

Perbandingan Aktivitas Enzim MMP-9, TIMP-1, dan Ekspresi Kolagen-4 pada Model SOPK Dibandingkan dengan Siklus Estrus Normal

(Compartion Study Between Animal Model SOPK and Normally Clycle is MMP-9, TIMP-1 Enzym Activities and Collagen Expression (an Experiment Study in Rat))

Budi Santoso*, R. Prajitno Prabowo*, Soetjipto**, Widjiati***

ABSTRACT

This study was aimed to explain pathogenesis of occurring ovarian cyst and ovulation disturbance in PCOS case. This study is an experimental study using Rattus novergicus as PCOS model, compared to control study in every estrus cycle phase of Rattus novergicus, ie, proestrous, estrous, metestrous and disestrous phase. Each study group and control group consisted of 5 rats so that there were a total of 25 Rattus novergicus. PCOS model group was injected with testosterone propionate with dose 1mg/ 100 BW, whereas control group with propylene glycol injection. The examination of MMP-9, TIMP-1 activity by ELISA activity and Collagen-4 used immunohistochemistry staining. The statistic analysis used ANOVA test. The average of MMP-9 activity of PCOS model (P): 235.17 (SD: 5.47), Proestrous Group (PG): 257.40 (SD: 0.25), Estrous Group (EG): 262.80 (SD: 2.34), Metestrous Group (MG): 254.43 (SD: 6.21), Diestrous Group (DG): 240.69 (SD: 4.16). With ANOVA test, PCOS model only indicated a significant difference with Estrus Group: ($p = 0.001$). The average of TIMP-1 activity of P: 57.15 (SD: 2.46), PG: 51.63 (SD: 3.81), EG: 16.30 (SD: 2.33), MG: 12.84 (SD: 0.42), DG: 28.95 (SD: 3.07). With ANOVA test, PCOS model indicated a significant difference with Estrus, Metestrus and Diestrus ($p = 0.000$). The average of Collagen – 4 expression P: 41.60 (SD: 3.36), PG: 22.40 (SD: 3.51), EG: 21.40 (SD: 1.52), MG: 23.80 (SD: 1.92), DG: 23.80 (SD: 1.79) with ANOVA test indicated a significant difference ($p = 0.00$). The decrease of MMP-9 activity and the increase of TIMP-1 activity occurring in PCOS model have resulted in the increase of Collagen 4 expression and finally caused the thickening fibrous follicle wall consequently, the failure of follicle enlargement may mechanically occur.

Key words: PCOS, PCOS model, MMP-9 activity, TIMP-1 activity, Collagen-4

PENDAHULUAN

Sindroma Ovarium Polikistik (SOPK) merupakan gangguan ovulasi yang paling banyak dialami oleh wanita pada masa reproduksi. Kurang lebih 4-6% wanita mengalami gangguan ini. Patofisiologi Sindroma Ovarium Polikistik ini belum diketahui secara pasti. Wanita dengan SOPK memiliki karakteristik antara lain, anovulasi kronik dan hiperandrogenisme. Pada umumnya penderita dengan SOPK datang ke dokter karena gangguan menstruasi dan infertilitas. Penelitian di Surabaya, mendapatkan angka 4,5% dari wanita usia reproduksi mengalami gangguan menstruasi dan infertilitas (Santoso dan Irawan, 2007).

Matrix metalloproteinase yang berperan pada degradasi dinding folikel adalah MMP-9 dan MMP-2, di mana MMP-

9 disintesis oleh makrofag, sedangkan MMP-2 disintesis oleh endotel. Substrat dari kedua enzim ini adalah kolagen tipe I dan tipe IV (Birkedal-Hansen, 1993). Bila terjadi degradasi kolagen pada basal membran folikel oleh MMP-2 dan MMP-9, yang mengakibatkan terjadinya ruptur dari membran folikel, maka dilepaslah suatu enzim yang disebut sebagai *lysyl oxidase* (LOX), di mana enzim ini kerjanya menghambat kerusakan kolagen pada membran folikel (Henmi, 2001). Sebaliknya bila terjadi penurunan MMP-2 dan MMP-9 maka tidak terjadi degradasi dan menyebabkan penebalan dinding folikel dan terbentuklah kista.

Untuk membuktikannya perlu dilakukan penelitian. mengukur MMP-9, KOLAGEN-4 dan ketebalan fibrous dinding folikel kista ovarium model SOPK dibandingkan dengan siklus estrus normal.

* Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

** Departemen Biokimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya

*** Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya

Oleh karena hal ini tidak mungkin dilakukan pada manusia maka dibuat model dengan menggunakan *Rattus novergicus* imatur berumur 21 hari yang telah disuntik dengan testosteron propionat, selama 14 hari. Dari beberapa studi literatur dan telah kami buktikan pada penelitian kami sebelumnya model demikian telah memenuhi syarat morfologi kasus SOPK (**Beloosesky et al.**, 2004; **Santoso et al.**, 2007). Tujuan penelitian adalah untuk menjelaskan pathogenesis kejadian kista ovarium dan gangguan ovulasi pada kasus SOPK yang terjadi pada tikus.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan menggunakan *Rattus novergicus* sebagai model SOPK, dibandingkan dengan kontrol setiap fase siklus estrus *Rattus novergicus*, yaitu: fase proestrus, estrus, meterus, dan diestrus. Masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sebanyak 5 ekor, sehingga secara keseluruhan diperlukan 25 ekor *Rattus novergicus*. Kelompok model SOPK diinjeksikan *testosteron propionat* dengan dosis 1 mg/100 BB rattus, sedangkan kelompok kontrol dengan *propyleneglicol*. Pemeriksaan aktivitas MMP-9 dan aktivitas TIMP-1 menggunakan Elisa Aktivitas dan ekspresi KOLAGEN-4 menggunakan cara Imunohistokimia.

Adapun bahan kit yang digunakan untuk pemeriksaan tersebut tersebut diatas, adalah:

- Antibodi monoklonal Kolagen-4: Lab Vision, Cataloc Number, MS-375-S
- Kit pemeriksaan TIMP-1 (Quantikine, Cataloc Number, DTM100
- Kit pemeriksaan MMP-9 (Quantikine, Cataloc Number, DM9L20).

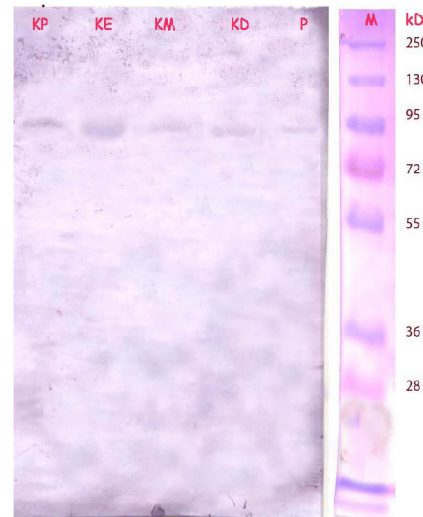
Penelitian Ini sudah mendapat persetujuan Laik Etik dari *Animal Care and Use Committee* (ACUC) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, No: 037-KE/2008.

Data yang dihasilkan akan dianalisa menggunakan Uji statistik Anova.

HASIL DAN DISKUSI

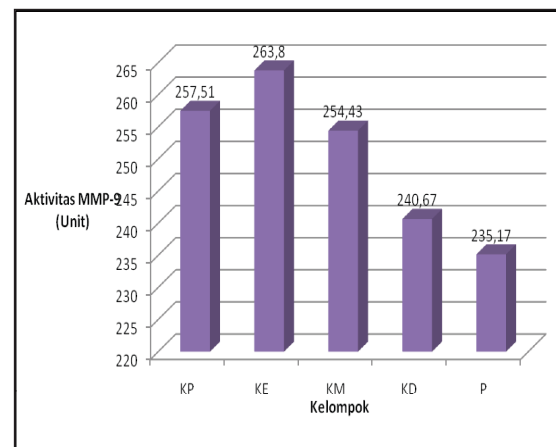
Gambar 1, menunjukkan ekspresi protein MMP-9 pada cairan folikel dengan metode western blotting yang timbul dapat terdeteksi secara spesifik pada kisaran berat molekul 95 kDa. Tampak dalam pita fase estrus (KE) yang paling tebal, hal ini menunjukkan aktivitas MMP-9 yang paling tinggi, sebaliknya kelompok P (model SOPK) yang paling tipis.

Rerata aktivitas MMP-9 kelompok model SOPK (P): 235,17 (SD: 5,47), Kelompok Proestrous (KP): 257,40 (SD: 0,25), Kelompok Estrous (KE): 262,80 (SD: 2,34), Kelompok Metestrous (KM): 254,43 (SD: 6,21), Kelompok Diestrous (KD): 240,69 (SD: 4,16). Dengan tes ANOVA model SOPK menunjukkan perbedaan yang bermakna hanya dengan kelompok Estrus estrus: ($p = 0,001$).



Gambar 1. Hasil Western Blotting MMP- 9 Cairan Folikel yang dikenali oleh MAB MMP9.

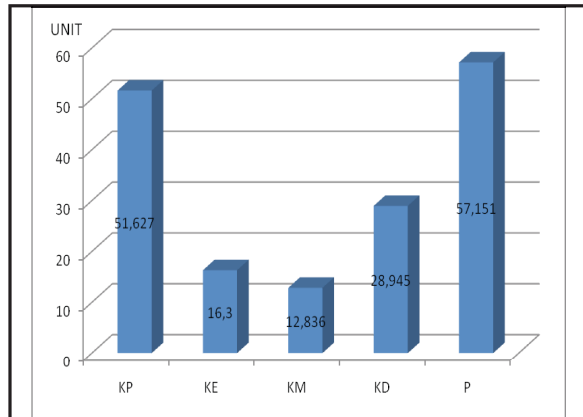
Keterangan: Protein (95 kDa) yang dikenali oleh MAB MMP-9.



Gambar 2. Aktivitas MMP-9 cairan folikel kelompok perlakuan (P) dibandingkan dengan siklus estrus normal (KP, KE, KM dan KD).

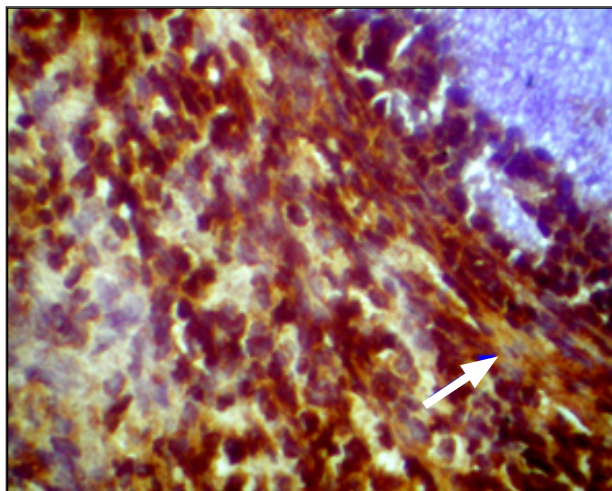
Rerata aktivitas TIMP-1 kelompok P: 57,15(SD: 2,46), kelompok KP: 51,63(SD: 3,81), KE: 16,30 (SD: 2,33), kelompok KM: 12,84 (SD: 0,42), kelompok KD:

28,95 (SD: 3,07). Dengan tes ANOVA model SOPK menunjukkan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok fase Estrus, kelompok Metestrus dan kelompok Diestrus ($p = 0,000$).

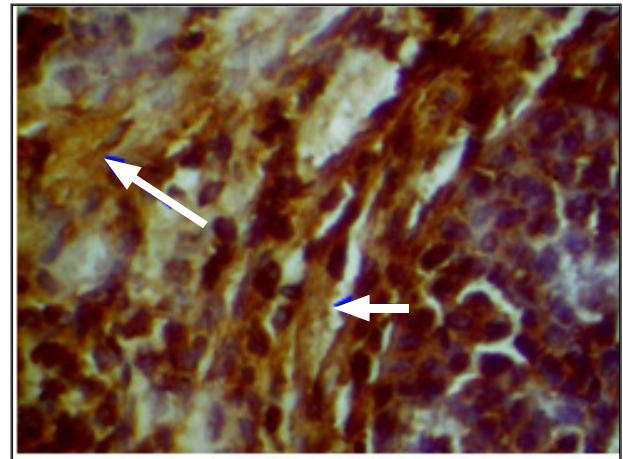


Gambar 3. Hasil Elisa aktivitas TIMP-1 kelompok Perlakuan (KP) dibandingkan dengan kelompok siklus estrus normal (KP, KE, KM dan KM).

Rerata ekspresi KOLAGEN-4 kelompok P: 41,60 (SD: 3,36), kelompok KP: 22,40 (SD: 3,51), kelompok KE: 21,40 (SD: 1,52), kelompok KM: 23,80 (SD: 1,92), kelompok KD: 23,80 (SD: 1,79) Dengan tes ANOVA model SOPK menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan seluruh fase estrus ($p = 0,00$).



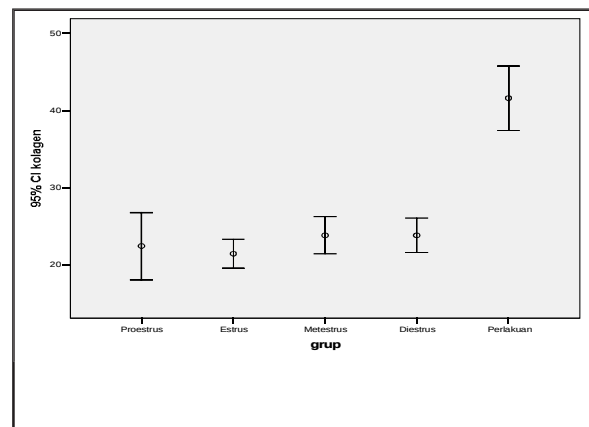
Gambar 4. Tampak sel penghasil kolagen tipe-4 dengan pemeriksaan IHC pada kelompok KP. (Pembesaran 400×).



Gambar 5. Tampak sel penghasil kolagen tipe-4 dengan pemeriksaan IHC, pada kelompok Perlakuan (Model SOPK) (pembesaran 400×).

Pada gambar 5, terlihat ekspresi Kolagen-4 pada kelompok P (model SOPK) yang paling tinggi (41,600) dibandingkan dengan seluruh kelompok kontrol, dengan uji statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p = 0,000$), sedangkan kelompok kontrol menunjukkan hasil yang hampir mirip, yaitu: KP (22,400), KE (21,400), KM (23,800), dan KD (23,800) dengan uji statistik semuanya menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna.

Tampak jelas pada kelompok model SOPK, terjadi peningkatan Kolagen-4 yang merupakan penyusun utama jaringan fibrous.



Gambar 6. Ekspresi KOLAGEN-4 kelompok Perlakuan (KP) dibandingkan dengan kelompok siklus estrus Normal (KP, KE, KM, dan KD).

Pada folikulogenesis awal, tampak peran androgen mempromosi pertumbuhan folikel. Namun pemberian testosteron pada biri-biri bunting dan saat fetus prenatal dengan androgen, mengurangi jumlah folikel primordial dan meningkatkan jumlah folikel pada stadium perkembangan, menunjukkan bahwa testosteron meningkatkan jumlah rekrutmen folikel. Pada kera betina rhesus, diinjeksi dengan testosteron saat prenatal, banyak ditemukan ovarium yang mengandung folikel kistik menyerupai ovarium polikistik pada wanita dengan SOPK. Pada primata yang diberikan injeksi androgen dalam rentang waktu pendek didapatkan dalam ovarium peningkatan jumlah folikel preantral dan antral kecil serta hipertrofi dari sel teka. Pada babi jumlah folikel preovulatori dan corpus luteum meningkat saat diterapi dengan testosteron atau dihidrotestosteron (**Cardenas**, 1997).

Pada manusia gejala klasik dari SOPK adalah hiperandrogen. Hal ini disebabkan oleh sel teka pada ovarium wanita SOPK tidak respon terhadap downregulation gonadotropin, menyebabkan produksi androgen tidak terkendali. Hypertrophy sel teka, yang terjadi pada ovarium wanita SOPK memperburuk problem tersebut. Bukti bahwa androgen berperan pada anovulasi datang dari pasien SOPK yang diterapi dengan anti androgen yaitu flutamid. Setelah enam bulan pengobatan ternyata ovulasi kembali lagi. Ditambahkan juga pada saat terapi dengan clomifen sitrat atau regimen FSH dengan dikombinasi anti androgen lain, yaitu cyproterone acetate, angka ovulasi dan kehamilan lebih tinggi. Hiperandrogen menyebabkan: 1) Konversi androgen menjadi 5α androgen oleh 5α reductase yang tidak dapat dilakukan aromatisasi menjadi estrogen; 2) Hiperandrogen mempertahankan keadaan tetap anovulasi; 3) Menghambat pertumbuhan folikel dan mempercepat atresia folikel premature.

Penelitian ini dirancang dengan menciptakan kondisi hiperandrogen tanpa memperhatikan darimana hiperandrogen tersebut berawal, walaupun dari penelitian yang telah dipublikasikan dengan membuat model mirip dalam penelitian ini, penyuntikan diatas 21 hari dengan testosteron propionat menyebabkan keadaan resistensi insulin (**Beloosesky**, 2004). Hal yang sama namun dengan menggunakan regimen DHT dan letrozole, **Manneras** (2007) menyimpulkan selain menghasilkan perubahan morfologi pada ovarium, juga terjadi perubahan metabolik seperti pada perempuan dengan SOPK. Hasil ini memperkuat argumentasi bahwa kondisi hiperandrogen pada penderita SOPK tanpa kelainan metabolik pada awalnya, bisa terjadi resistensi insulin dan berakhir dengan penyakit metabolik (**Slowey**, 200).

Pada penderita SOPK terjadi akumulasi jaringan folikel yang terus memproduksi hormon steroid, dan berjalan terus hingga terjadi atresia, seketika itu pula diganti folikel baru dengan potensi pertumbuhan terbatas. Folikel yang mengalami atresia berasal dari sel granulosa, dan menjadi bagian stroma ovarium dengan fungsi menghasilkan androstenedion dan testosteron, dalam keadaan normal kedua steroid tersebut dihasilkan oleh sel teka. Di intrafolikuler, keadaan hiperandrogen ini juga akan mengakibatkan terjadi konversi dari androgen menjadi 5α androgen oleh enzim 5α reduktase. Bentuk aktif ini akan menghalangi aromatisasi dari androgen menjadi estrogen.

Keseimbangan antara MMP-9 dan TIMP-1

Perkembangan folikel, ovulasi, pembentukan dan regresi corpus luteum melibatkan proses *tissue remodelling* sangat panjang. Dengan melibatkan sejumlah matrix metalloproteinases (MMP) dan inhibitor MMP (TIMP). Ada perbedaan produksi MMP-2, MMP-9 dan TIMP-1 dengan melakukan kultur terhadap sel granulosa pada perempuan SOPK dan perempuan dengan ovulasi normal setelah dilakukan simulasi pada program In Vitro Fertilisasi (FIT). Dalam cairan intra folikuler perempuan SOPK kadar MMP-9 dan MMP-2 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perempuan normal. Produksi basal TIMP-1 pada kultur tidak berbeda pada kelompok SOPK dibandingkan dengan kelompok normal. Lebih jauh, ada beberapa alasan untuk mempercayai bahwa sistem MMP dan TIMPs sebagai kaskade proteolitik yang berinteraksi dengan sistem regulator intra ovari, seperti IGF-1 dan *respective binding proteins*.

Kelompok kontrol menunjukkan kesesuaian dengan proses perkembangan folikel, dimana pada fase estrus aktivitas MMP-9 paling tinggi dibandingkan dengan fase siklus estrus lainnya. Dimulai dengan kenaikan pada aktivitas MMP-9 pada fase proestrus, meningkat dan paling tinggi pada fase estrus karena ovulasi dan secara bertahap turun pada fase metestrus dan diestrus. Pada kelompok estrus dimana aktivitas MMP-9 paling tinggi, untuk ikut berperan pada proses ovulasi bersama dengan faktor lainnya (**Gambar 2**), dilain pihak aktivitas TIMP-1 justru rendah, aktivitas TIMP-1 meningkat secara berangsur-angsur setelah terjadi ovulasi pada fase metestrus dan diestrus (**Gambar 3**).

Kolagen-4

Hasil akhir dari proses panjang mulai saat rangsangan oleh hormon androgen tinggi, terhadap sel teka sampai peningkatan ekspresi Kolagen-4. Hal ini terlihat pada

gambar 6, pada kelompok model SOPK tampak ekspresi kolagen-4 yang paling tinggi dibandingkan dengan seluruh fase siklus estrus normal.

Temuan lain dalam penelitian ini

Peran sitokin dan enzim Matriks Ekstra Seluler yang selama ini diyakini hanya dimulai sesaat setelah lonjakan *Luteinizing Hormone* (LH) sebagai respon akumulasi kenaikan hormon estrogen, dan selanjutnya memulai perubahan sejumlah sistem regulator intraovarium dengan beraksi secara bersama, sinkron bertahap sehingga terjadi degradasi matriks ekstraseluler pada *apex* folikel, peningkatan permeabilitas dan peningkatan aliran darah. Peningkatan permealabilitas dan peningkatan aliran darah tersebut selanjutnya merangsang perubahan vaskuler dan meningkatkan tekanan intrafolikuler. Degradasi dinding folikel dan peningkatan tekanan intrafolikuler akan memicu ovulasi.

Ternyata dari penelitian ini mampu membuktikan bahwa pada siklus estrus normal, kenaikan dan penurunan enzim MMP dan inhibitorynya, dalam hal ini diwakili oleh MMP-9 dan penghambatnya TIMP-1, mulai muncul saat fase proestrus. Kenaikan aktivitas enzim MMP-9 dan penurunan aktivitas TIMP-1 dipicu oleh kenaikan kadar TGF- β . TGF- β selama ini dikenal hanya berperan pada proses degradasi endometrium saat mulai terjadi menstruasi atau saat implantasi embrio, ternyata juga berperan sebagai pemicu pada proses degradasi dinding folikel. Dan kemungkinan peran LH, sebagai pemicu akhir setelah proses degradasi dinding folikel berjalan sejak awal fase estrus terjadi.

Jika dilakukan ekstrapolasi pada folikel manusia tentunya sejak awal fase folikuler sudah terjadi kenaikan aktivitas MMP-9, penurunan aktivitas TIMP-1, penurunan Kolagen-4 dan penipisan dinding folikel, selanjutnya saat terjadi *LH surge*, peran LH hanya menambah aktivitas MMP-9, menurunkan aktivitas TIMP-1, penurunan Kolagen-4 dan penipisan dinding folikel, khususnya di *apex* sebagai tempat keluar oosit.

Temuan baru pada penelitian ini

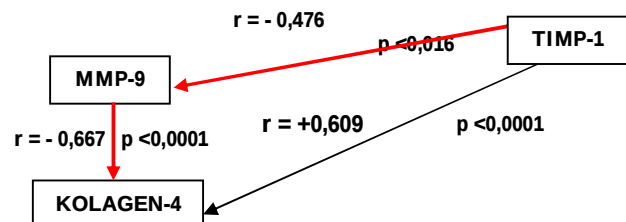
- Keterlibatan produk sitokin, kemokin dan enzim yang berperan pada proses pertumbuhan folikel terhenti, cukup menonjol, terbukti dibandingkan dengan seluruh fase siklus estrus normal menunjukkan perbedaan bermakna (*Gambar, 2, 3 dan 6*).
- Hubungan antara variabel aktivitas TIMP-1 menunjukkan korelasi positif ($r = 0,195$ dan

$p < 0,351$), hubungan TGF- β dengan aktivitas MMP-9 menunjukkan korelasi negatif ($r = -0,167$ dan $p < 0,424$), Hubungan antara aktivitas MMP-9 dengan TIMP-1 menunjukkan korelasi negatif ($r = -0,476$ dan $p < 0,016$), hubungan antara aktivitas MMP-9 dengan Kolagen-4 menunjukkan korelasi negatif ($r = -0,667$ dan $p < 0,000$), hubungan antara aktivitas TIMP-1 dengan Kolagen-4 menunjukkan korelasi yang positif ($r = 0,609$ dan $p < 0,0001$) dan hubungan.

Menarik sekali hasil yang ditunjukkan pada pemeriksaan aktivitas MMP-9 sebagai enzim yang berfungsi mendegradasi KOLAGEN-2 dan 4 turun secara bermakna pada kelompok Perlakuan (Sebagai Model SOPK) dibandingkan dengan seluruh kelompok Kontrol yang merupakan fase siklus estrus normal. Demikian juga pada pemeriksaan aktivitas TIMP-1 yang merupakan enzim yang berfungsi sebagai penghambat aktivitas dari MMP-9, tampak meningkat pada kelompok Perlakuan. Sebagai hasil akhir dari ketidakseimbangan aktivitas beberapa enzim tersebut dapat dilihat dari hasil pemeriksaan KOLAGEN-4, yang menunjukkan peningkatan ekspresi KOLAGEN-4 secara bermakna pada kelompok Perlakuan dibandingkan dengan kelompok Kontrol.

Juga tampak dari semua pemeriksaan tersebut di atas, peningkatan aktivitas MMP-9 dan penurunan aktivitas TIMP-1 yang selanjutnya direspon oleh penurunan KOLAGEN-4, sebagai penyusun dinding fibrous folikel sudah tampak sejak awal perjalanan perkembangan folikel, hal ini bisa mematahkan bahwa aktivitas enzim sebagai pendeградasi jaringan Matriks Ekstra Seluler, tidak hanya bekerja saat menjelang ovulasi sebagai respon lonjakan LH (*LH surge*), namun sudah bekerja sejak awal perkembangan folikel.

Uji korelasi antara aktivitas MMP-9 terhadap KOLAGEN-4 menunjukkan hubungan yang positif ($p = 0,000$), demikian juga Uji Korelasi untuk hubungan antara aktivitas TIMP-1 dengan KOLAGEN-4 menunjukkan hubungan yang positif pula ($p = 0,001$).



Gambar 7. Hubungan antara MMP-9, TIMP-1 dan Kolagen-4

SIMPULAN

Pada kelompok Model SOPK terjadi penurunan aktivitas MMP-9 dan peningkatan aktivitas TIMP-1, sehingga terjadi peningkatan ekspresi KOLAGEN-4 yang menyebabkan ketebalan fibrous dinding folikel lebih tebal dibandingkan dengan fase siklus estrus normal, kemungkinan hal ini yang mengakibatkan kegagalan pembesaran folikel secara mekanik.

DAFTAR PUSTAKA

- Beloosesky R, Gold R and Almog B**, 2004. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/ insulin ratio, *Inter. J. mol. med.*14: 207–15.
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI and Bodden MK**, 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197–250.

- Cardenas H, Pope WF**, 1997. Administration of testosterone from day 13 of the oestrous cycle to oestrus increased the number of corpora lutea and conceptus survival in gilts. *J Amin Sci.* 75: 202–207.
- Henmi H, Endo T, and Nagsawa K**, 2001. Lysyl Oxidase and MMP-2 Expression in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Rats, *Biol. Reprod.* 64: 157–162.
- Manneras L, Cajander S and Holmang A**, 2007. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystics Ovary Syndrome. *Endoc.* 148: 3781–3791.
- Santoso B dan Irawan**, 2007. Prevalensi Sindroma Ovarium Polikistik Wanita Usia Reproduksi di Surabaya (Laporan akhir Risbin Iptekdok 2007/dibacakan pada PIT XVIII – Balikpapan 2008).
- Slowey MJ**, 2001. Polycystic Ovary Syndrome: New Perspective on an Old Problem. *Southern Medical Journal* 94(2): 190–196.