

Ekspresi Matriks Metalloproteinase-9 Berhubungan Positif dengan Kedalaman Invasi Adenokarsinoma Kolorektal

Herlina Eka Shinta, I Gusti Alit Artha, Herman Saputra
*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana
Denpasar*

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma kolorektal masih merupakan penyakit keganasan penyebab kematian di dunia, termasuk Indonesia. Kedalaman invasi merupakan salah satu gambaran prognostik mayor yang penting dalam menentukan progresivitas dan prognostik penyakit. Matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) adalah salah satu komponen yang penting pada proses invasi sel tumor, karena memegang peranan penting dalam mendegradasi matriks ekstraseluler. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis hubungan antara MMP-9 dan kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal.

Metode

Penelitian ini menggunakan metode potong lintang. Jumlah sampel sebanyak 50 yang berasal dari blok parafin pasien adenokarsinoma kolorektal sejak tahun 2012 sampai 2016 di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Sanglah Denpasar. Re-evaluasi faktor prognosis kedalaman invasi telah dilakukan dan kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia MMP-9.

Hasil

Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan terdapat korelasi antara ekspresi MMP-9 dengan kedalaman invasi ($r=0,435$, $r^2=0,189$; $p=0,002$).

Kesimpulan

Ekspresi MMP-9 dan kedalaman invasi karsinoma kolorektal menunjukkan hubungan positif.

Kata kunci : adenokarsinoma kolorektal, ekspresi matriks metalloproteinase-9, kedalaman invasi.

ABSTRACT

Background

Colorectal carcinoma is still one of the most deadly malignancy in the world, including Indonesia. The depth of invasion is one of the major prognostic factors to determine disease progression and outcome. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is one of the important components in the process of tumor cell invasion, because it plays an important role in degrading the extracellular matrix. The purpose of this study was analyzed the correlation between MMP-9 and the depth of invasion of colorectal adenocarcinoma.

Methods

This study was cross-sectional method using 50 samples taken from paraffin block of patients with colorectal adenocarcinoma not otherwise specified, from 2012 until 2016 at the Pathology Anatomy Laboratory, Sanglah Hospital, Denpasar. Re-evaluation of the depth of invasion, followed by immunohistochemical staining of MMP-9.

Results

Spearman correlation test results showed there was a correlation between the expression of MMP-9 with depth of invasion ($r=0.435$; $r^2=0.189$; $p=0.002$).

Conclusion

Expression of MMP-9 and depth of invasion in colorectal adenocarcinoma showed positive correlation.

Key words : colorectal adenocarcinoma, depth of invasion, expression MMP-9.

PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal (KKR) merupakan keganasan yang terjadi pada usus besar dan rektum. Karsinoma kolorektal menduduki peringkat keempat penyebab kematian terbanyak akibat keganasan di dunia. Lebih 90% kasus KKR adalah adenokarsinoma.

Di Indonesia, berdasarkan data dari Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI tahun 2006, KKR merupakan jenis keganasan ketiga terbanyak. Pada tahun 2011 terdapat peningkatan kasus KKR, pada laki-laki 1.200 kasus dan 1.142 kasus pada wanita.¹ Di Bali, insiden KKR menempati urutan ketiga setelah karsinoma payudara dan serviks uteri pada wanita, serta menempati urutan ketiga pada laki-laki setelah keganasan nasofaring dan prostat, dengan jumlah kasus 103 pada laki-laki dan 81 pada perempuan.²

Pedoman klinis yang digunakan sebagai dasar menentukan penatalaksanaan dan prognosis KKR merujuk pada pedoman yang ditetapkan oleh *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) berdasarkan klasifikasi Tumor Nodul Metastasis (TNM).³ Kedalaman invasi ditandai dengan derajat invasi lokoregional sel tumor primer yang ditunjukkan oleh komponen T.⁴

Invasi sel kanker merupakan suatu proses Bergeraknya sel dari tumor primer dan berjalan menuju jaringan yang lebih dalam, menuju pembuluh darah dan ditransportasikan ke bagian tubuh yang lain. Kedalaman invasi merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi prognosis KKR dan termasuk dalam faktor prognosis kategori I. Kedalaman invasi merupakan gambaran biologikal mayor suatu neoplasma ganas sebagai penyebab utama morbiditas dan mortalitas suatu keganasan.³

Proses invasi tumor melibatkan *matriks metalloproteinase* (MMP), seperti MMP-9 sebagai salah satu komponen ekstraseluler melalui efek proteolitik.⁴ Sejak diidentifikasi sebagai *tumour type IV collagenase*, MMP-9 mendapat perhatian khusus sebagai penanda tumor potensial karena berperan utama dalam mendegradasi kolagen IV dan merupakan kunci yang berperan dalam proses invasi, metastasis, adesi sel, penyebaran, migrasi dan angiogenesis.^{4,5}

Penelitian Buhmeida, pada 48% sampel KKR dengan MMP-9 positif tidak menunjukkan

adanya korelasi dengan umur, kedalaman invasi, dan status KGB,⁶ sedang penelitian lainnya menunjukkan ekspresi MMP-9 yang tinggi berkorelasi dengan kedalaman invasi dan metastasis,^{3,5,8} serta dapat berguna sebagai marker *independen* dalam menentukan prognosis yang buruk pada pasien KKR.⁷

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan antara MMP-9 dan kedalaman invasi pada KKR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan *cross-sectional study*. Sampel penelitian adalah blok parafin hasil operasi reseksi penderita adenokarsinoma kolorektal tipe tidak spesifik yang diperiksa secara histopatologi pada Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah sejak 1 Januari 2012 sampai 31 Juni 2016. Sampel penelitian adalah semua sediaan blok parafin bahan operasi penderita KKR yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

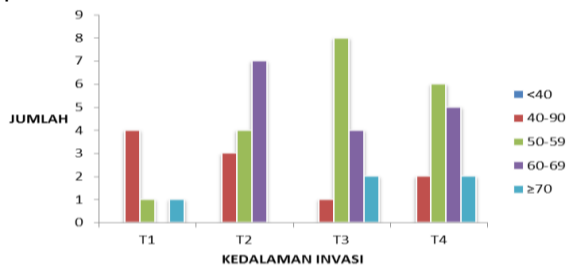
Sampel dipilih dengan cara *consecutive random sampling* dengan jumlah sampel 50. Revaluasi dilakukan pada sediaan mikroskopik dengan pulasan H-E adenokarsinoma kolorektal tipe tidak spesifik. Kedalaman invasi tumor KKR dikategorikan T1, T2, T3, dan T4. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan IHC menggunakan antibodi primer *Monoclonal Rabbit Anti-Human MMP-9 Antigen* (Abcam) yang telah diencerkan (pengenceran 1:100) selama 30 menit pada suhu kamar atau semalam pada suhu 4°C. Dilanjutkan dengan antibodi sekunder streptavidin-biotin peroksidase dan kromogen diaminobenzidine (DAB). Kontrol positif disertakan untuk setiap pewarnaan antibodi, sedangkan kontrol negatif disertakan untuk setiap kasus. Jaringan kelenjar getah bening digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif diambil dari jaringan mukosa kolon normal.

Penilaian ekspresi MMP-9 dan interpretasi dilakukan secara *blind independent* tanpa mengetahui diagnosis histopatologi sebelumnya. Penilaian ekspresi MMP-9 dilakukan berdasarkan analisis persentase sel yang terpulas positif MMP-9 dan intensitas warna MMP-9 pada sel tumor dan sel stroma.³ Berdasarkan persentase sel ganas yang terpulas positif tersebut maka dibagi menjadi skor 0-3 yaitu: 0 (tidak terwarna), 1+ (<25% sel

dari seluruh sel tumor), 2+(25-75% sel dari seluruh sel tumor) dan 3+(>75% sel dari seluruh sel tumor). Berdasarkan intensitas warna coklat pada sel-sel yang menunjukkan pulasan positif MMP-9 maka dibagi menjadi skor 0 sampai 3, yaitu: 0 (negatif), 1+ (lemah), 2+ (sedang), dan 3+ (kuat). Skor persentase dari sel yang terpulas positif kemudian dikalikan dengan skor intensitasnya, sehingga didapatkan hasil perkalian 0 sampai 9. Ekspresi MMP-9 dinyatakan dengan skor 0 sampai 3, yaitu: negatif (0)=skor 0, positif ringan (+1)=skor 1-2, positif sedang (+2)=skor 3-4, dan positif kuat (+3)=skor 5-9.¹¹ Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji korelasi Spearman ($p < 0,5$).

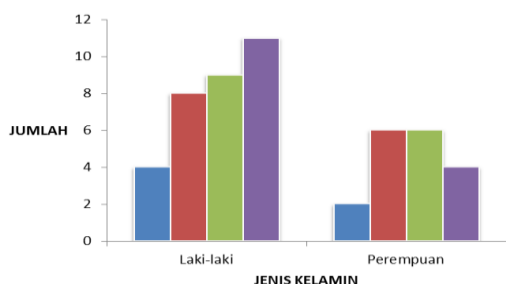
HASIL

Rentang umur sampel berkisar dari 41 tahun sampai 83 tahun dengan rerata umur $57,78 \pm 9,66$ tahun. Jumlah terbanyak penderita pada rentang umur 50-59 tahun (19/50 kasus). Data distribusi kasus berdasarkan kelompok umur dan kedalaman invasi tumor disajikan pada Gambar 1.



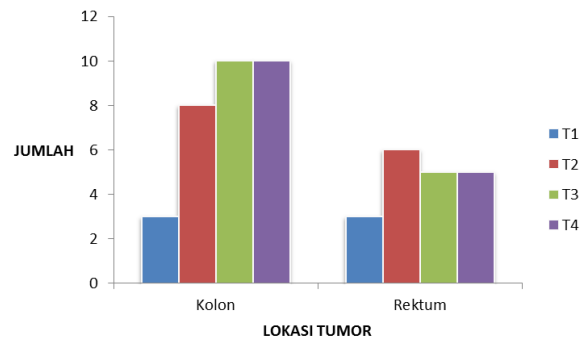
Gambar 1. Grafik distribusi kasus berdasarkan kelompok umur dan kedalaman invasi.

Kasus dengan jenis kelamin laki-laki lebih banyak dibandingkan perempuan (1,7:1). Data distribusi kasus berdasarkan jenis kelamin dan kedalaman invasi tumor dan disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik distribusi kasus berdasarkan kelompok jenis kelamin dan kedalaman invasi.

Berdasarkan lokasi tumor didapatkan tumor sebanyak 31 kasus pada kolon dan 19 kasus pada rektum. Data distribusi kasus berdasarkan lokasi tumor dan kedalaman invasi tumor dan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik distribusi kasus berdasarkan kelompok lokasi tumor dan kedalaman invasi.

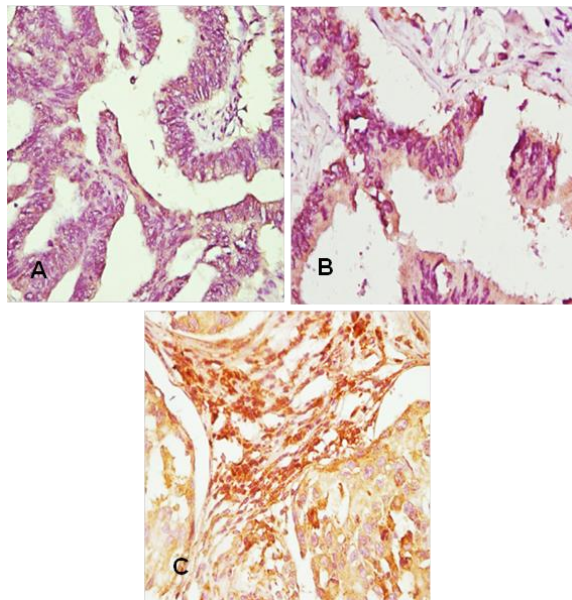
Ekspresi MMP-9 dinilai pada sel tumor dan sel stroma (Gambar 4). Ekspresi MMP-9 yang semakin tinggi dijumpai pada tumor dengan kedalaman invasi yang lebih dalam. Distribusi kasus berdasarkan ekspresi MMP-9 pada setiap kategori kedalaman invasi tumor disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi kasus berdasarkan kedalaman invasi dan ekspresi MMP-9.

MMP9	Kedalaman invasi			
	T1	T2	T3	T4
0	1 (2%)	1 (2%)	0	1 (2%)
+1	4 (8%)	6 (12%)	3 (6%)	1 (2%)
+2	1 (2%)	2 (4%)	9 (18%)	4 (8%)
+3	0	5 (10%)	3 (6%)	9 (18%)
Total	6 (12%)	14 (28%)	15 (30%)	15 (30%)

$r=0,435$; $r^2=0,189$; $p=0,002$ ($p < 0,05$)

Hasil uji korelasi Spearman antara kedalaman invasi dan ekspresi MMP-9 adalah $p=0,002$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan terdapat korelasi bermakna antara kedalaman invasi dan ekspresi MMP-9. Adapun nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh sebesar 0,435 dan menunjukkan tingkat korelasi sedang dengan koefisien determinasi (r^2) 0,189.



Gambar 4. Ekspresi MMP-9 pada sitoplasma sel tumor dan sel stroma. A. Intensitas lemah; B. Intensitas sedang; C. Intensitas kuat (400x).

DISKUSI

Pada penelitian ini, rentang umur berkisar antara 41 tahun sampai 83 tahun dengan rerata umur 57,78±9,66 tahun. Rentang umur pasien terbanyak adalah pada kelompok 50-59 tahun (38%). Menurut peneliti terdahulu, insiden KKR tinggi pada rentang umur 50 tahun sampai 69 tahun, dan prevalensi rendah pada umur di bawah 50 tahun dan di atas 69 tahun.¹² Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa insiden KKR akan meningkat sesuai dengan peningkatan umur dan jarang terjadi sebelum usia 40 tahun, KKR terutama pada umur paruh baya dan lanjut.¹²⁻¹⁵

Berdasarkan jenis kelamin diperoleh data kasus laki-laki lebih banyak dari perempuan. Laki-laki memiliki risiko lebih tinggi dibandingkan perempuan.¹⁵ Hal ini dikaitkan dengan hubungan faktor-faktor resiko dan perbedaan gaya hidup antara laki-laki dan perempuan, seperti pola diet, konsumsi merokok, alkohol, perbedaan kondisi hormonal, dan lain-lain. Di Indonesia, berdasarkan data dari Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI tahun 2006, KKR merupakan jenis keganasan ketiga terbanyak. Pada tahun 2011 terdapat peningkatan kasus KKR, pada laki-laki 1.200 kasus dan 1.142 kasus pada wanita.¹ Di Bali, insiden KKR

menempati urutan ketiga setelah karsinoma payudara dan serviks uteri pada wanita, serta menempati urutan ketiga pada laki-laki setelah keganasan nasofaring dan prostat.²

Pada penelitian ini KKR lebih banyak terjadi pada kolon dibandingkan dengan rektum. Sebagian besar KKR berlokasi pada kolon sigmoid dan rektum.³ Seiring dengan peningkatan umur terjadi perubahan lokasi dengan meningkatnya proporsi karsinoma pada bagian yang lebih proksimal.^{3,12}

Dalam menentukan stadium tumor KKR, salah satu komponennya adalah kedalaman invasi. Pada penelitian ini memakai pedoman yang ditetapkan oleh *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* berdasarkan klasifikasi menurut sistem TNM.^{12,15} Kedalaman invasi tumor primer ditunjukkan oleh komponen T. Perluasan invasi tumor melewati muskularis propria berpengaruh kuat terhadap prognosis. Tumor yang melewati muskularis propria dapat menyebabkan perforasi peritoneum atau menginfiltrasi struktur viseral sekitarnya.^{12,16,17} Pada penelitian ini sebagian besar kasus menunjukkan kedalaman invasi T3 dan T4.

Pada penelitian ini ekspresi MMP-9 dinilai tidak hanya pada sel tumor tetapi pada sel-sel stroma disekitar sel tumor, seperti sel-sel inflamatori dan non inflamatori, (makrofag, limfosit maupun neutrofil serta sel fibroblast dan sel endotel pembuluh darah). Ekspresi MMP-9 yang cukup kuat dijumpai pada sel stroma seperti halnya pada sel tumor. Hal ini menjelaskan bahwa MMP-9 dihasilkan oleh sel tumor dan sel stroma. Hasil interaksi antara sel tumor dengan lingkungan sekitarnya akan mempengaruhi aktivasi dan produksi MMP-9.^{3,7}

Pada penelitian ini MMP-9 tampak terpulas pada sebagian besar sel tumor dan sel stroma pada kedalaman invasi T1 sampai T4. Ekspresi yang kuat (+3) sebagian besar didapatkan pada tumor dengan kedalaman invasi T4. Hal ini menandakan bahwa ekspresi MMP-9 meningkat pada KKR dibandingkan mukosa kolon normal serta dapat menjelaskan kemampuannya dalam mendegradasi komponen ECM dan memudahkan proses invasi sel tumor. Selain itu, interaksi antara sel tumor dan sel stroma di sekitarnya mempunyai peranan penting dalam membantu proses invasi sel tumor dan metastasis.^{3,18}

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat korelasi yang bermakna antara kedalaman

invasi tumor dengan ekspresi MMP-9 dengan nilai p sebesar 0,002 ($p < 0,05$) dengan koefisien korelasi sebesar 0,435 yang memiliki arti korelasi sedang, dengan koefisien determinasi kuat ($r^2 = 0,189$). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan terdapat korelasi positif antara kedalaman invasi dengan ekspresi MMP-9. Peneliti terdahulu menyatakan adanya korelasi positif yang signifikan antara ekspresi MMP-9 dengan kedalaman invasi, metastasis ke KGB dan metastasi yang luas, dan tidak terdapat korelasi antara umur penderita, jenis kelamin, lokasi tumor dan status diferensiasi.⁸ Demikian juga penelitian lainnya melaporkan adanya korelasi positif antara ekspresi MMP-9 pada stadium II dan III dibandingkan dengan stadium I pada KKR. Penelitian terdahulu menunjukkan hubungan yang kuat antara kedalaman invasi dan metastasis ke KGB dengan ekspresi MMP-9, sehingga dapat digunakan sebagai indikator yang penting pada pasien KKR.^{7,3}

Matriks metalloproteinase mendapat perhatian karena terlibat pada proses invasi melalui peranannya dalam mendegradasi kolagen IV membran basalis. Selain mendegradasi komponen ECM, MMP-9 memiliki kemampuan motilitas yang mampu memicu transisi epitelial menjadi progenitor mesenkimal (EMT).⁴ Pada saat proses metastatik, sel-sel epitel ganas akan terlepas dari tumor primer dan mengalami transisi mesenkimal, menginvasi jaringan stroma, ekstrasvasasi dan membentuk koloni metastasis.^{19,20}

Pada proses intravasasi, akan melibatkan neutrofil, dan aktivasi sel endotel sehingga menghasilkan MMP-9 yang bebas dari TIMP. Aktivasi MMP-9 tersebut akan melepaskan faktor angiogenik yang tersimpan dalam ECM yang akan berperan dalam proses intravasasi dan penyebaran sel tumor. Selain itu, MMP-9 akan mempengaruhi fenotip tumor sehingga memiliki potensi metastatik.²⁰

Distribusi MMP-9 pada stroma menjadi kriteria penilaian ekspresi MMP-9. Pada sitoplasma makrofag, yang membuktikan keterlibatan *Tumor Associated Macrophage* (TAM) dalam menghasilkan MMP-9, tetapi efek terhadap progresivitas tumor tergantung dari fenotipnya yang ditentukan oleh sitokin yang dihasilkan.²⁰

KESIMPULAN

Eksresi MMP-9 dan kedalaman invasi karsinoma kolorektal menunjukkan hubungan positif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Anatomi. Kanker di Indonesia tahun 2011. Jakarta: Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI: 2011.
2. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Anatomi. Kanker di Indonesia tahun 2008. Jakarta: Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI: 2008.
3. Kostova E, Slaninka-Miceska M, Labacevski N, Jakjovski K, Trojancanec J, Atanasovska E, *et al.* Serum matrix metalloproteinase-2, -7 and -9 (MMP-2, MMP-7, MMP-9) level as prognostic markers in patient with colorectal cancer. *Int J Health Sci.* 2012; 2: 169-75.
4. Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancers* 2014; 6: 240-96.
5. Lubbe WJ, Pitari GM. Antimetastatic therapy in colorectal cancer: Role of tumor cell matrix metalloproteinase 9 (Methodology). *Col Cancer.* 2009; 4: 137-8.
6. Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjänen S, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2009; 40: 91-7.
7. Yang GY, Guo S, Dong CY, Wang XQ, Hu BY, Liu YF. Integrin $\alpha V\beta 6$ sustains and promotes tumor invasive growth in colon cancer progression. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 7457-67.
8. Chu D, Zhao Z, Zhao Y, Li Y, Li J, Zheng J, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 318-25.
9. Zuzga DS, Gibbons AV, Li Peng, Lubbe JW, Chervoneva I, Pitari GM. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 in tumor epithelial cells correlates with colorectal cancer metastasis. *Clin Transl Sci.* 2008; 1: 136-41.
10. Bouchet S, Bauvois B. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Pro-Matrix Metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and Their Complex Pro-MMP-9/NGAL in Leukaemias. *Cancers.* 2014; 6: 796-812.

11. Meng X, Hua T, Zhang Q, Pang R, Zheng G, Song D. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 papillary thyroid carcinoma. *African J Pharm Pharmacol.* 2012; 6: 3075-9.
12. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P. Tumours of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen A, editors. *World Health Organization: classification of tumours, pathology and genetics of tumours of the digestive system.* 3th Edition. Lyon: IARC Press. 2010; 104-19.
13. Homick JL, Odze RD. Polyps of the large intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, editors. *Surgical Pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier. 2011; 507-20.
14. Washington K, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, *et al.* Protocol for examination of specimens from patient with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Lab Pathol Lab Med.* 2011; 133: 1539-51.
15. Redston M, Driman DK. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Odze, RD., Goldblum, JR., editors. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas.* 3th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2015; 737-78.
16. Fenoglio-Preiser CM. *Gastrointestinal pathology: an atlas and text.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2009; 899-1036
17. Otero-Estévez OO, De Chiara L, Rodríguez-Girondo M, Rodríguez-Berrocal FJ, Cubiella J, Castro I. Serum matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer family risk population screening. *Sci Rep.* 2015; 5: 1-10.
18. Georgescu EF, Mogoanta SS, Costache A, Parvanescu V, Totolici BD, Patrascu S, Stanescu C. The assesment of Matrix Metalloproteinase-9 Expression and angiogenesis in colorectal cancer. 2015. *Rom J Morphol Embryol.* 2015; 56: 1137-44.
19. Deryugina EI, Quigley PJ. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 9-34.
20. Ansari MA, Shaikh S, Muteeb G, Rizvi D, Shakil S, Alam A, Tripathi R, Ghazal F, Rehman A, Ali SZ, Pandey AK, Ashraf GM. Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer. In: Ashraf GM, Sheikh IA, editors. *Advanced in Protein Chemistry.* USA: OMICS group ebook. 2013; 4-10.