

ARTIKEL ASLI

COMPARATION OF P53 PROTEIN EXPRESSION IN VARIOUS HISTOPATHOLOGICAL GRADING OF TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER

PERBANDINGAN EKSPRESI PROTEIN P53 PADA BERBAGAI DERAJAT HISTOPATOLOGI KARSINOMA SEL TRANSITIONAL BULI-BULI

Eviana Norahmawati

Laboratorium Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya- RSUD Dr Saiful Anwar Malang

ABSTRACT

The present study examines and compares p53 protein expression in various histopathological grading (according to Mostofi Derajat System 1972) of Transitional Cell Carcinoma of The Bladder (TCC). We retrospectively studied 30 bladder biopsies and transurethral resection specimens which consist of normal urothelium (n = 3); grade I TCC (n = 6); grade II TCC (n = 10); grade III TCC (n = 11). Sections were labeled immunohistochemically with antibodies to p53 (DO 7 clone). Two hundred cells from each lesion were visually counted, and the percentage of positive cells was tabulated without knowing of histopathological grading. By statistical test using one way analysis of variance it was a significant difference p53 protein expression in various histopathological grading ($p = 0,001$). By "Least Significance Difference" procedure, it was significant difference between benign urothelial lesion to grade II and grade III, and grade I and II, to grade III. The conclusion is the expression of p53 protein increases from benign urothelium to grade III TCC. Significant difference of p53 protein expression in various histopathological grading shows that the grading system that had been used can express biological behaviour of cancer cell and p53 protein overexpression can aid diagnosis of malignancy in problematic cases of TCC.

Key words: P53 protein expression, Histopathological grading, Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan memeriksa dan membandingkan ekspresi protein p53 pada berbagai derajat histopatologi (menurut Mostofi 1972) dari karsinoma sel transitional buli-buli (KSTB). Dilakukan penelitian retrospektif terhadap 30 spesimen buli-buli dari biopsi dan transurethral reseksi yang terdiri dari urothelium normal (n = 3), KSTB grade I (n = 6), KSTB grade II (n = 10), dan KSTB grade III (n = 11). Sediaan dilabel dengan pengecatan immunohistokimia menggunakan antibodi terhadap p53 klon DO7. Dua ratus sel dari tiap lesi dihitung secara visual dan persentase sel yang positif ditabulasi tanpa mengetahui derajat histopatologinya. Dengan analisa statistik menggunakan ANOVA didapatkan perbedaan signifikan antara ekspresi protein p53 pada berbagai derajat histopatologi ($p = 0,001$). Selanjutnya dengan prosedur "Least Significance Difference" didapatkan perbedaan ekspresi bermakna antara lesi urothelium jinak dengan grade II dan grade III, serta antara grade I dan II dengan grade III. Kesimpulan : Ekspresi protein p53 meningkat dari urothelium jinak sampai KSTB grade III. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapatnya perbedaan signifikan ekspresi protein p53 pada berbagai derajat histopatologi menunjukkan bahwa sistem derajat yang dipakai selama ini dapat mengekspresikan perilaku biologis sel kanker dan overekspresi p53 dapat membantu diagnosa keganasan pada kasus-kasus sulit KSTB.

Kata kunci : Ekspresi protein p53 – Derajat histopatologi – Karsinoma Sel Transitional Buli-Buli

PENDAHULUAN

Neoplasma sel transitional merupakan jenis neoplasma terbanyak di buli-buli dan 90 % karsinoma buli-buli adalah karsinoma sel transitional (KSTB) yang berasal dari urothelium (1,2,3). Menurut data Badan Registrasi Kanker Indonesia 1995, kanker buli-buli merupakan jenis keganasan terbanyak nomor satu pada sistem urogenitalia pria di sentra Patologi Anatomi Malang dan Surabaya. Karakteristik klinis yang merupakan masalah utama dalam terapi KSTB adalah tingginya angka rekurensi (70%) dan tingginya tingkat invasi (4,5). Selama ini prediksi rekurensi dan progresifitas KSTB didasarkan pada faktor prognostik konvensional seperti derajat histopatologi (1,2,6,7).

Namun terdapat beberapa kelemahan dalam penentuan derajat yaitu bersifat subyektif, sehingga terdapat derajat variabilitas interobserver dan intraobserver, dan terdapat differensiasi dari area ke area, sehingga biopsi dapat menunjukkan derajat yang berbeda dari spesimen operasi (1,2,4,8)

Untuk itu diperlukan marker prognostik yang lebih akurat dan obyektif seperti ekspresi protein p53 untuk menentukan diagnosa dan prognosa KSTB dengan lebih tepat (1,8). Sampai saat ini masih terdapat banyak kontroversi dalam hal ekspresi protein p53 pada berbagai derajat histopatologi, juga belum didapatkan kejelasan sistem derajat manakah yang terbaik dan

dapat menggambarkan perilaku biologis sel kanker seperti ekspresi produk gen p53 (9).

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah melakukan pemeriksaan dan membandingkan ekspresi protein p53 pada berbagai derajat histopatologi karsinoma sel transitional buli-buli, untuk mengetahui apakah sistem derajat histopatologi yang dipergunakan selama ini dapat menggambarkan perilaku biologis sel kanker khususnya ekspresi gen p53, dan sejauh mana peranan pemeriksaan protein p53 dalam diagnosa KSTB.

MATERI DAN METODE

Sampel dalam penelitian ini berupa blok jaringan biopsi maupun reseksi buli-buli trans urethral dari penderita KSTB yang sediaannya diperiksa di laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo Surabaya dan RSUD Dr Saiful Anwar Malang selama periode Januari 2001 sampai bulan Juli 2002. Didapatkan 27 kasus KSTB yang memenuhi kriteria inklusi (Pada sediaan tampak lapisan otot buli-buli), selain itu diperiksa pula 3 lesi *cystitis* kronis dengan urothelium jinak, sebagai pembanding.

Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi terhadap p53 *clone* DO7 dengan metode *Labelled Straptavidine Biotin*. Pada 27 kasus KSTB yang diteliti juga dilakukan pengecatan *Hematoxylin Eosin* dan penentuan ulang derajat menurut sistem derajat histopatologi Mostofi (WHO 1972). Setelah dilakukan penentuan ulang derajat didapatkan 6 kasus KSTB derajat histopatologi I, 10 kasus KSTB derajat histopatologi II, dan 11 kasus KSTB derajat histopatologi III.

Pada *slide* yang dicat imunohistokimia dilakukan penghitungan persentase sel ganas yang tercat positif dengan antibodi p53 dari 200 sel ganas di daerah yang paling imunoreaktif, dan hasilnya dinyatakan sebagai *Labelling Index*. Penghitungan dilakukan tanpa mengetahui derajat histopatologi dari KSTB.

HASIL

Dari 30 sampel yang diteliti didapatkan bahwa kasus KSTB terbanyak terjadi pada dekade 7 (6 penderita) dengan rentang usia 32 sampai 71 tahun dan terutama didapatkan pada penderita laki-laki (96,3 %). Pada tabel 1 secara deskriptif tampak bahwa rata-rata "*labeling index*" (LI) p53 semakin meningkat bersama dengan meningkatnya derajat histopatologi. Didapatkan rata-rata ekspresi protein p53 yang paling tinggi pada derajat histopatologi III (72,2%) berturut-turut kemudian derajat histopatologi II (45,6%) dan derajat histopatologi I (23,5%). Pada 3 lesi dengan urothelium jinak yang dipakai sebagai pembanding didapatkan LI p53 minimal (rata-rata 1,000% dengan rentang 0,0% - 3,0%) nilai LI p53 maksimal 100% didapatkan pada 2 dari 10 kasus KSTB derajat histopatologi II dan pada 4 dari 11 kasus KSTB derajat histopatologi III.

Setelah dilakukan analisis statistik dari data pada tabel 1 dengan "*One Way Anova*" diperoleh harga $p = 0,001$ ($p < 0,05$), yang berarti didapatkan perbedaan yang bermakna dari "*labeling index*" p53 pada berbagai derajat histopatologi.

Selanjutnya dilakukan prosedur LSD (*Least Significance Difference*) untuk komparasi multipel dan didapatkan hasil yaitu perbedaan LI p53 tidak signifikan antara lesi jinak dengan KSTB derajat histopatologi I dan KSTB derajat histopatologi I dengan KSTB derajat histopatologi II. Hal ini berarti ekspresi protein p53

tidak dapat dipergunakan untuk membedakan antara lesi jinak dengan KSTB derajat histopatologi I dan antara KSTB derajat histopatologi I dengan KSTB derajat histopatologi II. Terdapat perbedaan yang signifikan dari LI p53 lesi jinak dengan KSTB derajat histopatologi II dan III, serta antara KSTB derajat histopatologi I dan II dengan KSTB derajat histopatologi III. Hal ini berarti ekspresi protein p53 dapat dipergunakan untuk membedakan antara lesi jinak dengan KSTB derajat histopatologi II dan III serta antara KSTB derajat histopatologi I dan II dengan KSTB derajat histopatologi III.

PEMBAHASAN

Derajat histopatologi pada KSTB yang dipergunakan untuk memprediksi perilaku tumor, merupakan subyek perdebatan yang paling besar, karena masih terdapat reproduksibilitas yang jelek antara pengamat disebabkan kriteria penentuannya yang subyektif sehingga akurasinya pun kurang dan sangat tergantung pada pengamat. (2,4,8). Sampai saat ini banyak sistem derajat yang telah dipakai, mulai dari derajat menurut Ash 1940 (*Grade I-IV*) sampai sistem derajat terbaru dari *World Health Organization* (WHO) dan *International Society of Urological Pathology* (ISUP) yang diperkenalkan tahun 1998. (1,2). Akhir-akhir ini para peneliti banyak melakukan studi untuk menemukan hubungan antara derajat konvensional dengan marker progresifitas neoplasma yang lebih obyektif dan menggambarkan perilaku biologis sel kanker, seperti ekspresi Ki67 dan ekspresi p53 (8,9). Cina (2001), dalam penelitiannya menemukan bahwa sistem klasifikasi WHO/ ISUP yang baru menunjukkan peningkatan aktifitas proliferasi dan akumulasi produk gen supresor tumor p53 dari lesi urothelium jinak sampai KSTB yang *high grade* (9).

Di sentra Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo Surabaya dan RSUD dr. Saiful Anwar Malang, selama ini dipakai sistem derajat histopatologi WHO lama (1972) yang diadopsi dari sistem derajat histopatologi Mostofi, yang membagi KSTB dalam derajat histopatologi I, II, III dan menganggap papilloma sebagai derajat histopatologi 0.

Dari data derajat histopatologi penderita dalam penelitian ini didapatkan bahwa seluruh KSTB derajat histopatologi I termasuk dalam stadium superfisial ($P_{1a} - P_1$), hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa sebagian besar tumor derajat histopatologi II menurut Ash yang sesuai dengan derajat histopatologi I menurut Mostofi/ WHO 1972 adalah tumor superfisial, sementara tumor derajat histopatologi III dan IV menurut Ash yang sesuai dengan derajat histopatologi II dan III menurut Mostofi/ WHO 1972 adalah tumor yang *invasive* (1). Sesuai dengan hal tersebut, 6 dari 10 (60%) KSTB derajat histopatologi II dan 11 dari 11 (100%) KSTB derajat histopatologi III dalam penelitian ini menunjukkan stadium yang invasif ($P_2 - P_4$).

Pada sediaan-sediaan yang diteliti didapatkan bahwa pada lesi buli-buli dengan urothelium jinak ekspresi p53 sangat minimal (rata-rata LI 1%). Selanjutnya ekspresi p53 yang ditunjukkan sebagai presentase sel tumor yang intinya tercat coklat homogen dengan antibodi p53 (D07) makin meningkat dari KSTB derajat histopatologi I sampai KSTB derajat histopatologi III, hal ini menunjukkan bahwa pada KSTB yang derajat histopatologinya lebih tinggi terjadi frekuensi mutasi gen p53 yang lebih tinggi (10). Sebagaimana diketahui terdapat korelasi kuat

antara karsinoma urothelial dengan sejumlah perubahan sitogenetik dan molekular yang bersifat heterogen, yang tersering adalah monosomi kromosom 9 atau delesi 9p dan 9q, demikian juga delesi 17p, 13q, 11p dan 14q. (2,9,10,11). Mutasi gen p53 yang merupakan gen supresor tumor yang terdapat pada kromosom no. 17 p13.1 ditemukan pada 40%-60% karsinoma urothelial (9). Produk dari gen p53 berupa phosphoprotein seluler yang memiliki perangkat untuk menekan pertumbuhan tumor. Apabila terjadi mutasi pada gen p53, protein p53 mutan yang lebih stabil dengan "half life" yang lebih panjang dibanding protein tipe "wild" akan diproduksi.(2,8,9).

Akumulasi produk protein p53 yang mutan dalam inti merupakan indikasi adanya perubahan dalam sel dan perubahan ini dapat dideteksi dengan pemeriksaan immunohistokimia, sehingga pemeriksaan immunohistokimia terhadap protein p53 dapat memberikan bantuan dalam diagnosa keganasan. Beberapa peneliti yang mencari hubungan antara perubahan genotip dan fenotip p53 melaporkan adanya hubungan yang kuat antara deteksi immunohistokimia dari akumulasi p53 di inti dalam jaringan yang difiksasi formalin dan diblok parafin dengan adanya mutasi dalam gen p53 yang ditunjukkan lewat metode *Single Strand Conformational Polymorphism Analysis* (SSCP) (9,10).

Esrig dan kawan-kawan melaporkan bahwa 27 dari 32 (84%) tumor yang menunjukkan mutasi p53 dengan SSCP menunjukkan adanya reaktifitas p53 inti lebih dari sama dengan 10% sementara 12 dari 41 (29%) tumor tanpa mutasi p53 juga menunjukkan imunoreaktifitas p53. Hal ini membuat timbulnya dugaan bahwa immunohistokimia mungkin lebih sensitif daripada SSCP. Empat dari enam tumor dengan mutasi pada exon 5 tidak terdeteksi imunoreaktifitasnya, diduga heterogenitas dari imunoreaktifitas p53 berhubungan dengan lokasi mutasi gen p53 yang berbeda-beda. Berdasarkan penelitian sebelumnya selama ini ditetapkan nilai 10% sampai 20% sebagai "Cut point" untuk menyatakan imunoreaktifitas yang positif dari p53 inti (10). Apabila pada penelitian ini dipergunakan nilai "Cut Point" lebih dari sama dengan 20% untuk menyatakan imunoreaktifitas p53 yang positif maka didapatkan p53 lebih dari sama dengan 20% pada 50% KSTB derajat histopatologi I, 90% KSTB derajat histopatologi II dan 91% KSTB derajat histopatologi III.

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan LI (*Labeling Index*) p53 yang bermakna antara lesi urothelium jinak dengan KSTB derajat histopatologi II dan derajat histopatologi III hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menyebutkan bahwa ekspresi p53 yang kuat merupakan gambaran dari golongan "papillary carcinoma" baik yang *low grade* (sesuai dengan *grade* II WHO 1972) maupun *high grade* (sesuai dengan *grade* III WHO 1972), dan bahwa sebagian besar lesi urothelium jinak yang flat menunjukkan ekspresi p53 yang minimal (rata-rata LI 1,1%) (9). Namun menurut penelitian bisa didapatkan ekspresi p53 yang kuat (>20%) pada lesi yang tampaknya secara morfologis jinak, hal ini dapat merupakan indikasi adanya abnormalitas molekular dengan potensi progresif neoplasma atau terdapat lesi displasia maupun karsinoma di tempat lain yang tidak terbiopsi (9).

Pada penelitian ini ekspresi p53 juga menunjukkan perbedaan yang bermakna antara KSTB derajat histopatologi dan II dengan KSTB derajat histopatologi III, hal ini juga sesuai dengan penelitian-penelitian terdahulu (7,9,10). Menurut penelitian ekspresi p53 secara statistik bermakna untuk

membedakan dua kategori karsinoma papiler dalam klasifikasi WHO/ISUP (1998) yaitu *low grade* dan *high grade papillary carcinoma* (sesuai dengan *grade* II dan III menurut WHO 1972) (9).

Dalam penelitian ini ekspresi p53 pada KSTB derajat histopatologi I tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan ekspresi p53 pada KSTB derajat histopatologi II dan dengan lesi urothelium jinak, hal ini tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekspresi p53 dapat membedakan secara bermakna antara KSTB derajat histopatologi I (sesuai dengan *Neoplasma Urothelial of Low Malignant Potential* pada klasifikasi WHO/ISUP) dengan KSTB derajat histopatologi II (*Low Grade Papillary Carcinoma*) (9). Heterogenitas antara hasil-hasil penelitian yang didapat seperti di atas dapat disebabkan karena antibodi p53 yang digunakan berbeda, nilai standart yang dipakai berbeda, atau prosedur pemeriksaan yang berbeda. (11)

Pada keadaan ekspresi p53 tidak dapat membedakan 2 golongan derajat histopatologi seperti pada penelitian ini, maka pedoman utama untuk membedakan antara 2 golongan KSTB ataupun membedakan lesi jinak dengan KSTB derajat histopatologi I tetap menggunakan gambaran morfologi arsitektur maupun sitologi dari sel. Selain itu dapat diperiksa petanda proliferasi sel seperti Ki67 untuk membantu diagnosa KSTB dengan lebih tepat. (9)

Pada penelitian ini terdapat 3 KSTB derajat histopatologi I, 2 KSTB derajat histopatologi II dan 1 KSTB derajat histopatologi III yang LI p53 nya kurang dan sama dengan 20%. Ekspresi p53 yang rendah pada kasus-kasus tersebut dapat disebabkan hal-hal sebagai berikut:

1. Karsinogenesis KSTB pada kasus tersebut tidak melalui jalur mutasi gen p53
2. Terjadi mutasi p53 tetapi lokasi mutasinya tidak terdeteksi oleh jenis antibodi p53 DO 7 yang dipakai dalam penelitian ini. (2,11)

KESIMPULAN

1. Perbedaan yang bermakna dari Labeling Indeks protein p53 pada berbagai derajat histopatologi menunjukkan bahwa semakin tinggi derajat semakin tinggi pula ekspresi protein p53 dan bahwa sistem derajat histopatologi menurut WHO (1972) (Mostofi) dapat mencerminkan perilaku biologis sel kanker.
2. Tingginya ekspresi protein p53 dapat membantu diagnosa keganasan namun rendahnya ekspresi protein p53 tidak menjamin bahwa tidak terdapat keganasan.

SARAN

Pemeriksaan ekspresi protein p53 dapat dipergunakan untuk membantu diagnosa keganasan pada kasus KSTB yang meragukan secara klinis dan tidak jelas dengan pemeriksaan histopatologi rutin.

Perlu dilakukan penelitian prospektif lebih lanjut secara multi institusional melibatkan ahli patologi, ahli urologi, ahli radiologi dan ahli onkologi dalam skala yang lebih besar, dengan menetapkan protokol standart untuk evaluasi marker immunohistokimia, sehingga dapat diketahui pasti peranan p53 dalam penentuan prognosa dan penatalaksanaan Karsinoma Sel Transitional Buli-buli.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Rosai, J., *Urinary Tract in Ackerman's Surgical Pathology, Eight Edition, Mosby St, Louis, Missouri. 1996: 1185-1220.*
2. Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., *The Lower Urinary Tract in Pathologic Basis of Disease. Sixth Edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia. 1999: 997 – 1010.*
3. Anonymous, *Bladder Cancer., University of Pennsylvania Cancer Center, Oncolink. 2001: 1-12.*
4. Ikegami, S., Yoshimura, I., Tsuji, A., Seta, K., Kumura, F., Odajima, K., Asano, T., Hayakawa, M., *Immunohistochemical Study of P53 and Ki67 Overexpression In Grade 3 Superficial Bladder Tumor in Relationship to Tumor Recurrence and Prognosis. Pub Med. 2001 (Abstract).*
5. Krause, F.S., Feil, G., Bichler, K.H., *Immunohistochemical. Examination (Ki67, P53, nm 23) and DNA Cytophotometry Eberhard Karls-University of Tubinger, Germany. Pub Med. 2001 (Abstract).*
6. Gontero, P., Casetta, G., Zitella, A., Ballario, R., Pacchioni, D., Magnani, C., Muir, G.H., Tizzani, A., *Evaluation of P53 Protein Overexpression, Ki67 Proliferative Activity and Mitotic Index as Markers of Tumors Recurrence in Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder, in European Urology. Sep 2000: 38 (3): 287-286 (Abstract).*
7. Calvo, M., Rodrigues, M., Gamiz, O., Galan, P., Sanchez, S., Palenciano, B., Rodriguez, A., Davidson, G., Fernandez, J., *DNA Ploidy Determination With Flow Cytometry, Ki67 Index, and Overexpression of p53 Protein in 121 T1 Superficial Bladder Carcinoma. Retrospective Study. Correlation with Classic Variables, in Actas Urologica ESP. Nov-Dec 2000: 24 (10): 785-795 (Abstract).*
8. Leong, A., *Applied Immunohistochemistry for The Surgical Pathologist, Edward Arnold, Britain. 1993: 1 – 23.*
9. Cina, S.J., Weiss, K.J.L., Lecksell, K., Epstein, J., *Correlation of Ki-67 and P53 with The New World Health Organization/International Society of Urological Pathology Classification System for Urothelial Neoplasia, in Archieve Pathology Lab Med. May 2001: 125 (5): 646 – 651.*
10. Rabbani, F., Cordon, C., *Superficial Bladder Cancer: New Strategies in Diagnosis and Treatment, Mutation of Cell Cycle Regulators and Their Impact on Superficial Bladder Cancer, in Urologic Clinics of North America. February. 2000: 27 (1): 1-38.*
11. Olumi, A.F., *A Critical Analysis of The Use of p53 As A Marker for Management of Bladder Cancer, in Urologic Clinics of North America, February. 2000: 27: 75-80.*

Tabel 1 Persentase Sel yang Positif p53 (LI) pada Berbagai Derajat Histopatologi

No	Klasifikasi	Jumlah sampel	LI p53 (%)		
			Rata-rata	Standard deviasi	Rentang
1	Urothelium jinak	3	1,000	1,732	0,0 - 3,0
2	Grade I	6	23,500	17,556	3,0 - 49,5
3	Grade II	10	45,600	31,909	15,0 - 100,0
4	Grade III	11	72,227	30,166	13,5 - 100,0
	Total	30	F = 7,294	P = 0,001	(signifikan)

Tabel 2 Perbedaan Labeling Index p53 pada Berbagai Derajat Histopatologi dengan Prosedur LSD

Lesi yang dibandingkan	Nilai p	Keterangan
Jinak VS KSTB grade I	0,260	NS
Jinak VS KSTB grade II	0,021	S
Jinak VS KSTB grade III	0,001	S
KSTB grade I VS KSTB grade II	0,133	NS
KSTB grade I VS KSTB grade III	0,0062	S
KSTB grade II VS KSTB grade III	0,036	S

Keterangan : (S) = signifikan bila $p \leq 0,05$
(NS) = tidak signifikan bila $p > 0,05$