

Analisis Hubungan antara Ekspresi MMP-2 dengan Derajat Neoplasia Serviks pada Pap Smear Berbasis Cairan

Marini Stephanie, Lisnawati, Rahmiati

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Cipto Mangunkusumo
Jakarta

ABSTRAK

Latar belakang

MMP (*matrix metalloproteinase*) merupakan protease yang memiliki peran yang sangat penting pada proses invasi dan metastasis. Seiring dengan perkembangan pengetahuan mengenai aktivitas MMP dan matriks ekstraseluler, MMP dipikirkan juga ikut berkontribusi dalam lesi-lesi intraepitelial neoplasia serviks, salah satu diantaranya adalah MMP 2. MMP 2 merupakan salah satu anggota kelompok gelatinase yang sering dilaporkan kaitannya dengan progresifitas lesi kanker serviks, yang penelitiannya pada umumnya dilakukan pada jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan ekspresi MMP 2 dengan derajat neoplasia serviks yang dilakukan pada bahan sitologi berbasis cairan.

Metode

Penelitian ini dilakukan secara prospektif, menggunakan studi deskriptif analitik dengan disain potong lintang pada sediaan pap smear berbasis cairan yang telah didiagnosis sesuai dengan klasifikasi Bethesda 2001. Kasus dengan papsmear abnormal akan dilanjutkan dengan imunositokimia MMP 2.

Hasil

Terdapat hubungan bermakna antara ekspresi MMP 2 dengan derajat neoplasia serviks ($p=0,001$).

Kesimpulan

Ekspresi MMP 2 dapat ditemukan pada lesi atipikal, prekanker dan kanker invasif pada serviks. Tampak proporsi positifitas ekspresi MMP 2 lebih tinggi secara bermakna pada lesi derajat tinggi dibandingkan pada lesi derajat rendah.

Kata kunci: MMP 2, derajat neoplasia serviks, pap smear berbasis cairan.

ABSTRACT

Background

MMP (*matrix metalloproteinase*) is a protease which have important role in the invasion and metastatic process. Recent study of the activity and extracellular matrix of MMP, especially MMP-2 is suspected contribute in the cervical intraepithelial neoplasia MMP-2 is one of the gelatinase group, that have been reported having correlation with cervical cancer progresivity. Many studies concerning the activity of MMP-2 in the tissues had been done. The aim of this study is to learn the relation of MMP-2 expression with cervical neoplasia grading using liquid base cervical cytology specimen.

Methods

This is a prospective study by cross sectional analysis using liquid base cytology slides, that was diagnosed according the Bethesda 2001 classification. All cases were reviewed and the abnormal cases were continued to immunocytochemistry staining using MMP-2 antibody.

Results

There were significantly association between MMP 2 and degree of neoplasia cervical lesion with $p=0.001$.

Conclusion

MMP 2 expression can occur in atypical, precancer and cancer lesions of the cervix. It was shown that high grade cervical lesions had higher proportion of MMP 2 positivity than low grade cervical lesions significantly.

Key words : MMP 2, degree of neoplasia cervical lesions, liquid based cytology.

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan tumor ganas kedua tersering pada wanita di seluruh dunia. Walaupun demikian insiden kanker serviks telah menurun pada 3 sampai 4 dekade terakhir berkat program skrining, penurunan paritas dan meningkatnya kesejahteraan hidup.^{1,2} Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia tahun 2008 mencatat 2.638 kasus kanker serviks (13,07%), dan merupakan urutan kedua dari 10 kanker tersering di Indonesia.³

Sebagian besar kanker serviks disebabkan oleh infeksi HPV (*Human papilloma virus*). DNA HPV diidentifikasi pada 95-99% kasus kanker serviks. Umumnya kanker serviks berkembang secara bertahap, diawali dengan lesi prekanker berupa CIN/*cervical intraepithelial neoplasia* hingga karsinoma invasif.⁴ Sampai saat ini pap smear merupakan metode skrining yang paling berhasil dalam deteksi dini lesi-lesi prekanker serta dalam menurunkan insiden kanker serviks. Selain pap smear konvensional (*conventional papsmear/CP*), para ahli juga telah mengembangkan metode skrining sitologi berbasis cairan (*liquid-based cytology/LBC*) yang diharapkan memiliki kualitas yang lebih baik dari pendahulunya. Berbagai keuntungan dari LBC antara lain meningkatnya kualitas sediaan dan sisa suspensi sel dapat dipakai untuk pemeriksaan lainnya seperti *genotyping* HPV dan tes molekular lainnya.⁵

Pada proses invasi dan metastasis, MMP (*matrix metalloproteinase*) merupakan protease yang memiliki peran yang sangat penting, dengan mendegradasi matriks ekstraseluler (MES) dan membran basal, sehingga membuka jalan bagi invasi dan memfasilitasi migrasi sel tumor. MMP merupakan kelompok *zinc dependent endoproteinase* yang memiliki berbagai aktivitas antara lain degradasi matriks ekstraseluler, proteolisis molekul permukaan sel, induksi migrasi sel dan pelepasan faktor pertumbuhan dari MES. Saat ini lebih dari 25 enzim telah diidentifikasi sebagai MMP sesuai dengan spesifisitas substrat masing-masing.⁶⁻⁸

Hingga saat ini overekspresi MMP-2 pada kanker serviks yang dikaitkan dengan progresivitas dan prognosis telah banyak dilaporkan. Seiring dengan berkembangnya pengetahuan mengenai matriks ekstraseluler dan aktivitas MMP, para ahli memikirkan bahwa MMP-2 berperan pula dalam tahap awal perkembangan

tumor, yaitu pada lesi-lesi intraepitelial neoplasia serviks. Hal ini didukung oleh adanya peningkatan ekspresi MMP-2 baik pada lesi prekanker dan kanker serviks yang sejajar dengan peningkatan derajat neoplasia serviks.⁸⁻¹⁰

Sheu dkk¹⁰ mendemonstrasikan overekspresi MMP2 dan MMP9 pada lebih dari 90% kasus karsinoma sel skuamosa, 83-100% kasus HSIL, dan 13% kasus LSIL. No dkk¹¹ melaporkan proporsi positifitas MMP-2 sebesar 40% pada LSIL/CIN1, 66,7% pada CIN2 dan 31,6% CIN3. Perbedaan hasil ekspresi MMP-2 pada berbagai derajat lesi neoplasia serviks, terutama pada lesi derajat rendah, serta perbedaan hasil analisis antara hubungan ekspresi MMP-2 dengan progresifitas penyakit, memerlukan kajian yang lebih lanjut.

Penilaian ekspresi MMP pada kanker serviks umumnya dilakukan melalui pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan, sehingga terbatas sekali data-data mengenai imunositokimia MMP pada sediaan *pap smear*. Oleh karena itu kami melakukan pemeriksaan imunositokimia MMP-2 pada berbagai derajat neoplasia serviks di sediaan *pap smear* berbasis cairan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara ekspresi MMP 2 dan derajat neoplasia serviks.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara prospektif, menggunakan studi deskriptif analitik dengan disain potong lintang. Penelitian diawali dengan mengumpulkan sediaan pap smear berbasis cairan (*liqui prep*TM, *thin prep*TM) yang berasal dari berbagai rumah sakit di Jakarta dan yang telah didiagnosis sebagai lesi atipikal, lesi prekanker dan kanker sesuai dengan klasifikasi Bethesda 2001,¹² yaitu ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*), ASC-H (*atypical squamous cells cannot exclude HSIL*), LSIL (*low grade squamous intraepithelial lesions*), HSIL (*high grade squamous intra-epithelial lesions*), adenokarsinoma insitu (AIS) dan karsinoma invasif/karsinoma sel skuamosa (KSS). Seluruh sediaan dievaluasi kembali dan pada kasus papsmear abnormal akan dilanjutkan dengan pemeriksaan imunositokimia MMP 2. Pemilihan sampel dilakukan secara konsekutif berdasarkan kriteria inklusi yaitu sediaan kasus pap smear berbasis cairan yang abnormal, yaitu lesi atipikal, lesi prekanker dan kanker. Kriteria

eksklusi adalah sediaan mempunyai jumlah sel abnormal yang tidak cukup untuk dilakukan pulasan. Total jumlah sampel yang didapatkan berjumlah 60 kasus dan 5 kasus diantaranya dikeluarkan dari penelitian karena sediaan tidak adekuat untuk dilakukan pemeriksaan.

Metode pulasan imunositokimia MMP 2

Sediaan direndam dalam xylol 3-5 hari, kemudian dilanjutkan rehidrasi. Dilakukan *blocking endogenous peroxidase* selama 30 menit dan *blocking background snipper* (*Starr Trek Universal HRP Detection Kit Biocare®*) selama 30 menit. Dilakukan inkubasi dengan antibodi *mouse monoclonal* anti MMP 2 (*abcam®*) 1/1000 selama 1 jam. Dilanjutkan dengan antibodi sekunder *biotinylated universal link* (*Starr Trek Universal HRP Detection Kit Biocare®*) selama 20 menit, *trekavidin* (*Starr Trek Universal HRP Detection Kit Biocare®*) selama 10 menit dan DAB (*diaminobenzidin tetrahydrochloride*) selama 1-2 menit. Dilakukan *counterstain* dengan Hematoxylin Mayer, dehidrasi dan clearing. Kontrol positif dan negatif disertakan setiap kali melakukan pulasan.

Penilaian Ekspresi MMP 2

Penilaian ekspresi MMP 2 dibagi menjadi 2 kelompok yaitu positif dan negatif. Positivitas pulasan protein MMP 2 dinilai dengan melihat warna coklat pada sitoplasma. Ekspresi MMP 2 disebut positif bila ditemukan pada minimal 1 sel yang abnormal yang terwarnai coklat sedang atau kuat pada sitoplasma. Ekspresi MMP 2 disebut negatif bila tidak terwarnai coklat atau terwarnai coklat lemah pada sitoplasma sel yang abnormal.^{11,13-15}

Analisis data

Pada analisis statistik, lesi derajat neoplasia serviks dibagi menjadi 2 kelompok yaitu lesi derajat rendah (ASCUS, ASCH, LSIL) dan lesi derajat tinggi (HSIL, AIS, karsinoma sel skuamosa), yang kemudian dihubungkan dengan hasil ekspresi MMP 2 dalam tabel 2x2 menggunakan uji *chi square* dan dilanjutkan dengan uji *Fisher* bila tidak memenuhi syarat.

HASIL

Seluruh kasus yang didapatkan adalah 55 kasus terdiri atas 6 ASCUS, 1 ASCH, 17 LSIL, 19 HSIL, 1 AIS dan 11 KSS. Berdasarkan data sekunder usia dengan 4 data *missing* diperoleh rata-rata usia pasien 43,2 tahun, dengan usia yang termuda 27 tahun dengan diagnosis ASCUS dan usia yang tertua 61 tahun dengan diagnosis LSIL. Distribusi kelompok usia menunjukkan usia <35 tahun berjumlah 10 orang, sedangkan kelompok ≥ 35 tahun berjumlah 41 orang, dengan pembagian golongan lesi seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Distribusi kelompok usia pada lesi atipikal/neoplasia serviks

	ASC	LSIL	HSIL*	KSS	Total
Kelompok usia					
Usia < 35 tahun	2	5	3	0	10
Usia ≥ 35 tahun	5	10	15	11	41

ASC, *atypical squamous cells*; LSIL, *low grade squamous intraepithelial lesions*; HSIL*, *high grade intraepithelial lesions* termasuk 1 kasus adenokarsinoma insitu (AIS); KSS, karsinoma sel skuamosa.

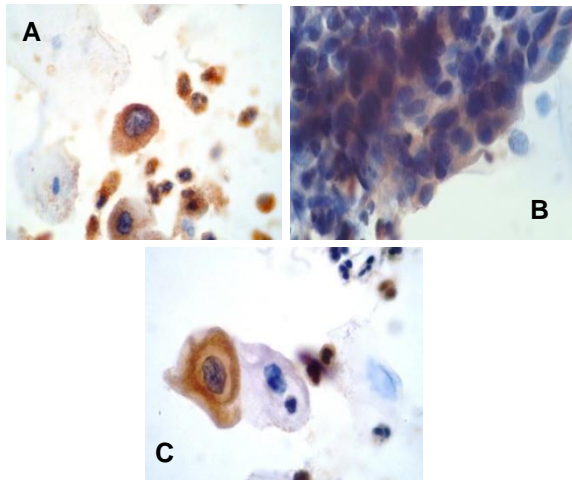
Ekspresi MMP 2

Pulasan imunositokimia MMP-2 menunjukkan hasil positif pada 57,1% (4/7) kasus ASC (3 ASCUS dan 1 ASCH), 58,8% (10/17) kasus LSIL, 95% (19/20) kasus HSIL/AIS dan 100% (11/11) kasus KSS (tabel 2).

Tabel 2. Distribusi ekspresi MMP-2 dan MMP 9 pada lesi atipikal/neoplasia serviks

	ASC		LSIL		HSIL*		KSS		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ekspresi MMP-2										
Negatif	3	42,9	7	41,2	1	5	0	0	11	20
Positif	4	57,1	10	58,8	19	95	11	100	44	80
Total	7	100	17	100	20	100	11	100	55	100

ASC, *atypical squamous cells*; LSIL, *low grade squamous intraepithelial lesions*; HSIL*, *high grade intraepithelial lesions* termasuk 1 kasus adenokarsinoma insitu (AIS); KSS, karsinoma sel skuamosa.



Gambar 1. Ekspresi MMP-2 positif di sitoplasma sel; A. *High grade intraepithelial lesions* (HSIL), Ekspresi MMP 2 ditemukan pada sel abnormal dan sel-sel radang; B. ASC-H (*atypical squamous cells cannot exclude HSIL*), sel dg ukuran sebesar sel metaplastik dengan inti 1,5-2,5x sel normal, *crowded sheet*

pattern, polaritas inti abnormal, ekspresi MMP 2 ditemukan pada sebagian sel abnormal; C. *Low grade squamous intraepithelial lesions* (LSIL), ekspresi MMP 2 ditemukan pada sitoplasma koilosit dan pada beberapa sel radang.(1.000x)

Hubungan ekspresi MMP 2 dengan derajat neoplasia serviks

Analisis statistik dengan menggunakan uji Fisher menunjukkan hubungan yang bermakna antara ekspresi MMP 2 dan derajat neoplasia serviks (p=0,001). Didapatkan *odds ratio* (OR) 21,43 (IK 95% 2,49-184,19) yang memperlihatkan bahwa lesi derajat tinggi memiliki kemungkinan 21,43 kali untuk menunjukkan ekspresi MMP 2 positif dibandingkan dengan lesi derajat rendah.(tabel 3) Penilaian ekspresi MMP 2 antar 2 pengamat menunjukkan kesesuaian baik (*good strength of agreement*), dengan nilai kappa = 0,8.

Tabel 3. Hubungan ekspresi MMP 2 dengan derajat neoplasia serviks

	Ekspresi MMP 2						p	OR(IK95%)
	Positif		Negatif		Total			
	n	%	n	%	n	%		
Derajat neoplasia serviks								
Lesi derajat tinggi	30	96,8	1	3,2	31	100	0,001	21,43 (2,49-184,19)
Lesi derajat rendah	14	58,3	10	41,7	24	100		

Uji Fisher

DISKUSI

Pada penelitian ini ekspresi MMP 2 pada 55 kasus *pap smear* abnormal lebih banyak ditemukan pada kelompok usia ≥ 35 tahun. Risiko terjadi lesi neoplasia intraepitelial berkaitan dengan infeksi HPV dan aktivitas seksual, sehingga sering ditemukan pada usia reproduktif dan risikonya mulai menurun pada dekade 4 hingga 5. Hal ini juga dipengaruhi oleh berbagai faktor resiko antara lain perbedaan budaya setempat.⁴

Kanker invasif dibedakan dengan lesi neoplasia intraepitelial termasuk karsinoma *insitu* berdasarkan kemampuannya menembus berbagai hambatan jaringan untuk menyebar ke seluruh organ tubuh, oleh karena itu MMP yang berfungsi mendegradasi komponen MES, merupakan salah satu faktor yang penting dalam memfasilitasi sel tumor untuk dapat melakukan invasi dan metastasis.⁸

Pada penelitian ini ekspresi MMP-2 lebih tinggi pada lesi derajat tinggi dibandingkan

pada lesi derajat rendah. Terdapat hubungan bermakna antara ekspresi MMP-2 dengan derajat lesi neoplasia intraepitelial (p=0,001). Hasil ini didukung oleh penelitian Sheu dkk¹⁰ yang melaporkan peningkatan aktivitas dan ekspresi MMP-2 yang bermakna mulai dari serviks normal, HSIL hingga KSS, berbeda dengan positivitas MMP-2 pada lesi derajat rendah. Sheu dkk¹⁰ melaporkan proporsi positivitas MMP-2 pada LSIL (n=8) sebesar 13% sedangkan No dkk¹¹ melaporkan proporsi positivitas MMP-2 pada LSIL (n=10) sebesar 40%. Hasil penelitian ini menunjukkan proporsi positivitas ekspresi MMP-2 pada lesi derajat rendah sebesar 58,3%. Perbedaan proporsi positivitas ini antara lain mungkin disebabkan oleh perbedaan jumlah kasus yang diteliti dan perbedaan cara penilaian kriteria positivitas.

Pada penelitian ini pulasan MMP-2 menunjukkan ekspresi tidak hanya pada sel tumor saja, namun juga pada sel radang dan sel basal/parabasal. Ekspresi MMP-2 pada sel

radang dikarenakan, pada kasus keganasan, sel tumor dapat langsung mensekresi MMP atau menginduksi sel fibroblas dan sel-sel radang untuk mensekresi MMP melalui berbagai faktor yang dihasilkan oleh sel tumor seperti EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), begitu pula sebaliknya sel radang juga menghasilkan sitokin yang dapat menginduksi sel tumor dan sel fibroblast untuk menghasilkan MMP.^{16,17} Tidak diketahui secara jelas mengapa ekspresi MMP 2 dapat ditemukan pada sel basal/parabasal namun Brummer dkk¹⁸ juga melaporkan adanya ekspresi MMP yang lemah pada sel basal di epitel skuamosa normal.

Brummer dkk¹⁸ melaporkan MMP2 pada lesi neoplasia intraepitelial serviks (CIN=*cervical intraepithelial neoplasia*) tereksresi pada area sel-sel proliferasi dengan intensitas ekspresi MMP 2 lebih tinggi pada sel-sel tumor yang berada pada garis depan invasi. Sheu dkk¹¹ melaporkan bahwa sel tumor dengan MMP 2 positif dengan rata-rata persentase 40% pada KSS dan 20% pada HSIL. Hasil ini sesuai dengan penelitian ini, yang mendapatkan tidak semua sel tumor menunjukkan ekspresi MMP yang positif, namun persentase positifitas sel tidak dapat dihitung karena jumlah sel abnormal yang sedikit dan tidak sama pada setiap kasus.

Keterbatasan pada penelitian ini disebabkan antara lain oleh ketiadaan baku emas histopatologik sebagai konfirmasi diagnosis sitologi. Jumlah sel abnormal yang sedikit dan tidak sama pada setiap kasus, sehingga persentase intensitas ekspresi MMP-2 tidak dapat dinilai. Laporan mengenai pulasan imunositokimia MMP-2 masih jarang ditemukan, sehingga diperlukan waktu optimasi yang lebih lama dalam proses pulasan imunohistokimia.

KESIMPULAN

Ekspresi MMP-2 dapat ditemukan secara dini, pada lesi atipikal atau prekanker selain pada kanker serviks. Proporsi positifitas ekspresi MMP-2 lebih tinggi secara bermakna pada lesi derajat tinggi dibandingkan dengan lesi derajat rendah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Montag A, Kumar V. The female genital system and breast. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, eds. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8thed.

- Philadelphia: Saunders-Elsevier. 2010. p. 716-21.
2. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:11-22.
3. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia. Kanker di Indonesia tahun 2008: data histopatologik. Jakarta: Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
4. Wells M, Ostor AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M, Nesland JM, et al. Tumours of the uterine cervix. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. Pathology and genetics tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press; 2003.p.262-79
5. Koss LG, Melamed MR, editors. Koss' diagnostic cytology. 5thed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.370-71
6. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:558-64.
7. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516
8. Kahari VM, Reunanen N. Matrix metalloproteinases in cancer cell invasion. In: Kahari VM, Heino J, editors. Cell invasion. Texas: Eurekah; 2002.p.1-11
9. Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, et al. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). *Int J Oncol*. 2009;34:897-903.
10. Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res*. 2003;63:6537-42.
11. No JH, Jo H, Kim SH, Park IA, Kang D, Lee CH, et al. Expression of MMP-2, MMP-9, and urokinase-type plasminogen activator in cervical intraepithelial neoplasia. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:100-4.
12. Solomon D, Nayar R, editors. The Bethesda system for reporting cervical cytology. 2nd ed. New York: Springer-verlag; 2004.p.67-118
13. Benovolo M, Vocaturo A, Mottolese M, Mariani L, Vocaturo G, Marandino F, et al.

- Clinical role of p16^{INK4a} expression in liquid-based cervical cytology. *Am J Clin Pathol.* 2008;129:606-12
14. Filho AL, Utagawa ML, Shirata MK, Pereira SMM, Namiyama GM, Kanamura CT, *et al.* Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears. *Int J Gynecol Pathol.* 2005;24:118-24
 15. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R, *et al.* The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:12-21.
 16. Sier CF, Zuidwijk K, Zijlmans HJ, Hanemaaijer R, Mulder-Stapel AA, Prins FA, *et al.* EMMPRIN-induced MMP-2 activation cascade in human cervical squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2006;118:2991-8.
 17. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Role of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:128-37.
 18. Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petri KU, Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation-an immunohistochemical Study. *Gynecol Oncol.* 2002;84:222-27.