



Original Article

Perbedaan Ekspresi Cyclin D1 dengan Karakteristik Klinikopatologi Pasien Adenokarsinoma Kolorektal di RSUP Dr. Kariadi Semarang

Devia Eka Listiana¹, Hermawan Istiadi¹, Viena Alodia²

¹Kelompok Staf Medik Patologi Anatomi, RSUP Dr. Kariadi Semarang

²Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i1.487>

Diajukan: 19 Agustus 2020
Diterima: 26 Januari 2021

Afiliasi Penulis:
Kelompok Staf Medik Patologi Anatomi,
RSUP Dr. Kariadi Semarang

Korespondensi Penulis:
Devia Eka Listiana
Jl. Dr. Sutomo No. 16, Semarang,
Jawa Tengah 50244,
Indonesia

E-mail:
devia.sppa@gmail.com

Latar belakang : Adenokarsinoma kolorektal merupakan keganasan yang paling sering ditemui dengan mortalitas ketiga terbanyak di dunia. Beberapa ekspresi protein diketahui berhubungan dengan karsinogenesis adenokarsinoma kolorektal, diantaranya adalah Cyclin D1. Cyclin D1 merupakan proto-onkogen yang dapat mengalami overekspresi pada adenokarsinoma kolorektal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil ekspresi Cyclin D1 dan hubungannya dengan parameter klinikopatologis pasien adenokarsinoma kolorektal.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan sampel 40 blok paraffin pasien adenokarsinoma kolorektal di RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia pada periode Januari 2019 hingga Desember 2019. Parameter klinikopatologis yang diamati meliputi : lokasi tumor, kedalaman infiltrasi tumor, derajat histologi serta metastasis pada kelenjar getah bening (KGB) regional serta ekspresi Cyclin D1 dengan imunohistokimia berdasarkan distribusi sel yang positif dan intensitasnya, yang diklasifikasikan sebagai: tanpa ekspresi, ekspresi rendah dan ekspresi tinggi.

Hasil : Profil ekspresi Cyclin D1 menunjukkan ekspresi rendah sebanyak 60%, dan ekspresi tinggi sebanyak 40% sampel. Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi ditemukan pada pasien dengan lokasi rectosigmoid, infiltrasi serosa, derajat histologi derajat rendah, tidak berbeda bermakna.

Simpulan : Ekspresi Cyclin D1 tidak memiliki hubungan yang bermakna dengan parameter klinikopatologik pasien adenokarsinoma kolorektal.

Kata kunci : adenokarsinoma kolorektal, Cyclin D1

Difference expression of Cyclin D1 in clinicopathological features of colorectal adenocarcinoma in Kariadi Central General Hospital

Abstract

Introduction : Colorectal adenocarcinoma is the most common malignancy with the third highest mortality in the world. Several protein expressions are known to be associated with colorectal adenocarcinoma carcinogenesis, including Cyclin D1. Cyclin D1 are proto-oncogens that can overexpressed in colorectal adenocarcinoma. The objective of this study is to determine the expression profile of Cyclin D1 and its relationship with the clinicopathological parameters of colorectal adenocarcinoma patients.

Methods : This study is an analytic observational study using 40 paraffin blocks sample of colorectal adenocarcinoma patients at Dr. Kariadi General Hospital Semarang, Indonesia in the period January 2019 to December 2019. The clinicopathological parameters included: tumor location, depth of tumor infiltration, the degree of histology, metastases in regional lymph nodes and expression of Cyclin D1 with immunohistochemistry based on distribution and intensity of positive tumour cell, classified as: no expression, low expression and high expression.

Results : Cyclin D1 expression profile showed a low expression in 60% patients, while a high expression in 40% patients. High Cyclin D1 expression was found in patients with rectosigmoid location, serosal infiltration and low histological grade, not significantly different.

Conclusion : Cyclin D1 expression had no significant association with the clinicopathological parameters of colorectal adenocarcinoma patients.

Keywords : colorectal adenocarcinoma, Cyclin D1

PENDAHULUAN

Adenokarsinoma kolorektal merupakan salah satu keganasan yang paling sering ditemui di dunia, menduduki urutan ketiga sebagai keganasan yang paling sering ditemui dengan mortalitas ketiga terbanyak, dengan angka kejadian pada pria lebih tinggi daripada wanita.^{1,2} Pada tahun 2018 didapatkan 1,8 juta kasus baru dengan angka mortalitas 881.000 sesuai data dari GLOBOCAN.³ Di Amerika Serikat angka kejadian menurun kurang lebih 2% per tahun dengan adanya proses skrining yang berjalan dengan baik. Hal ini berkebalikan dengan meningkatnya angka kejadian pada beberapa daerah yang sebelumnya tercatat memiliki angka kejadian rendah seperti Spanyol, negara-negara pada Asia timur dan Eropa timur.^{1,2,4} Di Indonesia sendiri, berdasarkan data GLOBOCAN tahun 2018, ditemukan 348.809 kasus baru per tahun dengan mortalitas 207.210.³ Adenokarsinoma kolorektal jarang ditemukan pada usia di bawah 40 tahun, angka kejadian mulai meningkat pada usia 40–50 tahun.^{2,5} Peningkatan angka kejadian yang tajam pada negara-negara maju di Asia disebabkan faktor lingkungan dan gaya hidup seperti merokok, konsumsi alkohol, konsumsi daging merah dan daging awetan, peningkatan lemak tubuh terutama lemak pada bagian abdomen dan gaya hidup sedentari.^{2,5}

Cyclin D1, merupakan protein pengatur utama dalam siklus pembelahan sel, dikode oleh gen *CCND1*, yang terletak di kromosom 11q13.⁶ Ekspresi Cyclin D1 yang berlebihan dapat mengganggu kontrol siklus pembelahan sel normal, sehingga mendorong pertumbuhan dan perkembangan sel menjadi sel kanker.^{7,8} Ekspresi Cyclin D1 yang berlebihan telah

diamati pada banyak tumor, diantaranya pada karsinoma endometrium, tiroid, urotelial, payudara, glioma, dan esofagus.⁹⁻¹⁵ *Upregulation* protein cyclin D1 diketahui berperan penting dalam patogenesis dan metastasis karsinoma kolorektal.¹⁶ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil ekspresi Cyclin D1 dan hubungannya dengan parameter klinikopatologis pasien adenokarsinoma kolorektal di RSUP Dr. Kariadi Semarang.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain studi *cross sectional* menilai hubungan profil ekspresi Cyclin D1 dengan parameter klinikopatologis pasien adenokarsinoma kolorektal di RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia. Sampel dari penelitian ini adalah pasien adenokarsinoma kolorektal dengan kriteria inklusi blok paraffin jaringan kolorektomi dari pasien yang telah didagnosis sebagai adenokarsinoma kolorektal di RSUP Dr. Kariadi Semarang pada periode Januari 2019 hingga Desember 2019, yang mengandung jaringan yang cukup untuk pemeriksaan imunohistokimia, dengan jumlah sampel total 40 blok paraffin yang diambil secara *consecutive sampling*.

Parameter klinikopatologis pasien diambil dari rekam medis pasien yang meliputi : usia, jenis kelamin, lokasi tumor, kedalaman infiltrasi tumor, derajat histologi, metastasis pada kelenjar getah bening (KGB) regional serta metastasis jauh. Sediaan histopatologi dari sampel dengan pengecatan *hematocillin – eosin* diperiksa ulang gambaran histopatologinya. Seluruh sampel yang telah terkumpul kemudian dilakukan pengecatan

immunohistokimia Cyclin D1 di laboratorium patologi anatomic RSUP Dr. Kariadi Semarang, dengan tahapan pemotongan blok paraffin dengan *microtome* setebal 4 µm, deparafinisasi dengan larutan xylol, rehidrasi dengan alkohol bertingkat, aquades dan 0,01 PBS (PH 7,4), antigen retrieval dengan menggunakan Tris-EDTA buffer PH 9 dalam microwave selama 10 menit (750 W) dan 15 menit (350 W) dan diakhiri dengan pengecatan menggunakan antibodi monoklonal cyclin-D1 (DSC-6, Dako) pengenceran 1 : 50. Slide hasil pengecatan cyclin D1 dibaca menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X oleh 2 spesialis patologi anatomi.

Penilaian ekspresi Cyclin D1 pada masing-masing sampel dilakukan oleh 2 spesialis patologi anatomi

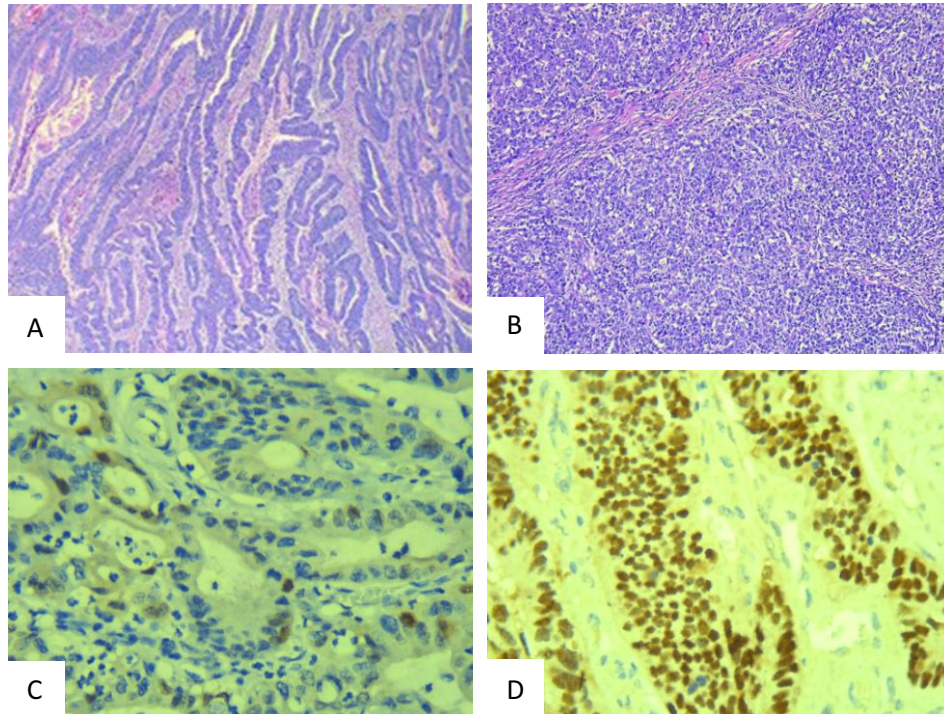
dengan kesepakatan, dengan menilai pulasan Cyclin D1 pada inti sel (nukleus) sel ganas. Penilaian dilakukan secara keseluruhan dan dilakukan penilaian prosentase distribusi sel ganas yang positif, yaitu dengan menghitung prosentase sel ganas yang memiliki ekspresi positif dibanding keseluruhan sel ganas, dengan kategori distribusi : 0 untuk kurang dari 5% sel ganas yang positif; 1 untuk 5–25%; 2 untuk 26–50%; 3 untuk 51–75%; dan 4 untuk lebih dari 75% sel ganas yang positif. Selain itu juga dilakukan penilaian intensitas pewarnaannya dengan kategori : 0 untuk negatif, 1 untuk intensitas lemah, 2 untuk intensitas sedang, dan 3 untuk intensitas kuat. Skor ekspresi akhir Cyclin D1 dihitung dengan menjumlahkan skor distribusi dan skor intensitas, yang

TABEL 1
Karakteristik Sampel Penelitian

Parameter	N (%)	Cyclin D1 ekspresi rendah	Cyclin D1 ekspresi tinggi	Nilai p
Usia	52,08 ± 10,2	50,17 ± 11,45	54,94 ± 7,41	0,159*
Jenis kelamin				
- Laki-Laki	21	11	10	
- Perempuan	19	13	6	
Lokasi				0,843**
- Caecum	1 (2,5%)	1	0	
- Ascendens	5 (12,5%)	4	1	
- Descendens	2 (5%)	1	1	
- Sigmoid	4 (10%)	2	2	
- Rectosigmoid	15 (37,5%)	8	7	
- Rectum	13 (32,5%)	8	5	
Infiltrasi				0,463**
- Submukosa	1 (2,5%)	0	1	
- Muskularis propria	9 (22,5%)	7	2	
- Serosa	20 (50%)	12	8	
- Perforasi	3 (7,5%)	1	2	
- Tidak diketahui	7 (17,5%)	4	3	
Derajat Histologi				0,519**
- Derajat rendah	32 (80%)	20	12	
- Derajat tinggi	8 (20%)	4	4	
Metastasis KGB				0,604**
- Ya	18 (45%)	10	8	
- Tidak	22 (55%)	14	8	

* : Uji *unpaired t test*

** : Uji korelasi *Spearman*



Gambar 1. Ekspresi Cyclin D1 pada adenokarsinoma kolorektal. **(A)** Adenokarsinoma dengan derajat histologi derajat rendah (Pengecatan hematoxilin eosin, Pembesaran 100X). **(B)** Adenokarsinoma dengan derajat histologi derajat tinggi (Pengecatan hematoxilin eosin, Pembesaran 100X) **(C)** Ekspresi rendah Cyclin D1, sel yang positif terpulas pada inti sel dengan warna coklat (Pengecatan imunohistokimia HER2, Pembesaran 400X). **(D)** Ekspresi tinggi Cyclin D1, sel yang positif terpulas pada inti sel dengan warna coklat (Pengecatan imunohistokimia HER2, Pembesaran 400X)

hasilnya dikategorikan menjadi : '-' untuk skor 0, '+' untuk skor 13, '++' untuk skor 46, dan '+++' untuk skor > 6. Untuk tujuan analisis statistik, sampel dengan ekspresi '-' dianggap mempunyai nilai sebagai negatif, sampel dengan ekspresi '+' dianggap mempunyai nilai sebagai ekspresi rendah dan sampel dengan ekspresi '++' dan '+++' dianggap mempunyai nilai sebagai ekspresi tinggi.⁷

Analisis data untuk menilai hubungan antara profil ekspresi Cyclin D1 dengan parameter klinikopatologis pasien adenokarsinoma kolorektal menggunakan uji korelasi *Spearman* dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$ sebagai signifikan secara statistika. *Ethical clearance* didapatkan dari komisi etik penelitian kedokteran RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor: 573/EC/KEPK-RSDK/2020 serta ijin penelitian didapatkan dari RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor : DP.02.01/I.II/4334/2020.

HASIL

Dari 40 sampel pasien adenokarsinoma kolorektal di RSUP dr. Kariadi, didapatkan memiliki lokasi tumor terbanyak di rectosigmoid (37,5%), infiltrasi terbanyak hingga tunika serosa (50%), memiliki derajat histologi *low grade* (80%), dengan metastasis ke KGB regional sebanyak 45% sampel. Ekspresi Cyclin D1 dari sel-sel ganas

adenokarsinoma pada penelitian ini terbagi menjadi 3 kategori, yaitu tanpa ekspresi, ekspresi rendah dan ekspresi tinggi, dimana dari 40 sampel, mayoritas menunjukkan ekspresi rendah sebanyak 60%, dan ekspresi tinggi sebanyak 40% sampel (Tabel 1).

Hubungan antara status ekspresi Cyclin D1 dengan parameter klinikopatologis pasien adenokarsinoma kolorektal pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3. Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi ditemukan pada pasien adenokarsinoma kolorektal dengan lokasi terbanyak di rectosigmoid, dengan infiltrasi terbanyak hingga ke serosa, serta memiliki derajat histologi derajat rendah, sedangkan ekspresi Cyclin D1 yang rendah ditemukan pada adenokarsinoma kolorektal dengan lokasi terbanyak di rectosigmoid dan rectum, infiltrasi terbanyak di serosa serta memiliki derajat histologi derajat rendah, namun tidak didapatkan perbedaan dan hubungan yang bermakna antara ekspresi Cyclin D1 dengan lokasi tumor, kedalaman infiltrasi, derajat histologi dan metastasis ke KGB regional.

PEMBAHASAN

Cyclin D1 merupakan protein yang berperan penting dalam pengaturan siklus pembelahan sel, khususnya

dalam transisi dari fase G1 ke fase S.^{17,18} Protein Cyclin D1 dikode oleh Gen cyclin D1 (CCND1) yang terletak di kromosom 11q13. Cyclin D1 bertindak sebagai onkogen selama proses tumorigenesis dengan memacu pertumbuhan dan pembelahan sel yang berlebih, proses invasi, angiogenesis, dan resistensi terhadap apoptosis.^{19,20} Pengaktifan dari gen Cyclin D1 ini melalui amplifikasi, *rearrangement* kromosom atau ekspresi berlebih dari Cyclin D1 telah ditemukan pada berbagai jenis neoplasma, yaitu kolorektal, payudara, kepala leher dan paru. Ekspresi cyclin D1 yang tinggi dapat terjadi akibat amplifikasi gen CCND1 maupun mekanisme lain yang masih belum dapat terdefiniskan dengan baik.²¹ Ekspresi cyclin D1 yang tinggi dapat terjadi akibat aktivasi Cyclin D1 oleh jalur APC / WNT yang berperan dalam menginisiasi karsinogenesis pada kolorektal.^{22,23} Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi ditemukan pada 30 hingga 68% kasus kanker kolorektal.^{7,15,16,19,20,24}

Pada penelitian ini, ekspresi Cyclin D1 didapatkan pada semua pasien, namun yang memiliki ekspresi yang tinggi terdapat pada 16 pasien (40%). Pasien adenokarsinoma kolorektal dengan ekspresi Cyclin D1 yang tinggi memiliki karakteristik lokasi terbanyak di rectosigmoid, infiltrasi terbanyak hingga ke serosa serta memiliki derajat histologi derajat rendah, namun tidak didapatkan perbedaan dan hubungan yang bermakna antara ekspresi Cyclin D1 dengan lokasi tumor, kedalaman infiltrasi, derajat histologi dan metastasis ke KGB regional.

Pada penelitian ini, pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 memiliki lokasi terbanyak di rectosigmoid. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang juga menunjukkan hasil dimana pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 memiliki lokasi terbanyak di colon distal dan rectum.^{24,25} Pada penelitian ini, pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 memiliki infiltrasi terbanyak di serosa. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian lain dimana pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 memiliki infiltrasi terbanyak hingga di luar submukosa atau dengan status tumor minimal T2 pada sistem TNM, serta dengan kedalaman invasi ≥ 5 cm.^{15,25,26} Pada penelitian ini, pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 memiliki derajat histologi rendah. Hal ini berbeda dengan penelitian lain yang menunjukkan pasien dengan ekspresi tinggi Cyclin D1 lebih banyak memiliki derajat histologi derajat tinggi, hal ini dapat disebabkan proporsi jumlah pasien adenokarsinoma terbanyak pada penelitian ini adalah derajat rendah.^{15,25,26}

Beberapa penelitian menunjukkan adanya ekspresi tinggi cyclin D1 berkaitan dengan kelangsungan hidup pasien adenokarsinoma kolorektal yang lebih lama, dengan prognosis yang lebih baik.^{21,24} Namun pada penelitian lain menyebutkan bahwa ekspresi tinggi Cyclin D1 berkaitan dengan prognosis buruk.^{7,21,24} Telah diketahui bahwa adenokarsinoma kolorektal dapat berkembang melalui berbagai akumulasi peristiwa

genetik dan epigenetik. Beberapa tumor berkembang melalui aktivasi cyclin D1, sedangkan yang lain berkembang melalui aktivasi gen-gen lain. Untuk tumor dengan ekspresi Cyclin D1 yang rendah atau negatif, tumor tersebut dapat memiliki ekspresi tinggi pada protein-protein lain, yang kemudian dapat membuat perilaku sel ganasnya menjadi lebih agresif.^{7,21,24} Peran ekspresi tinggi Cyclin D1 dalam adenokarsinoma kolorektal yang masih kontroversial ini dapat dipengaruhi oleh adanya perbedaan jumlah proporsi sampel pada berbagai derajat histologi adenokarsinoma, serta perbedaan metode pengukuran ekspresi Cyclin D1.

Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang menilai ekspresi Cyclin D1 pada jaringan tumor pasien adenokarsinoma kolorektal di Semarang. Beberapa keterbatasan dalam penelitian ini adalah sedikitnya jumlah sampel serta varian sampel, dimana proporsi jumlah sampel adenokarsinoma dengan derajat histologi derajat rendah jauh lebih banyak dibanding sampel adenokarsinoma dengan derajat histologi derajat tinggi.

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa pasien adenokarsinoma kolorektal khususnya di Semarang, memiliki profil Cyclin D1 dengan ekspresi rendah sebanyak 60%, dan ekspresi tinggi sebanyak 40% sampel. Ekspresi Cyclin D1 yang tinggi ditemukan pada pasien adenokarsinoma kolorektal dengan lokasi terbanyak di rectosigmoid, dengan infiltrasi terbanyak hingga ke serosa, serta memiliki derajat histologi derajat rendah, namun tidak didapatkan hubungan yang bermakna antara ekspresi Cyclin D1 dengan lokasi tumor, kedalaman infiltrasi, derajat histologi dan metastasis ke KGB regional. Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan melibatkan lebih banyak jumlah dan varian sampel serta korelasinya dengan prognosis pasien.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76:182-8.
2. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer : incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol Rev*. 2019;14(2):89-103.
3. Globocan.iarc.fr. Cancer Fact Sheet [Internet]. Lyon. 2018 [cited 2019 Sep 9]. Available from: <https://globocan.iarc.fr/>
4. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2016;0:1-9.
5. Pedoman nasional pelayanan kedokteran tatalaksana kanker kolorektal 2018 [Internet]. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018 [cited 2019 Oct 22]. Available from: <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PNPKkolorektal.pdf>
6. John RR, Malathi N, Ravindran C, Anandan S. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior. *Indian J Dent Res*. 2017;28:187-92.
7. Albasri AM, Elkablawy MA, Ansari A, Alhujaily AS.

- Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer : An Experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(8):2471-6.
8. Montalto FI, Amicis FD. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells.* 2020;9(12):1-15.
 9. Xu J, Lin DI. Oncogenic c-terminal cyclin D1 (CCND1) mutations are enriched in endometrioid endometrial adenocarcinomas. *PLoS One.* 2018;13(7):1-14.
 10. Hou X, Liang R, Wei J, Xu Y, Fu J, Luo R-Z, *et al.* Cyclin D1 expression predicts postoperative distant metastasis and survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(21):31088-96.
 11. Mahzouni P, Taheri F. An Immunohistochemical Study of Cyclin D1 Expression in Astrocytic Tumors and its Correlation with Tumor Grade. *Iran J Pathol.* 2019;14(3):252-7.
 12. Aboushousha T, Hammam O, Helal N, Dahshan S El. Impact of Cyclin D1 and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein-K (HnRNP-K) on Urinary Bladder Carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19:513-9.
 13. Teshima M, Tokita K, Ryo E, Matsumoto F, Kondo M, Ikegami Y, *et al.* Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules. *BMC Cancer.* 2019;19(245):1-10.
 14. Ahlin C, Lundgren C, Embretsen-Varro E, Jirstrom K, Blomqvist C, Fjallskog ML. High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164:667-78.
 15. Bahnassy A, Zekri AN, El-Houssini S, El-Shehaby A, Mahmoud MR, Abdallah S, *et al.* Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* 2004;4(22).
 16. Li Y, Wei J, Xu C, Zhao Z, You T. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer : A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One.* 2014;9(4):20-5.
 17. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):5168-77.
 18. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation : roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer.* 2007;6(24):1-16.
 19. Chen W, Lin M, Zhang B, Fang J, Zhou Q, Hu Y, *et al.* Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J Gastroenterol.* 2007;13(5):699-708.
 20. Holland TA, Elder J, McCloud JM, Hall C, Deakin M, Fryer AA, *et al.* Subcellular Localisation of Cyclin D1 Protein in Colorectal Tumours Is Associated With p21(WAF1/CIP1) Expression and Correlates With Patient Survival. *Int J Cancer.* 2001;95(5):302-6.
 21. McKay JA, Douglas JJJ, Ross VG, Curran S, Murray GI, Cassidy J, *et al.* Cyclin D1 Protein Expression And Gene Polymorphism In Colorectal Cancer. *Int J Cancer.* 2000;88:77-81.
 22. Tetsu O, McCormick F. β - Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1999;398:422-426.
 23. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'amico M, Pestell R, *et al.* The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(May):5522-7.
 24. Ogino S, Noshio K, Irahara N, Kure S, Shima K, Baba Y, *et al.* A Cohort Study of Cyclin D1 Expression and Prognosis in 602 Colon Cancer Cases. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4431-9.
 25. Nassrat FL, Ali HH, Qasim BJ. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in colorectal adenomas : a clinicopathological study. *Kasr Al Ainy Med J.* 2016;22(3):115-22.
 26. Wangefjord S, Manjer J, Gaber A, Nodin B, Eberhard J, Jirstrom K. Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective , population-based cohort study. *Biol Sex Differ [Internet].* 2011;2(1):10. Available from: <http://www.bsd-journal.com/content/2/1/10>