

Eksresi Topoisomerase IIA pada Karsinoma Duktal Invasif Payudara, Hubungannya dengan Derajat Histopatologik dan Klasifikasi Subkelas Molekuler Payudara

Nila Kurniasari, Imam Susilo

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma duktal invasive payudara merupakan penyebab tersering kematian pada wanita di seluruh dunia. Topoisomerase II α memiliki peran penting dalam replikasi DNA dan merupakan target spesifik agen kemoterapi berganda. Diduga amplifikasi topoisomerase II α berkaitan dengan prognosis yang buruk pada karsinoma duktal invasive payudara, namun mempunyai respon yang baik terhadap kemoterapi sitotoksik. Namun, hubungan antara derajat histopatologik dan klasifikasi subkelas molekuler berdasarkan ekspresi ER, PR, HER-2/neu dan Topoisomerase II α masih belum jelas.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan hubungan antara topoisomerase II α pada karsinoma duktal invasif payudara dan derajat histopatologik dan klasifikasi subkelas molekuler payudara.

Bahan dan cara

Sejak Januari-Desember 2009, rekam medik 35 pasien karsinoma duktal invasif payudara pada Departemen Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dicatat data derajat histopatologik dan hasil pemeriksaan imunohistokimia (ER, PR, HER-2/neu). Pembuatan spesimen dan pulasan imunohistokimia dilakukan untuk melihat ekspresi imunohistokimia topoisomerase II α .

Hasil

Pemeriksaan Imunohistokimia menunjukkan ekspresi Ekspresi topoisomerase II α pada 23 (65.7%) kasus. Analisa Chi Square antara topoisomerase II α dan derajat histopatologik menunjukkan hubungan yang tidak bermakna ($p=0.091$). Sedangkan analisa Chi Square antara ekspresi topoisomerase II α dan klasifikasi subkelas molekuler payudara menunjukkan hubungan yang tidak bermakna ($p= 0.204$).

Kesimpulan

Topoisomerase II α tidak berperan pada diferensiasi, proliferasi sel tumor dan karsinogenesis karsinoma duktal invasif payudara melalui jalur hormonal.

Kata kunci : karsinoma duktal invasif payudara , topoisomerase II α , ER, PR, HER-2/neu, derajat histopatologik.

ABSTRACT

Background

Invasive ductal carcinoma of the breast was the most common cause of death among women in the world. Topoisomerase II α plays a key role in DNA replication and is a target for multiple chemotherapeutic agents. Amplification of Topoisomerase II α is considered to have correlation with poor prognosis in invasive ductal carcinoma of the breast, but have a favourable response to cytotoxic chemotherapy. The correlation between Topoisomerase II α , histopathology grading and molecular subclass classification based on ER, PR and HER-2/neu expression is still unclear.

Objective

This study was conducted to determine the correlation between topoisomerase II α in invasive ductal carcinoma of the breast and histopathological grading and molecular subclass classification of the breast.

Methods

Since January-December 2009, medical records of 35 patients invasive ductal carcinoma of the breast of Pathology department of Dr. Soetomo Hospital Surabaya, retrieved histopathological grading and immunohistochemical data (ER, PR, HER-2/neu). Specimen and immunohistochemical examination were made to study expression of topoisomerase II α

Results

Immunohistochemical examination topoisomerase II α expression in 23 cases (65.7%). Chi Square analysis between topoisomerase II α expression and histopathological grading showed not significant correlation ($p=0.091$). However, Chi Square analysis between topoisomerase II α expression and molecular subclass classification of the breast showed not significant correlation ($p=0.204$)

Conclusion

Topoisomerase II α have no role in differentiation, tumor cell proliferation and carcinogenesis of invasive ductal carcinoma of the breast via the hormonal pathway.

Keywords : invasive ductal carcinoma of the breast, Topoisomerase II α , ER, PR, HER-2/neu, histopathological grading.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, karsinoma payudara menduduki urutan kedua dari seluruh keganasan pada wanita. Dari data Rekam Medik RSUD. Dr. Soetomo pada Januari-Desember 2009 didapatkan 123 kasus karsinoma duktal invasif payudara.¹

Topoisomerase II α adalah target spesifik dari beberapa agen kemoterapi, termasuk antra- siklin. Obat-obat tersebut terikat pada kompleks Topo-DNA dan menghambat proses religasi, sehingga rantai DNA ganda yang terbelah menjadi stabil dan diperkirakan akan merangsang apoptosis.² Overekspresi dari c-erbB2 (HER-2/neu) atau topoisomerase II α menunjukkan harapan hidup yang lebih pendek, sedangkan pasien dengan overekspresi keduanya menunjukkan luaran penyakit yang paling buruk ($P < 0.0001$)³, namun hubungan antara topoisomerase II α dengan derajat histopatologi masih kontroversi, sedang hubungan antara topoisomerase II α dengan klasifikasi subkelas molekular karsinoma payudara berdasarkan analisa gen yaitu reseptor estrogen positif (luminal A dan B), dan reseptor estrogen negatif (tipe HER-2/neu, *basal-like*) belum banyak diteliti.

METODE PENELITIAN

Tiga puluh lima blok parafin dari semua penderita karsinoma payudara yang telah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi ER, PR, HER-2/neu di Bagian/SMF/Instalasi Patologi Anatomi FK UNAIR/RSUD. Dr. Soetomo Surabaya, selama periode 1 Januari 2009 sampai 31 Desember 2009 dengan kriteria inklusi: (1) pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSUD. Dr. Soetomo Surabaya; (2) gambaran mikroskopik sesuai dengan kriteria karsinoma duktal invasif payudara; (3) arsitektur neoplasma dapat dievaluasi dengan jelas, tidak banyak nekrosis maupun perdarahan; (4) belum pernah dilakukan kemoterapi dan radioterapi (data rekam medik). Sampel diambil secara *simple random sampling*. Kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia dengan antibodi topoisomerase II α pada seluruh sampel.

Masing-masing blok parafin dipotong setebal 4 mikron, kemudian dilakukan deparafinisasi dengan xylol dan alkohol. Pulasan imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan teknik baku streptavidin-biotin, yang meng-

gunakan antibodi monoklonal ER (Dako) dengan pengenceran 1/100, antibodi monoklonal PR (Dako) dengan pengenceran 1/100, antibodi poliklonal HER-2/neu (Dako) dengan pengenceran 1/500, antibodi monoklonal topoisomerase II α (Thermo) dengan pengenceran 1/50. Ekspresi ER/PR dan topoisomerase II α terlihat sebagai granula coklat pada inti. Sedangkan ekspresi HER-2/neu terlihat pada membran sel. Ekspresi ER/PR dihitung dalam pembesaran 400x, dengan cut off 10%.⁴ Ekspresi topoisomerase II α dihitung dalam pembesaran 400x, dengan cut off 25%.³ Ekspresi HER-2/neu dihitung dengan pembesaran 400x, dengan skoring : 0 : negatif, bila tidak ada membran sel terpulas pada <30% sediaan; +1 : negatif, bila membran sel sedikit/ samar-samar terpulas pada >30% sediaan, atau terpulas sebagian; +2 : positif lemah, membran sel terpulas lengkap dengan intensitas lemah sampai sedang pada >30% sediaan; +3 : positif, bila membran sel terpulas lengkap dengan intensitas kuat pada >30% sediaan.⁵ Positif 2 dianggap negatif kecuali telah diverifikasi dengan FISH. Derajat histopatologi ditentukan berdasarkan klasifikasi *'Nottingham Modification of Bloom-Richardson System'*⁶, sedangkan klasifikasi subkelas molekular payudara dibagi menjadi 4 kelompok : (1) Luminal A : ER/PR+, HER-2- = ER+/PR+, HER-2-; ER-/PR+, HER-2-; ER+/PR-, HER-2-; (2) Luminal B : ER/PR+, HER-2+ = ER+/PR+, HER-2-; ER-/PR+, HER-2+; ER+/PR-, HER-2+; (3) HER-2 : ER/PR-, HER-2 +; (4) *Basal-like* : ER-/PR-, HER-2-.⁷ Adanya hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan derajat histopatologi, serta hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan derajat histologi serta hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan klasifikasi subkelas molekular payudara dianalisis menggunakan statistik non parametrik *Chi square*.

HASIL

Dari hasil pengumpulan data yang diperoleh di Bagian/SMF/Instalasi Patologi Anatomi FK UNAIR/RSUD. Dr. Soetomo Surabaya periode 1 Januari 2009 sampai dengan 31 Desember 2009 didapatkan 123 kasus KDIP. Berdasarkan kriteria inklusi dan besar sampel yang telah ditetapkan, diperoleh total 35 sampel.

Dari 35 sampel yang diteliti menunjukkan rentang umur penderita karsinoma duktal invasif antara 30-87 tahun, dengan rerata 51

tahun. Berdasarkan kelompok umur, terbanyak pada kelompok umur 50-59 tahun, sebanyak 11 penderita (31.4 %) (tabel 1).

Berdasarkan derajat histopatologi di dapatkan 5 (14.3%) kasus derajat baik, 12 (34.3%) kasus derajat sedang dan 18 (51.4%) kasus derajat buruk (tabel 1).

Berdasarkan klasifikasi molekuler payudara, dari 35 sampel, didapatkan 5 (14.3%) kasus kelompok luminal A, 7 (20.0%) kasus kelompok luminal B, 7 (20.0%) kasus kelompok HER-2, dan 16 (45.7%) kasus kelompok *basal-like* (tabel 1).

Empat puluh prosen kasus kelompok luminal A tergolong pada derajat diferensiasi baik dan 40% derajat diferensiasi berat dengan proporsi yang sama; 57.2% kelompok luminal B tergolong pada derajat diferensiasi berat; 57.1% kelompok HER-2 tergolong pada derajat diferensiasi sedang (57.1%) dan 68,7% kelompok *basal-like* terbanyak didapatkan pada derajat diferensiasi buruk (tabel 2).

Pada pengecatan imunohistokimia topoisomerase II α , menunjukkan 23 (65.7%) kasus dengan topoisomerase II α positif dan 12 (34.3 %) kasus dengan ekspresi topoisomerase II α negatif (tabel 1).

Kelompok derajat diferensiasi baik menunjukkan ekspresi topoisomerase II α positif 20%, pada kelompok derajat diferensiasi sedang tampak meningkat menjadi 75% dan pada kelompok derajat diferensiasi buruk mencapai 66,7 % (tabel 3).

Uji *Chi square* untuk mengetahui hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan derajat histopatologi KDIP, didapatkan hasil $\chi^2 = 4.803$ koefisien kontingensi =0.347 pada $p=0.091$ ($p>0.05$); berarti tidak menunjukkan hubungan bermakna.

Ekspresi topoisomerase II α positif pada 2 (40%) kasus kelompok luminal A, positif pada 6 (85.7%) kasus kelompok luminal B, positif pada 6 (85.7%) kasus kelompok HER-2, dan positif pada 9 (56.3%) kasus kelompok *basal-like* (tabel 4).

Tabel 1. Karakteristik Subyek Penelitian.

Karakteristik	Σ kasus	%
Umur(tahun)		
30-39	7	20
40-49	10	28,6
50-59	11	31,4
60-69	6	17,2
70-79	0	0,0
80-89	1	2,8
Derajat		
Baik	5	14,3
Sedang	12	34,3
buruk	18	51,4
Klasifikasi subkelas molekuler		
Luminal A	5	14,3
Luminal B	7	20,0
HER-2	7	20,0
<i>Basal-like</i>	16	45,7
Ekspresi Topoisomerase IIα		
Positif	23	65,7
Negatif	12	34,3

Tabel 2. Distribusi Kelompok Subkelas Molekuler pada Berbagai Derajat Histopatologi Karsinoma Duktal Invasif Payudara.

Kelompok subkelas molekuler	Derajat Histopatologi			Total
	Baik	Sedang	Buruk	
Luminal A	2	1	2	5
Jumlah %	40,0%	20,0%	40,0%	100%
Luminal B	0	3	4	7
Jumlah %	0,0%	42,8%	57,2%	100%
HER-2	2	4	1	7
Jumlah %	28,6 %	57,1%	14,3%	100%
<i>Basal-like</i>	1	4	11	16
Jumlah %	6,3%	25%	68,7	100%

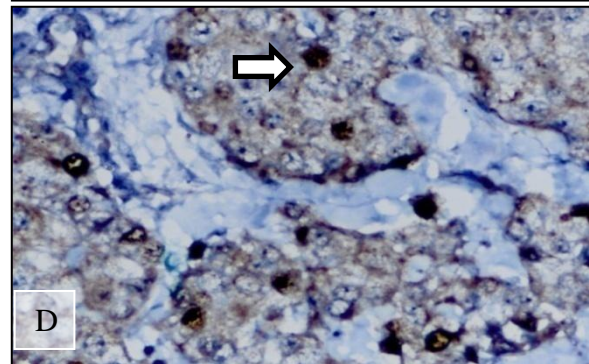
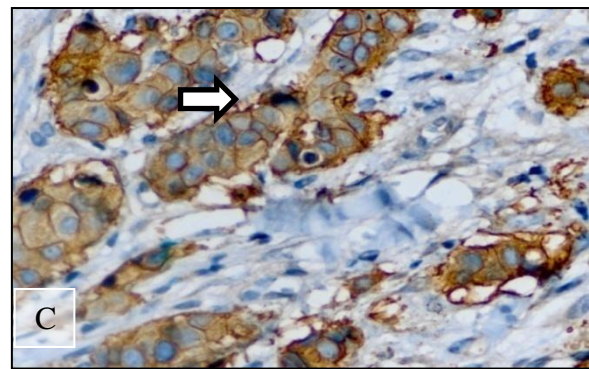
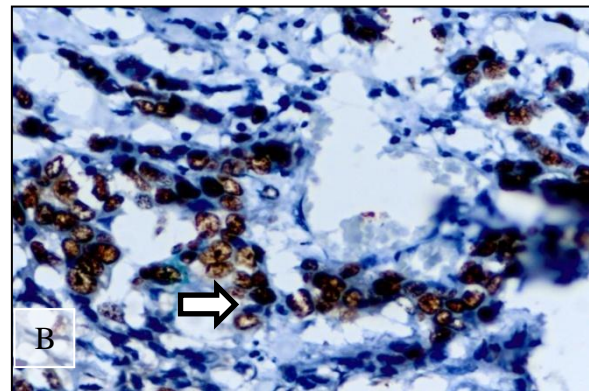
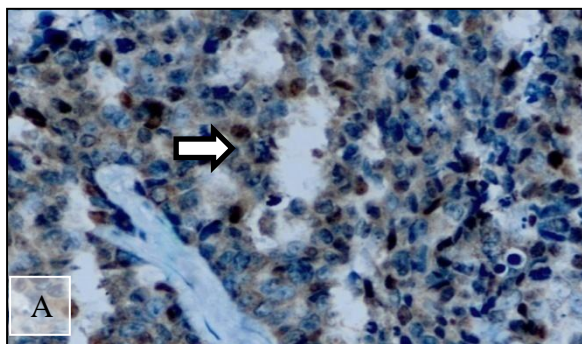
Tabel 3. Distribusi Ekspresi Protein Topoisomerase II α pada Berbagai Derajat Histopatologik Karsinoma Duktal Invasif Payudara.

Derajat Histopatologik	Ekspresi Topoisomerase II α		Total
	Positif	Negatif	
Baik			
Jumlah	1	4	5
%	20,0%	80,0%	100%
Sedang			
Jumlah	9	3	12
%	75,0%	25,0%	100%
Buruk			
Jumlah	12	6	18
%	66,7 %	33,3%	100%

Tabel 4. Distribusi Ekspresi Protein Topoisomerase II α pada Berbagai Kelompok Klasifikasi Subkelas Molekuler Karsinoma Duktal Invasif Payudara.

Klasifikasi subkelas molekuler	Ekspresi Topoisomerase II α		Total
	Positif	Negatif	
Luminal A			
Jumlah	2	3	5
%	40,0%	60,0%	100%
Luminal B			
Jumlah	6	1	7
%	85,7%	14,3%	100%
HER-2			
Jumlah	6	1	7
%	85,7 %	14,3%	100%
Basal-like			
Jumlah	9	7	16
%	56,3%	43,7%	100%

Uji *Chi square* untuk mengetahui hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan kelompok subkelas molekuler payudara didapatkan hasil $\chi^2 = 4.589$; koefisien kontingensi = 0.340; pada $p = 0.204$ ($p > 0.05$); berarti tidak menunjukkan hubungan bermakna.



Gambar 1. A. Ekspresi ER pada inti terpusat coklat (imunohistokimia, 400x); B. Ekspresi PR pada inti terpusat coklat (imunohistokimia, 400x); C. Ekspresi HER-2/neu pada membran sel intensitas kuat setara dengan +3 (imunohistokimia, 400x); D. Ekspresi topoisomerase II α pada inti terpusat coklat (imunohistokimia, 400x).

PEMBAHASAN

Topoisomerase II α berperan penting dalam replikasi DNA, pengaturan kromatin, mempertahankan stabilitas genomik, rekombinasi DNA, dan merupakan target dari berbagai agen kemoterapi. Pada karsinoma payudara, ekspresi topoisomerase II α dikaitkan dengan proliferasi sel, dan overekspresi dari HER-2/neu.^{8,9}

Pada penelitian ini didapatkan 23 (65.7%) kasus KDIP menunjukkan ekspresi topoisomerase II α positif. Beberapa literatur menyebutkan bahwa ekspresi Topoisomerase II α pada KDIP bervariasi antara 25-39.4%. Perbedaan tersebut disebabkan belum adanya keseragaman dalam penentuan nilai *cut off*. Ekspresi topoisomerase II α dikatakan juga meningkat pada tumor dengan ER dan PR yang negatif. Letak topoisomerase II α berdekatan dengan onkogen HER-2/neu pada kromosom 17q12, sehingga diduga bahwa terdapat mekanisme yang menyebabkan ko-ekspresi aberant pada ke dua protein ini. Pada level genomik DNA, baik amplifikasi dan delesi gen topoisomerase II α berkaitan dengan amplifikasi HER-2/neu.¹⁰ Dari literatur tersebut dapat diasumsikan bahwa ekspresi topoisomerase II α akan meningkat pada tumor dengan ER PR negatif dan HER-2/neu positif (kelompok HER-2). Sesuai dengan literatur, pada penelitian ini didapatkan ekspresi topoisomerase II α positif pada kelompok HER-2/neu yang cukup tinggi, yaitu 6 dari 7 sampel (85,7%). Namun secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi topoisomerase II α dan kelompok subkelas molekuler ($p = 0.204$). Hal ini didukung oleh penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa tidak terdapat hubungan antara ekspresi topoisomerase II α dan status hormonal.^{8,9} Perbedaan hasil ini dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu perbedaan teknik pemeriksaan yang digunakan, perbedaan keragaman sampel, maupun karena jumlah sampel yang kecil.

Peneliti sebelumnya menyatakan bahwa topoisomerase II α berkaitan dengan derajat histopatologi yang tinggi dan DNA aneuploidi. Namun tidak berkaitan dengan variabel klinis, misalnya usia penderita, ukuran tumor dan status nodal.¹⁰ Pada penelitian ini diungkapkan bahwa ekspresi topoisomerase II α paling rendah pada derajat diferensiasi baik (20%), dan paling tinggi pada derajat diferensiasi sedang (75%), sedangkan pada derajat diferensiasi berat didapatkan positif (66.7%), sehingga secara statistik tidak terdapat hubungan yang bermakna ($p = 0.091$). Hal tersebut didukung oleh peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa ekspresi topoisomerase II α tidak berkaitan dengan ukuran tumor, derajat histopatologi, status reseptor estrogen/progesteron, atau rekurensi penyakit. Namun berkaitan

dengan overekspresi HER-2.⁹ Perbedaan ini terjadi karena diduga banyak interaksi yang mengontrol atau merangsang pertumbuhan sel, sehingga peningkatan ekspresi topoisomerase II α tidak serta merta meningkatkan derajat histopatologi. Juga karena diduga penentuan derajat histopatologi merupakan hal yang subjektif, meskipun sudah memiliki standart pemeriksaan, sehingga bisa terjadi bias antara pemeriksa satu dengan yang lain.^{8,9,10}

KESIMPULAN

Tidak terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi topoisomerase II α dan derajat histopatologi, artinya topoisomerase II α tidak berperan dalam diferensiasi dan proliferasi sel tumor pada karsinoma duktal invasif payudara.

Tidak terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi topoisomerase II α dan kelompok subkelas molekuler payudara, artinya topoisomerase II α tidak berperan dalam karsinogenesis melalui jalur hormonal pada karsinoma duktal invasif payudara.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kusumowardojo, Panuwun T, et al., Beberapa Aspek Sitologi & Histologi Kanker Payudara. Indonesian Issue on Breast Cancer I Surabaya 2004; p 1-17.
2. Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P. Culprit and victim – DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* 2002; 3: 235-43
3. Fritz P, Cabrera MC, Dippon J, Gerteis A et al. c-erbB2 and topoisomerase II α protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Research* 2005. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/7/3/R374>
4. Lal P, Tan KL, and Chen B. Correlation of HER-2 Status With Estrogen and Progesterone Receptors and Histologic Features in 3,655 Invasive Breast Carcinomas, *Am J Clin Pathol* 2005; 123:541-6
5. Onitilo AA, Engel MJ, Greenlee TL, and Mukesh NB. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and HER-2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research* 2009;7:4-13.
6. Schnitt SJ, Millis RR, et al. The Breast. In *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*

- 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2005; p.355
7. Raica M, Jung I, Cimpean MA, Suci C, et al. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2009;50:5-13
 8. Hellems P, van Dam AP, Geyskens M, van Oosterom TA. Immunohistochemical study of topoisomerase II- α expression in primary ductal carcinoma of the breast *J Clin Pathol* 1995;48:147-150
 9. Depowski L, Rosenthal IS, Brien, Stylos S, Johnson LS et al. Topoisomerase II α Expression in Breast Cancer: Correlation with Outcome Variables The United States and Canadian Academy of Pathology Inc. 2000;13;542.
 10. Jarvinen, Kononen J, Peltto-Huikko, Isola J. Expression of Topoisomerase II α Is Associated with Rapid Cell Proliferation, Aneuploidy, and c-erbB2 Overexpression in Breast Cancer. *Amer J Pathol* 1996;148: 752-5