

Perbedaan Tampilan *Cathepsin D* pada Berbagai Grade Histo- patologi Karsinoma Duktus Invasif Payudara

Susi Lusanna Lubis, H. M. Nadjib Dahlan Lubis, H. Joko S. Lukito

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara
Medan*

ABSTRAK

Latar belakang

Penyebaran dan metastasis sel-sel tumor payudara merupakan masalah yang sering dijumpai pada karsinoma payudara. Berdasarkan *grade* histopatologi menunjukkan makin tinggi suatu *grade*, maka makin ganas suatu kanker payudara. *Cathepsin D* adalah *acidic lysosomal proteinase* yang berperan dalam berbagai langkah pertumbuhan tumor, merangsang sel-sel kanker berproliferasi, perkembangan fibroblas, dan angiogenesis, serta menghambat apoptosis tumor. Peningkatan dari *Cathepsin D* berhubungan dengan meningkatnya keganasan dari kanker payudara. Tujuan penelitian ini untuk melihat perbedaan tampilan imunohistokimia *Cathepsin D* pada berbagai *grade* histopatologi karsinoma duktus invasif pada payudara.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskripsi analitik dengan rancangan *cross sectional*. Sampel penelitian sebanyak 48 blok paraffin jaringan payudara yang telah didiagnosa sebagai karsinoma duktus invasif yang telah ditentukan *grade*-nya dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Dilakukan pemotongan ulang blok paraffin dan dilanjutkan dengan pewarnaan imunohistokimia *Cathepsin D* metode *The EnVision + Dual Link System kit*. Antibodi primer yang digunakan adalah *mouse monoclonal Hu-antibody Cathepsin D* dengan pengenceran 1:200 dan kemudian dinilai tampilan warna dari *Cathepsin D* tersebut pada tiap *grade* karsinoma duktus invasif.

Hasil

Pada *grade 1* dijumpai 4 kasus (25%) dengan skor intensitas warna lemah, 7 kasus (43.8%) dengan intensitas sedang, 5 kasus (31.3%) dengan intensitas warna kuat. Sedangkan pada *grade 2* dijumpai intensitas warna lemah 1 kasus (6.3%), warna sedang 9 kasus (56.3%), warna kuat 6 kasus (37.5%) dan pada *grade 3* skor intensitas warna lemah 2 kasus (12.5%), warna sedang 11 kasus (68.8%), warna kuat 3 kasus (18.8%). Skor intensitas warna terbanyak adalah pada intensitas sedang yaitu sebanyak 27 kasus (56.3%). Pemeriksaan imunohistokimia *Cathepsin D* menunjukkan dengan uji *Chi Square*, tidak ada perbedaan proporsi intensitas warna berdasarkan *grade* dengan nilai $p > 0.05$ dan dengan uji korelasi Spearman menunjukkan tidak ada hubungan peningkatan *grade* dengan intensitas warna pada karsinoma duktus invasif dengan nilai $p > 0.05$.

Kesimpulan

Tampilan imunohistokimia *Cathepsin D* tidak dapat digunakan untuk membedakan *grade* pada karsinoma duktus invasif.

Kata kunci : Karsinoma Duktus Invasif, *Grade* Histopatologi, Intensitas Warna *Cathepsin D*

ABSTRACT

Background

Invasion and metastasis of breast tumour cells are still a problem that often been observed on breast cancer. The histopathological grading showed that the higher grade of a cancer reflecting a more malignant breast cancer. *Cathepsin D* is acidic cysteine proteinase play an essential role in multiple steps of tumor progression, i.e stimulating cancer cell proliferation, fibroblast outgrowth and angiogenesis, as well as inhibiting tumor apoptosis. Increasing level of *Cathepsin D* correlates with increasing malignancy of breast cancer. The purpose of this research is to evaluate the differences of *Cathepsin D* expression in various histopathological grade of invasive ductal carcinoma of the breast.

Methods

This research is an analytical descriptive study with cross sectional design. The sample are 48 paraffin blocks of breast tissue that had been diagnosed as invasive ductal carcinoma predetermined grade with hematoxylin eosin staining. Recutting of paraffin blocks was performed, continued with *Cathepsin D* staining using *The Envision + Dual Link System kit*. The primary antibodies were mouse monoclonal antibody *Hu-Cathepsin D* diluted by 1: 200 and the appearance of *Cathepsin D* staining were evaluated.

Results

The evaluation of *Cathepsin D* staining on grade 1 with weak intensity found on 4 cases (25%), moderate intensity on 7 cases (43.8%), strong intensity on 5 cases (31.3%). The staining evaluation on grade 2 with weak intensity found on 1 case (6.3%), moderate intensity on 9 cases (56.3%), strong intensity on 6 cases (37.5%). The staining evaluation on grade 3 with weak intensity found on 2 cases (12.5%), moderate intensity on 11 cases (68.8%), strong intensity on 3 cases (18.8%). From all grading, the highest color intensity were moderate intensity found on 27 cases (56.3%). The expression of *Cathepsin D* were analyzed with *Chi Square* test with no differences *Cathepsin D* intensity in any grade of invasive ductal carcinoma with p values > 0.05 . The expression of *Cathepsin D* were also analyzed with Spearman's correlation test with no relationship of higher grade of invasive ductal carcinoma with *Cathepsin D* intensity with p values > 0.05 .

Conclusion

The expression of *Cathepsin D* in invasive ductal carcinoma unable to differentiate the grade.

Key words: Invasive Ductal Carcinoma, Histopathological Grade, Intensity of *Cathepsin D*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak kedua sesudah kanker leher rahim di Indonesia menurut data nasional dari Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI) tahun 2001.¹ Insiden kanker payudara terus meningkat dari 16,53% pada tahun 1994, 19,18% pada tahun 1999 dan 19,88% pada tahun 2001.²

Penyebaran dan metastasis sel-sel tumor payudara masih merupakan masalah yang sering dijumpai pada karsinoma payudara. Keterlambatan dalam mendiagnosa suatu kanker payudara yang telah mengalami metastase menyebabkan peningkatan insiden kematian penderita kanker payudara.

Invasi dan metastase tumor berhubungan dengan aktivitas proteolitik dari berbagai tipe proteinase. Diantara Proteinase tersebut adalah *Cathepsin*.^{3,4} *Cathepsin D* adalah *acidic lysosomal proteinase* yang berperan dalam berbagai langkah pertumbuhan tumor, merangsang sel-sel kanker berproliferasi, perkembangan fibroblas, dan angiogenesis, serta menghambat apoptosis tumor.⁵ Pada sel-sel kanker sekresi *pro-cath-D* terjadi secara berlebihan sehingga terjadi over-ekspresi dari *pro-cath-D* dan dapat diendositososis oleh sel-sel kanker atau oleh fibroblas melalui reseptor M6P dan yang lainnya oleh reseptor yang belum diketahui. Endositososis *pro-cath-D* berturut-turut mengalami mekanisme pematangan menjadi 48kDa bentuk intermediet kemudian menjadi matang (14kDa dan 34kDa). Mekanisme pematangan *cath-D* berikut endositosisnya, sejauh ini tidak jelas. Coopman dkk menunjukkan bahwa mekanisme endositososis dari *pro-cath-D* juga tergantung pada fungsi katalitiknya dan memerlukan protease sistein *cath-B* dan *cath-L*, seperti pada *cath-D* seluler di retikulum endoplasmik kasar.^{6,7,8}

Cathepsin D diekspresi berlebihan dan disekresi banyak oleh sel-sel kanker payudara. Protease ini merupakan petanda prognosa yang buruk bagi sel-sel kanker epitel payudara sehubungan dengan meningkatnya metastase kanker payudara. Ekspresi *Cathepsin D* yang berlebihan ini merangsang tumorigenitas dan metastasis, berperan penting dalam berbagai langkah perkembangan tumor, merangsang sel-sel kanker berproliferasi, pertumbuhan fibroblas dan angiogenesis serta menghambat apoptosis tumor. *Cathepsin D* yang mutan tanpa aktivitas proteolitik masih terbukti mitogenik untuk sel-sel

kanker, fibroblas dan endotel, yang menunjukkan bahwa *Cathepsin D* baik secara langsung maupun tidak langsung terlibat dalam proses tersebut.^{9,10,11,12}

Grading histopatologi merupakan satu indikator untuk menentukan prognosis dari suatu kanker payudara. Sampai saat ini, sistem penilaian yang paling umum digunakan adalah modifikasi Elston-Ellis dari sistem *grading* Scarff-Bloom-Richardson dimana semakin tinggi suatu *grade*, maka semakin ganas suatu kanker payudara.^{13,14}

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah dengan makin tingginya *grade* karsinoma duktus invasif, akan bertambah nyata tampilan *Cathepsin D*.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian berupa deskriptif analitik dengan rancangan *cross sectional*. Penelitian dilakukan selama bulan Juni 2010 sampai Juli 2011 dengan sampel jaringan payudara dan pemeriksaan histopatologinya dilakukan di Sentra Diagnostik Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara bekerja sama dengan RSUP. H. Adam Malik Medan, dan laboratorium patologi anatomik swasta di Medan. Kriteria inklusi sampel adalah sediaan blok parafin jaringan payudara dan slide pulasan Hematoksilin-Eosin yang didiagnosa sebagai karsinoma duktus invasif payudara yang telah di-*grade*. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan 48 sampel yang didiagnosa sebagai karsinoma duktus invasif dengan masing-masing *grade* sebanyak 16 sampel. Dikumpulkan semua slide yang berasal dari payudara yang telah didiagnosa sebagai karsinoma duktus invasif. Dilakukan pembacaan ulang oleh dua orang ahli patologi secara independen dan kemudian dilakukan *grade* (berdasarkan *grade* histopatologi dari sistem kombinasi Nottingham) terhadap slide karsinoma duktus invasif tersebut. Dilakukan pemotongan ulang blok paraffin dan dilanjutkan dengan pewarnaan immunohistokimia *Cathepsin D* dan kemudian dinilai tampilan warna dari *Cathepsin D* tersebut.

Penelitian menggunakan metode *The EnVision + Dual Link System kit*, teknik pulasan immunohistokimia 2 langkah. Antibodi primer yang digunakan adalah *mouse monoclonal Hu-antibody Cathepsin D* dengan pengenceran 1 : 200.

Penilaian terhadap pulasan immunohistokimia *Cathepsin D* adalah sebagai berikut:

kontrol positif berasal jaringan yang telah diketahui positif terhadap *Cathepsin D* pada karsinoma payudara dan kontrol negatif adalah karsinoma payudara yang tidak diberi *Cathepsin D*. Tampilan *Cathepsin D* positif apabila terampil pada sitoplasma sel epitel warna coklat. Cara menginterpretasikan tampilan imunohistokimia jaringan adalah skor tampilan warna coklat yaitu: skor 1 bila intensitas warna lemah, skor 2 sedang dan skor 3 kuat. Skor jumlah sel yang terwarnai dibagi empat yaitu: skor 0 apabila tidak ada sel yang terwarnai, skor 1 apabila jumlah sel yang terwarnai kurang dari 25%, skor 2 antara 25%-75% , skor 3 lebih dari 75%. Intensitas warna merupakan hasil perkalian dari skor tampilan warna dan skor jumlah sel yang terwarnai. Interpretasi intensitas warna : negatif apabila hasil perkalian skor tampilan warna dan skor jumlah sel adalah nol, positif lemah apabila hasil perkaliannya 1 sampai 3, positif sedang 4 sampai 6 dan positif kuat 7 sampai 9.¹⁵

Karakteristik penderita karsinoma duktus invasif disajikan dalam bentuk tabulasi dan dideskripsikan tanpa diuji. Evaluasi perbedaan tampilan imunohistokimia *Cathepsin D* pada setiap *grade* karsinoma duktus invasif disajikan

dalam bentuk tabulasi dan diuji dengan menggunakan korelasi *Spearman*.

HASIL

Pemeriksaan imunohistokimia *Cathepsin D* dilakukan terhadap 48 sediaan blok parafin jaringan histopatologi payudara yang didiagnosa sebagai karsinoma duktus invasif dibagi atas 3 *grade* dan masing-masing *grade* sebanyak 16 kasus (33.3%).

Proporsi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor jumlah sel yang terwarnai dipaparkan pada tabel 1.

Tabel 1. Proporsi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor jumlah sel yang terwarnai.

Jumlah sel yang terwarnai	Karsinoma Duktus Invasif		
	Grade 1	Grade 2	Grade 3
< 25%	0	0	0
25%-75%	0	0	0
>75%	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)
Jumlah	16 (100%)	16 (100%)	16 (100%)

Proporsi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor intensitas warna dipaparkan pada tabel 2.

Tabel 2. Proporsi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor intensitas warna.

Skor intensitas warna	karsinoma duktus invasif			Jumlah	X ²	P
	Grade 1	Grade 2	Grade 3			
Lemah	4(25%)	1(6.3%)	2(12.5%)	7(14.6%)	3.889 ^a	0.421*
Sedang	7(43.8%)	9(56.3%)	11(68.8%)	27(56.3%)		
Kuat	5(31.3%)	6(37.5%)	3 (18.8%)	14(29.2%)		
Jumlah	16(100%)	16(100%)	16 (100%)	48 (100%)		

Keterangan : Uji Chi Square *Tidak Signifikan

Dengan uji *Chi Square*, secara statistik tidak terdapat perbedaan proporsi intensitas warna berdasarkan *grade* ($p > 0.05$).

Korelasi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor intensitas warna dipaparkan pada tabel 3.

Tabel 3. Korelasi karsinoma duktus invasif berdasarkan *grade* dan skor intensitas warna

Variabel yang dihubungkan	N	Correlation Coefisien	P
Grade karsinoma duktus invasif dan intensitas warna	48	-.014	.922

Keterangan : Uji Spearman

Dengan uji *Spearman* tidak terdapat hubungan antara tingginya *grade* dengan intensitas warna yang ditampilkan oleh *Cathepsin D* ($p>0.05$).

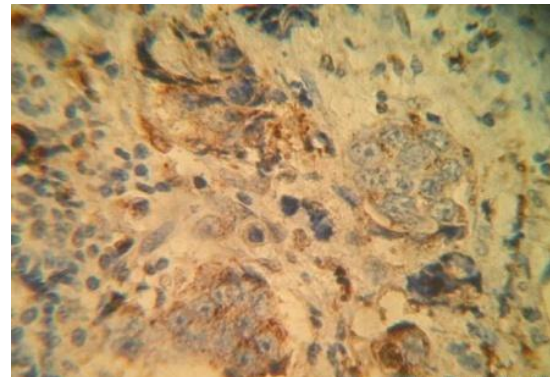
DISKUSI

Data-data penelitian ini diperoleh dari 48 preparat karsinoma duktus invasif yang masing-masing *grade* berjumlah 16 sampel (33.3%). Lebih dari 75% sel-sel kanker dari seluruh karsinoma duktus invasif baik *grade* 1, 2, maupun 3 menunjukkan ekspresi *Cathepsin D*. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Namura T bahwa *Cathepsin D* ekspresinya berlebihan dan disekresi banyak oleh sel-sel kanker payudara.⁵

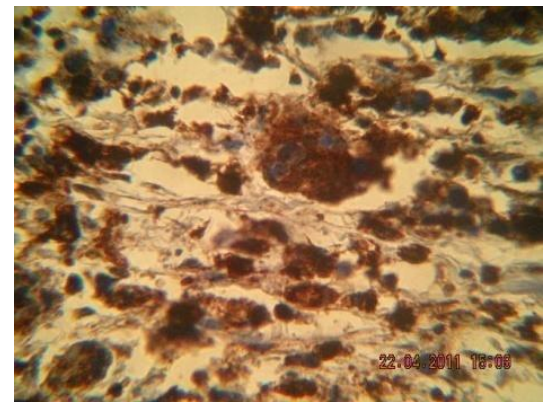
Tidak terlihat peningkatan signifikan intensitas warna *Cathepsin D* dengan meningkatnya *grade*. Pada *grade 1* dijumpai 4 kasus (25%) dengan skor intensitas warna lemah, 7 kasus (43.8%) dengan intensitas sedang, 5 kasus (31.3%) dengan intensitas warna kuat. Sedangkan pada *grade 2* dijumpai intensitas warna lemah 1 kasus (6.3%), warna sedang 9 kasus (56.3%), warna kuat 6 kasus (37.5%) dan pada *grade 3* skor intensitas warna lemah 2 kasus (12.5%), warna sedang 11 kasus (68.8%), warna kuat 3 kasus (18.8%). Skor intensitas warna terbanyak adalah pada intensitas sedang yaitu sebanyak 27 kasus (56.3%). Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Foekens dkk bahwa tidak ada hubungan antara peningkatan level dari *Cathepsin D* dengan *grade* tumor.¹⁶

Dengan uji *chi-square*, penelitian ini memberikan nilai $p=0.421$ ($p>0.05$) tidak terdapat perbedaan proporsi intensitas warna berdasarkan *grade*. Dengan uji korelasi Spearman tidak terdapat hubungan peningkatan *grade* dengan intensitas warna yang ditampilkan oleh *Cathepsin D* ($p=0.922/p>0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan intensitas warna *Cathepsin D* tidak dipengaruhi oleh peningkatan *grade*. Hal ini menunjukkan bahwa *Cathepsin D* terutama berperan dalam tumorigenitas dan metastasis dari sel-sel kanker bukan dipengaruhi formasi tubulus, plemorfisme inti dan derajat mitosis dari suatu kanker payudara.^{9,10,11,12} Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan besar tidak ada hubungan antara gambaran morfologi sel karsinoma dengan perbedaan intensitas warna yang ditampilkan oleh *Cathepsin D*.

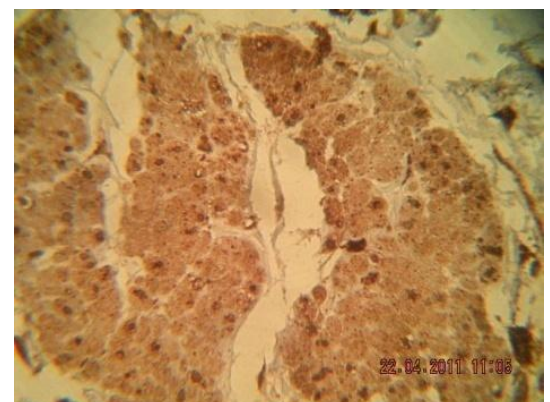
Pada 16 kasus (33,3%) sediaan yang diteliti tampak adanya sel-sel normal. Sel-sel normal tersebut juga terwarnai oleh *Cathepsin D* walaupun intensitasnya lemah. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Masson dkk bahwa pada sel normal tampilan *Cathepsin D* juga dijumpai di dalam vesikel intraseluler sel normal.⁹



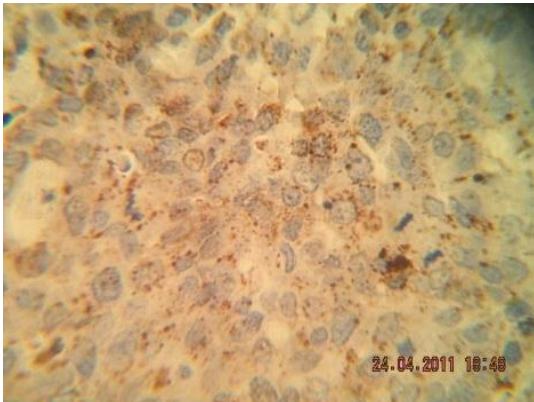
Gambar 1. Kasus karsinoma duktus invasif grade 1. Dengan IHC *Cathepsin D* menunjukkan tampilan lemah.



Gambar 2. Kasus karsinoma duktus invasif grade 1. Dengan IHC *Cathepsin D* menunjukkan tampilan warna kuat.



Gambar 3. Kasus karsinoma duktus invasif grade 2 Dengan IHC *Cathepsin D* menunjukkan tampilan sedang.



Gambar 4. Kasus karsinoma duktus invasif grade 3. Dengan IHC *Cathepsin D* menunjukkan tampilan lemah.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa *Cathepsin D* tertampil pada sitoplasma sel epitel dan lebih dari 75% sel karsinoma duktus invasif payudara baik grade 1, 2 dan 3 menunjukkan tampilan *Cathepsin D*.

Pada penelitian ini dengan uji *chi-square* memberikan nilai $p=0.421$ ($p>0.05$) yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan proporsi intensitas warna berdasarkan grade dan dengan uji korelasi Spearman nilai $p=0.922$ ($p>0.05$) yang berarti tidak terdapat hubungan peningkatan grade dengan intensitas warna yang ditampilkan oleh *Cathepsin D*. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan tampilan warna *Cathepsin D* tidak dapat digunakan untuk membedakan grade pada karsinoma duktus invasif payudara yang berarti bahwa tampilan warna *Cathepsin D* tidak dapat digunakan untuk menentukan prognosa dari karsinoma duktus invasif pada payudara.

Sel-sel normal yang dijumpai pada 33,3% kasus penelitian juga menampilkan *Cathepsin D* walaupun dengan intensitas warna lemah yang berarti bahwa pada sel epitel normal payudara dapat dijumpai adanya *Cathepsin D*.

SARAN

Tampilan *Cathepsin D* dapat dijumpai pada sel-sel normal payudara maupun sel-sel ganas payudara. Hal ini dapat menjadi landasan penelitian selanjutnya untuk menentukan asal tumor primer atau sekunder yang diperkirakan merupakan metastase kanker payudara dengan

melihat tampilan *Cathepsin D* baik secara histopatologi maupun aspirasi.

Dari hasil penelitian ini bahwa lebih dari 75% sel-sel kanker karsinoma duktus invasif menunjukkan ekspresi *Cathepsin D*. Hal ini dapat digunakan untuk menemukan inhibitor *Cathepsin D* sehingga diharapkan penemuan terapi baru ini dapat mencegah metastase kanker payudara sedini mungkin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kartika EP I, Maulani H, Sulastri H, Yuwono. Ekspresi Protein Her2/neu, Status Reseptor Estrogen dan Progesteron pada Berbagai Derajat Keganasan Karsinoma Payudara Duktal Invasif Wanita Usia Muda. *Majalah Patologi*. Vol.18. No.1. Januari 2009.
2. Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Depkes RI, Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia. *Data Histopatologik*. Yayasan Kanker Indonesia. 2001.
3. Kumar V, Abbas, Fauston, Aster. *The Breast*. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis and Disease. 8th edition. Philadelphia WB Saunders Company. Elsevier. 2010
4. Kagedal K, Johansson U, Olinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *The FASEB Journal*. 2001;15:1592-4
5. Namura T, Katunuma N: Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *The Journal of Medical Investigation*. Vol.52. 2005.
6. Coopman EL, Melanie B, Derocq D, Gracia M, Lassis MG, Matha VL, et.al. *Cathepsin D: newly discovered of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis*. Elsevier. *Cancer letters* 237 (2006). P:167-79.
7. Masson O, Bach AS, Derocq D, Prebois C, Matha VL, Sophie P, et.al. *Pathophysiological functions of cathepsin D: targeting its catalytic activity versus its protein binding activity?* *Biochimie*. 2010.
8. Matha V laurent, Farnoud MR, Lucas A, Rougeout C, Garcia M, Rochefort H. *Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors*. *Journal of Cell Science*. Vol.111.1998
9. Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, et.al. *Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical*

- application, a 1999 overview. *Clinica Chimica Acta* 291. Elsevier.2000. p.157-70
10. Garcia M, et.al. Biological and Clinical Significance of *Cathepsin D* in Breast Cancer Metastasis. *Stem cells*.1996.vol.14. P:642-50.
 11. Shaheen RM,Miseljic S, Wiehle RD,Wittliff JM. Relation Between *Cathepsin D* Expression and Other Prognostic Factors in Breast Carcinomas. *Clinical Chemistry*. Vol.41. No.11.1995.P:1585-91.
 12. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. *Cathepsin D* and Prognosis in Breast Cancer.*The New England Journal of Medicine*.1990.Vol.322. No.5.P:297-302.
 13. Tavasolli, Devilee R. Pathology and Genetic of Tumours of the Breast and Female Genital Organs/WHO Classification of Tumours. IARC Press. 2003: 34-6.
 14. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Ninth edition. Mosby. Elsevier. 2004. p.1825
 15. Shaw. Breast cancer hormone receptor scoring [internet]. 2010 [cited 2011 April 07]. Available from: <http://www.theeffectivetruth.info/hormonerecept.html.16>
 16. Foekens JA, Look MP, Vries JB, Gelder MEM, Putten WLJ, Klijn JGM. *Cathepsin-D* in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *British journal of cancer*. 2000. p. 300-7.