

Tingkat Kesesuaian Diagnosis Invasi Limfatik pada Karsinoma Duktal Invasif Payudara pada Pulasan Hematoksilin-Eosin Dibandingkan dengan Pulasan Imunohistokimia VEGFR-3

I Wayan Juli Sumadi, AAN Susraini

Bagian/SMF/Instalasi Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana
RSUP Sanglah Denpasar

ABSTRAK

Latar belakang

Berbagai faktor dapat mempengaruhi prognosis penderita karsinoma payudara, salah satunya adalah invasi limfatik. Identifikasi invasi limfatik pada preparat hematoksilin eosin (HE) sulit sehingga diperlukan metode alternatif yaitu dengan pulasan imunohistokimia *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3* (VEGFR-3). Penelitian menggunakan pulasan VEGFR-3 dalam mendiagnosis invasi limfatik pada karsinoma payudara belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik pada karsinoma duktal invasif payudara antara pulasan VEGFR-3 dan pulasan HE.

Metode

Lima puluh satu blok parafin penderita karsinoma duktal invasif payudara tipe tidak spesifik dilakukan pemotongan ulang dan dipulas dengan HE dan VEGFR-3. Semua sediaan dievaluasi oleh dua kelompok pengamat untuk didiagnosis invasi limfatik peritumoral. Kemudian dihitung persentase kesesuaian dan nilai kappa.

Hasil

Pada pulasan HE didapatkan kesesuaian diagnosis invasi limfatik sebesar 78,4%, dengan nilai $\kappa=0,45$; $SE=0,14$; $95\%CI=0,31-0,59$. Sedang pada pulasan imunohistokimia dengan VEGFR-3 didapatkan kesesuaian diagnosis invasi limfatik sebesar 92,1%, dengan nilai $\kappa=0,73$; $SE=0,13$; $95\%CI=0,60-0,86$. Ekspresi VEGFR-3 dapat ditemukan pada sebagian besar kasus.

Kesimpulan

Pada karsinoma duktal invasif tipe tidak spesifik, VEGFR-3 dapat digunakan untuk menilai tingkat kesesuaian invasi limfatik peritumoral, dan untuk memulas sitoplasma sel tumor.

Kata kunci: invasi limfatik, VEGFR-3, HE, kesesuaian, karsinoma payudara

ABSTRACT

Background

There are many factors influence the prognosis of breast cancer patients, one of them is lymphatic invasion. Identification of lymphatic invasion on hematoxyllin eosin (HE) slide is very difficult, so an alternative methode is needed, that is using anti VEGFR-3 antibody. Research of VEGFR-3 in diagnosing lymphatic invasion of carcinoma mammae has not done yet. The aim of the study is to analysis the level of diagnosis invasive ductal lymphatic carcinoma ductal mammae between VEGFR-3 and HE.

Methods

Fifty one paraffin block patient of invasive ductal carcinoma mammae NOS were process and stained using HE and VEGFR-3. All slides were analyzed by two groups observers for peritumoral lymphatic invasion. Scoring and kappa were done.

Results

Observed agreement of HE staining was 78,4%, with $\kappa=0,45$; $SE=0,14$; $95\%CI=0,31-0,59$. While, observed level agreement of VEGFR-3 immunostaining was 92,1%, with $\kappa=0,73$; $SE=0,13$; $95\%CI=0,60-0,86$. VEGFR-3 expression could be found on almost cases that the cytoplasm of cancer tumor cells were showing positive staining for in most of the cases.

Conclusion

On invasive ductal carcinoma NOS, VEGFR-3 could be used to observed level agreement of lymphatic invasion peritumoral, and could staining the cytoplasm of cancer cells.

Key word: lymphatic invasion, VEGFR-3, HE, agreement, breast cancer

PENDAHULUAN

Karsinoma payudara merupakan keganasan yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia.¹ Kesintasan penderita karsinoma payudara sangat bervariasi, beberapa pasien dapat mencapai harapan hidup yang lebih panjang, sementara pasien lainnya hanya memiliki harapan hidup 5 tahun sebesar 10%.¹ Terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi prognosis penderita karsinoma payudara. Faktor-faktor tersebut dibagi menjadi faktor prognostik dan faktor prediktif. Yang termasuk faktor prognostik adalah adanya karsinoma invasif, metastase jauh, metastasis kelenjar getah bening (KGB), ukuran tumor, stadium lanjut lokal, dan *inflammatory carcinoma*. Sementara itu yang termasuk faktor prediktif adalah sub tipe histologi, derajat histologi, status reseptor estrogen dan progesteron, overekspresi HER-2/neu, invasi limfovaskuler, indeks proliferasi, *DNA content*, respon terhadap terapi neoajuvan, dan *gen expression profile*.^{1,2}

Salah satu faktor prediktif adalah adanya invasi limfovaskuler, yaitu adanya sel tumor dalam pembuluh, baik pembuluh limfatik maupun pembuluh darah. Invasi limfovaskuler harus dilaporkan pada pemeriksaan histopatologi karsinoma payudara, karena mempunyai hubungan yang sangat kuat dengan metastasis KGB. Selain itu, invasi limfovaskuler merupakan faktor prognosis yang buruk terhadap *overall survival* penderita karsinoma payudara tanpa metastasis KGB, dan merupakan faktor risiko untuk terjadinya rekurensi lokal.^{1,3-5} Adanya invasi limfatik peritumoral juga dimasukkan sebagai salah satu kriteria St. Gallen untuk seleksi pasien dalam memberikan terapi ajuvan sistemik pada pasien karsinoma payudara yang operabel;⁶ sehingga pelaporan mengenai ada tidaknya invasi limfatik dan kesesuaian diagnosis invasi limfatik di antara ahli patologi menjadi sangat penting.

Eastern Cooperative Oncology Group melaporkan bahwa kesesuaian identifikasi invasi limfatik tumor primer payudara dengan pulasan hematoxilin eosin (HE) oleh 2 orang ahli patologi adalah 12 dari 35 kasus (34.2%).⁶ Sebagai perbandingan, tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik karsinoma kolorektal dengan pulasan HE adalah *fair* ($\kappa = 0,28$).⁷

Salah satu penanda imunohistokimia yang spesifik dalam mengenali sel endotel pembuluh limfe adalah VEGFR-3, yang diketahui

lebih spesifik mengidentifikasi endotel pembuluh limfatik dibandingkan dengan penanda vaskuler lainnya, seperti CD31, CD34, dan Factor VIII.⁸ VEGFR-3 yang juga disebut Flt-4 (fms-like tyrosine kinase-4) diekspresikan pada vaskulatur embrionik. Pada individu dewasa telah dibuktikan bahwa setelah berikatan dengan ligand VEGF-D maka ekspresi Flt-4 spesifik pada permukaan sel endotel dan berperan dalam proses limfangiogenesis.⁹⁻¹¹ Karena VEGFR-3 diekspresikan secara spesifik oleh endotel limfatik, maka dengan pulasan imunohistokimia VEGFR-3 identifikasi invasi limfatik pada karsinoma payudara menjadi lebih mudah.

Pada pulasan HE terdapat kesulitan membedakan antara invasi limfatik dan artefak retraksi, pembuluh darah kapiler, dan sarang invasi solid di dalam stroma yang sulit dibedakan dengan emboli komplis sel tumor di dalam pembuluh limfatik.^{3,5,7} Namun, kesulitan-kesulitan tersebut dapat diatasi dengan menggunakan VEGFR-3 karena ditemukan positifitas VEGFR-3 pada sitoplasma sel-sel tumor. Berbagai penelitian telah dilakukan pada karsinoma payudara menggunakan pulasan VEGFR-3 yang menilai densitas limfatik dan hubungannya dengan parameter kliniko-patologik karsinoma payudara.^{12,13} Penelitian mengenai hubungan VEGFR-3 dan FAK (*focal adhesion kinase*) dengan apoptosis menemukan ekspresi VEGFR-3 pada sitoplasma *breast cancer cell lines* (BT474, BT20, dan MCF7) dan *human breast cancer*. Hal ini diduga karena VEGFR-3 dapat mengikat FAK dan menghancurkan lokalisasi FAK sehingga mengakibatkan sel-sel karsinoma payudara terlepas dan terjadi apoptosis.¹⁵

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik pada karsinoma duktal invasif payudara antara pulasan VEGFR-3 dan pulasan HE.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah pengukuran berulang (*repeated measurement*) dengan sampel yang diambil dari blok parafin tumor payudara dengan diagnosis karsinoma duktal invasif tipe tidak spesifik yang diperiksa di Instalasi Patologi Anatomi RSUP Sanglah Denpasar periode Januari 2009 sampai dengan Desember 2010, dan sampel diambil dengan cara *consecutive sampling*. Sampel harus mengandung jaringan ikat dan atau lemak peritumoral lebih dari satu lapangan pandang besar (x400), sehingga dida-

patkan 51 sampel yang memenuhi syarat. Pengamat pada penelitian ini terdiri dari 2 kelompok pengamat yang masing-masing kelompok beranggotakan 1 orang ahli patologi dan 1 orang *chief* residen.

Masing-masing blok parafin dipotong menjadi 2 slaid dengan ketebalan 4 mikron. Preparat pertama dipulas dengan HE. Preparat ke-2 dipulas dengan VEGFR-3. Proses diawali dengan deparafinisasi dan rehidrasi, selanjutnya dilakukan pulasan imunohistokimia menggunakan teknik baku *streptavidin-biotin-peroxidase complex* dengan menggunakan antibodi primer *antihuman VEGFR-3 (flt-4) rabbit antibody* (Labvision, CA, USA) pengenceran 1:200, dan jaringan plasenta sebagai kontrol positif. Invasi limfatik peritumoral dikatakan positif pada pulasan HE bila terdapat emboli sel-sel tumor di dalam celah yang berjarak lebih dari 1 lpb (obyektif 40x, okuler 10x), di mana celah tersebut dilapisi selapis endotel, tidak mengandung eritrosit, dan tidak disokong oleh otot polos. Invasi limfatik peritumoral dikatakan positif pada pulasan VEGFR-3 bila terdapat emboli sel-sel tumor di dalam celah yang berjarak lebih dari 1 lpb (obyektif 40x, okuler 10x), dimana celah tersebut dilapisi selapis endotel yang terpulas positif kuat, tidak mengandung eritrosit, dan tidak disokong oleh otot polos.

Mula-mula sediaan HE dievaluasi oleh kelompok pengamat I, kemudian dievaluasi oleh kelompok pengamat II. Satu bulan kemudian sediaan VEGFR-3 dievaluasi oleh kelompok pengamat I, kemudian dilanjutkan oleh kelompok pengamat II. Kedua kelompok pengamat diberikan sediaan secara acak dan tidak mengetahui hasil pengamatan emboli sel-sel tumor pada masing-masing kelompok.

HASIL

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

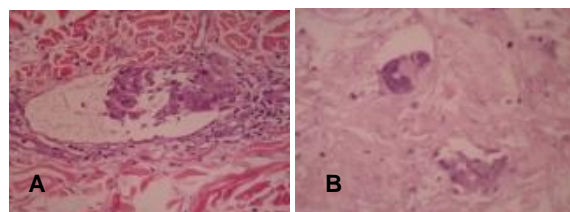
Karakteristik	n	%
Umur (tahun)		
< 40	6	11.8
40-49	22	43.1
50-59	15	29.4
>60	8	15.7
Ukuran tumor (T)		
T1	7	13.7
T2	9	17.6
T3	5	9.8
T4	30	58.8
Nodal status (N)		
N0	17	33.3
N1	22	43.1
N2	7	13.7
N3	5	9.8
Metastasis (M)		
M0	39	76.5
M1	12	23.5
Derajat histologik (<i>grade</i>)		
<i>Grade</i> 1	2	3.9
<i>Grade</i> 2	19	37.3
<i>Grade</i> 3	30	58.8

Tabel 2. Diagnosis invasi limfatik pengamat I dan pengamat II pada pulasan HE

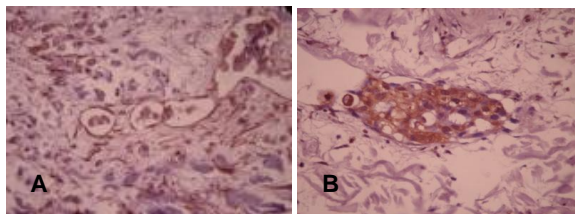
Kelompok Pengamat I	Kelompok Pengamat II		Total
	Invasi limfatik (-)	Invasi limfatik (+)	
Invasi limfatik (-)	32 (27,5)	3 (7,5)	35
Invasi limfatik (+)	8 (12,5)	8 (3,5)	16
Total	40	11	51

Tabel 3. Diagnosis invasi limfatik pengamat I dan pengamat II pada pulasan IHK VEGFR-3

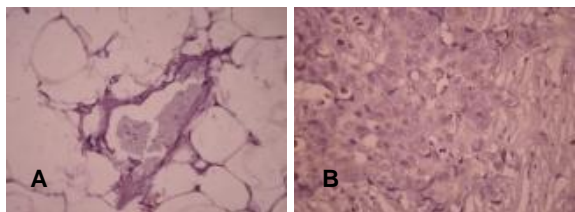
Kelompok Pengamat I	Kelompok Pengamat II		Total
	Invasi limfatik (-)	Invasi limfatik (+)	
Invasi limfatik (-)	40 (34,6)	3 (8,4)	43
Invasi limfatik (+)	1 (6,4)	7 (1,6)	8
Total	41	10	51



Gambar 1. A. Contoh invasi limfatik positif pada pulasan HE yang didiagnosis oleh kedua kelompok pengamat. HE,x400. B. Salah satu kelompok pengamat menyatakan invasi limfatik positif, tetapi yang lain menyatakan negatif. HE, x400).



Gambar 2. A. Contoh invasi limfatik positif pada pulasan VEGFR-3 yang didiagnosis oleh kedua kelompok pengamat. VEGFR-3,x400. B. Salah satu kelompok pengamat menyatakan invasi limfatik positif, tetapi yang lain menyatakan negatif. VEGFR-3, x400. Pada kedua gambar tersebut tampak sitoplasma sel-sel tumor terpulus positif.



Gambar 3. A. Tampak endotel pembuluh darah memberikan reaksi negatif terhadap VEGFR-3. VEGFR-3,x400. B. Contoh sel-sel tumor yang memberikan reaksi negatif terhadap VEGFR-3. VEGFR-3, x400).

DISUKSI

Tabel 1 menunjukkan bahwa kasus terbanyak adalah penderita pada rentang usia 40-49 tahun (43.1%). Hal ini berarti banyak penderita dengan usia relatif muda mengalami karsinoma duktal invasif payudara. Namun, di negara-negara barat 80-90% kasus ini penderita berusia di atas 60 tahun.^{1,2,4} Juga, pada kasus ini ditemukan penderita yang mengalami *grade 3* (58.8%) datang dengan ukuran tumor yang besar, sudah bermetastasis, terutama ke kelenjar getah bening regional dan dengan derajat differensiasi yang tinggi. Hal ini berarti makin besar ukuran tumor, makin tinggi angka metastasis nodal dan metastasis jauh ke kelenjar getah bening, sehingga ditemukan adanya invasi limfatik peritumoral. Hal ini sesuai peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa metastasis tumor payudara ke tempat jauh dapat menyebabkan terjadinya karsinoma duktal invasif payudara.^{3,6}

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada pulasan HE, didapatkan 35 sampel (68,6%) dinyatakan invasi limfatik negatif, dan 16 sampel (31,4%) dinyatakan invasi limfatik positif pada kelompok pengamat I. Sedangkan pada kelompok pengamat II didapatkan 40 sampel (78,4%)

dinyatakan invasi limfatik negatif dan 11 sampel (21,6%) invasi limfatik positif. Kesesuaian diagnosis invasi limfatik diantara kedua kelompok pengamat pada pulasan HE adalah 78,4%, dengan nilai $\kappa = 0,45$; (SE= 0,14; 95%CI=0,31-0,59) (tingkat kesesuaiannya *moderate*). Hal ini sesuai dengan peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa invasi limfatik tumor primer payudara menunjukkan tingkat kesesuaian diagnosis rendah.^{6,7} Kesesuaian diagnosis invasi limfatik pada pulasan HE dalam penelitian ini masih lebih baik dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang mendapatkan kesesuaian sebesar 34,2%.⁵ Hal ini sesuai peneliti terdahulu yang meneliti tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik dengan pulasan HE pada karsinoma kolorektal mendapatkan kesesuaian diagnosis invasi limfatik dan nilai kappa yang lebih rendah, berturut-turut 66,4% dan $\kappa = 0,28$.⁷ Akan tetapi, tingkat kesesuaian dan nilai kappa pada penelitian ini tidak searah sehingga menimbulkan suatu *paradox*. Hal tersebut terjadi karena frekuensi invasi limfatik yang diobservasi masih jarang, sehingga mempengaruhi nilai kappa. Nilai kappa dipengaruhi oleh prevalensi kejadian yang diamati seperti nilai prediktif yang dipengaruhi oleh prevalensi kejadian yang diamati. Untuk pengamatan yang jarang, nilai kappa yang rendah tidak semata-mata merefleksikan tingkat kesesuaian yang rendah.¹⁶

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada pulasan VEGFR-3 tampak sitoplasma sel-sel endotel limfatik peritumoral terpulus positif kuat, sementara sel-sel endotel pembuluh darah kecil sampai besar tidak terpulus. Pada penelitian ini juga didapatkan positifitas VEGFR-3 pada sitoplasma sel-sel tumor karsinoma duktal invasif tipe tidak spesifik sebanyak 46 kasus (90,2%) dan yang tidak terpulus sebanyak 5 kasus (9,8%). Beberapa sel fibroblast juga terpulus positif lemah dengan distribusi yang *patchy*. Pada pulasan VEGFR-3, didapatkan 43 sampel (84,3%) dinyatakan invasi limfatik negatif, dan 8 sampel (15,7%) dinyatakan invasi limfatik positif oleh kelompok pengamat I; sedangkan pada kelompok pengamat II didapatkan 41 sampel (80,4%) dinyatakan invasi limfatik negatif dan 10 sampel (19,6%) invasi limfatik positif. Kesesuaian diagnosis invasi limfatik diantara kedua kelompok pengamat adalah 92,1%, dengan nilai $\kappa = 0,73$; SE=0,13; 95%CI=0,60-0,86 (tingkat kesesuaiannya *substantial*). Hal ini berarti pulasan VEGFR tidak

menunjukkan pulasan yang spesifik untuk sel tumor. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pada karsinoma payudara pulasan VEGFR-3 tidak menunjukkan adanya ekspresi yang kuat.^{12,13,14} Tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik pada pulasan VEGFR-3 dalam penelitian ini lebih baik dibandingkan dengan tingkat kesesuaian diagnosis invasi limfatik menggunakan pulasan D2-40, suatu penanda tumor endotel limfatik. Hal ini sesuai dengan peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa tingkat kesesuaian diagnosis karsinoma kolorektal didapatkan sebesar 68,07%, dengan nilai kappa rendah ($\kappa = 0,32$).⁷ Hal ini kemungkinan karena perbedaan jenis sampel, dan metode yang digunakan.

Pada penelitian ini ditemukan ekspresi VEGFR-3 pada sel fibro-blast. Hal ini sesuai dengan peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa ekspresi VEGFR-3 dapat ditemukan baik pada sel fibroblas, maupun sel myoepitel dan sel otot polos pembuluh darah; namun tidak pada sel tumor.¹³

KESIMPULAN DAN SARAN

Pada karsinoma duktal invasif tipe tidak spesifik, VEGFR-3 dapat digunakan untuk menilai tingkat kesesuaian invasi limfatik peritumoral, dan untuk memulas sitoplasma sel tumor.

RUJUKAN

1. Lester SC. The Breast. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, eds. *Robbin and Cotran's Pathologic Basis of diseases*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2010. p.1139-74
2. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. Invasive Breast Carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *WHO: Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC;2003. p.13-59.
3. Rosen, PP. Invasive Duct Carcinoma: Assessment of prognosis, morphologic prognostic markers, and tumor growth rate. In: *Rosen's Breast Pathology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2009. p.359-97.
4. Tavassoli FA, Eusebi V. Staging of breast carcinoma and prognostic and predictive indicators. In: Sillverberg SG, ed. *Tumors of the Mammary Gland-AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series 4*. Washington: AFIP. 2009. p.123-48.
5. Arnaout-Alkarnain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessels invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* 2007; 20:183-91.
6. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thu'rlimann B, Senn HJ, et al. Meeting Highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005 (Review). *Ann Oncol* 2005j: 1569-83.
7. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer-an inter-pengamat variability study. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1816-21.
8. Gallagher PJ, Van der Wal AC. Blood vessels. In: Mills SC, ed. *Histology for pathologist*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007. p.218-38.
9. Ferrara N. VEGF and its receptors. In: Harmey JH, ed. *VEGF and Cancer*. New York: Kluwer Publisher. 2004.p.1-11
10. Mitchell RN, Kumar V, Abbas K. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: Mitchell RN, Kumar V, Abbas K, Fausto N, eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders;2010.p.87-118.
11. Kaipatnen A, Korhonen J, Mustonen T, Hissnergh VWM, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Med Sci* 1995;92:3566-70.
12. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, et al. Flt-4 positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-D expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5315-17.
13. Filho AL, Martins A, Costa SMA, Schmitt FC. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels. *Pathol Res Pract* 2005; 201:93-9.
14. Choi WWL, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong BG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessels density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and

- VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005;18:143-52.
15. Garces CA, Kurenova EV, Golubovskaya VM, Cance WG. Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:1446-54.
16. Viera AJ, Joanne MG. Understanding interpengamat agreement: the kappa statistic. *Family Med* 2005;37:360-3.