

Hubungan Ekspresi Protein NM23-H1, Densitas Limfovaskuler Peritumoral dan Invasi Limfovaskuler dengan Stadium dan Diferensiasi Histopatologi Adenokarsinoma Kolorektal

Tejo Jayadi, Harijadi, Prijono Tirtoprodjo

Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRAK

Latar belakang

Salah satu penyebab kekambuhan karsinoma kolorektal adalah metastasis *locoregional* atau metastasis jauh. NM23-H1 salah satu gen penghambat metastasis yang berperan dalam menurunkan potensi metastasis. Hasil penelitian-penelitian tentang peran NM23-H1 dan invasi limfovaskuler terhadap peningkatan derajat histopatologi dan stadium adenokarsinoma hasilnya masih kontroversial. Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan ekspresi protein NM23-H1 dan invasi limfovaskuler dengan derajat histopatologi dan stadium karsinoma kolorektal.

Metode

Rancangan Penelitian adalah potong lintang dengan menggunakan 50 blok parafin dari pasien karsinoma kolorektal yang diagnosis ditegakkan secara histopatologis sebagai adenokarsinoma kolorektal stadium Duke B dan C di RSUP. Dr. Sardjito mulai tanggal 1 Januari 2007. Blok parafin dipotong 4 μ m diwarnai dengan antibodi poliklonal anti NM23-H1 dan antibodi monoklonal anti D2-40. Korelasi NM23-H1 dengan invasi limfovaskuler dianalisa dengan uji korelasi Spearman; asosiasi NM23-H1 dan invasi limfovaskuler dengan diferensiasi histopatologi dan stadium dianalisa menggunakan uji *Chi-square*.

Hasil

Penelitian ini menunjukkan terdapat korelasi antara ekspresi NM23-H1 dan invasi limfovaskuler dengan stadium adenokarsinoma kolorektal Duke B dan C ($p=0,006$ dan $0,013$). Ekspresi NM23-H1 tidak berhubungan dengan diferensiasi histopatologi ($p=0,644$). Invasi limfovaskuler berhubungan dengan diferensiasi histopatologi ($p=0,018$). Densitas limfovaskuler peritumoral tidak berhubungan dengan diferensiasi histopatologi dan stadium ($p=0,556$ dan $p=0,768$). Penelitian ini juga menunjukkan tidak adanya akorelasi antara NM23-H1 dengan densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler ($p=0,996$ dan $p=0,176$), dengan rasio *odds* 1,071 dan 2,1.

Kesimpulan

Ekspresi NM23-H1 dan invasi limfovaskuler berperan dalam perluasan dan metastasis adenokarsinoma kolorektal, sedangkan derajat diferensiasi sel tumor berhubungan dengan invasi limfovaskuler.

Kata kunci : adenokarsinoma kolorektal, diferensiasi histopatologi, invasi limfovaskuler, NM23-H1, stadium.

ABSTRACT

Background

One of the causes of colorectal carcinoma recurrence due to locoregional or distant metastasis. NM23-H1 is one of metastasis suppressor gene, and many studies showed that the influence of NM23-H1 expression and lymphovascular invasion to the grading and staging of colorectal carcinoma still controversial. The aim of this study is to determine the correlation of NM23-H1 expression and lymphovascular invasion with the grading and staging of colorectal carcinoma.

Methods

The study was retrospective cross sectional using 50 paraffin embedded tissue of patients with adenocarcinoma colorectal Duke B and C paraffin block, which diagnosed as adenocarcinoma colorectal Duke B and C by histopathological examination in Dr. Sardjito Central General Hospital since 1 January 2007. Those embeded tissues were cut 4 μ m and stained by NM23-H1 polyclonal antibody and D2-40 monoclonal antibody. Correlation NM23-H1 with lymphovascular invasion were analyzed using Spearman test. Chi Square test was performed to analyzed the association of NM23-H1 and lymphovascular invasion with grading and staging of the tumor.

Results

There were correlations between NM23-H1 expression, lymphovascular invasion with adenocarcinoma colorectal stage B and C ($p=0.006$ and 0.013). There was no correlation between NM23-H1 expression with the grading of tumor ($p=0.644$). There was correlation between lymphovascular invasion and grading of the tumor ($p=0.018$). There was no correlation between peripheral lymphovessel density with grading dan staging of the tumor ($p=0,556$ and $p=0,768$). This study showed no correlation between NM23-H1 with peripheral lymphovessel density and lymphovascular invasion ($p=0.996$ and $p=0.176$), with odds ratio 1.071 and 2.1.

Conclusion

NM23-H1 expression and lymphovascular invasion may have a role in the adenocarcinoma colorectal expansion and metastasis, while moderate and high grade have relationship with lymphovascular invasion.

Key words: adenocarcinoma colorectal, histopathology differentiation, lymphovascular invasion, Nm23-H1, stage.

PENDAHULUAN

Adenokarsinoma kolorektal adalah jenis kanker kolorektal terbanyak dan mempunyai potensi metastasis setelah menginvasi submukosa.¹ Data *Cancer Statistic of United State*, menunjukkan 60%-80% kanker kolorektal dijumpai pada kolon distal atau rektum,² dengan 66% terjadi di rektum.³ Di Yogyakarta, frekuensi relatif karsinoma rektum lebih tinggi daripada karsinoma kolon, dengan subtype dan derajat karsinoma kolorektal terbanyak adalah adenokarsinoma diferensiasi baik.⁴ Di Indonesia, karsinoma kolorektal banyak terjadi pada usia 45-54 tahun (26,19%) dan 55-64 tahun (21,84%)⁵, sedangkan di negara maju insidensi karsinoma kolorektal meningkat pada usia lebih dari 60 tahun.⁶ Angka *5-years relative survival* karsinoma kolorektal di dunia meningkat, pada tahun 1975-1977: 52% dan 49%, tahun 1984-1986: 59% dan 57%, tahun 1999-2005: 66% dan 69%.⁶ Pada pasien yang didiagnosis karsinoma pada tahap dini, akan memberikan kesempatan waktu untuk memaksimalkan penatalaksanaan pasien, sehingga berpengaruh pada prognosis pasien.⁷

Gen *NM23* bertanggung jawab menghambat metastasis tumor. *NM23* adalah suatu *nucleoside diphosphatase kinase* (NDPK) yang bertanggung jawab dalam menjaga kadar *adenosine triphosphate* (ATP)⁸ dan *nuclioside triphosphate* (NTP) pada sintesis asam nukleat.⁹ Gen *NM23* pertama kali diisolasi dari *murine melanoma cell lines*,⁷ berlokasi pada kromosom 17q 21-23.¹⁰ Ekspresi protein *NM23-H1* yang rendah berhubungan dengan prognosis buruk pada penderita karsinoma kolorektal yang menimbulkan kecenderungan bermetastasis ke limfonodi. Penemuan ini menunjukkan efek protektif ekspresi *NM23* terhadap metastasis limfonodi.^{11,12} Ekspresi protein *NM23-H1* mempunyai korelasi negatif yang signifikan terhadap invasi limfovaskuler,¹¹ derajat histopatologi,^{10,13} stadium tumor,¹³ walaupun pada penelitian lain tidak didapatkan hubungan antara ekspresi *NM23* dengan lokasi tumor, invasi limfovaskuler,¹⁴ derajat histologi,¹⁴ metastasis limfonodi dan stadium karsinoma kolorektal.¹⁴

Untuk dapat bermetastasis ke limfonodi regional, sel-sel karsinoma harus mencapai dan masuk ke dalam pembuluh limfe yang mengalirkan cairan interstisial dari *lymphovascular invasion* (LVI) tumor.¹⁵ Sebagian peneliti berpendapat pembuluh limfe mempunyai peran

pasif dalam infiltrasi sel-sel tumor ke dalam sistem limfatik peritumoral yang telah ada.¹⁶ Sedangkan peneliti lain berpendapat limfangiogenesis berperan aktif dalam proses metastasis.¹⁷⁻¹⁹ Selain itu juga terdapat laporan bahwa limfangiogenesis tidak berhubungan dengan metastasis limfatik.²⁰ Penghitungan *lymphatic microvessel* karsinoma kolorektal dengan menggunakan D2-40 berhubungan signifikan dengan invasi limfovaskuler tumor, metastasis limfonodi dan stadium tumor.¹⁷ Hasil penelitian lain tidak menunjukkan hasil yang sama yaitu derajat limfangiogenesis bukan faktor prognosis (invasi limfovaskuler, metastasis limfonodi dan stadium berdasarkan klasifikasi Dukes) independen kanker kolorektal.²¹ Penghitungan pembuluh limfe D2-40 tidak berkorelasi dengan derajat histopatologi tumor.²² Ekspresi protein *vascular endothelial growth factor-C* (VEGF-C) yang berperan dalam proses limfangiogenesis berhubungan bermakna dengan semakin buruknya derajat histopatologi pada karsinoma kolorektal.¹⁸

Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan ekspresi protein *NM23-H1* dan invasi limfovaskuler dengan derajat histopatologi dan stadium karsinoma kolorektal.

METODE PENELITIAN

Pola penelitian yang dilakukan adalah potong lintang, menggunakan sampel blok parafin pasien adenokarsinoma kolorektal yang diagnosis ditegakkan secara histopatologi di Instalasi Patologi Anatomi RSUP. Dr. Sardjito. Jumlah sampel adenokarsinoma kolorektal Duke B dan Duke C masing-masing sebanyak 24 dan 26. Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah blok parafin berasal dari penderita adenokarsinoma kolorektal residif atau sudah mendapat terapi, adenokarsinoma kolorektal tipe musinosa, *signet ring cell*, *clear cell*, sediaan tidak diproses dengan baik (pada penilaian dengan H&E). Sediaan kemudian dipotong setebal 4 µm, diwarnai dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi poliklonal anti *NM23-H1* (*Bioworld Technology*) dan antibodi monoklonal anti D2-40 (*Biocare Medical*) dengan menggunakan metoda streptavidin biotin, kromogen DAB dan pulasan balik hematoksin Mayer.

Evaluasi jumlah limfovaskuler paling padat dilihat terlebih dahulu dengan pembesaran 100 kali pada area *hot spot*. Penghitungan

jumlahnya dilakukan dengan perbesaran 400 kali (Olympus CX21). Rerata jumlah limfovaskuler yang dihitung dalam 10 daerah *hot spot*, didefinisikan sebagai *lymphovascular density* (LVD). Nilai median dari semua LVD digunakan untuk menghitung *cut off* untuk membagi tumor menjadi densitas limfovaskuler tinggi dan rendah.²³ Invasi limfovaskuler diklasifikasikan menjadi positif dan negatif²⁴ (Gambar 1). Data kontinu didapatkan dari jumlah masing-masing variabel dalam 10 lapang pandang. Densitas limfovaskuler peritumoral didefinisikan sebagai jumlah limfovaskuler di tepi tumor. Nilai median LVI dinilai pada daerah yang sama dengan LVD.¹⁷

Sel-sel yang terwarnai NM23-H1 dinilai berdasarkan intensitas dan proporsi pewarnaan sel. Intensitas pewarnaan dibuat skor berdasarkan skala berikut: 0, pewarnaan negatif; 1, lemah; 2, cukup; 3, kuat. Distribusi pewarnaan dinilai dengan persentase: 0, < 5%; 1+, 5%-25%; 2+, 26%-50%; 3+, 51%-75%; 4+, >75%. Penjumlahan skor intensitas dan persentase disimpulkan sebagai nilai ekspresi. Ekspresi negatif (0): 0-1 (Gambar 1C); lemah (1+): 2 (Gambar 1D); sedang (2+): 3- 5 (Gambar 1E); kuat (3+): 6-7 (Gambar 1F).¹³ Penilaian ekspresi NM23-H1 ditunjukkan dalam jaringan neoplasma dalam 5 *hot spot*. Peneliti menilai ekspresi NM23-H1 hanya pada 5 *hot spot* karena ada penelitian yang menilai ekspresi NM23 lemah dan kuat pada paling sedikit 100 sel tumor.²⁵ Data kontinu, didapatkan dari penghitungan setiap sel yang mengekspresikan NM23-H1. Ekspresi positif NM23-H1 tampak pada sitoplasma sel tumor. Untuk mengidentifikasi daerah-daerah mengandung sel-sel tumor invasif, sediaan diperiksa dengan mikroskop perbesaran kuat (objektif, 40x Olympus CX 21).

Data diskret dengan variabel lebih dari dua untuk mencari perbedaan antara ekspresi NM23-H1, dengan berbagai stadium dan diferensiasi histopatologi; densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler dengan berbagai diferensiasi histopatologi dianalisa dengan uji non parametrik Kruskal Wallis. Data diskret untuk mencari perbedaan densitas limfovaskuler peritumoral, invasi limfovaskuler dengan stadium dianalisa dengan uji *chi square*. Data kontinu untuk mengetahui korelasi ekspresi protein NM23-H1 dengan densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler dianalisa dengan uji korelasi Spearman. Analisa statistik

dikerjakan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), version 15.0.

HASIL

Penelitian ini menunjukkan rerata penderita adenokarsinoma kolorektal adalah 55,3 tahun dengan rentang antara 20 hingga 76 tahun, usia penderita ≤ 50 tahun 15 (30%) dan usia > 50 tahun 35 (70%). Lokasi tumor pada kolon kanan sebanyak 12 orang (24%) dan kolon kiri sebanyak 38 orang (76%). Tiga puluh penderita (60%) memiliki derajat histologis baik, 14 penderita (28%) memiliki derajat histologis sedang, dan 6 penderita (12%) memiliki derajat histologis buruk. Penderita memiliki stadium Duke's B 24 orang (48%), stadium Duke's C adalah 26 orang (52%). Pemeriksaan ekspresi D2-40 untuk menghitung densitas limfovaskuler peritumoral menunjukkan ekspresi positif pada 38 kasus (76%), dari 50 kasus. Invasi limfovaskuler ke dalam limfovaskuler intra-tumoral dan peritumoral 12 kasus (24%) dari 50 kasus. Densitas limfovaskuler peritumoral bernilai median 24, sehingga ada 26 kasus (52%) berdensitas limfovaskuler peritumoral tinggi dan ada 24 kasus (48%) berdensitas limfovaskuler peritumoral rendah (Tabel 1). Invasi limfovaskuler positif pada 12 kasus (24%) dan 38 kasus (76%) negatif. Penderita dengan ekspresi NM23-H1 negatif 20 kasus (40%), ekspresi lemah 5 kasus (10%), ekspresi sedang 15 kasus (30%), ekspresi kuat 10 kasus (20%).

Pada penelitian ini ditunjukkan perbedaan bermakna antara ekspresi NM23-H1 pada stadium adenokarsinoma kolorektal dengan $p= 0,006$, dimana didapatkan 20 kasus ekspresi NM23-H1 lemah sampai kuat pada adenokarsinoma stadium Duke's B dibandingkan 10 kasus dengan ekspresi lemah sampai kuat pada stadium Duke's C (Tabel 2 dan Gambar 2).

Ekspresi NM23-H1 tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada berbagai derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal dengan $p=0,644$. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan bermakna invasi limfovaskuler pada stadium adenokarsinoma kolorektal dengan $p=0,013$ dimana pada stadium Duke B dan C masing-masing ditemukan 2 dan 10 kasus yang mengalami invasi limfovaskuler (Tabel 2), tidak terdapat perbedaan bermakna antara stadium dengan densitas limfovaskuler peritumoral nilai $p=0,768$, terdapat perbedaan invasi limfovask-

kuler bermakna dengan diferensiasi histopatologi ($p=0,018$), tidak terdapat perbedaan bermakna densitas limfovaskuler peritumoral ($p=0,556$) dengan diferensiasi (Gambar 3). Penelitian ini menunjukkan tidak ditemukan

korelasi antara NM23-H1 dengan densitas limfovaskuler peritumoral ($p=0,996$) dan invasi limfovaskuler ($p=0,176$; Tabel 3).

Tabel 1. Karakteristik klinikopatologi pasien

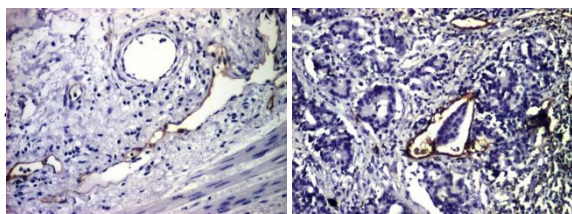
Karakteristik	Jumlah	Persentase	Karakteristik	Jumlah	Persentase
Umur			Peritumoral		
</=50 tahun	15	30%	Densitas rendah	24	48%
> 50 tahun	35	70%	Densitas tinggi	26	52%
Gender			Intratumoral		
Laki-laki	23	46%	Densitas rendah	25	50%
Perempuan	27	54%	Densitas tinggi	25	50%
Lokasi			Invasi Limfovaskuler		
Kolon kanan	12	24%	Negatif	38	76%
Kolon kiri	38	76%	Positif	12	24%
Diferensiasi			NM23H1		
Baik	30	60%	Negatif	20	40%
Sedang	14	28%	Lemah	5	10%
Buruk	6	12%	Sedang	15	30%
Stadium			Kuat	10	20%
B	24	48%			
C	26	52%			

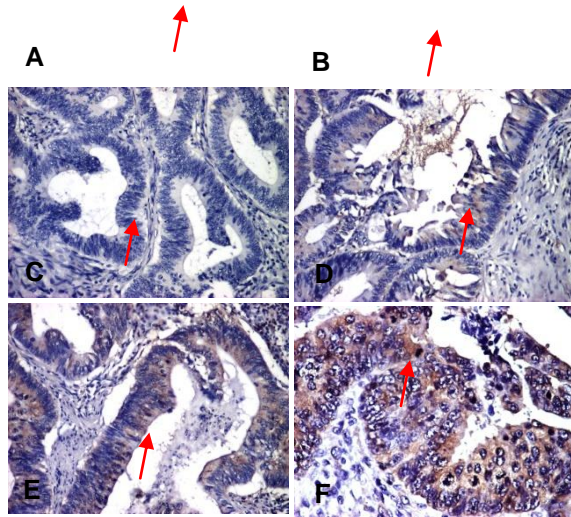
Tabel 2. Analisa asosiasi ekspresi NM23-H1, invasi limfovaskuler dan densitas limfovaskuler peritumoral dengan diferensiasi dan stadium.

		Diferensiasi			Stadium dukes	
		Baik	Sedang	Buruk	B	C
NM23-H1	Negatif	11	7	2	4	16
	Lemah	3	1	1	4	1
	Sedang	8	5	2	8	7
	Kuat	8	1	1	8	2
Kruskal-Wallis Test		0,644			0,006	
Invasi limfovaskuler	Positif	3	6	3	2	10
	Negatif	27	8	3	22	16
Kruskal-Wallis Test /Chi-square Test#		0,018			0,013 (#)	
Densitas Limfovaskuler Peritumoral	Rendah	14	9	3	13	13
	Tinggi	16	5	3	11	13
Kruskal-Wallis Test/ Chi-square Test#		0,556			0,768 (#)	

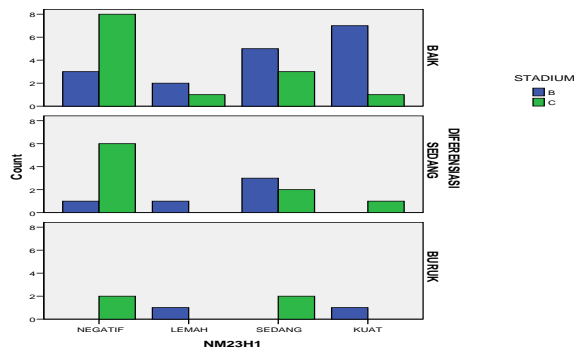
Tabel 3. Korelasi NM23-H1 dengan densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler.

NM23-H1	Jumlah	Peritumoral		Invasi Limfovaskuler	
		Densitas rendah	Densitas tinggi	Negatif	Positif
Negatif	14	7	6	9	4
Lemah	19	7	12	13	6
Sedang	12	7	5	11	1
Kuat	6	3	3	5	1
Correlation Spearman Test		0,996		0,176	
P < 0,05					
Rasio Odds		1,071		2,1	

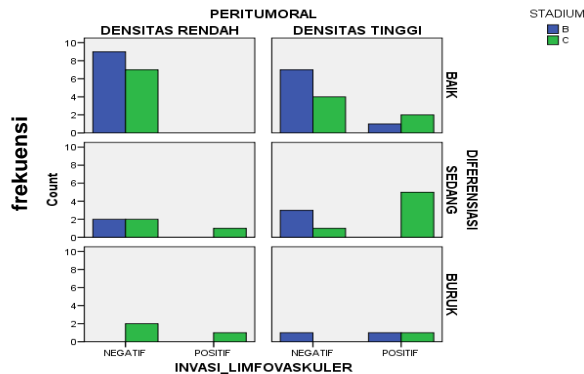




Gambar 1. Pewarnaan Imunohistokimia. A. LVD peritumoral. B. ILV. C. NM23-H1 pewarnaan kuat. D. NM23-H1 pewarnaan sedang. E. NM23-H1 pewarnaan lemah. F. NM23-H1 pewarnaan negatif.



Gambar 2. Ekspresi NM23-H1 pada berbagai diferensiasi histopatologi dan stadium.



Gambar 3. Invasi limfovaskuler terhadap stadium dan diferensiasi histopatologi.

DISKUSI

NM23-H1 adalah salah satu protein non yang merupakan produk gen *nm23*. Gen *nm23* terletak pada kromosom 17q regio21-23,

pertama kali ditemukan pada tahun 1988 oleh Steeg *et al.* pada sel melanoma *murine*. Sel-sel dengan potensi metastasis tinggi mengekspresikan NM23-H1 lebih rendah dibandingkan sel-sel dengan potensi metastasis rendah. Beberapa penelitian tentang peranan NM23-H1 pada berbagai tumor telah dilakukan. Pada karsinoma hepatoseluler, modulasi NM23-H1 mensupresi proses invasi (adesi dan migrasi sel)²⁶. Ekspresi kuat protein NM23-H1 pada sel-sel karsinoma payudara memodulasi stabilitas ikatan NM23-H1 melalui Hsp90 pada KSR1 (Erk MAP Kinase scaffold protein) menurunkan aktivitas MEK/ERK yang berperan dalam aktifitas supresi metastasis dan berkontribusi dalam efektifitas terapi.²⁷ Pada karsinoma kolorektal, peranan ekspresi NM23-H1 dalam menghambat metastasis masih kontroversial.^{10,14} NM23-H1 menekan kolonisasi metastasis melalui *lysophosphatidic acid receptor EDG*, sehingga penghambatan ekspresi EDG2 menurunkan motilitas, invasi dan metastasis.^{28,29} Hal-hal di atas menunjukkan bahwa NM23-H1 menghambat proses metastasis pada berbagai tahap perkembangan neoplasma yaitu invasi, survival dari sel-sel tumor dan kolonisasi metastatik.²⁸

Beberapa penelitian, mengenai ekspresi NM23 menunjukkan hasil bervariasi seperti 58,8% karsinoma kolorektal primer mengekspresikan NM23 lemah,¹⁰ positif pada 16 kasus dan negatif 14 kasus;¹² 88,2% mempunyai nilai 3 (overekspresi) dan 11,8% mempunyai nilai kurang dari 3 (ekspresi rendah) NM23-H1¹⁴. Perbedaan cara penilaian ekspresi protein NM23-H1 dapat menyebabkan perbedaan hasil penelitian. Pada satu penelitian menyatakan tidak ada hubungan NM23-H1 dengan invasi limfovaskuler, diferensiasi histopatologi dan stadium,¹⁴ sedangkan pada beberapa penelitian menyatakan ada hubungan NM23-H1 dengan invasi limfovaskuler, diferensiasi histopatologi dan stadium.¹¹⁻¹³ Sejauh ini belum ada konsensus untuk menentukan ekspresi protein NM23-H1 yang tinggi dan rendah.

Adenokarsinoma kolorektal tanpa metastasis limfonodi dan dengan metastasis limfonodi mempunyai perbedaan ekspresi NM23-H1 signifikan pada penelitian ini. Adenokarsinoma kolorektal dengan metastasis limfonodi mengekspresikan NM23-H1 lebih rendah dibandingkan tanpa metastasis limfonodi. Penelitian ini mendukung penelitian yang menyatakan efek protektif NM23-H1 terhadap metastasis limfo-

nodii.¹² Penelitian lain menyatakan tidak ada hubungan bermakna antara ekspresi protein NM23 dengan stadium.¹⁴ Hasil penelitian lain yang mendukung efek protektif NM23-H1 yang berhubungan dengan instabilitas genetika terhadap metastasis limfonodi menyatakan *microsatellite instability* (MSI) gen NM23-H1 terjadi lebih banyak pada karsinoma kolon stadium I dan II (tanpa metastasis limfonodi) sedangkan Loss of heterozigosity (LOH) banyak terjadi pada stadium III dan IV (dengan metastasis limfonodi). Hal ini menyimpulkan bahwa ekspresi protein NM23-H1 dan MSI gen NM23-H1 pada stadium awal mempunyai peranan dalam mensupresi metastasis pada *sporadic colon cancer*, sedangkan pada stadium lanjut penurunan ekspresi protein NM23-H1 dan LOH gen NM23-H1 mempunyai peranan dalam progresi dan metastasis.³⁰

Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan ekspresi NM23-H1 dengan diferensiasi histopatologi, walaupun data menunjukkan penurunan ekspresi positif NM23-H1 pada diferensiasi sedang sampai buruk dibandingkan diferensiasi baik. Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa NM23-H1 tidak berperan dalam diferensiasi pada karsinogenesis.¹¹ Sedangkan penelitian lain,^{10,13} menyatakan terdapat korelasi negatif NM23-H1 dengan diferensiasi histopatologi, dan disimpulkan ekspresi NM23-H1 dan LOH gen NM23-H1 berperan dalam progresifitas adenokarsinoma kolorektal. NM23-H1 sebagai gen non metastasis tidak mempengaruhi ukuran tumor, hanya mempunyai peran sebagai menghambat metastasis dengan menghambat motilitas sel tumor dan menonaktifkan sel-sel tumor. Gen NM23-H1 menghambat ekspresi reseptor asam lisofosfatidik endothelial differentiation gene-28 (EDG2) dan penurunan ekspresi ini sangat penting dalam mediasi hambatan pada motilitas, invasi dan metastasis oleh gen NM23-H1.^{28,29} Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran protein NM23-H1 dalam proses invasi limfovaskuler disebabkan penurunan motilitas sel tumor ataukah disebabkan kepekaan sel tumor terhadap reseptor pembuluh limfe, perlu penelitian untuk menilai hubungan ekspresi reseptor asam lisofosfatidik *endothelial differentiation gene 28-(G-protein coupled receptors* (EDG2) dengan ekspresi NM23-H1.

Pada penelitian ini terdapat perbedaan bermakna antara invasi limfovaskuler pada

berbagai stadium dengan $p=0,013$, di mana stadium Duke B dijumpai 2 kasus sedangkan stadium Duke C 10 kasus invasi limfovaskuler. Hasil penelitian yang samamenyatakan invasi limfovaskuler berhubungan dengan faktor prognosis yaitu metastasis limfonodi.^{17,19,22} Sedangkan densitas limfovaskuler peritumoral tidak mempunyai perbedaan bermakna pada berbagai stadium, sehingga penelitian ini mendukung bahwa limfangiogenesis bukan faktor prognosis independen kanker kolorektal.²¹

Pada penelitian ini terdapat perbedaan jumlah invasi limfovaskuler bermakna dengan diferensiasi histopatologi ($p=0,018$) dimana adenokarsinoma kolorektal berdiferensiasi sedang sampai buruk lebih sering mengalami invasi limfovaskuler. Tidak didapatkan perbedaan bermakna densitas limfovaskuler peritumoral dengan diferensiasi sel tumor. Penelitian ini menunjukkan derajat diferensiasi histopatologi sedang sampai tinggi berhubungan dengan invasi limfovaskuler, karena ekspresi molekul VEGFC oleh sel-sel tumor yang berperan dalam proses limfangiogenesis juga meningkat seiring bertambah buruk diferensiasi.¹⁸ Penelitian pada adenokarsinoma kolorektal tanpa metastasis limfonodi menunjukkan tidak ada hubungan signifikan antara ekspresi D2-40 dengan diferensiasi histopatologi,²² sedangkan pada penelitian lain menunjukkan limfangiogenesis berhubungan dengan diferensiasi histopatologi.¹⁸

Pada penelitian ini tidak terdapat korelasi densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler dengan ekspresi protein NM23-H1, dan semakin tinggi ekspresi NM23-H1 semakin rendah limfangiogenesis dan semakin rendah ekspresi NM23-H1 meningkatkan terjadinya invasi limfovaskuler. Penelitian ini sama dengan penelitian yang menyatakan bahwa ekspresi protein NM23 tidak berkorelasi dengan invasi limfovaskuler.¹⁴ Sedangkan penelitian yang lain NM23-H1 berkorelasi negatif dengan invasi limfovaskuler.¹¹ NM23-H1 bekerja melalui jalur MAPKs yang paling baik diketahui adalah MEK/ERK *cascade*, di mana dengan memfosforilasi KSR yang menyebabkan perubahan fungsi struktur KSR menyebabkan penurunan aktivitas pERK pada tumor. Sebuah penelitian mendapatkan bahwa limfangiogenesis juga mengambil jalur yang mirip yaitu jalur MAPKs, di mana jalur K-Ras/MAPK adalah jalur utama VEGFR3, tetapi masih tidak jelas bagaimana kadar ekspresi VEGFR3 diregulasi

oleh signal Ras/MAPK atau signal yang mengaktifkan RAS sehingga terjadi peningkatan ekspresi VEGFR3.³¹ Dari dua hasil penelitian ini diperlukan penelitian lebih lanjut apakah ekspresi NM23-H1 juga mempengaruhi ekspresi VEGFR3. Peranan NM23-H1 dalam limfangiogenesis dan invasi limfovaskuler masih perlu diteliti lebih lanjut, meskipun pada penelitian ini tidak didapatkan korelasi bermakna, karena baik NM23-H1 dan limfangiogenesis (melalui VEGFR3) secara teoritis menunjukkan jalur signal yang sama melalui *mitogen activated protein kinase* (MAPK), sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hubungan ekspresi VEGFR3 dengan ekspresi NM23-H1.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan antara invasi limfovaskuler dengan stadium, sedangkan densitas limfovaskuler peritumoral tidak berhubungan dengan stadium, sehingga penelitian ini mendukung bahwa limfangiogenesis bukan faktor prognosis independen kanker kolorektal. Penelitian ini juga menunjukkan tidak adanya korelasi densitas limfovaskuler peritumoral dan invasi limfovaskuler dengan ekspresi protein NM23-H1.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wittekind C. Dalam Jim Cassidy J, Johnston P, Cutsem EV, eds. Colorectal cancer. Madison Avenue New York Informa Healthcare USA, Inc. 2006;103-24.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, CA Cancer J Clin. 2000;50:7-33s.
3. Chen K, Cai J, Liu XY, Ma XY, Yao KY, Zheng S. Nested case-control study on the risk factors of colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2003; 9:99-103.
4. Soeripto, Indrawati, Indrayani. Gastrointestinal Cancer in Indonesia. Asian Pac J Cancer Prev. 2003; 4:289-96.
5. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, present and future. Jpn J Clin Oncol. 2002;32:S17-S21.
6. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society. 2010.
7. Marshall JC, Collins J, Marino N, Steeg P. The Nm23-H1 metastasis suppressor as a

translational target. Eur J Cancer. 2010; 46:1278-82.

8. Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. J Bioenerg Biomembr. 2003;35:31-40.
9. Tee YT, Chen GD, Lin LY, Ko JL, Wang PH. NM23-H1: A metastasis-associated gene. Taiwan J Obstet Gynecol. 2006;45:107-13.
10. Kapitanovic S, Cacev T, Berkovic M, Popovic-Hadzija M, Radosevic S, Seiwerth S, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R. NM23-H1 expression and loss of heterozygosity in colon adenocarcinoma. J Clin Pathol. 2004; 57: 1312-8.
11. Elagoz S, Egilmez R, Koyuncu A, Muslehiddinoglu A, Arichi S. Intratumoral microvessel density and expression of β -FGF and NM23-H1 in colorectal cancer. Pathol Oncol Res. 2006;12:21-7.
12. Yang YQ, Wu L, Chen JX, Sun JZ, Li M, Li DM, Lu HY, Su ZH, Lin XQ, Li JC. Relationship between nm23H1 genetic instability and clinical pathological characteristic in Chinese digestive system cancer patients. World J Gastroenterol. 2008;14: 5549-56.
13. Lin MS, Chen WC, Huang JX, Gao HJ, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y. Tissue microarrays in Chinese human rectal cancer: Study of expression of the tumor-associated genes. Hepato Gastroenterol. 2011;58:1937-42.
14. Oliveira LA, Artigiani-Neto R, Waisberg DR, Fernandes LC, Oliveira LF, Waisberg J. NM23 protein expression in colorectal carcinoma using TMA (Tissue Microarray): association with metastases and survival. Arch Gastroenterol. 2010;47,4: 361-7.
15. Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? J Exp Med. 2001; 194:F37-F42.
16. Pepper MS. Lymphangiogenesis dan tumor metastasis: Myth or reality? Clin Cancer Res. 2001;7:462-8.
17. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VAF, Baltazar, Schmitt F. Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. Virch Arch Path. 2008; 452:133-8.
18. Auwera I, Vermeulen PB, Dirix LY. Dalam: Stacker SA, Achen MG, eds. Lymphangio-

- genesis in Cancer Metastasis. Springer Science. 2009:119-58.
19. Nagahashi M, Ramachandran S, Rashid OM, Takabe K. Lymphangiogenesis: A new player in cancer progression. *World J Gastroenterol.* 2010;16:4003-12.
 20. Jain RK, Tong R, Munn LL. Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema and lymphatic metastatic: insight from a mathematical model. *Cancer Res.* 2007;67:2729-35.
 21. Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, Nomiya T, Miyagawa S, Ohhashi T, Nakayama J. Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessel in colorectal carcinoma and its clinicopathological significant. *Cancer Lett.* 2007;246:167-72.
 22. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Modern Pathol.* 2006; 19:1317-23.
 23. Kawamura L, Carvalho FM, Alves BGL, Bacchi CE, Goes CJS, Calil MA, Baracat EC, Carvalho JP. Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol.* 2010;8:89.
 24. Tezuka K, Onoda N, Takashima T, Takagaki K, Ishikawa T, Wakasa T, Wakasa K, Hirakawa K. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. *Oncol Reports.* 2007; 17:997-103.
 25. Wang YF, Chen JY, Chang SY, Chiu JH, Li WY, Chu PY, Tai SK, Wang LS. NM23-H1 expression of metastatic tumors in the lymph nodes is a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;122:377-86.
 26. She S, Xu B, He M, Lan X, Wang Q. NM23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migrating on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29/1/93.
 27. Salerno M, Palmieri D, Bouadis A, Halverson D, Steeg PS. NM23-H1 Metastasis suppressor Expression Level Influences the Binding properties, stability, and function of the kinase suppressor of Ras1 (KSR1) Erk scaffold in breast carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2005;25:1379-88.
 28. Horak CE, Lee JH, Marshall JC, Shreeve SM, Steeg PS. The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2008; 116: 586- 601.
 29. Lee JH, Marshall JC, Steeg PS, Horak CE. Altered gene and protein expression by NM23-H1 in metastasis suppression. *Mol Cell Biochem.* 2009;329: 141-8.
 30. Su ZH, Li JC. Lymphatic metastasis and nm23-H1 genetic instability in chinese colon cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2800-4.
 31. Ichise T, Yoshida N, Ichise H. H-, N-, Kras cooperatively regulate lymphatic vessel growth by modulating VEGFR3 expression in lymphatic endothelial cells in mice. *Development* 2010; 137: 1003-13.