan jalur ekspresi gen, signal atau keduanya melalui reseptor estrogen. Estrogen 4-hidroksikatekol dan 2-hidroksikatekol mempunyai afinitas pengikat yang kuat terhadap reseptor estrogen dibanding estradiol sendiri dan mampu memacu *estrogen-receptor-dependent gene expression*. 4-hidroksikatekol yang memediasi secara bebas ER  $\alpha$  dan  $\beta$  dari efek katekol estrogen akan mampu memacu proliferasi sel dan menghambat apoptosis<sup>29,30</sup>.

E2 selain untuk meregulasi transkripsi reseptor estrogen, stabilisasi mRNA E2 juga akan menginduksi transkripsi reseptor progesteron A dan B. Kedua reseptor progesteron tersebut mempunyai sifat yang berlawanan, dimana reseptor progesteron A akan menginaktivasi transkripsi, transdominan menghambat reseptor progesteron B dan menghambat estrogen dalam menginduksi proliferasi sel epitel yang akan memacu protein pro-apoptosis TNF- $\alpha$  dan Bax. Reseptor progesteron B secara selektif mengaktivasi koaktivator transkripsi dan juga melalui mekanisme non-transkripsi dapat memacu pertumbuhan sel dan berinteraksi dengan reseptor estrogen dan menstimulasi estrogen reseptor kinase yang memacu aktivitas mitosis dan peningkatan aktivitas ki67 serta *downregulation* proses apoptosis. Keseimbangan reseptor progesteron ini yang diatur oleh 331 GA, bila terdapat gangguan disini akan memacu aktivasi dari reseptor progesteron B yang akan meningkatkan aktivitas proliferasi endometrium<sup>8,10</sup>.

Ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis pada endometrium akan menghasilkan suatu gambaran hiperplasia pada endometrium berupa

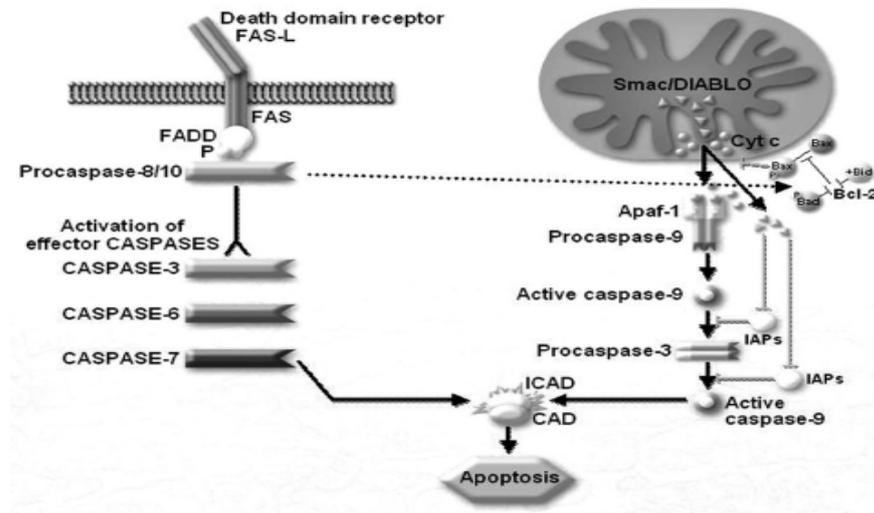
adanya perubahan rasio kelenjar dan stroma tanpa belum adanya suatu gambaran sel atipik. Struktur kompleksitas kelenjar yang ditentukan oleh aktifitas proliferasi sel kelenjar endometrium terdapat kemampuan mitosis yang lebih tinggi dibanding aktifitas apoptosisnya, sehingga dibedakan menjadi simpleks dan kompleks. Apabila terdapat mutasi protein *ras*, PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) dan ekspansi klonal selama bertahun-tahun mengakibatkan terdapatnya gambaran suatu hiperplasia atipik. PTEN yang merupakan *tumor suppressor gene* yang menekan mitosis dan memacu apoptosis, kerjanya dipengaruhi oleh adanya perubahan hormon steroid pada endometrium. Terjadinya mutasi dan delesi PTEN disebabkan adanya peningkatan estrogen misalnya pada fase proliferasi, tetapi tidak adanya PTEN juga dipengaruhi oleh adanya kondisi genetik seperti mutasi pada protein *ras*, terutama pada gen BRAF yang merupakan efektor protein *ras* pada jalur MAPK yang selanjutnya memacu ekspansi klonal sel endometrium dan menginisiasi menjadi suatu bentuk adenokarsinoma<sup>16,26,33-35</sup>.

## **2.5 Peranan Bcl-2 dalam proses apoptosis**

Ada 2 mekanisme kematian sel yaitu nekrosis dan apoptosis. Dikatakan nekrosis bila adanya perubahan morfologi sel yang diikuti dengan kematian sel pada jaringan yang hidup, umumnya disebabkan oleh aksi degradasi enzim pada kerusakan sel yang letal. Umumnya, nekrosis secara histologi terjadi pada kerusakan oleh karena lingkungan eksternal yang ireversibel. Karakter sel yang mengalami kerusakan ini ditandai dengan sel dan organelnya seperti

mitokondria membengkak (oleh karena rusaknya kemampuan membran plasma untuk mengatur pengeluaran ion dan cairan), cairan sel keluar, dan inflamasi disekitar jaringan<sup>36,37</sup>.

Apoptosis merupakan jalur kematian sel yang dipacu oleh mekanisme pengaturan intraseluler dimana sel yang akan mati mengaktifkan enzim yang akan mendegradasi DNA nukleus sel dan protein sitoplasma. Sel yang mengalami apoptosis, morfologinya berupa sitoplasma mengkerut, membran berbentuk gelembung, kondensasi kromatin (DNA dan protein) dan fragmentasi pada membran yang mengembang. Apoptosis pada kondisi fisiologis berfungsi untuk mengatur jumlah sel, proliferasi dan menghilangkan sel yang sudah tidak berguna lagi sebagai suatu perkembangan normal dari sel, seperti pada embriogenesis, *hormone-dependent involution* pada siklus menstruasi dan atresia folikel pada menopause, delesi sel pada proliferasi sel epitel, eliminasi sel reaktif limfosit yang berlebihan, kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik pada infeksi virus dan perkembangan tumor. Apoptosis juga terjadi pada kondisi patologi, dimana apoptosis bertanggung jawab pada kematian sel seperti stimulasi kerusakan eksternal pada radiasi, obat sitotoksik anti-kanker, infeksi virus, atrofi patologi pada parenkim organ setelah adanya obstruksi saluran, semisal pada pankreas dan ginjal, juga kematian sel pada tumor. Disregulasi proses kematian sel ini mempunyai peranan pada patogenesis dari penyakit. Penilaian jumlah sel yang mengalami kematian karena apoptosis dinyatakan dalam indeks apoptosis<sup>11,36,37</sup>.



**Gambar 9.** Dua jalur mekanisme terjadinya apoptosis <sup>11</sup>

Terdapat 2 jalur apoptosis yaitu jalur ekstrinsik (jalur sitoplasma), yang dipacu melalui Fas *death receptor*, bagian dari *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor superfamily* dan jalur intrinsik (jalur mitokondria) yang timbul oleh adanya stimulasi yang memacu pelepasan sitokrom-c dari mitokondria dan akan mengaktifasi signal kematian sel. Adanya suatu sinyal kematian sel, protein pro-apoptosis melakukan modifikasi *posttranslation* termasuk defosforilasi dan pemecahan yang mengakibatkan aktivasinya dan translokasi mitokondria untuk memacu apoptosis. Respon dari stimulus apoptosis, menyebabkan membran luar mitokondria menjadi permeabel, yang akan memacu pelepasan sitokrom C dan pemacu caspase. Sitokrom C juga melepaskan sitosol, yang berinteraksi dengan Apaf-1 dan memacu aktivasi pro-enzim caspase-9. Aktivasi caspase-9 kemudian mengaktifkan caspase-3, selanjutnya menginduksi aktivasi sisa cascade caspase dan terjadilah apoptosis. Aktivasi caspase menyebabkan pemecahan lamin nukleus dan

terurainya nukleus oleh caspase-3. Jalur intrinsik dan ekstrinsik ini saling berhubungan, dimana pemaparan berlebihan dari Bcl-2 pada jalur intrinsik dapat memacu hambatan dari jalur ekstrinsik, sebaliknya TNF- $\alpha$  dapat meningkatkan ekspresi NF-kB dan menstimulasi anggota anti-apoptosis dari protein Bcl-2 *family* (gambar 9) <sup>38</sup>.

Bcl-2 family terdiri dari bagian pro-apoptosis seperti Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim dan Hrk, dan bagian anti-apoptosis seperti Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1 dan Mcl-1. Anggota anti-apoptosis Bcl-2 bekerja dengan menekan apoptosis melalui blokade pelepasan sitokrom-c, dimana anggota pro-apoptosis bekerja sebagai promotor. Efek ini lebih tergantung pada keseimbangan antara Bcl-2 dan Bax dibandingkan pada Bcl-2 sendiri <sup>11,39</sup>.

Protein Bcl-2 *family* merupakan regulator yang paling penting pada jalur intrinsik juga merupakan pengaturan utama pada proses apoptosis dalam keseimbangan regulasi pertumbuhan siklik endometrium dan hiperplasia endometrium non-atipik yang berhubungan dengan aktivitas steroid seks dibandingkan dengan p53 yang jarang terdeteksi pada tumor yang *hormonal dependent* <sup>16,33</sup>. Bcl-2 dikatakan dapat memperlama kelangsungan hidup sel tanpa adanya proses proliferasi sel yang merupakan kategori baru dari suatu onkogen. Protein ini sering terekspresi berlebihan pada berbagai keganasan meskipun tanpa adanya translokasi kromosom t (14;18) yang mengakibatkan perubahan gen Bcl-2. Peningkatan ekspresi Bcl-2 dapat menyebabkan resistensi terhadap obat kemoterapi dan terapi radiasi, meskipun penurunan ekspresi Bcl-2 dapat memacu respon apoptosis pada obat anti-kanker.

Selanjutnya, pemaparan berlebihan dari Bcl-2 dapat menghasilkan akumulasi sel pada fase  $G_0$  dari siklus sel dan menyebabkan suatu kondisi kemoresisten<sup>11,38</sup>.

## **2.6 Apoptosis pada hiperplasia endometrium**

Beberapa penelitian mengemukakan bahwa apoptosis mengontrol keseimbangan sel pada endometrium selama siklus menstruasi yang normal, dimana mekanisme apoptosis pada organ reproduksi wanita berhubungan dengan kerja hormon seks steroid. Hormon estrogen yang berfungsi untuk memacu proliferasi sel endometrium, juga akan mengaktivasi gen anti-apoptosis dan menghambat gen pro-apoptosis. Progesteron sebagai faktor untuk mendefinisikan sel endometrium akan menghentikan mitosis sel dan akan mengaktivasi gen pro-apoptosis yang menghasilkan protein-protein pro-apoptosis seperti Bax, Fas-fasL, dan TNF- $\alpha$  yang akan menghambat pertumbuhan sel. Hal ini tampak selama siklus menstruasi dimana saat fase proliferasi terdapat peningkatan ekspresi Bcl-2 dan menurun pada awal sekresi sedangkan pada saat fase sekresi tampak adanya peningkatan ekspresi Bax, Fas, dan TNF- $\alpha$ . Saat akhir fase sekresi dan pada fase menstruasi terdapat peningkatan ekspresi protein pro-apoptosis dan dengan penghitungan indeks apoptosis, menunjukkan proses apoptosis pada endometrium berfungsi untuk menghambat proliferasi sel dan memacu differensiasi terminal sel endometrium<sup>9,10,12</sup>. Aktivitas proliferasi sel kelenjar yang lebih meningkat dibandingkan aktivitas sel stroma diduga adanya transduksi signal pada

reseptor estrogen yang meningkat sesuai dengan peningkatan aktivitas proliferasi sel yang tidak dihambat oleh protein pro-apoptosis, diikuti dengan peningkatan mutasi yang terjadi selama sintesis DNA sehingga menghasilkan gambaran hiperplasia kompleks dengan struktur kelenjar yang lebih padat<sup>15-17</sup>.

Pada beberapa penelitian dikatakan pengaruh Bcl-2 lebih berperan daripada protein apoptosis lainnya dalam keseimbangan regulasi pertumbuhan siklik endometrium<sup>5,15</sup>. Gen Bcl-2 yang berlokasi pada kromosom 18, merupakan gen pertama yang terlibat dalam proses apoptosis serta berfungsi untuk mengkode protein 25-kDa yang berada pada membran bagian dalam pada mitokondria dan terlibat berfungsi pada jalur antioksidan<sup>36,39</sup>. Bcl-2 berhubungan erat dengan kromosom pada nukleus sel yang sedang mitosis dan disini tampak meningkat ekspresinya pada fase proliferasi dimana reseptor estrogen dan kadar estrogen meningkat yang memicu peranannya sebagai hormon yang mitogenik dan bila terdapat peningkatan *unopposed* estrogen akan memacu proses mitosis yang berlebihan untuk berkembang menjadi hiperplasia endometrium dan neoplasma<sup>15-17</sup>.

Salah satu bagian dari Bcl-2 *family* yang bersifat menghambat kerja proto-onkogen dari Bcl-2 dengan memacu proses apoptosis adalah Bax. Hasil gen dari Bcl-2 *family* dapat berbentuk homo- dan heterodimer dengan salah satunya. Aksi pro-apoptosis dari protein Bax tergantung pada pembentukan Bax homodimer pada membran luar mitokondria. Efek antagonis dari protein Bcl-2 dilihat pada kemampuannya untuk membentuk heterodimer Bcl-2-Bax,

yang akan mencegah pembentukan homodimer Bax<sup>38,39</sup>. Saat ini, telah diketahui bahwa faktor kunci dari regulasi apoptosis adalah tingginya rasio Bcl-2/Bax akan membuat sel resisten terhadap stimulus apoptosis dan rendahnya rasio tersebut akan memacu apoptosis<sup>17</sup>. Pada beberapa penelitian dikemukakan bahwa ekspresi Bax akan meningkat pada adenokarsinoma endometrium dibandingkan pada hiperplasia endometrium atipik dan ekspresi Bax cenderung menurun pada hiperplasia endometrium non-atipik. Peningkatan ekspresi Bax ini akan meningkatkan apoptosis sel dan hal ini sama dengan proses apoptosis pada karsinoma prostat dan paru bahwa peningkatan jumlah apoptosis sel menunjukkan adanya peningkatan terjadinya keganasan yang berhubungan dengan sel kanker yang muda dan rapuh. Ratio Bcl-2/Bax juga akan menurun dengan adanya *down-regulation* Bcl-2 bila mengarah ke keganasan<sup>15,17</sup>.

Pengaruh dari ekspresi Bcl-2 yang meningkat akan mempengaruhi jalur intrinsik dari proses apoptosis dimana Bcl-2 akan meningkatkan *interleukin-converting enzyme (ICE)-like protease*. Akibatnya Bcl-2 akan menghambat Fas untuk melakukan proses apoptosis dengan tidak mengaktifkan *ICE-like protease* yang akan menurunkan kemampuan fungsi Fas-FasL pada jalur apoptosis. Sehingga, ekspresi Bcl-2 yang persisten pada kejar hiperplasia endometrium dapat disebabkan oleh adanya penurunan ekspresi Fas<sup>11,14</sup>.

Diduga interaksi Fas-FasL pada sel kelenjar endometrium merupakan bagian suatu mekanisme autokrin pada kematian sel endometrium pada siklus menstruasi. Apabila ada suatu aktivasi Fas *intracellular death domain* pada

molekul Fas, akan terjadi pengikatan dengan FADD (*Fas-associated death domain –containing protein*), yang kemudian akan mengambil FADD-like interleukin-1  $\beta$ -converting enzym (FLICE). Aktivasi FLICE memacu pembentukan kompleks sinyal kematian yang memicu aktivasi caspase 3, 6, 7, dan 8 yang menyebabkan degradasi masif dari endometrium<sup>10,11,38</sup>. Pada penelitian mengenai ekspresi Fas dan Fas-L pada terapi progesteron untuk kasus hiperplasia endometrium, ditemukan kasus bahwa ketidakseimbangan ekspresi Fas dan Fas-L menyebabkan sel yang hiperplastik dapat bertahan hidup dan tumbuh yang akan menyebabkan resistensi terhadap terapi progesteron. Hal ini diduga peran peningkatan regulasi Fas-L pada reseptor estrogen yang meningkat menghambat interaksi Fas dengan Fas-L disamping adanya pengaruh Bcl-2 terhadap jalur intrinsik pada proses apoptosis ini<sup>13,14</sup>.

TNF- $\alpha$  yang juga berperan sebagai imunomodulator akan memacu apoptosis pada berbagai jenis tumor, karena sitokin tersebut mempunyai efek sitotoksik, menstimulasi makrofag dan menghambat petanda pertumbuhan tumor, hal ini mungkin juga terjadi pada endometrium yang normal dan yang terdapat kelainan patologis<sup>40</sup>. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dapat menekan aksi pro-apoptosis TNF-  $\alpha$ . Pada penelitian didapatkan adanya ekspresi NF- $\kappa$ B pada hiperplasia dan karsinoma endometrium, yang sebelumnya ada pada endometrium normal dimana kerjanya dibawah pengaruh hormon steroid ovarium. Progesteron mampu mengontrol aktivitas transkripsi NF- $\kappa$ B, dan selama fase perimenstruasi, yang berhubungan dengan penurunan konsentrasi serum progesteron, terjadi peningkatan sintesis mRNA dan aktivitas

transkripsi NF- $\kappa$ B. Pada penelitian dikemukakan bahwa NF- $\kappa$ B mempunyai peranan dalam melindungi sel dari proses apoptosis pada hiperplasia endometrium dan karsinoma endometrium stadium awal, yaitu pada stadium awal maglinansi NF- $\kappa$ B dihubungkan dengan peningkatan ekspresi matrix metallo-proteinase yang akan memacu invasi dan metastasis sel kanker serta membentuk neovaskularisasi. Pada stadium II karsinoma endometrium, terdapat penurunan ekspresi NF- $\kappa$ B dan peningkatan apoptosis, sedangkan pada stadium III fungsi NF- $\kappa$ B kurang berarti dan penurunan indeks apoptosis yang menunjukkan adanya mekanisme kontrol yang berbeda atau telah hilang<sup>17,33</sup>.

Mutasi p53 sebagai *tumor suppressor gene* jarang terdeteksi pada tumor dengan mutasi PTEN. Hal ini terbukti pada beberapa penelitian mutasi p53 berhubungan terbalik dengan ekspresi reseptor hormon steroid seks, dibandingkan mutasi PTEN yang berkorelasi positif dengan ekspresi reseptor estrogen. Seperti halnya pada karsinoma endometrium tipe II yang *non-estrogen* dependent, dimana mutasi p53 merupakan prekursor utama dari berkembangnya *endometrial intraepithelial carcinoma* (EIC) menjadi suatu bentuk agresif karsinoma endometrium jenis serosum dan *clear cell* dari endometrium yang atrofi<sup>41,42</sup>.

p53 yang berperan sebagai mediator Bcl-2 akan mencegah terjadinya kerusakan DNA dan mengaktifkan signal apoptosis serta memblok aktivitas proliferasi sel. Apabila produksi Bcl-2 meningkat, maka akan menekan apoptosis secara simultan pada sel yang terkena untuk berproliferasi yang

distimulasi oleh aktivasi myc dan p53. Mutasi gen p53 menonjol pada akhir perkembangan progresi tumor, yaitu pada karsinoma endometrium tipe I yang tergantung pada keseimbangan hormonal. Pada stadium akhir keganasan ini, tidak hanya tergantung dari aktivitas *hormonal dependent* seperti hiperplasia endometrium tetapi merupakan akumulasi perubahan gen yang terlibat dalam differensiasi dan progresi, diantaranya terjadi ekspresi yang meningkat dari mutasi p53, Her 2, dan neu<sup>33,42</sup>.

## **BAB 3**

### **HIPOTESIS**

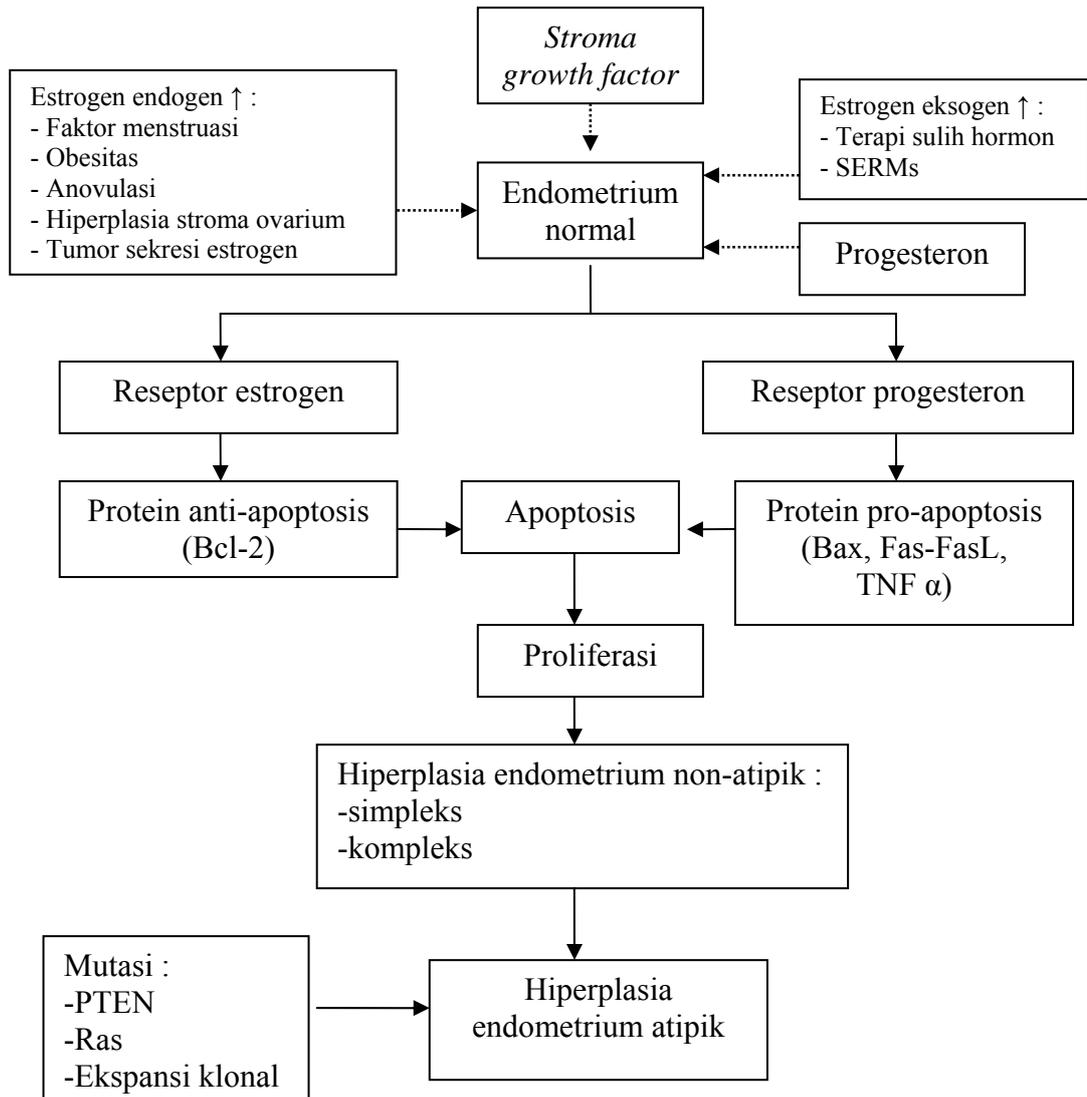
Pada hiperplasia endometrium non-atipik :

1. Ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia kompleks lebih tinggi dibanding hiperplasia simpleks
2. Indeks apoptosis pada hiperplasia kompleks lebih rendah dibanding hiperplasia simpleks
3. Ada korelasi negatif antara Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium simpleks dan kompleks

## BAB 3

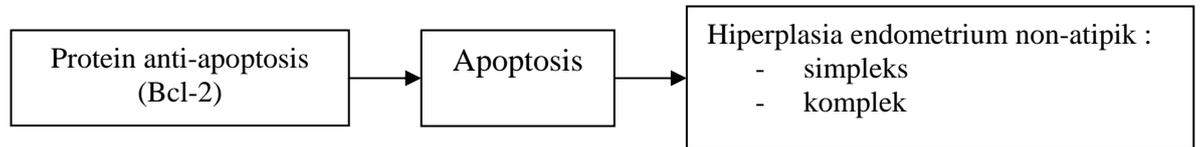
### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka teori





### 3.2 Kerangka konsep



### 3.3 Hipotesis

Pada hiperplasia endometrium non-atipik :

1. Ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia kompleks lebih tinggi dibanding hiperplasia simpleks
2. Indeks apoptosis pada hiperplasia kompleks lebih rendah dibanding hiperplasia simpleks
3. Ada korelasi negatif antara Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium simpleks dan kompleks

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang lingkup penelitian**

Ruang lingkup penelitian adalah bidang ginekologi endokrinologi dan patologi anatomi serta biologi molekuler.

#### **4.2 Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Bagian/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS. Dr. Kariadi Semarang, Sub Bagian Ginekologi. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS. Dr. Kariadi Semarang. Pemeriksaan imunohistokimia dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Yogyakarta. Penelitian ini akan dilaksanakan mulai Februari 2008 sampai jumlah sampel terpenuhi.

#### **4.3 Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan rancangan studi potong lintang (*cross sectional study*)

#### **4.4 Populasi dan sampel penelitian**

##### **4.4.1 Populasi target**

Populasi target adalah penderita dengan hiperplasia endometrium non-atipik

##### **4.4.2 Populasi terjangkau**

Populasi terjangkau adalah penderita dengan hiperplasia endometrium non-atipik di RS. Dr. Kariadi Semarang.

### **4.4.3 Sampel**

Sampel penelitian ini adalah penderita dengan hiperplasia endometrium non-atipik di RS. Dr. Kariadi Semarang yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

#### **4.4.3.1 Kriteria inklusi**

1. Wanita usia  $\geq 40$  tahun dengan perdarahan uterus abnormal
2. Wanita usia  $< 40$  tahun dengan perdarahan uterus abnormal dan mempunyai faktor risiko adanya paparan estrogen endogen (faktor menstruasi, obesitas, anovulasi, tumor ovarium sekresi estrogen) dan eksogen (terapi sulih hormon, SERMs)

#### **4.4.3.2 Kriteria eksklusi**

1. Pasca kuretase  $< 3$  bulan
2. Curiga keganasan serviks
3. Kehamilan
4. Penderita dengan gangguan pembekuan darah
5. Mioma uteri
6. Penggunaan kontrasepsi hormonal
7. Kasus yang telah mendapatkan terapi hormonal
8. Sediaan yang diperiksa tidak representatif untuk dinilai

### **4.4.4 Besar sampel**

- Besar sampel untuk hipotesis ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks lebih tinggi dibanding simpleks.

Untuk menganalisis hipotesis tersebut diatas, dengan ditentukan derajat kemaknaan  $p = 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $Z\alpha = 1,64$ ) untuk membedakan ekspresi Bcl-2

pada hiperplasia non-atipik simpleks dan kompleks. Berdasarkan kepustakaan nomor 17 didapatkan perbedaan ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium adalah 2,08 dengan SD = 0,32, apabila diperkirakan akan ada perbedaan 0,30 dengan power sebesar 90% ( $\beta=0,1$ ;  $Z\beta = 1,44$ ), maka besar sampel dihitung dengan rumus uji hipotesis terhadap rerata 2 populasi:

$$n1 = n2 = 2 \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta) \delta}{x1 - x2} \right]^2 = 2 \left[ \frac{(1,64 + 1,44) 0,32}{0,30} \right]^2$$

$$n1 = n2 = 21,58 \text{ subyek} \sim 22 \text{ subyek}$$

Besar sampel total adalah  $n1 + n2 = 44$  subyek

- Besar sampel untuk hipotesis indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks lebih rendah dibanding simpleks.

Untuk menganalisis hipotesis tersebut diatas, dengan ditentukan derajat kemaknaan  $p = 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $Z\alpha = 1,64$ ) untuk membedakan indeks apoptosis pada hiperplasia non-atipik simpleks dan kompleks. Berdasarkan kepustakaan nomor 17 didapatkan perbedaan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium adalah 0,76 dengan SD = 0,34, apabila diperkirakan akan ada perbedaan 0,30 dengan power sebesar 90% ( $\beta=0,1$ ;  $Z\beta = 1,44$ ), maka besar sampel dihitung dengan rumus:

$$n1 = n2 = 2 \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta) \delta}{x1 - x2} \right]^2 = 2 \left[ \frac{(1,64 + 1,44) 0,34}{0,30} \right]^2$$

$$n1 = n2 = 24,36 \sim 25 \text{ subyek}$$

Besar sampel total adalah  $n1 + n2 = 50$  subyek

- Besar sampel untuk korelasi negatif antara Bcl-2 dengan indeks apoptosis

Untuk menganalisis hipotesis tersebut diatas, dengan ditentukan derajat kemaknaan  $p = 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $Z\alpha = 1,64$ ) untuk mencari korelasi negatif antara Bcl-2 dengan indeks apoptosis pada hiperplasia non-atipik simpleks dan kompleks. Apabila diperkirakan korelasi antara Bcl-2 dan indeks apoptosis adalah derajat sedang ( $r = -0,4$ ) dengan power sebesar 90% ( $\beta=0,1$ ;  $Z\beta = 1,44$ ), maka besar sampel dihitung dengan rumus:

$$N = \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta)}{0,5 \ln (1+r / 1-r)} \right]^2 + 3 = \left[ \frac{(1,64 + 1,44)}{0,5 \ln (1+0,4/ 1-0,4)} \right]^2 + 3$$

$$= 55,76 \sim 56 \text{ subyek}$$

Berdasarkan perhitungan besar sampel ketiga hipotesis, maka besar sampel minimal terbesar 56 subyek yang terdiri atas masing-masing 28 hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks.

#### 4.4.5 Cara pengambilan sampel

Subyek penelitian dipilih secara *consequitive sampling* dari preparat blok parafin hiperplasia endometrium di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS Dr. Kariadi Semarang. Pengambilan sampel dihentikan sampai dengan jumlah sampel terpenuhi.

#### 4.5 Variabel penelitian

- Variabel bebas adalah ekspresi Bcl-2 endometrium; skala rasio
- Variabel perantara adalah indeks apoptosis; skala rasio

- Variabel tergantung adalah kompleksitas kelenjar hiperplasia endometrium non-atipik; skala nominal
  - a. Hiperplasia simpleks non atipik
  - b. Hiperplasia kompleks non atipik

## **4.6 Bahan dan cara kerja**

### **4.6.1 Pengambilan data**

Penderita yang diikutkan dalam penelitian ini (kasus perdarahan uterus abnormal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan hasil kuretase hiperplasia endometrium non-atipik). Kemudian dicari adanya sediaan preparat blok parafin sebelumnya, kemudian dilakukan pembacaan preparat histopatologi menentukan derajat kompleksitas kelenjar endometrium serta dibuat sediaan ulang untuk pemeriksaan imunohistokimia menilai indeks apoptosis dan ekspresi Bcl-2. Karakteristik dari sampel penelitian ditelusuri dari catatan rekam medik.

### **4.6.2 Pembuatan preparat**

Blok parafin dipotong dengan *microtome*, ketebalan 3-4  $\mu$ . Hasil potongan diletakkan dalam air hangat. Tempelkan pada obyek *glass* yang telah diolesi dengan poly-L-Lysine untuk pemeriksaan imunohistokimia, sedangkan untuk pengecatan hematoxyline eosine (HE) dengan albumine : glyserine 1 : 1. Nomori dengan pena kaca sesuai dengan label. Panaskan dalam oven selama 10 sampai 15 menit dan kemudian didinginkan. Rendam dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Rendam

dalam alkohol bertingkat, dengan alkohol 96%, kemudian 80%, 70% dan 50% masing-masing selama 5 menit. Direndam dalam aquadest selama 10 menit selanjutnya direndam dalam hematoxyline selama 15 menit bila hendak dilanjutkan dengan pengecatan HE. Bilas dengan air kran. Celupkan dalam alkohol asam 1 – 2 celupan. Dibilas lagi dengan air kran kemudian dimasukkan dalam larutan *bluing solution* selama 5 sampai 15 menit dan dibilas lagi dengan air kran. Masukkan selama 2 menit dalam alkohol 50% dan diulang lagi selama 2 menit kemudian 2 kali pada alkohol 70% masing-masing selama 2 menit. Masukkan dalam eosine 2 menit dan selanjutnya dibilas dengan alkohol 70%, 80%, 96%, dan absolut masing-masing 2 – 3 celupan, kemudian dipres dengan kertas saring. Masukkan dalam xylol I selama 5 menit dipres, xylol II dipres dan selanjutnya xylol III selama 30 menit. Pres dengan kertas saring, tetesi dengan E-Z Mount. Tutup dengan *cover glass* dan kemudian diberi label. Sediaan siap dibaca dengan mikroskop cahaya.

#### **4.6.3 Pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Bcl-2**

Antibodi primer yang digunakan pada pemeriksaan Bcl-2 ini adalah *monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein* khusus, Clone 124, Code-Nr. M 0887 (DakoCytomation, Gloustrup, Denmark). Potongan jaringan dari blok parafin ditempatkan pada slide, kemudian dideparafinasasi dengan xylol (PA) 2 kali masing-masing selama 3 menit, kemudian direhidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut 95%, 90%, 80%, 70%) dan air masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci dibawah air

kran sebentar dan dengan PBS. Kemudian direndam dalam *blocking solution* selama 10 menit atau dibawah air kran selama 5 menit. Preparat di inkubasikan dalam *prediluted blocking serum* selama 10 menit suhu 25<sup>0</sup>C. Antibodi Bcl-2 ditambahkan ke preparat 100 ul. Inkubasi 1 jam pada suhu kamar atau semalam dengan suhu 4<sup>0</sup>C. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit. *Biotinylated universal secondary antibody* sebanyak 100 ul per slide, kemudian inkubasi selama 10 menit dalam suhu kamar. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dengan *ready-to-use streptavidin/peroxidase complex* reagen selama 10 menit. Cuci dengan PBS selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dalam *peroksidase substrate solution* (DAB) 100 ul per preparat selama 2-10 menit. Preparat dicuci dengan air kran. Mayer hematoxylin (*counterstain*) sampai tergenang diinkubasikan 1-3 menit, kemudian dicuci dibawah air kran. Slide selanjutnya dicelupkan ke dalam alkohol, dibersihkan, dicelupkan ke xylol. Slide ditetesi dengan *maounting* media kemudian ditutup dengan *cover slip*. Diamati dibawah mikroskop cahaya.

#### **4.6.4 Pemeriksaan Apoptosis**

TumorTACS *in situ* TUNEL-based Kit TA5411 (R&D Sistem Eropa, Abingdon, Inggris) digunakan untuk mendeteksi apoptosis pada potongan blok parafin setebal 3  $\mu$ m. Potongan jaringan dari blok parafin ditempatkan pada slide, kemudian dideparafinasasi dengan xylol (PA) 2 kali masing-masing selama 3 menit, direhidrasi dengan alkohol bertingkat

(absolut 95%, 90%, 80%, 70%) dan air masing-masing selama 5 menit. Slide dicuci dengan aquabides steril. Ditambahkan 50 ul *tunnel label mix* dengan TdT. Inkubasi 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam *chamber*. Slide dicuci 3 x dengan PBS. Inkubasi slide dengan RNA ( 5 ug / ml ) *solution* 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Slide dicuci 3 kali dengan PBS. Inkubasi slide dengan propidium iodide ( 1 ul/ml ). Cuci dengan PBS 3 kali. Ditungkup dengan *cover slide* 18 mm dan *imumont*. Diamati dibawah mikroskop *fluorescence*.

#### 4.7 Batasan Operasional

1. Hiperplasia endometrium non-atipik (WHO 1994) adalah terjadinya peningkatan rasio kelenjar terhadap stroma, tepi kelenjar tidak teratur dengan ukuran kelenjar yang bervariasi. Aktivitas mitosis kelenjar tampak jelas dengan derajat yang berbeda. Sering terjadi peningkatan vaskularisasi stroma di dalam epitel. Tanpa ada gambaran sel atipik.
  - Simpleks merupakan bentuk tidak beraturan dengan stroma yang relatif banyak.
  - Kompleks dengan kelenjar tersusun padat dengan stroma yang sedikit, tepi kelenjar sangat ireguler (rasio kelenjar : stroma > 2 : 1).

Skala : nominal

2. Ekspresi Bcl-2 adalah hasil *imunostaining* Bcl-2 pada jaringan endometrium yang dinilai dengan persentase (%) pewarnaan (*staining*) Bcl-2 pada sitoplasma yang berwarna coklat. Positif kontrol menggunakan

endometrium fase proliferasi. Dilakukan penghitungan 3 lapangan pandang dengan pembesaran 100 x pada 2 bagian tepi dan 1 bagian tengah dari *slide* untuk menilai intensitas *staining* dan persentase imunoreaktivitas Bcl-2 menurut cara Kokawa dkk <sup>3</sup>. Hasil penilaian intensitas *staining* nilainya berupa:

negatif (-) : sel positif kurang dari 10%

positif lemah ( $\pm$ ): sel positif 10-30%

positif (+) : sel positif 31-70%

positif kuat (++) : sel positif 71-100%

Persentase (%) imunoreaktivitas ekspresi Bcl-2 = jumlah sel positif/jumlah total sel x 100%

Skala : ordinal (untuk intensitas *staining*) dan rasio (untuk imunoreaktivitas ekspresi Bcl-2)

3. Indeks apoptosis adalah jumlah sel apoptosis / jumlah total sel x 100 menurut cara Kokawa dkk <sup>3</sup>.

Sel apoptosis pada mikroskop *fluorecence* tampak sebagai pewarnaan kuning keemasan, kondensasi, berlobus, dan terdapat fragmentasi nukleus.

Sel nekrosis akan tampak inti dan sitoplasma berwarna kuning kecoklatan yang membengkak atau membesar. Sel nekrosis tidak dilakukan perhitungan. Positif kontrol menggunakan endometrium fase akhir sekresi.

Penghitungan 3 lapangan pandang dengan pembesaran 100 x pada 2 bagian tepi dan 1 bagian tengah dari *slide*.

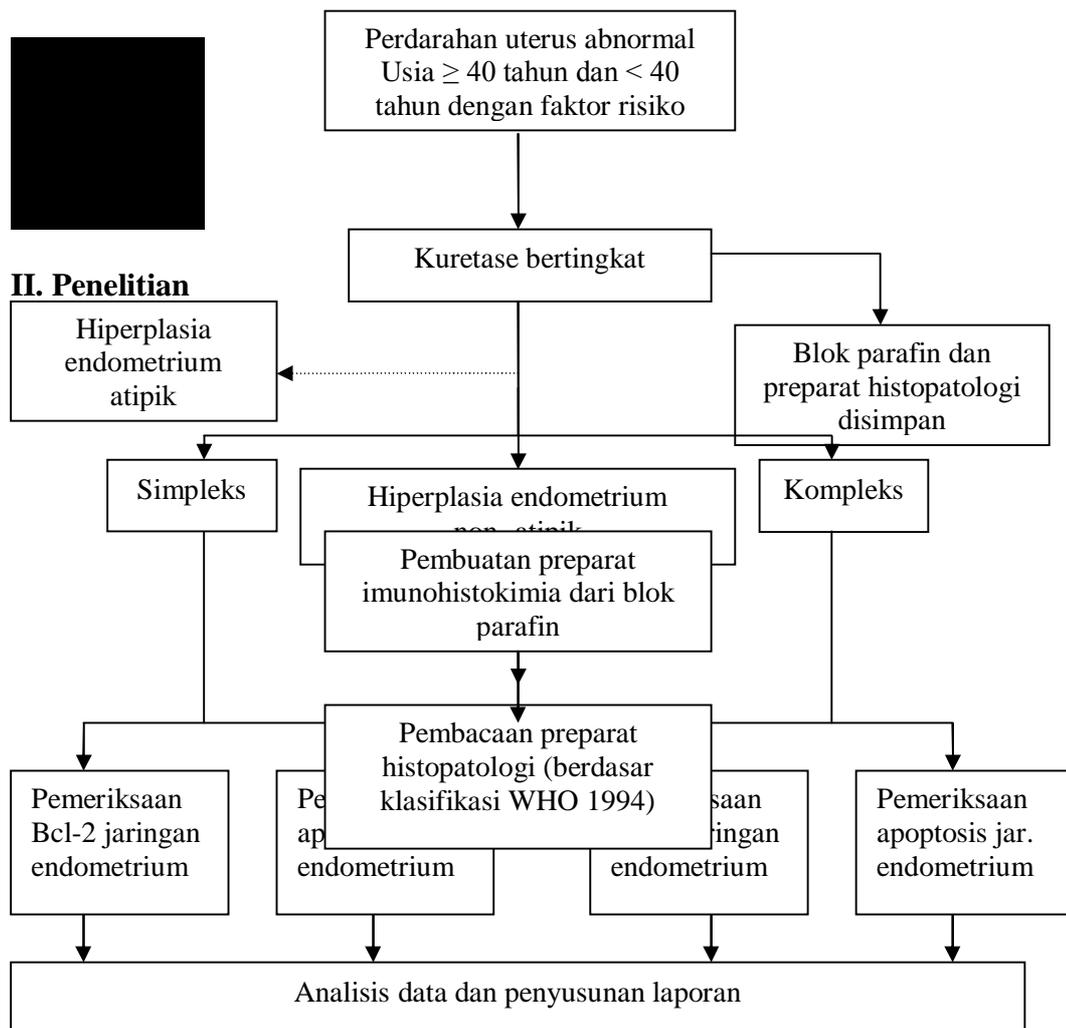
Skala : rasio

## 4.8 Alur penelitian

### I. Asal-usul data



### II. Penelitian



#### 4.9 Analisis data

Analisis univariat pada deskripsi variabel kategorikal akan disajikan dengan frekuensi dan persentase. Analisis univariat pada deskripsi variabel dengan skala numerik akan disajikan dengan rerata (simpangan baku) bila distribusi data normal dan disajikan dengan median (minimum-maksimum) bila berdistribusi data tidak normal. Normalitas distribusi dan homogenitas varians diperiksa sebelum analisis dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji *Levenne* untuk data numerik. Analisis bivariat untuk mengetahui perbedaan kedua kelompok dalam variabel-variabel kategorikal digunakan uji  $\chi^2$ , uji *Fisher-Exact* (apabila syarat  $\chi^2$  tidak terpenuhi untuk tabel 2 x 2). Untuk mengetahui perbedaan 2 kelompok digunakan uji *t*-tidak berpasangan untuk variabel dengan skala numerik berdistribusi normal atau uji *Mann Whitney* pada distribusi tidak normal. Korelasi pada data numerik berdistribusi normal digunakan uji korelasi *Pearson* dan berdistribusi tidak normal dengan korelasi *Spearman*. Pada penelitian belah lintang analisis hubungan atau perbedaan prevalensi antara kelompok yang diobservasi dilakukan perhitungan rasio prevalensi (RP). Analisis multivariat dengan regresi logistik dilakukan apabila terdapat adanya perbedaan distribusi karakteristik yang dapat menjadi faktor pengganggu pada analisis selanjutnya.

Nilai  $p$  dianggap bermakna bila  $p \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan dan power sebesar 90%. Analisis data akan menggunakan program SPSS versi 15.0 *for Windows* (SPSS Inc, USA).

#### **4.10 Etika penelitian**

Penelitian ini hanya menggunakan sedian endometrium dan endoserviks yang telah dilakukan kuretase bertingkat pada penderita dengan perdarahan uterus abnormal wanita usia  $\geq 40$  tahun atau  $< 40$  tahun yang mempunyai faktor risiko paparan estrogen endogen (faktor menstruasi, obesitas, anovulasi, tumor ovarium sekresi estrogen) dan eksogen (terapi hormon, SERMs) untuk tujuan diagnostik dan terapeutik sesuai prosedur tetap di RSUP Dr. Kariadi. Dengan menggunakan sediaan histopatologi yang ada kemudian dibaca ulang menentukan klasifikasi hiperplasia endometrium dan menggunakan blok parafin yang sudah tersedia untuk pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis, maka penelitian ini tidak memberikan intervensi tindakan invasif pada sampel penelitian dimana hanya menggunakan sediaan yang sudah ada sebelumnya. Seluruh identitas dan data pasien akan dijamin kerahasiannya.

Seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti. Protokol penelitian akan dimintakan persetujuan dari Ketua Bagian/SMF Obstetri-Ginekologi FK UNDIP-RSUP. Dr. Kariadi dan Direktur RSUP Dr. Kariadi Semarang serta Komisi Etik Penelitian FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi.

## 4.8 Alur penelitian

### I. Asal – usul data

Blok parafin dan preparat histopatologi dari sediaan kuretase bertingkat pada perdarahan uterus abnormal :

- Usia  $\geq$  40 tahun
- Usia  $<$  40 tahun dengan faktor risiko paparan estrogen endogen (faktor menstruasi, obesitas, anovulasi, tumor ovarium sekresi estrogen) dan eksogen (terapi hormon, SERMs)

Hiperplasia endometrium atipik

Hiperplasia endometrium non -atipik

### II. Penelitian

Pembacaan preparat ulang histopatologi (berdasar klasifikasi WHO 1994)

Simpleks

Kompleks

Pembuatan preparat imunohistokimia dari blok parafin

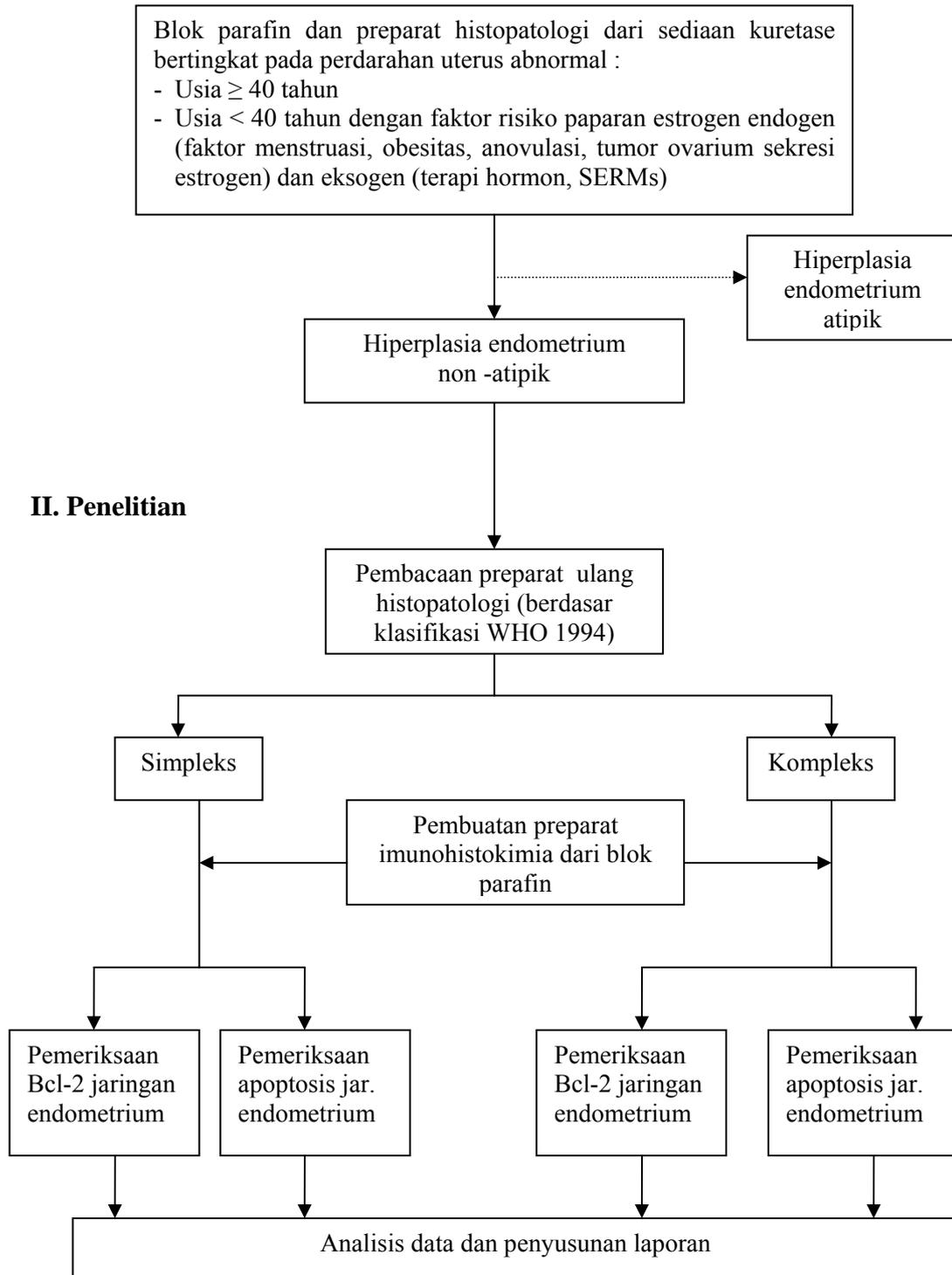
Pemeriksaan Bcl-2 jaringan endometrium

Pemeriksaan apoptosis jar. endometrium

Pemeriksaan Bcl-2 jaringan endometrium

Pemeriksaan apoptosis jar. endometrium

Analisis data dan penyusunan laporan



## **BAB 5**

### **HASIL PENELITIAN**

Dari pemeriksaan diagnostik sediaan 86 blok parafin yang didapatkan dari tahun 2006-2008, terdiagnosis kasus 76 hiperplasia endometrium non-atipik, 8 hiperplasia endometrium atipik, dan 2 sediaan yang tidak representatif untuk dinilai. Sebanyak 76 kasus hiperplasia endometrium non-atipik diklasifikasikan pembacaan histopatologinya berdasar klasifikasi WHO 1994, 48 hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan 28 kompleks. Diambil 28 kasus dari 48 kasus hiperplasia endometrium non-atipik simpleks yang sediaanannya baik untuk dilakukan pemeriksaan dan 28 kompleks yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

#### **5.1 Karakteristik subyek penelitian**

Dari tabel 3 menunjukkan bahwa rerata usia wanita, usia menarache, dan usia menopause pada kelompok hiperplasia endometrium simpleks dan kompleks terdapat perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Distribusi usia menarache  $< 12$  tahun (menarache dini) dan usia menopause  $> 52$  tahun (menopause terlambat) disini lebih tinggi pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks tetapi tidak bermakna.

Distribusi paritas pada kedua kelompok juga didapatkan adanya perbedaan yang tidak bermakna ( $p = 0,1$ ) walaupun jumlah kasus nullipara pada hiperplasia kompleks lebih banyak (28,6%) dibandingkan yang simpleks (7,1%). Infertilitas primer dan sekunder lebih banyak dijumpai pada

hiperplasia kompleks non-atipik, masing-masing 21,4%, dengan didapatkan perbedaan distribusi yang tidak bermakna ( $p = 0,1$ ).

**Tabel 3.** Karakteristik subyek penelitian

Variabel	Jenis hiperplasia endometrium				p
	Simpleks		Kompleks		
	Rerata (SB)	n (%)	Rerata (SB)	n(%)	
Usia (tahun)	42,5 (7,12)		43,0 (7,00)		0,6 <sup>¶</sup>
Usia menarche (tahun)	13,6 (0,50)		13,4 (0,79)		0,3 <sup>¶</sup>
< 12 tahun		0 ( 0,0)		1( 3,6)	
12 - 16 tahun		28 (100,0)		27( 96,4)	1,0 <sup>#</sup>
Usia menopause (tahun)	51,3 (1,26)		50,8 (1,47)		0,7 <sup>¶</sup>
50 - 52 tahun		3 ( 10,7)		4( 14,3)	
> 52 tahun		1 ( 3,6)		2( 7,1)	0,8*
Paritas					
Nullipara		2 ( 7,1)		8( 28,6)	
Primipara		6 ( 21,4)		4( 14,3)	
Multipara		20 ( 71,4)		16( 57,1)	0,1*
Infertilitas					
Primer		2 ( 7,1)		6( 21,4)	
Sekunder		3 ( 10,7)		6( 21,4)	0,1*
Indeks massa tubuh (kg/m <sup>2</sup> )	27,8 (3,36)		28,97 (3,66)		0,8 <sup>¶</sup>
18,5 - 24,9 kg/m <sup>2</sup>		6 ( 21,4)		4( 14,3)	
25,0 - 29,9 kg/m <sup>2</sup>		15 ( 53,6)		12( 42,9)	
≥ 30,0 kg/m <sup>2</sup>		7 ( 25,0)		12( 42,9)	0,4*
Riwayat paparan hormon					
Tidak ada		28 (100,0)		28(100,0)	
Ada		0 ( 0,0)		0( 0,0)	-
Diagnosis					
<i>Perimenopausal bleeding</i>		7 ( 25,0)		1( 3,6)	
<i>Postmenopausal bleeding</i>		4 ( 14,3)		6( 21,4)	
Uterus miomatosus		17 ( 60,7)		21( 75,0)	0,07*

<sup>¶</sup> Uji *t*-tidak berpasangan

<sup>#</sup> Uji *Fisher-Exact*

\* Uji  $\chi^2$

Tidak didapatkan adanya paparan hormon eksogen seperti penggunaan SERMs dan pengobatan hormonal lainnya pada kedua kelompok. Indeks massa tubuh rerata pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks (28,97 kg/m<sup>2</sup>) lebih tinggi tetapi tidak bermakna ( $p = 0,8$ ), dengan sebagian besar kelompok termasuk gemuk, IMT 25,0 - 29,9 kg/m<sup>2</sup> (53,6%) pada hiperplasia simpleks dan yang kompleks masing-masing 42,9% termasuk dalam indeks massa tubuh gemuk dan obesitas (IMT  $\geq$  30,0 kg/m<sup>2</sup>). Pada diagnosis pasien terdapat perbedaan distribusi yang tidak bermakna, dengan kasus terbanyak adalah uterus miomatosus pada simpleks (60,7%) dan kompleks (75%).

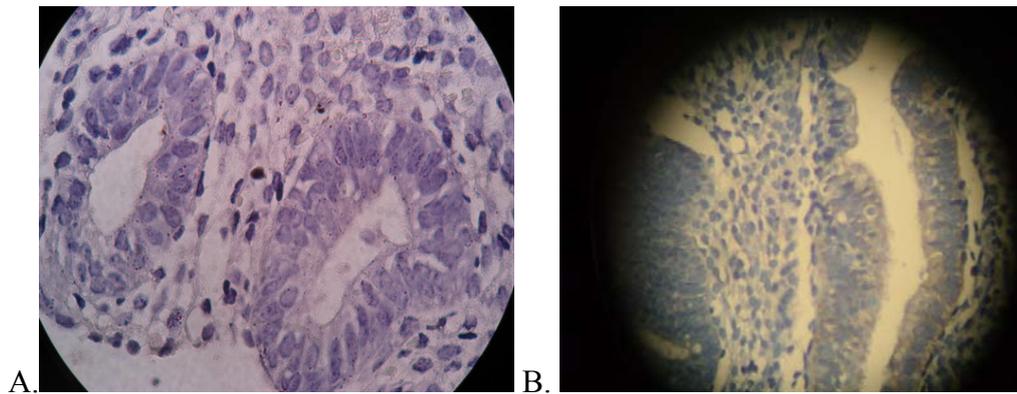
## 5.2 Ekspresi Bcl-2 dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik

Pada pemeriksaan imunohistokimia Bcl-2 didapatkan gambaran *immunostaining* spesifik berwarna coklat pada sitoplasma sel. Ekspresi Bcl-2 terdapat pada semua kasus hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks. Intensitas *staining* (tabel 4) pada epitel kelenjar positif kuat pada hiperplasia simpleks sebanyak 24 kasus (85,7%) dan terdapat peningkatan intensitas *staining* kuat pada hiperplasia kompleks (n=27, 96,4%) bila dibandingkan dengan hiperplasia simpleks, tetapi perbedaan intensitas *staining* tersebut tidak bermakna ( $p= 0,176$ ).

**Tabel 4.** Intensitas *staining* Bcl-2

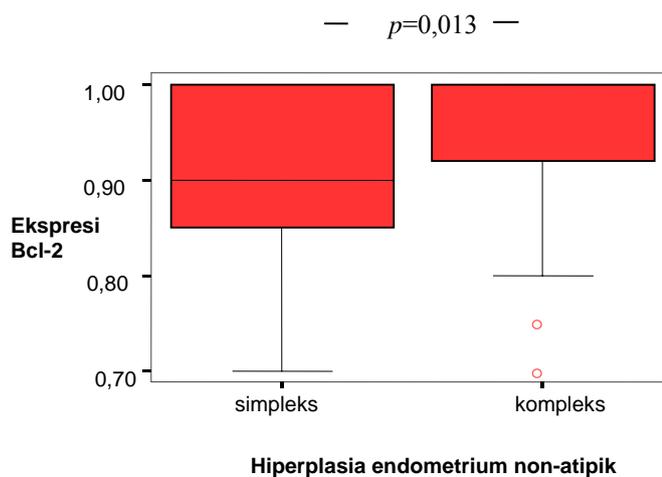
Intensitas <i>staining</i>	Jenis hiperplasia endometrium non-atipik		<i>p</i>
	Simpleks n (%)	Kompleks n (%)	
Positif	4 (14,3)	1 ( 3,57)	
Positif kuat	24 (85,7)	27 (96,40)	0,176 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Uji Fisher-Exact

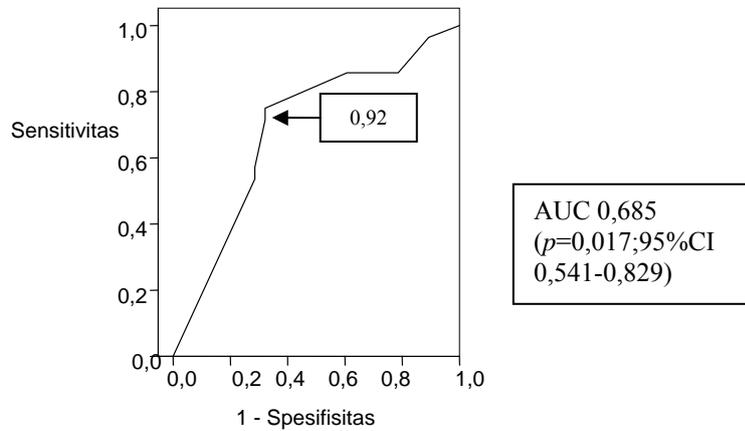


**Gambar 10.** *Staining* imunohistokimia Bcl-2 dengan pembesaran 100x. Akumulasi protein Bcl-2 ditunjukkan dengan adanya pewarnaan coklat pada sitoplasma endometrium pada hiperplasia simpleks (A) dan hiperplasia kompleks (B)

Nilai sentral dari ekspresi imunoreaktivitas Bcl-2 berupa median pada hiperplasia simpleks 90% (70-100%) dan pada hiperplasia kompleks 100% (70-100%). Dari uji beda dengan uji non parametrik *Mann-Whitney*, ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks dan kompleks (gambar 11) didapatkan adanya perbedaan yang bermakna dengan nilai ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium kompleks lebih tinggi dibandingkan yang simpleks ( $p=0,013$ ).



**Gambar 11.** Ekspresi Bcl-2 dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik



**Gambar 12.** *Cut off point* ekspresi Bcl-2

Nilai ekspresi Bcl-2 (gambar 12) dengan *cut off point* 0,92 (sensitivitas 75% dan 1-spesifitas 32,1%) didapatkan bahwa endometrium dengan  $Bcl-2 \geq 0,92$  mempunyai risiko 2,6 kali (tabel 5) untuk terjadinya hiperplasia non-atipik kompleks dibandingkan  $Bcl-2 < 0,92$  ( $p=0,001$ ; Rasio Prevalensi 2,6; 95%, CI = 1,3-5,1).

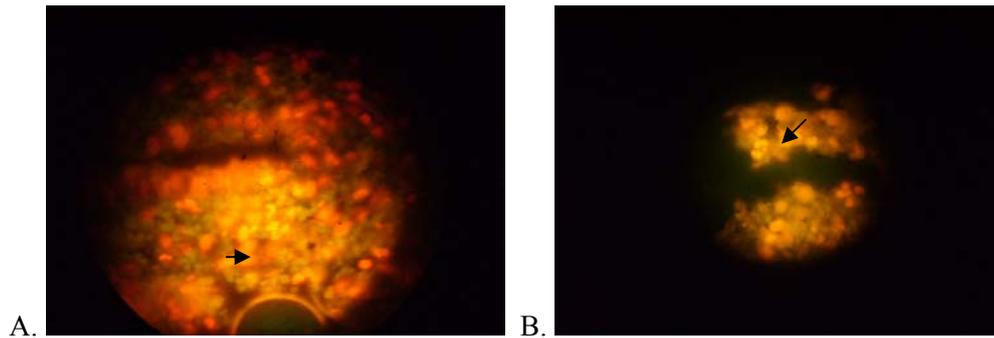
**Tabel 5.** Kategori Bcl-2 berdasarkan jenis histopatologi hiperplasia endometrium non-atipik

Kategori ekspresi Bcl-2	Jenis hiperplasia endometrium non-atipik	
	Simpleks	Kompleks
< 0,92	19 (33,9%)	7 (12,5%)
$\geq 0,92$	9 (16,1%)	21 (37,5%)
$\chi^2=10,338$	Derajat bebas = 1	$p = 0,001$

Rasio prevalensi = 2,6 (95% interval kepercayaan = 1,3 - 5,1)

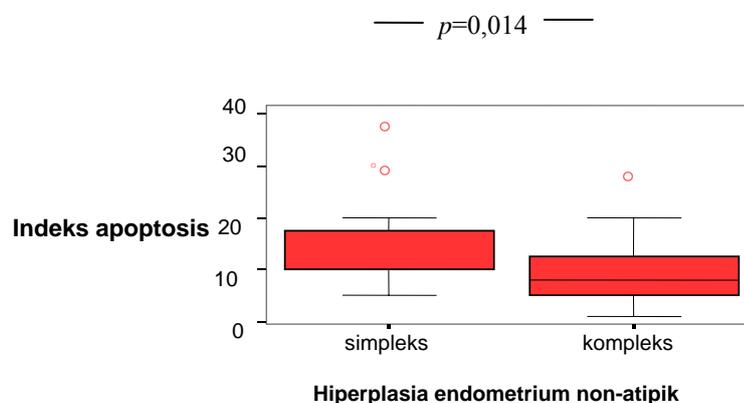
### 5.3 Indeks apoptosis dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik

Pada hasil pemeriksaan sel apoptosis pada kelenjar endometrium dari hiperplasia endometrium non-atipik dijumpai nilai median indeks apoptosis pada hiperplasia non-atipik simpleks 10 (5-40) dan yang kompleks 8 (1-30).

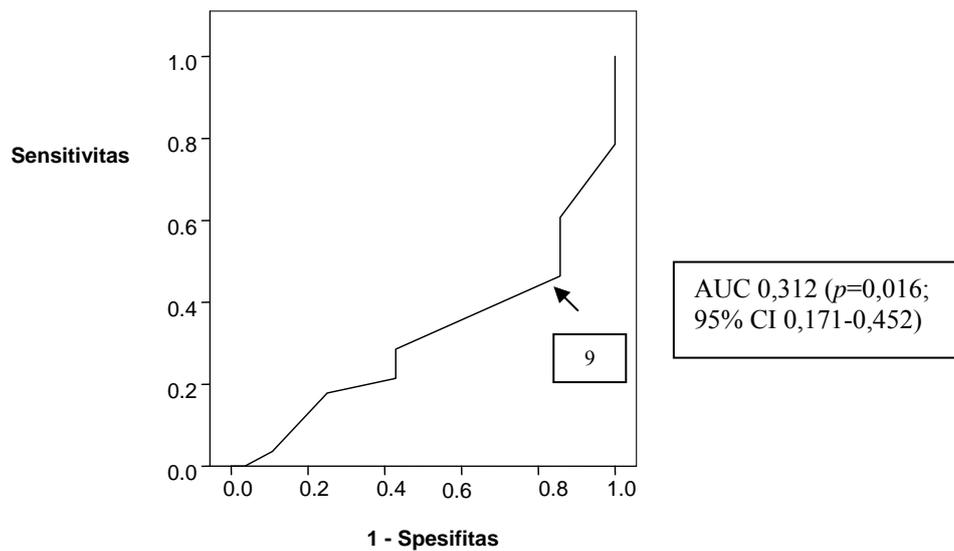


**Gambar 13.** A) Pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks tampak adanya gambaran sel apoptosis yang tersebar pada kelenjar endometrium. B) Gambaran sel apoptosis lebih terbatas jumlahnya pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks (pembesaran 100 x)

Dari uji beda non-parametrik dengan uji *Mann-Whitney* didapatkan hasil adanya perbedaan nilai indeks apoptosis yang signifikan ( $p=0,014$ ) pada hiperplasia endometrium simpleks dan kompleks, dengan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks lebih tinggi indeks apoptosisnya dibandingkan yang kompleks (gambar 14).



**Gambar 14.** Indeks apoptosis dan jenis hiperplasia endometrium non-atipik



**Gambar 15.** *Cut off point* indeks apoptosis

Nilai indeks apoptosis (gambar 15) dengan *cut off point* 9 (sensitivitas 46,4% dan 1-spesifitas 85,7%) didapatkan bahwa pada endometrium dengan indeks apoptosis  $\geq 9$  (tabel 6) mempunyai risiko terjadinya hiperplasia non-atipik simpleks dibandingkan indeks apoptosis  $< 9$  ( $p=0,002$ ; Rasio Prevalensi 3,8; 95%, CI = 1,4-9,9).

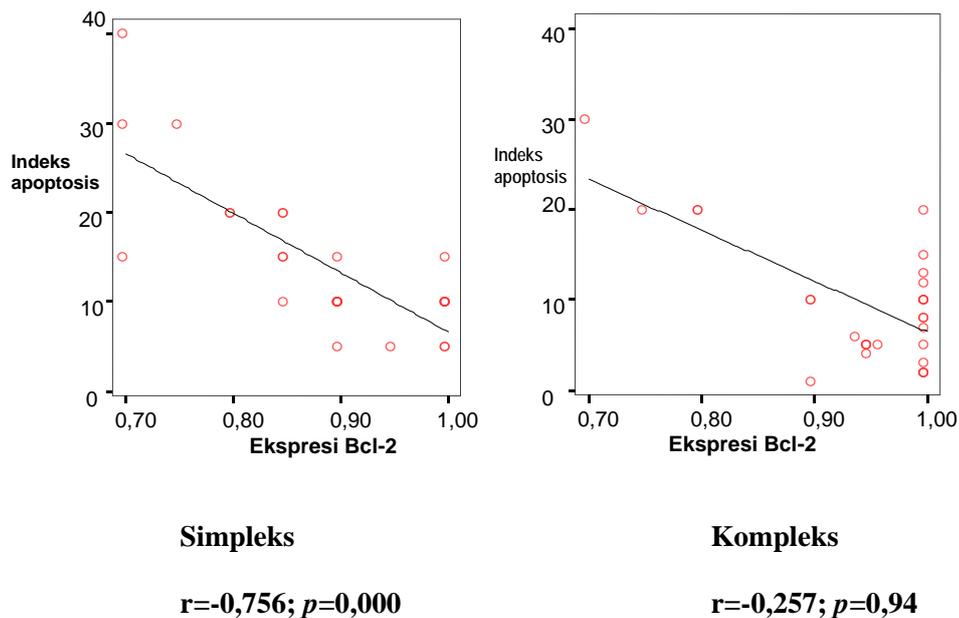
**Tabel 6.** Kategori indeks apoptosis berdasarkan jenis histopatologi hiperplasia endometrium non-atipik

Kategori indeks apoptosis	Jenis hiperplasia endometrium non-atipik	
	Simpleks	Kompleks
$< 9$	4 (7,1%)	15 (26,8%)
$\geq 9$	24 (42,9%)	13 (23,2%)
$\chi^2=9,639$	Derajat bebas = 1	$p = 0,002$

Rasio prevalensi = 3,8 (95% interval kepercayaan = 1,4 - 9,9)

#### 5.4 Hubungan ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis

Korelasi antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada kedua jenis hiperplasia endometrium non-atipik dikerjakan dengan analisis menggunakan uji korelasi Spearman. Pada hiperplasia yang simpleks terdapat korelasi negatif derajat kuat ( $r=-0,756$ ;  $p=0,000$ ) yang bermakna (gambar 16). Hiperplasia endometrium non-atipik kompleks menunjukkan tidak adanya suatu korelasi negatif bermakna ( $r=-0,257$ ;  $p=0,94$ ) antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis (gambar 16).



**Gambar 16.** Diagram sebar hubungan antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Bcl-2 merupakan onkogen yang memacu terjadinya neoplasia dan mampu meningkatkan kelangsungan hidup sel, sehingga ekspresi dari Bcl-2 akan menghambat apoptosis meskipun tidak adanya faktor pertumbuhan yang penting. Ekspresi Bcl-2 pada endometrium diatur oleh hormon steroid seks, dimana Bcl-2 meningkat pada fase proliferasi dan mencapai puncaknya pada akhir fase proliferasi serta pada fase sekresi ekspresinya akan menghilang. Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa adanya hubungan ekspresi Bcl-2 dan imunoreaktivitas reseptor hormon pada hiperplasia dan karsinoma endometrium tipe I yang merupakan suatu *estrogen dependent*<sup>12,15</sup>.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas kelenjar endometrium dari hiperplasia endometrium non-atipik, didapatkan adanya perbedaan yang bermakna, dimana ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks lebih rendah bila dibandingkan yang kompleks. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa pada hiperplasia yang kompleks, ekspresi Bcl-2 yang lebih tinggi mempunyai kemampuan meningkatkan kelangsungan hidup sel yang lebih tinggi dengan adanya struktur kelenjar yang lebih padat dibandingkan yang simpleks. Hal ini diduga akibat adanya aktivitas Bcl-2 yang diregulasi oleh reseptor estrogen yang meningkat. Reseptor tersebut akan memacu kemampuan mitosis sel kelenjar dan Bcl-2 berhubungan erat dengan kromosom pada nukleus

sel yang sedang mitosis sehingga sel epitel kelenjar endometrium akan meningkat aktivitas proliferasinya serta mampu bertahan hidup lebih lama<sup>6,8</sup>.

Kelenjar endometrium pada hiperplasia endometrium non-atipik yang kompleks, aktivitas apoptosisnya lebih rendah bila dibandingkan dengan yang simpleks. Adanya indeks apoptosis yang rendah dan ekspresi Bcl-2 yang tinggi pada hiperplasia endometrium kompleks menunjukkan bahwa pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks progresifitasnya untuk menjadi karsinoma endometrium lebih tinggi. Oleh Kurman dkk dikatakan progresifitas hiperplasia endometrium non-atipik simpleks 1% dan kompleks 10% untuk menjadi keganasan<sup>2</sup>.

Kemampuan apoptosis yang rendah tersebut dipengaruhi adanya ekspresi protein anti-apoptosis dari Bcl-2 yang tinggi pada endometrium, tetapi pengaruh dari Bcl-2 tersebut tidak menonjol pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks. Penelitian ini menunjukkan terdapat korelasi negatif antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis, tetapi pada penelitian ini korelasi negatifnya hanya pada hiperplasia yang simpleks. Tidak terdapatnya korelasi negatif antara Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks, yang diduga bahwa penghambatan aktivitas apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik yang kompleks tidak hanya dipengaruhi oleh ekspresi Bcl-2 yang tinggi. Hasil ini menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 mempunyai pengaruh untuk terjadinya hiperplasia kompleks, tetapi aktivitas apoptosis yang rendah pada hiperplasia kompleks tidak hanya tergantung pada ekspresi Bcl-2 sebagai protein

anti-apoptosis, kemungkinan adanya suatu kinetika protein-protein apoptosis lainnya yang diatur oleh hormon steroid seks, serta pengaruh dari *growth factor*.

Pengaruh adanya estrogen yang tinggi dan reseptor estrogen yang meningkat sebagai stimulator aktivitas proliferasi sel, akan memacu protein anti-apoptosis dan mensupresi protein pro-apoptosis. Bax sebagai protein pro-apoptosis dari Bcl-2 *family*, memegang peranan sebagai faktor kunci dari regulasi apoptosis adalah tingginya rasio Bcl-2/Bax akan membuat sel resisten terhadap stimulus apoptosis dan rendahnya rasio tersebut akan memacu apoptosis. Ekspresi dari Bcl-2 yang meningkat akan mempengaruhi jalur intrinsik dari proses apoptosis dimana Bcl-2 akan meningkatkan *interleukin-converting enzym (ICE)-like protease*. Akibatnya Bcl-2 akan menghambat Fas untuk melakukan proses apoptosis dengan tidak mengaktifkan ICE-like protease yang akan menurunkan kemampuan fungsi Fas-FasL sebagai protein pro-apoptosis dari anggota keluarga TNF (*Tumor Necrosis Factor*) pada jalur apoptosis intrinsik. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dapat menekan aksi pro-apoptosis TNF- $\alpha$ . Pada penelitian oleh Vasvivuo dkk (2002) dikemukakan bahwa NF- $\kappa$ B mempunyai peranan dalam melindungi sel dari proses apoptosis pada hiperplasia endometrium dan karsinoma endometrium stadium awal, yaitu pada stadium awal malignansi NF- $\kappa$ B dihubungkan dengan peningkatan ekspresi matrix metallo-proteinase yang akan memacu invasi dan metastasis sel kanker serta membentuk neovaskularisasi. Kapucuoglu (2007) menyatakan bahwa mutasi dari PTEN sebagai *tumor suppressor gene* yang berkorelasi positif dengan ekspresi reseptor estrogen berpengaruh untuk terjadinya hiperplasia endometrium 30-63%. Hal ini diduga

oleh adanya peningkatan mutasi yang terjadi selama sistesis DNA yang akan menghasilkan gambaran hiperplasia kompleks dengan struktur kelenjar yang lebih padat. Protein yang bermutasi ini mempunyai kontribusi tinggi sebesar 55% terjadinya progresifitas dari hiperplasia menjadi suatu karsinoma endometrium<sup>11,13,17,33,43</sup>.

Pada stroma endometrium berhubungan langsung dengan ketergantungan estrogen pada reseptor di stroma yang bertanggung jawab terhadap proliferasi epitel pada kelenjar endometrium. Kedua reseptor tersebut berinteraksi agonis dalam memacu aktivasi mitogenik estrogen pada sel endometrium yang memacu hiperplasia dan transformasi sel kanker, dengan melalui aktivasi jalur MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) oleh IGF-1 yang juga akan memacu angiogenesis dengan menginduksi ekspresi VEGF (*vascular endothelial growth factor*) mRNA dan juga proses aromatisasi dengan menstimulasi ekspresi aromatase dan aktivitas enzimnya yang akan meningkatkan produksi estradiol dari androgen<sup>26,28</sup>.

Dapat disimpulkan bahwa pada hiperplasia endometrium non-atipik dengan adanya aktivitas proliferasi sel kelenjar yang lebih meningkat dibandingkan aktivitas sel stroma, disebabkan oleh adanya ekspresi Bcl-2 sebagai protein anti-apoptosis yang meningkat. Ekspresi Bcl-2 tersebut akan menyebabkan penurunan kemampuan apoptosis dengan nilai indeks apoptosis yang rendah. Pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks, peranan ekspresi Bcl-2 dalam menurunkan indeks apoptosis diduga masih dipengaruhi oleh beberapa faktor protein dan hormon steroid seperti estrogen dan progesteron,

yang berkaitan dengan aktivitas regulasi pada reseptor steroid seks di endometrium serta pengaruh dari *tumor suppressor gene* dan regulasi sel endometrium.

## **BAB 7**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Simpulan**

1. Ekspresi Bcl-2 pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks lebih tinggi dibandingkan simpleks
2. Pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks indeks apoptosis lebih rendah dibandingkan dengan hiperplasia endometrium non-atipik simpleks
3. Terdapat korelasi negatif antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks
4. Tidak terdapat korelasi negatif antara ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks

#### **7.2 Saran**

Pada penelitian ini Bcl-2 terbukti memegang peranan pada proses apoptosis pada hiperplasia endometrium non-atipik simpleks tetapi diduga ada protein-protein apoptosis lainnya seperti Bax, Fas dan Fas-L, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B serta ekspresi reseptor estrogen dan *growth factor* untuk terjadinya hiperplasia endometrium non-atipik kompleks. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai peranan Bcl-2 dengan mempertimbangkan peranan dan hubungan protein apoptosis lainnya serta ekspresi reseptor steroids seks dan kadar steroid seks pada hiperplasia endometrium non-atipik kompleks yang masih belum terjawab.

## DATA PENELITIAN DAN ANALISIS STATISTIK

### Intensitas staining Bcl-2

#### Intensitas staining \* Jenis histopatologi Crosstabulation

Count

		Jenis histopatologi		Total
		simpleks	kompleks	simpleks
Intensitas staining	positif	4	1	5
	positif kuat	24	27	51
Total		28	28	56

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,976(b)	1	,160		
Continuity Correction(a)	,878	1	,349		
Likelihood Ratio	2,104	1	,147		
Fisher's Exact Test				,352	,176
Linear-by-Linear Association	1,941	1	,164		
N of Valid Cases	56				

a Computed only for a 2x2 table

b 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,50.

### Ekspresi Bcl-2

#### Ranks

Jenis histopatologi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi Bcl-2	simpleks	28	23,32	653,00
	kompleks	28	33,68	943,00
Total		56		

#### Test Statistics(a)

	Ekspresi Bcl-2
Mann-Whitney U	247,000
Wilcoxon W	653,000
Z	-2,476
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013

a Grouping Variable: Jenis histopatologi

## Ekspresi Bcl-2 hiperplasia endometrium non-atipik simpleks

### Statistics

Ekspresi Bcl-2

N	Valid	28
	Missing	0
Mean		,8875
Median		,9000
Std. Deviation		,09682
Minimum		,70
Maximum		1,00

### Ekspresi Bcl-2

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid ,70	3	10,7	10,7	10,7
,75	1	3,6	3,6	14,3
,80	2	7,1	7,1	21,4
,85	5	17,9	17,9	39,3
,90	8	28,6	28,6	67,9
,95	1	3,6	3,6	71,4
1,00	8	28,6	28,6	100,0
Total	28	100,0	100,0	

## Ekspresi Bcl-2 hiperplasia endometrium non-atipik kompleks

### Statistics

Ekspresi Bcl-2

N	Valid	28
	Missing	0
Mean		,9446
Median		1,0000
Std. Deviation		,08430
Minimum		,70
Maximum		1,00

### Ekspresi Bcl-2

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid				
,70	1	3,6	3,6	3,6
,75	1	3,6	3,6	7,1
,80	2	7,1	7,1	14,3
,90	3	10,7	10,7	25,0
,94	1	3,6	3,6	28,6
,95	4	14,3	14,3	42,9
,96	1	3,6	3,6	46,4
1,00	15	53,6	53,6	100,0
Total	28	100,0	100,0	

### Indeks apoptosis

#### Ranks

Jenis histopatologi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Indeks apoptosis	simpleks	28	33,77	945,50
	kompleks	28	23,23	650,50
	Total	56		

#### Test Statistics(a)

	Indeks apoptosis
Mann-Whitney U	244,500
Wilcoxon W	650,500
Z	-2,462
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014

a. Grouping Variable: Jenis histopatologi

## Indeks apoptosis hiperplasia endometrium non-atipik simpleks

### Statistics

Indeks apoptosis

N	Valid	28
	Missing	0
Mean		14,11
Median		10,00
Std. Deviation		8,284
Minimum		5
Maximum		40

### Indeks apoptosis

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 5	4	14,3	14,3	14,3
10	12	42,9	42,9	57,1
15	5	17,9	17,9	75,0
20	4	14,3	14,3	89,3
30	2	7,1	7,1	96,4
40	1	3,6	3,6	100,0
Total	28	100,0	100,0	

## Indeks apoptosis hiperplasia endometrium non-atipik kompleks

### Statistics

Indeks apoptosis

N	Valid	28
	Missing	0
Mean		9,57
Median		8,00
Std. Deviation		7,068
Minimum		1
Maximum		30

### Indeks apoptosis

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	1	3,6	3,6	3,6
	2	3	10,7	10,7	14,3
	3	1	3,6	3,6	17,9
	4	1	3,6	3,6	21,4
	5	5	17,9	17,9	39,3
	6	1	3,6	3,6	42,9
	7	1	3,6	3,6	46,4
	8	2	7,1	7,1	53,6
	10	5	17,9	17,9	71,4
	12	1	3,6	3,6	75,0
	13	1	3,6	3,6	78,6
	15	1	3,6	3,6	82,1
	20	4	14,3	14,3	96,4
	30	1	3,6	3,6	100,0
	Total		28	100,0	100,0

### Korelasi ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis hiperplasia endometrium non-atipik simpleks

#### Correlations

			Indeks apoptosis	Ekspresi Bcl-2
Kendall's tau_b	Indeks apoptosis	Correlation Coefficient	1,000	-,664(**)
		Sig. (1-tailed)	.	,000
		N	28	28
	Ekspresi Bcl-2	Correlation Coefficient	-,664(**)	1,000
		Sig. (1-tailed)	,000	.
		N	28	28
Spearman's rho	Indeks apoptosis	Correlation Coefficient	1,000	-,756(**)
		Sig. (1-tailed)	.	,000
		N	28	28
	Ekspresi Bcl-2	Correlation Coefficient	-,756(**)	1,000
		Sig. (1-tailed)	,000	.
		N	28	28

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

## Korelasi ekspresi Bcl-2 dan indeks apoptosis hiperplasia endometrium non-atipik kompleks

### Correlations

			Indeks apoptosis	Ekspresi Bcl-2
Kendall's tau_b	Indeks apoptosis	Correlation Coefficient	1,000	-,208
		Sig. (1-tailed)	.	,085
		N	28	28
	Ekspresi Bcl-2	Correlation Coefficient	-,208	1,000
		Sig. (1-tailed)	,085	.
		N	28	28
Spearman's rho	Indeks apoptosis	Correlation Coefficient	1,000	-,257
		Sig. (1-tailed)	.	,094
		N	28	28
	Ekspresi Bcl-2	Correlation Coefficient	-,257	1,000
		Sig. (1-tailed)	,094	.
		N	28	28

### Cut off point ekspresi Bcl-2

#### Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Ekspresi Bcl-2

Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95% Confidence Interval	
Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
,685	,073	,017	,541	,829

The test result variable(s): Ekspresi Bcl-2 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a Under the nonparametric assumption

b Null hypothesis: true area = 0.5

### Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Ekspresi Bcl-2

Positive if Greater Than or Equal To <sup>a</sup>	Sensitivity	1 - Specificity
-,3000	1,000	1,000
,7250	,964	,893
,7750	,929	,857
,8250	,857	,786
,8750	,857	,607
,9200	,750	,321
,9450	,714	,321
,9550	,571	,286
,9800	,536	,286
2,0000	,000	,000

The test result variable(s): Ekspresi Bcl-2 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

- a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

### Kategori ekspresi BCI-2 \* PA Crosstabulation

			PA		Total
			simpleks	kompleks	simpleks
Kategori ekspresi BCI-2	<0,92	Count	19	7	26
		% of Total	33,9%	12,5%	46,4%
	≥0,92	Count	9	21	30
		% of Total	16,1%	37,5%	53,6%
Total		Count	28	28	56
		% of Total	50,0%	50,0%	100,0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	10,338(b)	1	,001		
Continuity Correction(a)	8,687	1	,003		
Likelihood Ratio	10,691	1	,001		
Fisher's Exact Test				,003	,001
Linear-by-Linear Association	10,154	1	,001		
N of Valid Cases	56				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,00.

### Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for Kategori ekspresi BCl-2 (<0,92 / >=0,92)	6,333	1,973	20,335
For cohort PA = simpleks	2,436	1,344	4,413
For cohort PA = kompleks	,385	,196	,756
N of Valid Cases	56		

**Input of DATA:**

		Disease		Total
		Yes	No	
Test	+	21	9	30
	-	7	19	26
Total		28	28	56

**Level of Confidence:**

- 90 %
- 95 %
- 97.5 %
- 99 %
- 99.5 %

**RESULTS:**

	%	Lower Lim	Upper Lim
<b>Sensitivity</b>	75,000	58,961	91,039
<b>Specificity</b>	67,857	50,558	85,156
<b>True Prevalence</b>	50,000	36,904	63,096
<b>Apparent Prevalence</b>	53,571	40,509	66,634
<b>Predictive Value +</b>	70,000	53,601	86,399
<b>Predictive Value -</b>	73,077	56,027	90,127

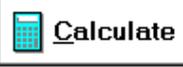
	Value	Lower Lim	Upper Lim
<b>Youden's J</b>	0,4286	0,1927	0,6645

**Input of DATA:**

Observed frequencies:

	Exposed		Total
	Yes	No	
Diseased	21	7	28
Healthy	9	19	28
Total	30	26	56

Level of Confidence: 95 %

 **Calculate**

 **Close**

**RESULTS:**

Expected frequencies:		Exposed		Attributable Risk:	
		Yes	No		
Diseased	15,00	13,00		0,431	
Healthy	15,00	13,00		Attributable propor. among exposed: 0,615	
				Attributable proportion: 0,462	
				<b>Confidence Limits</b>	
				Logarithmic approx. $\chi^2$ Approximation	
				Lower Lim.	Upper Lim.
Odds Ratio (OR):	6,333			1,973	20,340
Prevalence Ratio (PR):	2,600			2,035	19,710
				1,324	5,108
Bias:	3,733			1,445	4,680
				<b>Limits are valid.</b>	

## Cut off point indeks apoptosis

### Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Indeks apoptosis

Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95% Confidence Interval		
Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	
,312	,072	,016	,171	,452	

The test result variable(s): Indeks apoptosis has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a Under the nonparametric assumption

b Null hypothesis: true area = 0.5

### Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): Indeks apoptosis

Positive if Greater Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
,00	1,000	1,000
1,50	,964	1,000
2,50	,857	1,000
3,50	,821	1,000
4,50	,786	1,000
5,50	,607	,857
6,50	,571	,857
7,50	,536	,857
9,00	,464	,857
11,00	,286	,429
12,50	,250	,429
14,00	,214	,429
17,50	,179	,250
25,00	,036	,107
35,00	,000	,036
41,00	,000	,000

The test result variable(s): Indeks apoptosis has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.

a The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.

**Kategori Indeks Apoptosis \* Jenis histopatologi Crosstabulation**

			Jenis histopatologi		Total
			simpleks	kompleks	simpleks
Kategori Indeks Apoptosis	<9	Count	4	15	19
		% of Total	7,1%	26,8%	33,9%
	>=9	Count	24	13	37
		% of Total	42,9%	23,2%	66,1%
Total	Count	28	28	56	
	% of Total	50,0%	50,0%	100,0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9,639(b)	1	,002		
Continuity Correction(a)	7,966	1	,005		
Likelihood Ratio	10,103	1	,001		
Fisher's Exact Test				,004	,002
Linear-by-Linear Association	9,467	1	,002		
N of Valid Cases	56				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,50.

**Input of DATA:**

		Disease		Total
		Yes	No	
Test	+	15	4	19
	-	13	24	37
Total		28	28	56

**Level of Confidence:**

- 90 %
- 95 %
- 97.5 %
- 99 %
- 99.5 %

**RESULTS:**

	%	Lower Lim	Upper Lim
<b>Sensitivity</b>	53,571	35,098	72,044
<b>Specificity</b>	85,714	72,753	98,676
<b>True Prevalence</b>	50,000	36,904	63,096
<b>Apparent Prevalence</b>	33,929	21,528	46,329
<b>Predictive Value +</b>	78,947	60,616	97,279
<b>Predictive Value -</b>	64,865	49,482	80,248

	Value	Lower Lim	Upper Lim
<b>Youden's J</b>	0,3929	0,1672	0,6185

**Input of DATA:**

**Observed frequencies:**

	Exposed		Total
	Yes	No	
Diseased	15	4	19
Healthy	13	24	37
Total	28	28	56

Level of Confidence:

**RESULTS:**

**Expected frequencies:**

	Exposed	
	Yes	No
Diseased	9,50	9,50
Healthy	18,50	18,50

Attributable Risk:

Attributable propor. among exposed:

Attributable proportion:

**Confidence Limits**

	Logarithmic approx.		$\chi^2$ Approximation	
	Lower Lim.	Upper Lim.	Lower Lim.	Upper Lim.
Odds Ratio (OR):	6,923	1,900	25,230	2,018
Prevalence Ratio (PR):	3,750	1,421	9,898	1,616

Bias:

**Limits are valid.**



## DAFTAR PUSTAKA

1. Hammond R, Johnson J. Endometrial hyperplasia. *Curr Obstet Gynecol* 2001;11:160-3.
2. Marsden D, Hacker N. The classification, diagnosis and management of endometrial hyperplasia. *Rev in Gynecol Prac* 2003;3:87-90.
3. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod* 2001;16:2211-18
4. Kaku T, Tsukamoto N, Hachisuga T, Tsuruchi N, Sakai Karena, Hirakawa T, et al. Endometrial carcinoma associated with hyperplasia. *Gynecol Oncol* 1996;60:22-25.
5. Montgomery BE, Daum DS, Dunton CJ. Endometrial hyperplasia a review. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2004;5:368-78.
6. Lu K, Slomovitz BM. Neoplastic diseases of the uterus. In: Katz VL, Lentz GM, Rogerio AL, Gershenson DM editors. *Comprehensive Gynecology*. Philadelphia: Elsevier;2007: p813-20.
7. Nunobiki O, Taniguchi E, Ishii A, Tang W, Utsunomiya H, Nakamura Y, et al. Significance of hormone receptor status and tumor vessels in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Pathol Int* 2003;53:846-52.
8. Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Bioch Mol Biol* 2003;84:393-410.
9. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4144-47.
10. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994;8:665-73.
11. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55:178-94.
12. Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, et al. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:360-8.
13. Amezcua A, Zheng W, Muderspach L, Felix J. Down-regulation of Bcl-2 is a potential marker of the efficacy of progestin therapy in the treatment of endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 1999;73:126-36.
14. Amezcua CA, Lu JJ, Felix JC, Stanczyk FZ, Zheng W. Apoptosis may be an early event of progestin therapy for endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2000;79:169-76.
15. Nieman TH, Trgovac TL, McLaughvy VR, Vaccarello L. Bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996;63(3):318-22.
16. Ioffe OB, Papadimetriou JC, Dracherberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum Pathol* 1998;29(10):1150-9.
17. Vaskivuo TE, Stenback F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002 1;95(7):1463-71.

18. Garuti G, Grossi F, Centinaio G, Sita G, Nalli G, Luerti M. Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. *JAMA* 2002;288(13):1610-21.
19. Mazur MT. Endometrial hyperplasia/adenocarcinoma. A conventional approach. *Anal Diag Pathol* 2005;9:174-81.
20. Dubinsky J. Value of sonography in the diagnosis of abnormal vaginal bleeding. *J Clin Ultrasound* 2004;32(7):348-53.
21. Tabor A, Watt HC, Wald NJ. Endometrial thickness as a test for endometrial cancer in women with postmenopausal vaginal bleeding. *Obstet Gynecol* 2002;99:529-30.
22. Rosai J. The female reproductive system. In Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier;2004: p1676-80.
23. Horn L, Meinel A, Handzel R, Einkenkel J. Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma an update. *Anal Diag Pathol* 2007;11:297-311.
24. Iatrakis G, Tsionis C, Adonakis G, Staikidou M, Anthauli-Anagnostopoulo F, Parava M, et al. Polycystic ovarian syndrome, insulin resistance and thickness of the endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;20(4):925-33.
25. Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(2):235-44.
26. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 2000;13(3):295-308.
27. Shang Y. Molecular mechanism of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nature* 2006;6:360-68.
28. Horn LC, Dietel M, Einkenkel J. Hormone replacement therapy (HRT) and endometrial morphology under consideration of the different molecular pathways in endometrial carcinogenesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;122(1):4-12.
29. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Eng J Med* 2006;354:270-82.
30. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen. *Endo Rev* 2000;21(1):40-54.
31. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;27:67-73.
32. Wang S, Pudney J, Song J, Mor G, Schwartz PE, Zheng W. Mechanisms involved in the evolution of progestin resistance in human endometrial hyperplasia-precursor of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;88:108-17.
33. Shiozawa T, Konishi I. Early endometrial carcinoma: clinicopathology, hormonal aspects, molecular genetics, diagnosis, and treatment. *Int J Clin Oncol* 2006;11:13-21.
34. Mutter GL, Ince TA, Baak JPA, Kust GA, Zhou X, Eng C. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res* 2001;61:4311-14.
35. Feng Y, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, et al. *BRAF* mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with *KRAS* and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res* 2005;11:6133-38.
36. Kaufmann Sh, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the millineum. *Trend Cell Biol* 2001;11:526-534.
37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury, and cell death. In: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier;2005: p21-30.

38. Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001;2:33-42.
39. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
40. Gitsch G, Kohlberger P. Immunology of endometrial cancer. In: Bosze P, Artner A, Bender HG, Burton JL, Dargent D, Descamps D, et al editors. *Endometrial Cancer*. Mayenne:Elsevier;2003: p89-95.
41. Koshiyama M, Konishi I, Wang D, Mandai M, Komatsu T, Yamamoto Y, et al. Immunohistochemical analysis of p53 protein over-expression in endometrial carcinomas: inverse correlation with sex steroid reseptor status. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993;423:265-71.
42. Chan W, Cheung K, Schorge JO, Huang L, Welch WR, Bell DA, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;156:409-17.
43. Kapucuoglu N, Aktepe F, Kaya H, Bircan S, Karahan N, Ciris M. Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, Bcl-2, Bax, and apoptotic index. *Pathol Res and Prac* 2007;203:153-62.