

HUBUNGAN ANTARA DERAJAT KEGANASAN HISTOLOGIS DENGAN DERAJAT INFILTRAT SEL T SITOTOKSIK PADA ADENOKARSINOMA PROSTAT

THE CORRELATION BETWEEN HISTOLOGIC GRADING AND DEGREE OF T CELL CYTOTOXIC INFILTRATION AMONG PROSTATIC ADENOCARCINOMAS

Irianiwati dan Harijadi¹

ABSTRACT

The correlation between cytotoxic T cells infiltrate and grade of malignancy is still controversial. Some tumors like: medullary breast cancer and pancreatic cancer, indicates a negative correlation between cytotoxic T cells infiltration and tumor progression, but the presence of cytotoxic T cells in anaplastic large cell lymphoma is not related to clinical outcome of the disease. The role of cytotoxic T cell infiltrates in prostatic adenocarcinomas is still unclear till now. The aim of this study was to find out the correlation between the amount of cytotoxic T cell infiltrates and histological grading of prostatic adenocarcinoma. Thirty paraffin block of prostatic adenocarcinomas were selected randomly and stained immunohistochemically with anti CD 8 and anti CD3 MoAB, counterstained with Harris Hematoxyline. The positive CD8 and CD3 of infiltrates intratumor and peritumor was counted and analyzed with one way Anova statistically. The result showed that there was a significant difference statistically ($P < 0,05$) the amount of cytotoxic T cell infiltrates intratumor among histological grading of prostatic adenocarcinomas. The highest number of cytotoxic T cells was found in the poorest differentiated prostatic adenocarcinoma. In the peritumor infiltrates there was no significant difference ($P > 0,05$) of these variables. As a conclusion, the poorest histological grading of prostatic adenocarcinoma has the most intratumor cytotoxic T cell infiltration.

Key words: cytotoxic T cells; CD8-CD3; histologic grading; prostatic adenocarcinoma

PENGANTAR

Adenokarsinoma prostat merupakan keganasan nomor dua tersering yang dijumpai pada laki-laki di Amerika Serikat, dan merupakan penyebab kematian ketiga terbanyak dari semua kematian akibat kanker (Jones, 1980). Setiap tahun diperkirakan lebih dari 300.000 kasus baru kanker prostat ditemukan, dan data epidemiologis menunjukkan bahwa kejadian kanker prostat cenderung meningkat terutama pada kelompok pria berusia lebih dari 50 tahun, dan kira-kira 70% terjadi pada usia antara 70-80 tahun (Meike and Smith, 1990). Kebanyakan kanker prostat muncul pada prostat bagian posterior, sehingga pada tahap awal sering tidak menimbulkan gejala gangguan pengeluaran air kemih, sehingga lebih dari 50% kanker prostat ditemukan sudah dalam stadium lanjut (Cotran *et al.*, 1999). Prognosis adenokarsinoma prostat dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah derajat histologis tumor dan respon imunitas penderita. Derajat histologis adenokarsinoma prostat dibagi menjadi tiga, yaitu derajat diferensiasi baik, sedang, dan buruk (Mostofi *et al.*, 1980). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa makin buruk derajat diferensiasi tumor, makin buruk prognosinya (Foster and Deshmukh, 1998)

Secara umum keganasan suatu tumor merupakan akibat proliferasi sel yang berlebihan dan rendahnya apoptosis sel. Salah satu faktor yang memacu proses apoptosis sel adalah sel T sitotoksik, dengan mensekresikan perforin dan protease granzyme B yang mampu memecah protein dan membunuh sel tumor (Heusel *et al.*, 1994). Sel T sitotoksik dapat diamati dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimiawi dengan antibodi monoklonal anti CD8.

¹ Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Populasi sel T sitotoksik pada stroma jaringan ikat di luar tumor dan di antara kelompok tumor dapat dihitung dengan membandingkan dengan populasi sel T yang diwarnai dengan antibodi monoklonal anti CD3

Pada kanker prostat, antigen yang memacu reaksi sitotoksik telah diketahui. Housseau *et al* (1999) berhasil menemukan *human prostate cancer associated antigen* pada membran sel adenokarsinoma prostat, namun peran sel T sitotoksik pada derajat keganasan histologis kanker prostat belum diketahui secara pasti. Dalam makalah ini akan dilaporkan hubungan infiltrat sel T sitotoksik dengan derajat histologis adenokarsinoma prostat.

CARA PENELITIAN

Diambil tiga puluh sediaan adenokarsinoma prostat secara acak dari blok parafin di Bagian Patologi Anatomi FK UGM. Semua sediaan dipotong dengan mikrotom, dicat dengan pengecatan hematoksilin eosin. Kemudian diperiksa dengan mikroskop untuk menentukan derajat diferensiasi tumor menurut WHO (Mostofi *et al.*, 1980). Sediaan yang terpilih diwarnai imunohistokimiawi dengan antibodi monoklonal anti CD8 dan CD3 menggunakan metoda streptavidin biotin dengan kit HistoSpan, dan chromogen DAB. Pulasan balik dilakukan dengan pewarnaan Hematoksilin Harris. Dihitung jumlah sel yang mengekspresikan CD8 dan CD3 baik diantara sel-sel tumor maupun pada jaringan ikat di luar sel tumor. Banyaknya sel positif CD8 dan CD3 di antara sel-sel tumor dihitung dengan menghitung banyaknya sel positif CD8 dan CD3 dari 100 sel tumor secara acak, sedangkan banyaknya sel positif CD8 dan CD3 di luar tumor dihitung terhadap 100 limfosit diluar tumor.

Perbedaan rerata jumlah sel T sitotoksik yang ditandai dengan antibodi anti CD 8 antara berbagai derajat histologis adenokarsinoma prostat dianalisis dengan analisis statistik Anova satu jalan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

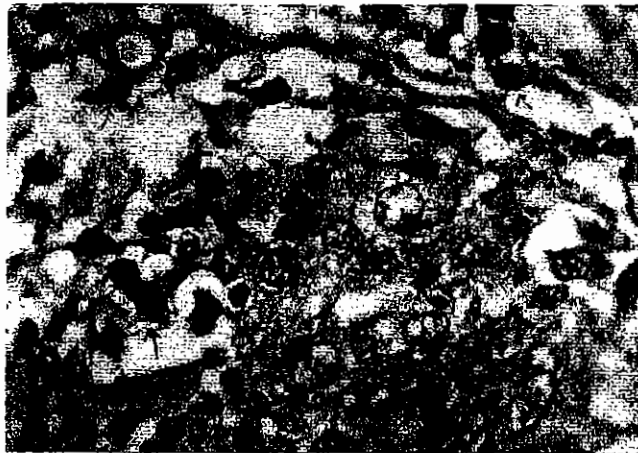
HASIL

Dari 30 sediaan adenokarsinoma prostat dengan rerata umur $63,26 \pm 8,33$ (54-82) tahun, berdasarkan derajat histologis tumor didapatkan 9 adenokarsinoma berdiferensiasi baik, 10 adenokarsinoma berdiferensiasi sedang, serta 11 adenokarsinoma berdiferensiasi jelek. Perbandingan rerata jumlah sel positif CD8 /CD3 dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan infiltrat sel T sitotoksik antara berbagai derajat diferensiasi adenokarsinoma prostat.

Karakteristik	derajat diferensiasi tumor			Anova
	Baik	sedang	Buruk	
Umur	$60,111 \pm 8,709$	$64,818 \pm 6,911$	$64,400 \pm 9,418$	F = 0,924 P = 0,409
CD8/CD3 Intratumor	$0,332 \pm 0,073$	$0,45 \pm 0,071$	$0,453 \pm 0,102$	F = 6,053 P = 0,007
CD8/CD3 Peritumor	$0,417 \pm 0,092$	$0,456 \pm 0,09$	$0,459 \pm 0,133$	F = 0,429 P = 0,655

Dari tabel 1 di atas terlihat bahwa tidak ada perbedaan rerata umur yang bermakna ($p > 0,05$) antara berbagai derajat histologis adenokarsinoma prostat. Tampak perbedaan infiltrat sel T sitotoksik intratumor yang bermakna ($p < 0,05$) antara berbagai derajat histologis, dan semakin buruk derajat histologis semakin banyak infiltrat sitotoksik. Hal serupa tidak dijumpai pada infiltrat sel T sitotoksik peri tumor ($p > 0,05$).



Gambar 1. Infiltrat sel T sitotoksik (sel positif CD8) diantara sel-sel tumor. Sel positif CD8 tampak berwarna coklat pada membran sel (perbesaran 1000 kali).

PEMBAHASAN

Apoptosis adalah kematian sel yang terjadi akibat aktifitas program kematian internal, yang dipacu oleh berbagai faktor, salah satunya adalah aktivitas sel T limfosit. Gen yang memacu apoptosis sel diantaranya adalah gena *Bax*, *Bad*, dan gena *p53*. Beberapa tumor terbukti menunjukkan adanya mutasi pada gena-gena tersebut, seperti adanya hubungan antara mutasi *p53* dengan agresivitas tumor kelenjar parotis (Gallo, *et al.*, 1994), serta kemampuan invasi dan metastasis karsinoma sel skuamosa esofagus (Wang, *et al.*, 1994). Pada karsinoma prostat, ekspresi *p53* mutan berhubungan dengan angka kemampuan hidup dan derajat keganasan histologis tumor (Stattin *et al.*, 1996).

Respon imun seluler terhadap antigen tumor diperantarai oleh sel-sel sitotoksik, secara invitro dapat diukur dengan esai pelepasan Cr radioaktif dengan menggunakan teknik biakan limfosit tercampur (*mixed lymphocytes culture*) (Beverley, 1998). Pada biakan tercampur tersebut, ternyata respon imun terhadap sel tumor dilakukan oleh sel T helper, sel T sitotoksik dan sel NK, tetapi hanya sel T sitotoksik dan sel NK yang berperan aktif pada proses sitotoksik tersebut (Rook, 1998).

Infiltrat sel T sitotoksik dapat dibedakan antara infiltrat intratumor dan peritumor. sel T sitotoksik intratumor berperan penting karena menunjukkan aktivitas sel T sitotoksik terhadap sel-sel tumor (Yakirevich, *et al.*, 1999). Sel T sitotoksik peritumor menunjukkan pola migrasi sel T sitotoksik menuju sel-sel tumor karena aktifitas kemoatraktan yang dilepaskan oleh sel-sel tumor (Rook, 1998). Aktifitas kemoatraktan tersebut, pada penelitian ini, agaknya tidak berhubungan dengan derajat histologis tumor. Hal tersebut masih perlu penelitian lebih lanjut. Penelitian pada karsinoma medulare payudara dan karsinoma duktal infiltratif juga menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna infiltrat sel T sitotoksik peritumor (Yakirevich *et al.*, 1999) Pada adenokarsinoma prostat, peran sel T sitotoksik belum diketahui dengan jelas. Dari tabel dapat dilihat bahwa tidak ada perbedaan rerata umur ($p > 0,05$) antara berbagai derajat histologis tumor, menunjukkan bahwa pemilihan blok parafin telah dilakukan secara acak. Selanjutnya, pada tabel tampak bahwa banyaknya sel sitotoksik T intratumor makin meningkat dengan makin tingginya derajat histologis tumor secara bermakna ($p < 0,05$). Semakin buruk derajat histologis tumor semakin banyak juga infiltrat sel T sitotoksik intratumor. Penelitian pada karsinoma medulare payudara menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel T sitotoksik dapat merupakan petanda membaiknya prognosis (Yakirevich *et al.*, 1999). Pada *Adult T cell Leukemia*, sel T sitotoksik kehilangan fungsinya (Ohshima *et al.*,

1999). Pada karsinoma pankreas, progresivitas ukuran kanker berkorelasi negatif dengan jumlah infiltrat sel T sitotoksik (Wenger *et al.*, 1999). Beberapa keterangan dibawah ini mungkin dapat menjelaskan perbedaan temuan tersebut.

Agar dapat membunuh sel tumor, selain terbentuknya ikatan antara reseptor sel T dengan MHC kelas I sel tumor, harus juga terbentuk ikatan tambahan antara LFA-1 sel T sitotoksik dengan ICAM 1 sel tumor, serta CD2 sel T dengan LFA-3 sel target. Jika ikatan-ikatan tambahan tersebut tidak terjadi, respon sitotoksik tidak akan bekerja (Rook, 1998). Padahal kebanyakan tumor, agar terhindar dari serangan respon imun, sel tumor ganas tidak mengekspresikan ICAM-1 sehingga ikatan tambahan tidak terbentuk; atau sel tumor menghasilkan musin yang bersifat anti adesif sehingga ikatan sel T sitotoksik dengan sel tumor tidak terjadi. Beberapa tumor bahkan tidak mengekspresikan MHC kelas I (Beverly, 1998). Housseau *et al.*, (1999) menunjukkan bahwa antigen kanker prostat dapat berikatan dengan reseptor sel T sitotoksik pada rantai alfa dan beta, tetapi tidak melewati MHC kelas I sel tumor. Masih belum jelas apakah bentuk ikatan tersebut menyebabkan respon sitotoksik tidak bekerja. Pada karsinoma kolorektal yang mengekspresi *Carcino Embryonic Antigen* (CEA) ternyata sel tumor resisten terhadap sel sitotoksik. karena CEA mencegah adesi sel sitotoksik dengan sel tumor (Prado *et al.*, 1995).

Berbagai penelitian membuktikan bahwa salah satu respon imun sel T sitotoksik terhadap antigen tumor dapat menyebabkan terbangkitnya program apoptosis melalui pelepasan Perforin dan Granzyme B (Cotran *et al.*, 1999). Perforin, suatu serin protease transmembran, dapat berikatan pada membran sel tumor dan menyebabkan terbentuknya porus pada membran sel tersebut. Jika porus sudah terbentuk, Granzym B akan dilepaskan oleh granula sitoplasma sel T sitotoksik, masuk melalui porus yang terbentuk, mengaktifkan *caspase* protein, akan menyebabkan fragmentasi DNA sel target dan menyebabkan pemecahan protein pada residu aspartat (Darmon, 1995), sehingga terjadi apoptosis. Pada *Anaplastic large cell lymphoma*, ekspresi sel sitotoksik ternyata tidak berhubungan dengan progresivitas tumor secara klinis. Hal itu mungkin disebabkan karena sel-sel pada *Anaplastic large cell lymphoma* resisten terhadap aktivitas perforin dan Granzyme B. Proses ini terjadi karena sel tumor menghasilkan inhibitor protease serin (Duker *et al.*, 1999). Pada adenokarsinoma prostat peristiwa serupa belum diketahui. Pengaruh ekspresi p53 dengan respon sitotoksik pada adenokarsinoma prostat juga belum diketahui.

Penelitian peran respon imun sel T sitotoksik pada pengobatan tumor ganas masih terus dilakukan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa resistensi sel-sel tumor terhadap apoptosis oleh sel T sitotoksik sering diikuti juga dengan resistensi terhadap apoptosis karena radioterapi dan khemoterapi (Dukers, *et al.*, 1999). Melihat hasil penelitian pada tabel diatas, perlu dilakukan uji resistensi sel-sel tumor terhadap apoptosis oleh sel T sitotoksik, dengan cara melihat aktivitas granzyme B dan perforin yang dihasilkan oleh sel T sitotoksik intratumor.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Semakin buruk derajat histologis adenokarsinoma prostat semakin banyak infiltrat sel T sitotoksik pada intratumor.

Saran

Untuk menjelaskan hubungan banyaknya infiltrat sel T sitotoksik intratumor dengan derajat diferensiasi adenokarsinoma prostat, perlu dilakukan penelitian aktivitas sel T sitotoksik dengan melihat ekspresi granzyme B dan perforin pada berbagai derajat diferensiasi adenokarsinoma prostat.

KEPUSTAKAAN

- Beverly, P. 1998 Tumour Immunology. *In* Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. : *Immunology*. P: 20.1. Mosby Philadelphia
- Cotran, R. S., Kumar. V., Collin, T. 1999 *Pathology Basis of Disease*, 6th eds. WB Saunders Company, Philadelphia
- Darmon, A. J. 1995 Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell derived granzyme B. *Nature*. 377:446
- Dukers, D. F., Ten Berge, R. L., Qudejans, J. J., Pulford, K., Hayes, D., Misere, J. F. M. M., Ossenkuppele, G. J., Jaspars, L. H., Willemze, R., Meijer, C. J. L. M. 1999. A cytotoxic phenotype does not predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphomas. *Clin Pathol*, 52: 129-36
- Foster, C. S. and Deshmukh, N. 1998 Grading prostate cancer. *In* Foster, C. S., Bostwick, D. G. (eds): *Pathology of Prostate*. P:191. W.B. Saunders. Philadelphia
- Gallo, O., Franchie, A., Bianchi, S., Boddi, V., Giannelli, E., Alajmo, E. 1994. P53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer*, 75:2037-43
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ., 1994. Cytotoxic Lymphocytes require Granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogenic target cells. *Cell*. 76-977.
- Housseau, F., Bright, R. K., Simonis, T., Nishimura, M. L., Topalian, S. L. 1999. Recognition of shared human prostate cancer -associated antigen by nonclassical MHC-restricted CD8 T cells. *J- Immunol*. Dec 1:163(11):6330-7
- Jones, G. W. 1980 Diagnosis and management of prostate cancer. *Cancer*, 51:2456-59
- Meike, A. W. and Smith, J. A. 1990 Epidemiology of prostate cancer. *J. Urol Clin North Am*. 17: 709
- Mostofi, F. K., Sesterhenn, I. A., Sobin, L. H. 1980 *International Histological Classification of Prostate Tumors*. World Health Organization, Geneva
- Ohshima, K., Haraoka, S., Suzumiya, J., Sugihara, M., Kanda, M., Shimazaki, K. 1999 Absence of cytotoxic molecules in CD8 and/or CD56- positive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Virchows-Arch*. Aug:435(2):101-4
- Prado, I. B.; Laudana, A. A., Carneiro, C. R. 1995. Susceptibility of colorectal carcinoma cells to natural killer lysis relationship to CEA expression and dedifferentiation. *J. Cancer*. 16: 854-60
- Rook, G. 1998. Cell-Mediated Immune Reactions. *In* Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. : *Immunology*. P:9.1. Mosby Philadelphia
- Stattin, P., Bergh, A., Karlberg, L., Nordgen, H., Damber, J. 1996 P53 immunoreactivity as prognostic marker for cancer specific survival in prostate cancer, *Eur Urol*. 30:65-72

- Wang, D. Y., Xiang, Y. Y., Tanaka, M., Li, X. R., Li, J. L., Shen, Q., Sugimura, H., Kino, I. 1994 High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer*. 74:3089-96
- Wenger, F. A., Jacobi, C. A., Zieren, J., Docke, W., Volk, H. D., Muller, J. M. 1999. Tumor size and lymph-node status in pancreatic carcinoma, is there a correlation to the preoperative immune function?. *Langenbecks-Arch-Surg*. 38(5):473-8
- Yakirevich, E., Izhak, O. B., Rennert, G., Kovacs, Z. G., Resnick, M. B. 1999 Cytotoxic phenotype of tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma of the breast. *Mod. Pathol*. 12(11):1050-56.