

# Ekspresi Kalretinin Pada Diagnosis Sitologi Efusi Pleura dengan Gambaran Sitomorfologi Adenokarsinoma

Syeben Hezer , Indra Wijaya , Ika Pawitra Miranti , Meira Dewi Kusuma

Bagian Patologi Anatomi Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi  
Jalan dokter Soetomo no 16-18, Semarang 50231. Telp (024) 8441270 Pesawat: 4030 ,  
Email: iapismg@gmail.com

## ABSTRAK

*Metastasis adenokarsinoma adalah kasus yang paling sering dijumpai pada efusi pleura yang disebabkan oleh keganasan. calretinin sampai saat ini digunakan sebagai penanda untuk sel mesothel baik jinak maupun ganas. Calretinin digunakan terutama untuk membedakan mesothelioma dari suatu karsinoma atau metastasis keganasan lainnya. Namun beberapa penelitian membuktikan bahwa kalretinin tidak hanya positif untuk sel-sel mesothel tetapi dapat pula pada keganasan lain seperti metastasis adenokarsinoma atau squamous sel karsinoma. Penelitian ini bertujuan membuktikan terdapat ekspresi kalretinin pada efusi pleura dengan gambaran sitomorfologi suatu adenokarsinoma. Jenis penelitian ini adalah deskriptif observasional dengan desain cross sectional. Terdapat 20 blok sitologi dari efusi pleura yang memenuhi kriteria kemudian dilakukan pengecatan calretinin. Eksresi positif ditandai dengan tercatnya inti dan sitoplasma sel yang dicurigai ganas. Eksresinya dibaca oleh 2 orang spesialis Patologi Anatomi secara blindly. Eksresi calretinin negatif pada 6 sampel, positif I pada 8 sampel, positif II pada 2 sampel dan positif III pada 4 sampel. Terdapat eksresi calretinin pada efusi pleura dengan gambaran sitomorfologi suatu adenokarsinoma dengan tingkat positivitas yang berbeda-beda, hal ini menunjukan bahwa kalretinin bukan merupakan penanda yang spesifik dan sensitif untuk sel-sel mesothel baik jinak maupun ganas.*

**Kata kunci:** *Calretinin, Sitologi efusi, Adenokarsinoma*

## ABSTRACT

*Metastatic adenocarcinoma is the most common case in pleural effusions caused by malignancy. Up to recently, calretinin is used as marker for benign and malignant mesothelial. Calretinin used primarily to distinguish mesothelioma from metastatic carcinoma or other malignancies. However, some studies shown that not only calretinin positive for mesothelial cells but can also be in other malignancies such as metastatic adenocarcinoma or squamous cell carcinoma. This study aims to prove there are calretinin expression in pleural effusions with cytomorphic adenocarcinoma. This study is descriptive analytic study using cross sectional design. Twenty paraffin embedded cells of pleural effusion that meet the criteria were stained with calretinin. Positive reaction was defined as nuclear and cytoplasmic staining. The immunoreactivity was evaluated blindly by two pathologists. Calretinin staining was negative in 6 samples, positive I in 8 samples, positive II in 2 samples and positive III in 4 samples. There was calretinin expression in the pleural effusion with cytomorphic adenocarcinoma on different levels of positivities, this shows that calretinin is not a specific and sensitive marker for benign and malignant mesothel.*

**Keywords :** *Calretinin, Cytology effusion, Adenocarcinoma*

## Pendahuluan

Efusi pleura adalah penumpukan cairan dalam rongga pleura, yang merupakan ruang antara paru-paru dengan dinding dada bagian dalam. Setengah dari penderita kanker mengalami

metastasis ke ruang pleura dan menyebabkan terjadinya efusi . Lebih dari 75% penderita dengan efusi pleura curiga ganas disebabkan oleh metastasis yang berasal dari paru, ovarium atau lymphoma. Metastasis adenokarsinoma adalah

kasus yang paling sering dijumpai, pada pria paling sering berasal dari paru sedangkan pada wanita terutama berasal dari ovarium (Cancer Net., 2012; Ensani *et al.*, 2011; Muduly *et al.*, 2011).

Calretinin termasuk keluarga *EF-hand* merupakan suatu *calcium-binding protein*, keluarga *EF-hand* yang banyak dikenal yaitu *calbindin-D28k* (CB), *calretinin* (CR) and *parvalbumin* (PV). Calretinin pertama kali dikemukakan oleh Rogers pada tahun 1987 dengan meneliti sel-sel retina, penamaannya berdasarkan kesamaan struktur dengan Calbindin D28k, terletak pada kromosom 16. Calretinin berupa struktur *helix-loop-helix* yang mempunyai 269 – 271 asam amino dan berisi 6 rantai EF, 4-rantainya mengikat Ca<sup>2+</sup> dengan afinitas tinggi, 1 rantai mengikat Ca<sup>2+</sup> dengan afinitas rendah dan 1 rantai non-fungsional. Calretinin juga mempunyai afinitas terhadap ion Cu<sup>2+</sup> (Robinson *et al.*, 2005; Kuznicki *et al.*, 1995). Calretinin banyak ditemukan pada jaringan saraf pusat dan perifer, di sel-sel retina, pada sel-sel mesothel, kelenjar ekrin kulit, tubulus ginjal, sel Leydig dan sertoli dari testis, endometrium, stroma ovarium dan sel kortikal ginjal (Bobrowicz *et al.*, 2011; Invitrogen 2007; Lee *et al.*, 2006; Hiradfar *et al.*, 2012). Calretinin berperan dalam buffer fisiologis ion kalsium sitosol, transportasi kalsium dan perlindungan terhadap kelebihan ion kalsium (Hiradfar *et al.*, 2012).

Imunihistokimia calretinin sampai saat ini digunakan sebagai penanda untuk sel mesothel baik jinak maupun ganas. Menurut laporan lebih dari 95% positif pada mesothelioma tipe epithelial. Calretinin digunakan terutama untuk membedakan mesothelioma dari suatu karsinoma atau metastasis keganasan lain terutama yang memiliki gambaran mirip mesothelioma dari jaringan biopsi atau sitologi (Miller, 2003). Namun penelitian lain membuktikan bahwa kalretinin tidak hanya positif untuk sel-sel mesothel tetapi dapat pula pada keganasan lain seperti metastasis adenokarsinoma atau squamous sel karsinoma. Penelitian yang dilakukan oleh Barberis dengan pewarnaan anticalretinin menunjukkan 100% positif pada mesothelioma maligna dan 23% yang positif pada metastasis adenokarsinoma pada cairan pleura. Sebaliknya penelitian yang dilakukan Simsir 27% positif pada reaktif mesothelial, 35% pada mesothelioma maligna dan 48% positif pada adenokarsinoma (Chhieng

*et al.*, 2000). Menurut Nelson calretinin dapat positif 6-10% pada adenokarsinoma paru, 31-38% pada serous karsinoma dan 0-4% pada renal sel karsinoma, sedangkan squamous sel karsinoma dari paru calretinin dapat positif pada 23-39% kasus dengan tingkat positivitas yang berbeda-beda (Ordonez, 2005).

Penelitian ini bertujuan membuktikan terdapat ekspresi kalretinin pada efusi pleura dengan gambaran sitomorfologi suatu adenokarsinoma.

## Metode

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif observasional dengan desain *cross sectional*, ruang lingkup disiplin penelitian ini meliputi bidang ilmu Patologi Anatomi, khususnya sitologi cairan dan imunositokimia yang dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP/ RSDK Semarang.

Populasi penelitian meliputi penderita yang dirawat inap di Rumah Sakit Umum Dr. Kariadi Semarang periode Januari 2012 sampai Desember 2013 dengan diagnosis klinis efusi pleura yang disebabkan oleh metastasis adenokarsinoma dari paru atau tempat lain. Pemilihan sampel dilakukan dengan teknik sistematik yaitu dengan memilih blok sitologi yang memberi gambaran keganasan, serta memenuhi kriteria inklusi yaitu penderita yang dirawat inap di RSDK Semarang, mempunyai blok sitologi dengan gambaran metastasis adenokarsinoma, blok sitologi masih dapat dipotong 2-5 kali dengan tebal 2-3mm, dan kriteria eksklusi blok sitologi rusak atau tidak terdapat sel, blok sitologi sudah tipis dan hanya dapat dipotong 2 kali saja, Sediaan sitologi yang tidak dibuat blok. Didapatkan 20 blok yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Blok dipotong dan dilakukan pengecatan immunositokimia calretinin. Ekspresi calretinin merupakan skor ekspresi calretinin positif pada sel ganas, dengan pemeriksaan imunositokimia, berdasarkan persentase sel ganas yang tercat pada inti dan sitoplasma (Ensani *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001), yaitu negatif = tidak tampak sel ganas yang tercat, positif I = 1-25% tercat pada sel ganas, positif II = 26-50% tercat pada sel ganas, positif III = 51-100% tercat pada sel ganas (Chhieng *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001; Ordonez

*et al.*, 2006). Dengan melihat pada 10 lapang pandang menggunakan pembesaran 400x secara acak, kemudian dibaca oleh dua dokter spesialis Patologi Anatomi secara *blindly* selanjutnya dibandingkan dengan menggunakan test Kappa. Slide dibaca menggunakan mikroskop Olympus PX51, pembesaran lensa okuler 10x dan lensa obyektif 40x.

Sitomorfologi adenokarsinoma pada cairan efusi berupa smear yang hiperseluler, dengan sel-sel ganas yang tersebar atau berkelompok memberi gambaran dua atau tiga dimensi, ada pula yang tersusun asiner, sel tersebut memiliki inti yang pleiomorfik, hiperkromatik, anak inti prominen, mitosis abnormal dapat ditemukan, serta kadang ditemukan sel-sel dengan bentukan yang aneh/*bizarre* (Gray W & Kocjan, 2010).

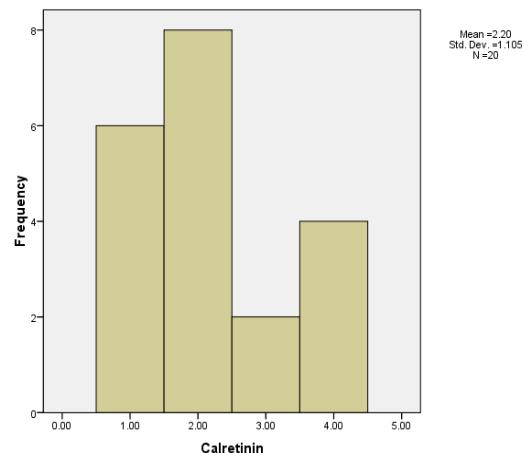
## Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini menggunakan 20 sampel blok sitologi, kemudian dilakukan pengecatan calretinin. Hasil pengecatan di baca oleh dua dokter spesialis Patologi Anatomi, independen selanjutnya dibandingkan dengan menggunakan test Kappa. Nilai kappa yang diperoleh adalah 0,88.

**Tabel 1.** Nilai Mean, median dan modus dari ekspresi Calretinin

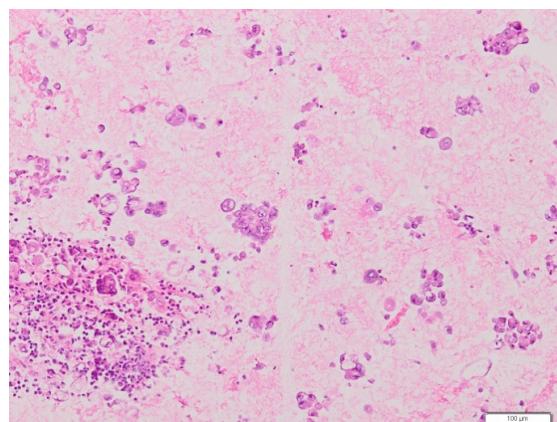
|                     | Mean | Media | Modus |
|---------------------|------|-------|-------|
| Ekspresi Calretinin | 2,2  | 2,0   | 2     |

Pada tabel 1. terlihat nilai mean, median dan modus ekspresi calretinin dan pada 20 sampel blok sitologi dengan penilaian 1= negatif, 2= positif I, 3= positif II dan 4= positif III.

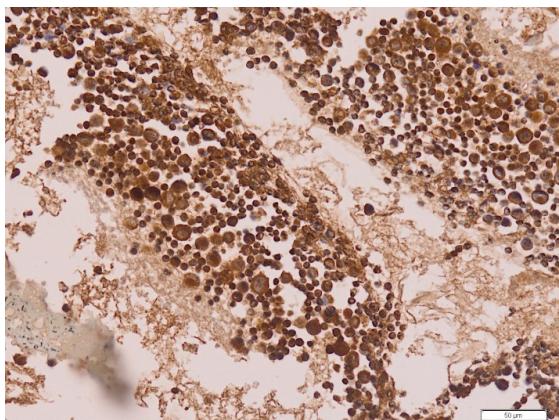


**Tabel 2.** Frekuensi ekspresi calretinin

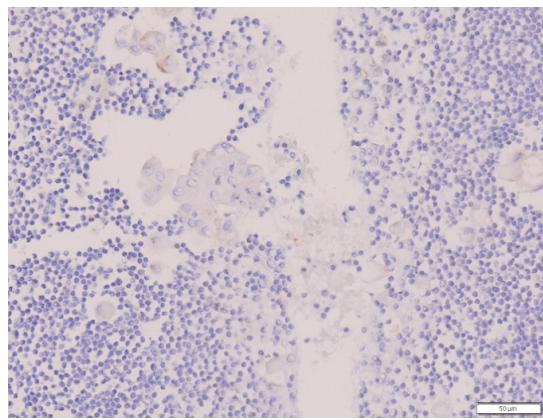
Pada tabel 2 terlihat bahwa frekuensi ekspresi calretinin terbanyak adalah positif I yaitu sebanyak 8 sampel atau 40%, sedangkan yang paling sedikit positif II sebanyak 2 sampel atau 10%.



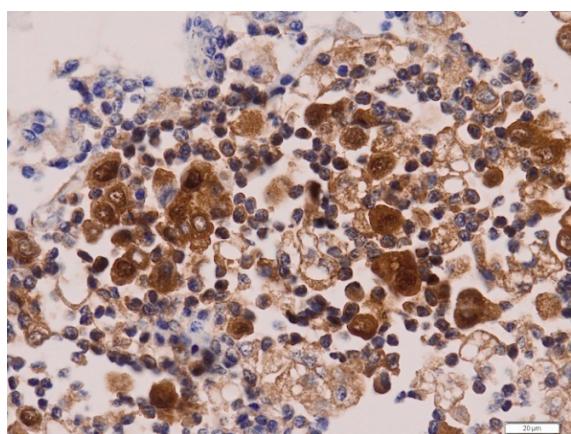
**Gambar 1.** Pengecatan HE pada blok sitologi dengan pembesaran 20x, panah menunjukkan kelompok sel yang mencurigakan keganasan



**Gambar 2.** Pengecatan calretinin pada blok sitologi dengan pembesaran 200x, menunjukkan kontrol positif pada sel-sel mesothel



**Gambar 4.** Pengecatan calretinin pada blok sitologi dengan pembesaran 200x, panah menunjukkan kelompok sel curiga ganas tidak tercat (-)



**Gambar 3.** Pengecatan calretinin pada blok sitologi dengan pembesaran 400x, panah menunjukkan sel-sel curiga ganas tercat positif

### Pembahasan

Dari 20 sampel yang digunakan, 14 sampel berekspsi positif atau 70%, sedangkan 6 sampel atau 30% negatif. Dari 14 sampel tersebut 8 sampel atau 40% positif I, 2 sampel atau 10% positif II dan 4 sampel atau 20% positif III. Nilai positif ditandai dengan tercatnya inti dan sitoplasma sel yang dicurigai sebagai sel ganas.

Pada 14 sampel yang bereaksi positif menunjukkan sel-sel tersebut mengandung calretinin, dengan tingkat positivitas yang berbeda-beda sedangkan pada 6 sampel yang negatif menunjukkan sel-sel tersebut tidak mengandung kalretinin. Secara teoritis calretinin terdapat terutama pada sel-sel saraf pusat dan perifer juga pada sel mesothel normal maupun keganasan (Kuznicki *et al.*, 1995), Namun pada beberapa penelitian menunjukkan adenocarcinoma, squamous cell carcinoma atau tumor lain juga dapat bereaksi positif pada pewarnaan dengan calretinin (Chhieng *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2001).

Pada penelitian ini didapatkan 70% sampel yang digunakan berekspsi positif, hal ini menunjukkan bahwa kalretinin tidak hanya terdapat pada sel-sel mesothel, tetapi dapat pula ditemukan pada adenokarsinom. Terdapat 20% dengan nilai positif III atau lebih dari 50% sel tumor yang ditemukan tercat positif, hasil ini bertentangan dengan apa yang dikemukakan oleh

Nelson yang mengatakan bahwa meskipun pada adenokarsinoma hasilnya dapat positif namun nilai positivitasnya rendah atau hanya bersifat fokal dibandingkan pada mesothelioma malignan dimana didapatkan positif kuat dan difus pada semua sel ganas (Ordonez, 2005). Terdapat juga hal-hal yang dapat mempengaruhi hasil diagnosis diantaranya antibodi yang digunakan, prosedurnya, serta jumlah sel ganas yang ditemukan, serta yang terpenting adalah gambaran sitomorfologi sel-sel yang didapat benar-benar merupakan gambaran adenokarsinoma bukan suatu mesothel reaktif (Yahya *et al.*, 2013). Kelemahan pada penelitian ini adalah jumlah sel ganas pada tiap sampel tidak sama, sehingga dapat mempengaruhi persentasinya.

Melihat hasil tersebut maka penggunaan kalretinin secara tunggal untuk membedakan mesothelioma dari suatu karsinoma atau metastasis keganasan lain terutama yang memiliki gambaran mirip mesothelioma dari jaringan biopsi atau sitologi perlu dipikirkan lagi. Perlu juga diingat belum ada satu immunohistokimia marker yang benar-benar 100% spesifik dan sensitif (Relan *et al.*, 2013).

### Simpulan

Terdapat ekspresi calretinin pada efusi pleura dengan gambaran sitomorfologi suatu adenokarsinoma dengan tingkat positivitas yang berbeda-beda, hal ini menunjukkan bahwa kalretinin bukan merupakan penanda yang spesifik dan sensitif untuk sel-sel mesothel baik jinak maupun ganas.

### Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan menggunakan sampel yang lebih besar.

### Daftar Pustaka

- Bobrowicz TW, Lowendowska E, Stepien T, Szpak Gm. 2011. Differential expression of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin in the cerebellum of pups of ethanol-treated female rats. *Folia Neuropathol* , 49 (1): 47-55
- Cancer Net. Fluid Around the Lungs or Malignant Pleural Effusion. [homepage on the Internet]. 2012 [cited 2014 Feb 27]. Available from: Oncologist-approved cancer information from the American Society of Clinical Oncology Web site: <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/side-effects/fluid-around-lungs-or-malignant-pleural-effusion>.
- Chhieng DC, Yen H, Schefer D, Cangiarella Jf, Jagindar J, Chiriboga La, *et al.* 2000. Calretinin Staining Pattern Aids in the Differentiation of Mesothelioma from Adenocarcinoma in Serous Effusions. *American Cancer Society*, 90(3):194-200.
- Ensani F, Nemetizadeh F, Irvanlou G. 2011. Accuracy of Immunohistochemistry in Evaluation on Malignant Pleura and Peritoneal Effusion. *Pol. J Patho*, 2:95-100.
- Foster MR, Johnson JE, Olson SJ, Allred C. 2001. Immunohistochemical Analysis of Nuclear Versus Cytoplasmic Staining of WT1 in Malignant Mesotheliomas and Primary Pulmonary Adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* , 125:1316-20.
- Gray W & Kocjan C Diagnostic Cytopathology. 3rd ed. China: Livingstone Elsevier; 2010.
- Hiradfar M, Sharifi M, Khajedaluee M, Zabolinejad N, Jamshidi St. 2012. Calretinin Immunohistochemistry: An Aid in the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *Iran J Basic Med Sci*., 15(5):1053-9.
- Invitrogen A. Rabbit anti-Calretinin. [homepage on the Internet]. 2007 [cited 2014 Feb 27]. Available from: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/081211\\_Rev0808.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/081211_Rev0808.pdf)
- Kuznicki, J, Wang TL, Martin BM, Winsky L, Jacobowitz Dm. 1995, Localization of Ca<sup>2+</sup>-dependent conformational changes of calretinin by limited tryptic proteolysis, *Biochem. J.* . 308:607-12.
- Lee ES, Leong AS, Kim YS, Lee Jh, Kim I, Ahn Gh. 2006. Calretinin, CD34, and a-smooth muscle actin in the identification of peritoneal invasive implants of serous borderline tumors of the ovary. *Modern Pathology*, 19:364-72.
- Miller RT. Calretinin. [serial on the Internet]. 2003 [cited 2014 Feb 27]. Available from: [http://www.ihcworld.com/\\_newsletter/2003/focus\\_feb\\_2003.pdf](http://www.ihcworld.com/_newsletter/2003/focus_feb_2003.pdf)
- Muduly DK, Deo SV, Kallapur AA, Shukla. 2011, An Update in the Management of Malignant Pleural Effusion. *Indian J Palliat Care*, 17(2):98-103

- Ordonez NG, 2005, Immunohistochemical Diagnosis of Epithelioid Mesothelioma An Update, *Arch Pathol Lab Med*, 129:1407-14.
- Ordonez NG, 2006, The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epithelioid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. *Modern Pathology*, 19:417-28.
- Relan V, Morrison L, Parsonson K, Clarke Be, Duhig Ee, Windsor Mn, et al. 2013. Phenotype and Karyotype of Human Malignant Mesothelioma Cell Lines. *Plos One*, 8(3):1-8.
- Roberts F, Downie IR, Harper CM, Burnett Ra. 2001, Immunohistochemical Analysis Still Has a Limited Role in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma. *Am J Clin Pathol*. 116:253-62.
- Robinson BW, Lake RA. 2005, Advances in Malignant Mesothelioma, *NEJM*, 353(15):1591-603.
- Yahya ZM, Ali HH, Hussein HG. 2013, Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Immunohistochemical Marker in the Differential Diagnosis of Effusion Cytology. *Oman Medical Journal*, 28(6):410-6.