

Pewarnaan *nucleolar organizer region* (AgNOR) pada perubahan fibrokistik payudara

Ahmad Ghozali dan Harijadi

Bagian Patologi Anatomik, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta

ABSTRACT

Ahmad Ghozali dan Harijadi - *Nucleolar organizer region (AgNOR) staining on fibrocystic change of the breast.*

In the past the fibrocystic change of breast was considered as a precancerous lesion, consequently the management of a fibrocystic patient was often overdone. Later, after thorough researches, it has been histologically (Page classification) proven that only small part of the changes have high risk to become invasive carcinoma. The leading factor which increases the risk is the grade of proliferation of the gland epithelia. AgNOR stain is a staining method to evaluate cell proliferation activity which has been proven as one of tools for the assessment of the prognosis of several malignant tumors including breast cancer. In this study the amount of AgNOR in fibrocystic change was studied based on Page classification. Nineteen fibrocystic cases classified by Page were stained with colloidal silver. NORs were counted manually. The mean of AgNOR of each classification, normal gland, and carcinoma was compared. There were significant differences of AgNOR count found between each classification, normal gland and carcinoma. The AgNOR count of non proliferative lesion were 2.074 ± 0.320 , proliferative disease without atypia 2.416 ± 0.35 , atypical hyperplasia 2.876 ± 0.249 , normal gland 1.637 ± 0.330 , and in carcinoma 4.407 ± 0.340 . The result demonstrated that the AgNOR staining is a reliable marker for proliferation activity, and can differentiate atypical hyperplasia from carcinoma. The determination of AgNOR count can be done routinely to follow up and monitor the high risk lesions.

Key words: fibrocystic change - Page classification - nucleolar organizer.

ABSTRAK

Ahmad Ghozali dan Harijadi - *Pewarnaan Nucleolar Organizer Region (AgNOR) pada perubahan fibrokistik payudara*

Pada masa-masa lalu perubahan fibrokistik dianggap sebagai lesi prekanker, sehingga pengelolaan pasien sering berlebihan. Pada penelitian-penelitian kemudian, berdasarkan gambaran histologis (klasifikasi Page) hanya sebagian kecil saja perubahan fibrokistik yang berisiko tinggi untuk carcinoma invasif. Faktor yang paling berperan dalam peningkatan risiko adalah tingkat proliferasi sel epitelium kelenjar. Pewarnaan AgNOR adalah teknik untuk menilai aktivitas proliferasi sel yang sudah terbukti dapat membantu penentuan prognosis beberapa tumor ganas termasuk karsinoma payudara. Pada penelitian ini diteliti jumlah AgNOR pada lesi perubahan fibrokistik menurut klasifikasi Page. Sembilan belas kasus perubahan fibrokistik diklasifikasikan menurut Page. NOR dipulas dengan perak koloidal dan dihitung secara manual. Jumlah rata-rata AgNOR dihitung pada masing-masing klasifikasi dan dibandingkan. Selain itu dibandingkan pula jumlah AgNOR pada asini-duktuli kelenjar normal dan karsinoma duktal. Jumlah rata-rata AgNOR pada masing-masing klasifikasi berbeda secara bermakna, begitu pula perbedaan jumlah AgNOR pada lesi perubahan fibrokistik dengan kelenjar normal dan karsinoma. Jumlah AgNOR pada lesi non proliferasif $2,074 \pm 0,320$, penyakit proliferasif tanpa atipia $2,416 \pm 0,35$, hiperplasi atipik $2,876 \pm 0,249$, kelenjar normal $1,637 \pm 0,330$, dan pada karsinoma $4,407 \pm 0,340$. Variasi jumlah AgNOR mempunyai hubungan yang erat dengan klasifikasi Page. Jumlah AgNOR dapat membedakan masing-masing klasifikasi dan membedakan antara hiperplasi atipik dengan karsinoma. Penentuan jumlah AgNOR dapat dilaksanakan rutin untuk follow-up dan memonitor lesi yang berisiko tinggi.

PENGANTAR

Perubahan fibrokistik banyak ditemukan pada wanita dengan lesi jinak payudara.¹ Meskipun sifatnya jinak dan non neoplastik, lesi ini penting karena pada banyak wanita menimbulkan keluhan periodik yang sangat mengganggu. Di samping itu gambaran beberapa subtype lesi ini (terutama yang hiperplastik) menyerupai karsinoma baik secara klinis, radiografis, makroskopis maupun mikroskopis,² sehingga histologis lesi fibrokistik dengan proliferasi epitel berat kadang-kadang sukar dibedakan dengan karsinoma payudara. Begitu pula lesi ini sering dianggap sebagai kelainan yang mempunyai potensi keganasan untuk menjadi karsinoma.^{3,4,5,6,7,8} Keadaan-keadaan ini menyebabkan pengelolaan penderita dengan perubahan fibrokistik kadang-kadang berbelit-belit.^{9,10}

Penelitian yang dilakukan oleh Dupont dan Page menggunakan klasifikasi berdasar gambaran histopatologis (Klasifikasi Page), ternyata membuktikan bahwa tidak semua perubahan fibrokistik berisiko untuk menjadi karsinoma invasif.¹¹ Proliferasi epitel adalah faktor yang paling berperan dalam peningkatan risiko ini. Dari seluruh kasus yang diteliti oleh kedua penulis ini, sebagian besar (69,7%) lesi jinak payudara berupa lesi non proliferasi yang mempunyai risiko sama dengan populasi wanita normal. Lesi proliferasi tanpa atipia (26,7%) mempunyai risiko sebesar 1,9 kali. Hanya 4% saja, berupa lesi proliferasi dengan atipia, yang berisiko tinggi untuk menjadi karsinoma. Dari penelitian ini ditemukan pula faktor-faktor lain yang mempengaruhi risiko untuk menjadi karsinoma, yaitu riwayat keluarga, adanya kista dan status menopause.

Aktivitas proliferasi sel pada lesi jinak maupun ganas dapat diteliti dengan *thymidine uptake*, pemberian label bromodeoxy-uridine, sitometrik alur maupun imunohistokimia, misalnya Ki-67, PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) maupun MIB-1. Nucleolar organizer region (AgNOR) akhir-akhir ini banyak dipakai untuk mengukur aktivitas proliferasi. Cara pewarnaan AgNOR mudah dan biayanya rendah sehingga dapat dilakukan secara rutin dengan blok parafin. NOR adalah lengkung DNA yang menempati area khusus dalam kromosom 13,14,15,21 dan 22

yang diketahui sebagai tempat gena DNA ribosomal (rDNA). NOR penting dalam sintesis protein, membantu menjaga perpanjangan konfigurasi DNA dan mengatur transkripsinya. NOR mempunyai struktur nukleoprotein yang khas yang dipakai sebagai identifikasinya. Protein tersebut selama transkripsi bersifat argirofilik, sehingga dapat dipulas dengan perak. Pada sediaan blok parafin dengan pewarnaan perak koloid NOR tampak sebagai bercak-bercak gelap intranukleus pada mikroskop cahaya. Bercak-bercak itu disebut agregat argirofilik (AgNOR). Hasil pewarnaan AgNOR mempunyai korelasi yang tinggi dengan sitometri alur dan pewarnaan imunohistokimia misalnya Ki-67.^{12,13} Jumlah AgNOR sudah terbukti pula sebagai faktor prognostik dan pembantu diagnosis pada kasus kanker payudara, cervix uteri, meningioma dan tumor-tumor padat lain.^{13,14,15} Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi jumlah AgNOR pada masing-masing klasifikasi Page lesi perubahan fibrokistik.

BAHAN DAN CARA

Sejumlah sediaan blok parafin dengan diagnosis perubahan fibrokistik dikumpulkan untuk penelitian. Sediaan diambil dari arsip di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Sediaan yang sudah dipulas dengan hematoksin-eosin diperiksa kembali oleh peneliti pertama dan dikonfirmasi kembali oleh peneliti kedua. Perubahan fibrokistik kemudian digolongkan menurut klasifikasi Page. Dari sejumlah sediaan tersebut didapatkan 19 sediaan yang dianggap representatif. Untuk mengevaluasi pewarnaan AgNOR sediaan blok parafin dipotong setebal 3 μ m, kemudian dideparafinisasi dalam xylene dan didehidrasi. Pewarnaan AgNOR dilakukan dengan metode *one step*. Setelah sediaan dicuci dengan air distilat sediaan diinkubasi dalam pengembang koloidal yang mengandung satu bagian volume 2% gelatin dalam 1% larutan asam format dengan dua volume 50% larutan perak nitrat selama 45 menit dalam ruang gelap pada temperatur ruang. Sediaan kemudian dicuci dengan air distilat, didehidrasi dalam ethanol dengan konsentrasi bertingkat, dan ditutup dengan kaca penutup menggunakan medium sintetik. Pada pewarnaan ini tidak digunakan

counterstaining. Penghitungan dilakukan pada daerah lesi sesuai dengan klasifikasi Page. Jumlah AgNOR tiap sel dihitung hati-hati dengan mengubah fokus naik turun untuk melihat seluruh AgNOR dalam inti, dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100X lensa obyektif dalam minyak imersi. Pada tiap sampel dinilai 100 sel atau seluruh sel dalam satu duktus yang hiperplasi. Jumlah rata-rata AgNOR setiap inti sel (skor AgNOR) kemudian ditentukan. Sebagai pembanding diperiksa juga jumlah AgNOR pada sediaan karsinoma payudara dan asini kelenjar normal. Untuk menunjukkan perbedaan secara statistik antara jumlah rata-rata AgNOR dari masing-masing klasifikasi digunakan uji *Analysis of Variance*. Untuk menilai hubungan antara klasifikasi Page dengan skor AgNOR digunakan uji korelasi produk momen Pearson.

HASIL

Pada semua sediaan dapat terlihat bercak-bercak gelap yang tercatat perak. Semakin tinggi klasifikasi perubahan fibrokistik menurut Page semakin banyak jumlah bercak AgNOR di dalam inti. Perbedaan jumlah rata-rata bercak AgNOR setiap inti antara masing-masing klasifikasi secara statistik sangat bermakna ($p < 0,001$; TABEL 1).

TABEL 1. – Skor AgNOR pada masing-masing klasifikasi perubahan fibrokistik

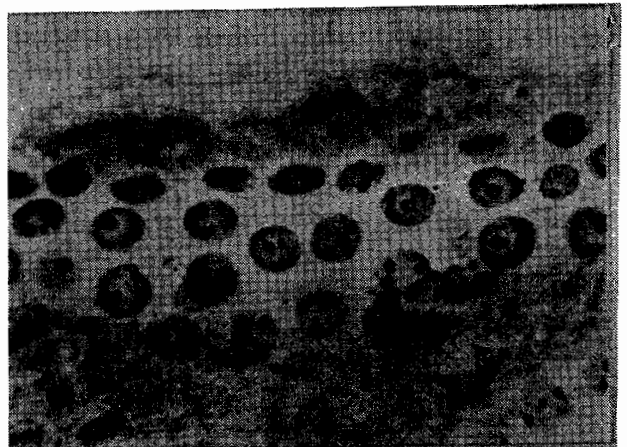
Klasifikasi	Jumlah sediaan	Rata-rata skor AgNOR ± SD	Kisaran skor minimum	Kisaran skor maksimum
LNP	5	2,074 ± 0,320	1,56	2,50
PPTA	9	2,416 ± 0,350	1,97	2,92
HA	5	2,876 ± 0,249	2,60	3,21
Ca	3	4,407 ± 0,340	3,95	4,75
Normal	3	1,637 ± 0,330	1,20	2,01

F=24,73 ; $p < 0,01$

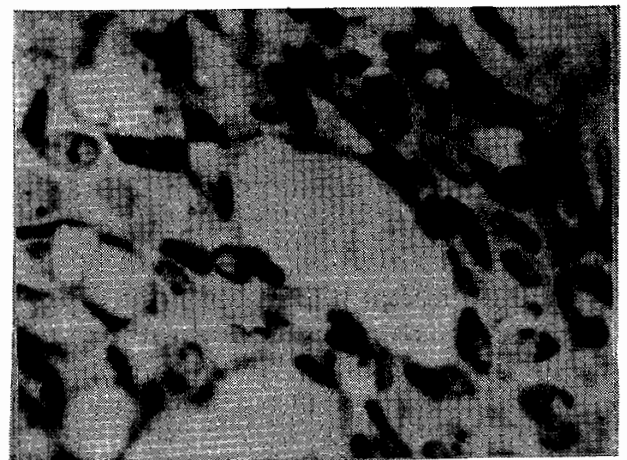
AgNOR: Argyrophilic nucleolar organizer region; LNP: Lesi non proliferasif (Page kelas 1, gambar 1); PPTA: Penyakit proliferasif tanpa atipia (Page kelas 2, gambar 2); HA: hiperplasi atipik (Page kelas 3, gambar 3); Ca: Karsinoma duktal in situ/infiltratif (gambar 4); SD standar deviasi.

Pada uji statistik ditemukan pula korelasi yang baik antara klasifikasi Page dengan skor AgNOR ($r=0,843$). Begitu pula antara klasifikasi Page dengan skor AgNOR terdapat hubungan kuat yang bermakna ($p < 0,001$).

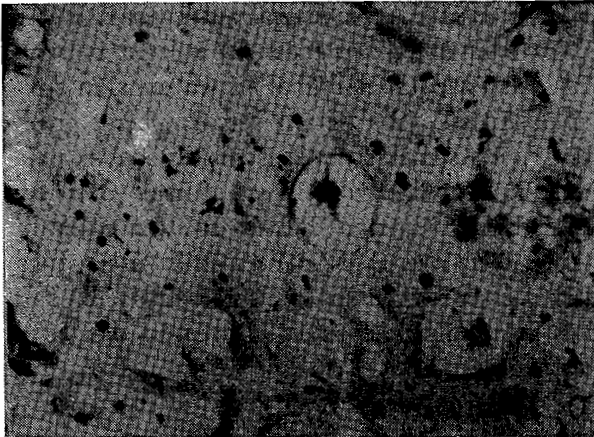
Pada lesi non proliferasif, yaitu lesi dengan proliferasi sel epitelium kelenjar yang ringan didapatkan skor AgNOR rata-rata sebesar $2,074 \pm 0,320$, lebih tinggi dari pada skor kelenjar normal. Dari tabel dapat juga dilihat bahwa semakin tinggi klasifikasi, yang berarti semakin berat proliferasi serta semakin atipik, semakin banyak pula jumlah rata-rata AgNOR. Pada sediaan yang berasal dari karsinoma duktal in situ/infiltratif jumlah rata-rata AgNOR semakin tinggi juga daripada sediaan perubahan fibrokistik (lebih dari dua kali sediaan lesi non proliferasif dan asini kelenjar normal).



GAMBAR 1. – AgNOR pada perubahan fibrokistik kelas Page 1. AgNOR tampak sebagai bercak-bercak kehitaman di dalam inti sel (perbesaran asli, lensa obyektif x100).



GAMBAR 2. – AgNOR pada perubahan fibrokistik kelas Page 2. Bercak AgNOR terlihat lebih banyak daripada lesi kelas 1 (GAMBAR 1) (perbesaran asli, lensa obyektif x100).



GAMBAR 3. - AgNOR pada perubahan fibrokistik kelas Page 3. Bercak AgNOR terlihat lebih banyak daripada kelas 1 dan 2 (gambar 1 dan 2) (perbesaran asli, lensa obyektif x100).



GAMBAR 4. - AgNOR pada karsinoma payudara jenis duktal, NOS, infiltratif diferensiasi jelek. Bercak AgNOR jauh lebih banyak dari pada lesi perubahan fibrokistik, dan dengan ukuran yang sangat bervariasi (perbesaran asli, lensa obyektif x100).

PEMBAHASAN

Berbagai macam pemeriksaan dapat dipakai untuk mengukur aktivitas proliferasi sel. Penghitungan mitosis merupakan cara tradisional untuk mengukur aktivitas proliferasi dan mempunyai kepentingan prognostik pada berbagai tumor. Cara lain yang banyak dipakai adalah sitometri alur dan imunohistokimia. Pewarnaan AgNOR dapat dipakai untuk mengukur proliferasi sel, de-

ngan biaya yang lebih murah dan cara yang lebih sederhana daripada pengukuran yang lain. Jumlah AgNOR dapat dihitung karena selama transkripsi, protein yang berkaitan dengan *organizer region* bersifat argirofilik dan dapat dipulas dengan pewarnaan perak. Karena hanya AgNOR yang sedang aktif transkripsi saja yang dapat dipulas, jumlah yang sebenarnya tidak dapat diketahui. Secara klinis hal ini tidak penting karena uji pewarnaan hanya difokuskan pada proliferasi sel. Hal yang menguntungkan adalah cara ini dapat dipakai untuk sediaan dengan fiksasi formalin, sehingga dapat untuk mengevaluasi sediaan-sediaan arsip blok parafin. Yang perlu diperhatikan dalam proses pewarnaan adalah lamanya waktu, karena bila terlalu cepat tidak semua AgNOR dapat tercatat, sedangkan bila terlalu lama bercak-bercak akan terlihat bergabung sehingga sukar dihitung.

Skor AgNOR berkorelasi tinggi dengan hasil pemeriksaan aktivitas proliferasi sel dengan cara lain. Sadi dan Barnack¹² menunjukkan bahwa skor AgNOR berkorelasi dengan skor Ki-67 pada karsinoma prostat. Sedangkan Borgiani *et al.*¹³ menunjukkan adanya korelasi antara skor AgNOR dengan ploidi dan fraksi fase S dengan sitometri alur pada karsinoma payudara jenis duktal. Skor AgNOR juga mempunyai nilai prediktif dan sebagai pembantu diagnosis pada berbagai tumor jinak dan ganas.^{13,14,15} Kunishio *et al.*¹⁵ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara skor AgNOR meningioma benigna rekuren dengan non rekuren. Skor pada meningioma yang rekuren lebih tinggi daripada non rekuren.

Pada penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa semakin tinggi klasifikasi perubahan fibrokistik, semakin tinggi pula skor AgNOR. Perbedaan skor pada masing-masing klasifikasi bermakna secara statistik. Perbedaan yang bermakna ditemukan pula antara skor lesi fibrokistik dengan skor dari asini-duktuli kelenjar normal dan karsinoma duktal. Penentuan klasifikasi Page didasarkan pada tingkat proliferasi sel epitel kelenjar. Hal ini dapat diartikan bahwa perbedaan tingkat proliferasi dari sel epitel menyebabkan juga perbedaan skor atau jumlah AgNOR. Jadi pada perubahan fibrokistik terjadi peningkatan aktivitas proliferasi yang pada penelitian ini dapat dilihat pada skor AgNOR. Pada lesi yang disertai atipia (hiperplasi

atipik) aktivitas proliferasi dan skor AgNOR semakin tinggi pula. Skor AgNOR paling tinggi ditemukan pada lesi yang sudah menjadi karsinoma.

Pada masa lalu perubahan fibrokistik dianggap sebagai lesi prekanker, sehingga dianggap berisiko tinggi untuk menjadi karsinoma, berdasarkan insidensi lokasi lesi, keberadaan lesi yang sering bersama-sama dengan karsinoma, dan riwayat lesi sebelumnya.^{3,4,5,6,7,8} Pada penelitian berikutnya yang diawali oleh Dupont dan Page¹¹ dibuktikan bahwa tidak semua lesi perubahan fibrokistik berisiko tinggi menjadi karsinoma, tetapi hanya lesi-lesi tertentu yaitu lesi hiperplasia atipik. Eratnya hubungan antara tingkat proliferasi epitel yang tinggi pada perubahan fibrokistik dengan karsinoma juga diamati oleh beberapa peneliti.^{6,16} Hasil penelitian Dupont dan Page di atas diperkuat lagi oleh London *et al.*¹⁷, dan Dupont *et al.*¹⁸ yang mengadakan penelitian prospektif dengan klasifikasi yang sama, dan hasil yang diperoleh kedua peneliti terakhir tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya.

Variasi dalam jumlah AgNOR dapat membantu menegakkan diagnosis dan dapat membedakan berbagai tingkatan lesi. Schwint *et al.*¹⁹ menunjukkan bahwa jumlah AgNOR dapat membedakan antara epitel mulut yang normal dengan epitel mulut di dekat karsinoma sel skuamus yang masih terlihat normal dan belum menunjukkan tanda-tanda displasia. Pada penelitian tersebut jumlah AgNOR dianggap dapat mendeteksi adanya perubahan selular sebelum perubahan morfologi terjadi, yaitu peningkatan aktivitas proliferasi pada mukosa mulut di dekat karsinoma sel skuamus. Kenaikan aktivitas proliferasi pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prekanker.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa variasi jumlah AgNOR merupakan tanda bahwa pada perubahan fibrokistik sudah mengalami perubahan selular, yaitu peningkatan proliferasi sel epitelium kelenjar. Di samping itu AgNOR adalah sarana pembantu yang dapat membedakan masing-masing klasifikasi dan ter-

utama membedakan antara hiperplasia atipik dengan karsinoma. Untuk sarana follow-up dan monitor kemungkinan adanya perubahan selular, khususnya pada lesi yang berisiko tinggi, pewarnaan AgNOR untuk menghitung jumlah AgNOR merupakan sarana yang murah, mudah dan dapat dikerjakan secara rutin.

KEPUSTAKAAN

1. Love SM, Gelman RS, Silen W. Sounding board: fibrocystic "disease" of the breast - a non disease? *N Engl J Med* 1982;307(16):1010-4.
2. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 7th ed. Washington DC: Mosby Company, 1989.
3. Franz VK, Pichen JW, Melcher GE, Auchinclass H Jr. Incidence of chronic cystic disease in so-called "normal breast". *Cancer* 1951;4:762-83.
4. Tellem M, Prive L, Meranze DR. Four quadrant study of breast removed for carcinoma. *Cancer* 1962;15:10-7.
5. Davis HH, Simons M, Davis JB. Cystic disease of the breast - relationship to carcinoma. *Cancer* 1964; 17: 957-78.
6. Kern WH dan Brooks RN. Atypical epitheloid hyperplasia associated with breast cancer and fibrocystic disease. *Cancer* 1969;24:668-75.
7. Pelletiere EV. The clinical and pathologic aspects of papillomatous disease of breast - a study of 97 patients treated by local excision. *Am J Clin Pathol* 1971; 55: 740-48.
8. Silverberg SG, Chitale AR, Levitt SH. Prognostic implications of fibrocystic dysplasia in breast removed for mammary carcinoma. *Cancer* 1972;29:574-80.
9. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommer SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from finding of the national surgical adjuvant breast project (protocol no:4). *Cancer* 1975; 36:1-84.
10. Hutter RV. Goodbye to "fibrocystic disease" (editorial). *N Engl J Med* 1985;312(3)179-81.
11. Dupont WD dan Page DL. Risk factor for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312(3):146-51.
12. Sadi NV, Barnack ER. Determination of growth fraction in advanced postate cancer. *J Urol* 1991;(Supll)
13. Borgiani L, Cogorno P, Oliviero J, Toso F, Gambini G, Turesi G, et al. AgNORs in ductal breast cancer: correlation with ploidy and s-phase fraction by DNA flow cytometry. *Eur J Histochem* 1994;38(2):171-6.
14. Miller B, Flax S, Dockter M, Photopulos G. Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994;74:3142-5.
15. Kunishio K, Okimoto T, Matsuhisa T, Maeshiro T, Furuta T, Matsumoto K. The significance of nucleolar organizer region (AgNOR) score in predicting meningioma recurrence. *Cancer* 1994;73:2200-5.
16. Franz VK, Pichen JW, Melcher GE, Auchinclass H Jr. Incidence of chronic cystic disease in so-called "normal breast". *Cancer* 1951;4:762-83.

17. London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA* 1992;267(7):941-4.
18. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993;71: 1258-65.
19. Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, Cabribni RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. *Cancer* 1994;73:2674-9.