

Hubungan antara virus Epstein Barr dengan penyakit Hodgkin.

Suatu analisis imunohistopatologik ekspresi EBV LMP-1

C. Murtono^{*}, Soeripto^{**}

^{*}) Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Katolik Atma Jaya, Jakarta

^{**}) Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Murtono & Soeripto - The Relation between Epstein-Barr Virus and Hodgkin's Disease: Immuno-histopathological Analysis of EBV LMP-1 expression

EBV-LMP-1 is one of the proteins formed in the B lymphocytes and that has an oncogenic property and expressed by Sternberg Reeds cells. Detection of EBV LMP-1 is a reliable method to determine the presence of EBV in Hodgkin's disease. There were geographical distributions of Hodgkin's disease based on its histological classification. This study determined the correlation between EBV and Hodgkin's disease based on its histological subtype in Yogyakarta. Eighteen formaldehyde fixed in paraffin wax embedded specimen of Hodgkin's disease were investigated for their EBV-LMP-1 expression by immunohistochemistry reaction with cocktail CS 1-4 (DAKO) as monoclonal antibody and Mayer's Hematoxylin as counterstain. For negative control LMP-1 monoclonal antibody was omitted. EBV LMP-1 expression was detected in 9/18 (50%) of Hodgkin's disease cases. The frequency of Hodgkin's disease subtypes is as follows LP (lymphocytic predominance) 11.11%, NS (nodular sclerosis) 11.11%, MC (mixed cellularity) 22.22% and LD (lymphocytic depletion) 55.55%. The median age of the patients is 52.5 years with mean 52.3 year and SD 9.15 year. LMP-1 positivity was detected in 0/2 (0%) for LP subtype, 1/2 (50%) for NS, 2/4 (50%) for MC, and 6/10 for LD (60%). Based on EBV LMP-1 expression in the Sternberg Reed cells, it corroborated a significant role for EBV on the oncogenesis of Hodgkin's disease in Yogyakarta especially for LD subtype

Key Words : Hodgkin's disease - histological classification - latent membrane protein-1 (LMP-1) - immunohistochemistry - oncogenesis.

ABSTRAK

Murtono & Soeripto - Hubungan antara virus Epstein Barr dengan penyakit Hodgkin. Suatu analisis imunohistopatologik ekspresi EBV LMP-1

EBV LMP-1 adalah satu dari protein yang dibentuk di dalam limfosit B, memiliki sifat onkogenik dan diekspresikan oleh sel Sternberg Reeds. Deteksi EBV-LMP-1 adalah metode yang dapat dipercaya untuk mendeteksi peran EBV pada onkogenesis penyakit Hodgkin. Terdapat distribusi geografis penyakit Hodgkin berdasar klasifikasi histologiknya. Penelitian ini dilakukan untuk menetapkan peran EBV pada onkogenesis penyakit Hodgkin berdasarkan sub tipe histologiknya di Yogyakarta. Delapan belas blok parafin spesimen jaringan penyakit Hodgkin yang telah difiksasi di dalam formaldehid diteliti ekspresi EBV LMP-1 dengan teknik immunohistokimia menggunakan CS1-4 (DAKO) sebagai antibodi primer dan Hematoxyllin Mayer sebagai *counter-stain*. Antibodi primer LMP-1 tidak digunakan pada kontrol negatif. Ekspresi EBV LMP-1 dideteksi pada 9/18 (50%) dari kasus-kasus penyakit Hodgkin. Distribusi sub tipe-sub tipe penyakit Hodgkin adalah LP 11,11%, NS 11,11%, MC 22,22% dan LD 55,55%. Median dari umur penderita adalah 52,5 tahun dengan mean 52,3 tahun dan SD 9,15 tahun. Positivitas LMP-1 dideteksi pada 0/2 (0%) untuk sub tipe LP, 1/2 (50%) untuk NS, 2/4 (50%) untuk MC dan 6/10 (60%) untuk LD. Berdasar ekspresi EBV LMP-1 di dalam sel Stenberg Reeds, tampak peran EBV dalam onkogenesis penyakit Hodgkin di Yogyakarta yang cukup besar terutama untuk sub tipe LD.

PENGANTAR

Epstein Barr Virus (EBV) adalah salah satu virus yang terdapat di mana-mana dan dikenal menginfeksi jaringan limfoid ataupun epitelial. Lebih dari 90% populasi dunia menunjukkan seropositif terhadap EBV¹. Akhir-akhir ini EBV ditunjukkan berperan pada onkogenesis penyakit Hodgkin di samping keganasan lain, antara lain karsinoma nasofaring, limfoma Burkitt serta limfoma non Hodgkin (NHL) pada penderita imunodefisiensi. Sel target utama EBV adalah limfosit B dan epitel orofaring, yaitu organ dengan kandungan reseptor terhadap EBV (CD21) paling padat. Pada limfosit B EBV menyebabkan infeksi laten, yang memberi reaksi imunologik yang berbeda dengan infeksi litis².

Pada infeksi laten tidak semua protein laten EBV selalu diekspresikan. Perbedaan pola ekspresi dapat dilihat dalam keadaan fisiologis dan patologis yang berbeda. Pada saat ini dikenal tiga pola ekspresi gena laten EBV seperti yang tersebut di bawah ini.

- Tipe laten I: ekspresi EBER-1, 2 dan EBNA-1. Gambaran ini dapat ditemukan pada limfoma Burkitt.
- Tipe laten II: ekspresi EBER-1, 2, EBNA-1, dan LMP-1, -2. Tipe ini didapatkan pada beberapa keganasan yang mempunyai asosiasi dengan EBV, antara lain penyakit Hodgkin dan karsinoma nasofaring.
- Tipe laten III: ekspresi EBER-1, 2 dan EBNA-1, -2, -3A, 3B, - 3C, LP, LMP-1, -2. Tipe ini dapat ditemukan pada *large B cell lymphoma* pada keadaan imunodefisiensi.

LMP-1 adalah suatu protein transmembran yang mempunyai asosiasi kuat dengan vimentin sitoskeletal. LMP-1 mempunyai sifat yang khas yaitu sebagai protein onkogenik. Protein ini memacu transformasi morfologis pada keratinosit manusia dan menghambat diferensiasi sel epitel. Transfeksi LMP-1 di dalam limfosit B mengakibatkan peningkatan pengaturan (*upregulation*) onkoprotein bcl 2 yang melindungi sel dari

kematian secara *apoptosis*. Ekspresi LMP-1 juga berhubungan dengan peningkatan ekspresi reseptor transferin dan molekul-molekul adesi selular LFA-1, LFA-2 dan ICAM-1³. Pemeriksaan ekspresi LMP-1 merupakan metode yang cukup adekuat untuk mendeteksi adanya infeksi laten EBV di dalam jaringan penyakit Hodgkin⁴ dan hal ini diperkuat oleh penelitian-penelitian lain yang menyimpulkan bahwa pemeriksaan ekspresi LMP-1 mempunyai korelasi yang sangat kuat dengan positivitas EBER-1, 2 di dalam sel Sternberg Reeds⁵ LMP-1 mempunyai kelebihan terhadap EBER-1, 2 karena mempunyai sifat onkogenesis.

Distribusi frekuensi atau insidensi rata-rata penyakit Hodgkin secara geografik berbeda-beda. Di Asia insidensi penyakit Hodgkin 0,5 per 100.000 penduduk per tahun, berbeda dibandingkan dengan di Amerika Utara 3.0 per 100.000 penduduk per tahun. Positivitas ekspresi LMP-1 pada penyakit Hodgkin cukup bervariasi. Hasil positif penelitian LMP-1 dalam sel Sternberg Reeds dapat dipakai untuk menilai sejauh mana EBV ikut berperan dalam onkogenesis penyakit Hodgkin. Di Amerika didapat angka rerata positivitas LMP-1 48%⁶, di Perancis 33%⁴, di Cina 65%⁷ dan di Inggris 32%⁸. Berdasarkan subtipe-nya, frekuensi tertinggi LMP-1 positif didapat pada subtipe *mixed cellularity* (MC) yaitu berkisar antara 60-90%^{6,7,8}. Pada subtipe *nodular sclerosis* (NS) didapat kasus positif sekitar 10-33%. Angka positif untuk subtipe *lymphocytic depletion* (LD) di Inggris 14%⁸, dan 83% di Mexico¹⁰. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berapa besar peran EBV dalam onkogenesis penyakit Hodgkin di Yogyakarta dengan memeriksa ekspresi LMP-1.

BAHAN DAN CARA

Sediaan-sediaan histopatologis diperoleh dari Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM, RSUP Dr. Sardjito, RS Bethesda, RS Panti Rapih, dan Laboratorium Patologi Waskitha.

Semua sediaan histopatologis yang tersedia dan didiagnosis sebagai penyakit Hodgkin dari Januari 1992 sampai dengan Juni 1996 diperiksa ulang untuk konfirmasi diagnosis histopatologik penetapan subtipe dan pemenuhan syarat untuk penelitian imunohistokimia.

Subtipe penyakit Hodgkin yang dipakai adalah klasifikasi Ann Arbor yaitu dengan subtipe histologis *lymphocytic predominance* (LP), *nodular sclerosis* (NS), *mixed cellularity* (MC) dan *lymphocytic depletion* (LD). Kriteria diagnosis histologis pasti penyakit Hodgkin yaitu jika dalam sediaan didapatkan sel Sternberg Reed. Konfirmasi dan representasi sediaan dilakukan oleh peneliti pertama selanjutnya dikonsultasikan kepada peneliti kedua. Sesudah sediaan dikonfirmasi dan dianggap representatif, blok parafin sediaan yang didiagnosis sebagai penyakit Hodgkin dipotong setebal 6 µm, dan atas sediaan tersebut dilakukan pemeriksaan imunoperoxidase terhadap adanya antigen EBV-LMP-1. Pemeriksaan tersebut didahului oleh *unmasking* terhadap antigen dengan menggunakan larutan 0,1% tripsin dan 0,1% CaCl₂ dalam larutan *tris buffer*. Larutan *tris buffer* tersebut mempunyai kepekatan 0,05 M dengan pH 7,6. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan KIT imunoperoxidase (DAKO) dan antibodi primer *cocktail* CS1-4 (DAKO). Larutan *Mayer Hematoxillin* digunakan sebagai *counter stain* yang diperkuat larutan amonia sebagai zat pembiru. Untuk *mounting* digunakan *GVA mounting*. Adanya ekspresi LMP-1 ditandai oleh adanya endapan ataupun granula coklat di sitoplasma dan membrana inti sel Sternberg Reeds dan variantnya. Sebagai kontrol negatif digunakan sediaan jaringan penyakit Hodgkin yang ikut proses reaksi immunologis, tetapi tanpa menggunakan antibodi primer. Terhadap data umur penderita dilakukan penghitungan *median* dan *mean*. Untuk dapat melihat besarnya ekspresi LMP-1 pada berbagai subtipe penyakit Hodgkin, dilakukan analisis deskriptif.

HASIL

Dari 46 kasus yang didiagnosis sebagai penyakit Hodgkin ternyata hanya 18 kasus yang dapat dikonfirmasi. Kasus yang tidak dapat dikonfirmasi adalah kasus yang pada sediaan histologisnya tidak didapatkan atau diragukan adanya sel Sternberg-Reed. Hasil klasifikasi subtipe histologis, umur penderita, jenis kelamin, dan ekspresi LMP-1 dapat dilihat pada TABEL 1.

TABEL 1. - Distribusi frekuensi penyakit Hodgkin di Yogyakarta menurut jenis kelamin, umur, klasifikasi histologis, dan ekspresi LMP-1.

No	Sediaan	Jenis kelamin	Umur (tahun)	Klasifikasi histologik subtipe	Ekspresi LMP-1
1.	WJ 92-5887	L	70	LP	-
2.	JL 95- 332	L	50	LP	-
3.	WJ 95-7758	P	4	NS	+
4.	J 95-1099	L	50	NS	-
5.	BJ 92-1541	L	60	MC	+
6.	WJ 94-3839	L	60	MC	+
7.	BJ 95- 232	L	32	MC	-
8.	JRS 93- 221	P	32	MC	-
9.	BJ 94- 293	L	39	LD	-
10.	JL 92- 352	L	55	LD	+
11.	P 94-1027	L	62	LD	+
12.	JL 95- 404	L	65	LD	-
13.	BJ 95- 660	L	60	LD	-
14.	WJ 96- 660	P	54	LD	+
15.	WJ 93-6707	L	51	LD	-
16.	WJ 95-2509	L	50	LD	+
17.	JL 96-1312	P	55	LD	+
18.	JL 95-2368	L	48	LD	+

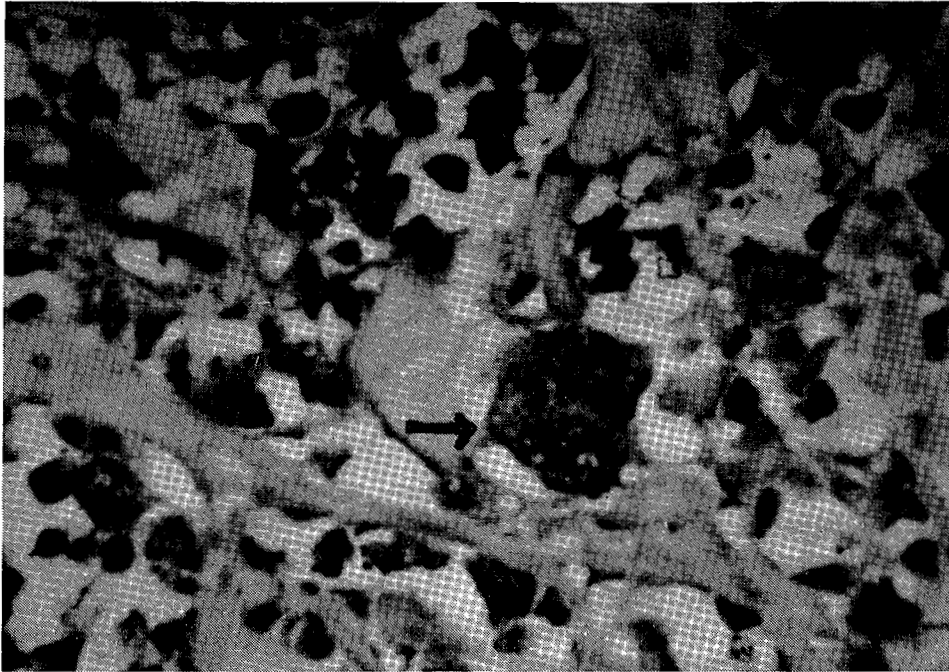
L = laki-laki; P = perempuan

LP = lymphocytic predominance; NS = nodular sclerosis;

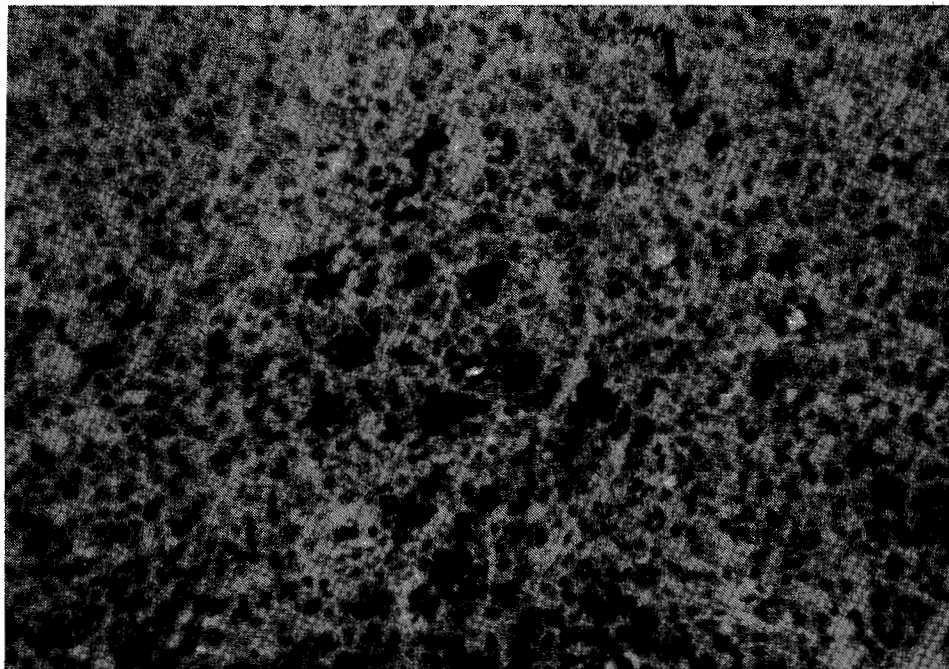
MC = mixed cellularity; LD = lymphocytic depletion

Dari TABEL 1 dapat dilihat bahwa dari 18 sediaan penyakit Hodgkin dari tahun 1992 sampai dengan 1996 frekuensi masing-masing subtipe adalah LP 2 (11,11%), NS 2 (11,11%) MC 4 (22,22%) dan LD 10 (55,55%). Umur penderita termuda 4 tahun dan tertua 70 tahun, median 52,5 tahun, dan *mean* 52,3 tahun. Ekspresi EBV-LMP-1 pada subtipe LP ditemui pada 0/2 kasus (0%), NS 1/2 kasus (50%), MC 2/4 kasus (50%), dan LD 6/10 kasus (60%). Dari 18 kasus didapat 14 kasus pada laki-laki dan 4 kasus pada perempuan. Di samping 9 sediaan yang menunjukkan adanya ekspresi LMP-1 di dalam sel Sternberg-Reeds, ekspresi LMP-1 juga dapat ditampilkan di dalam limfosit pada 5 sediaan, yaitu pada sediaan 3, 5, 10, 11, dan 18.

Hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk ekspresi LMP-1 dapat dilihat pada GAMBAR 1 dan 2. Pada GAMBAR 1 dapat dilihat ekspresi LMP-1 positif di membran inti dan sitoplasma sel Sternberg Reed (anak panah), sedangkan pada GAMBAR 2 dapat dilihat ekspresi LMP-1 dalam limfosit (anak panah) di antara limfosit yang tidak menunjukkan ekspresi.



GAMBAR 1. - Ekspresi LMP-1 di dalam sel Sternberg Reeds (anak panah). Tampak limfosit di sekelilingnya tanpa ekspresi di samping beberapa limfosit dengan ekspresi LMP-1



GAMBAR 2. - Ekspresi LMP-1 di dalam limfosit. Tampak limfosit secara sporadis menunjukkan ekspresi (anak panah) di antara limfosit yang tidak mengekspresi LMP-1

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian dapat dilihat jumlah penderita penyakit Hodgkin subtype LP dan NS sedikit sekali (masing-masing 2 kasus) sehingga tidak dapat dianalisis secara statistik. Kasus subtype MC menunjukkan usia terendah 32 tahun sedangkan dari subtype LD (10 kasus) memperlihatkan usia terendah 48 tahun. Selanjutnya hasil penelitian menunjukkan bahwa penyakit Hodgkin di Yogyakarta terjadi dalam usia dewasa lanjut (*mean* 52,3 tahun, dan SD 9,15 tahun), dan hanya didapatkan 1 penderita anak-anak (4 tahun, tipe NS). Hasil tersebut juga memberikan frekuensi distribusi yang mempunyai satu puncak yaitu pada usia 50-54 tahun. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian dari berbagai tempat yang mempunyai frekuensi distribusi 2 puncak; puncak pertama, berada pada umur 20-24 tahun, dan puncak kedua di atas 55 tahun^{7,11,12,13}. Dibandingkan dengan hasil di lain tempat umur penderita penyakit Hodgkin di Yogyakarta relatif lebih muda.

Dari delapan belas sediaan penyakit Hodgkin di Yogyakarta ternyata subtype LD mempunyai frekuensi yang paling tinggi (55,55%), dibandingkan dengan angka yang tercatat dalam penelitian di tempat lain, antara lain Amerika Serikat (3,8%)¹², dan di Jerman (0,7%)⁹. Angka kejadian penyakit Hodgkin subtype LD di Yogyakarta (55,55%) lebih tinggi dibandingkan dengan angka dari negara berkembang lain, yaitu di Mexico (22,2%)¹⁰. Frekuensi penyakit Hodgkin subtype LD di Yogyakarta yang tinggi cenderung terjadi pada usia dewasa lanjut dibandingkan pada anak-anak. Hal ini kemungkinan karena pada usia lanjut terjadi penurunan daya tahan tubuh sehingga mudah mendapatkan infeksi EBV¹². Faktor lain, rendahnya status sosial ekonomi sebagai penyebab tingginya frekuensi subtype LD di Yogyakarta tidak didukung oleh data yang ada sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut.

Ekspresi LMP-1 positif ditemukan pada sembilan dari delapan belas sediaan (50%). Angka ini lebih rendah dibandingkan dengan angka di beberapa negara berkembang lain, misalnya Peru (83%)¹⁴, Mexico (67%)¹⁰, dan Cina (65%)⁷, namun lebih tinggi dari angka di negara maju yaitu di Amerika Serikat (48%), Perancis (33,5%)⁴, dan Inggris (32%)⁸. Yang sangat mencolok pada

penelitian di Yogyakarta adalah tingginya ekspresi LMP-1 pada subtype LD (60%), yang jauh lebih tinggi daripada angka-angka yang tercatat sebelumnya misalnya di Inggris (14%)⁸, dan Perancis (0%)⁴. Ekspresi LMP-1 pada sel Sternberg Reed memberi petunjuk adanya proses onkogenesis oleh EBV. Tingginya frekuensi subtype LD disertai dengan tingginya ekspresi LMP-1 pada subtype LD di Yogyakarta lebih meyakinkan bahwa proses onkogenesis tampak lebih nyata pada penyakit Hodgkin tipe LD yang mempunyai prognosis paling jelek diikuti oleh tipe MC dan NS, yaitu masing-masing 50%. Dari hasil ini dapat ditunjukkan bahwa peranan EBV dalam onkogenesis penyakit Hodgkin di Yogyakarta sangat signifikan.

Satu temuan lain yang didapat pada penelitian di Yogyakarta adalah adanya limfosit dengan ekspresi LMP-1, di samping dalam sel Sternberg Reeds. Ekspresi LMP-1 pada limfosit harus dibedakan dengan reaksi silang karena reaksi silang relatif lemah dan dapat terjadi pada sel otot polos atau sel plasma⁶, sedangkan dalam limfosit pada penelitian di Yogyakarta ekspresinya nyata dan kuat seperti di sel Sternberg Reeds. Ekspresi LMP-1 di dalam *follicular dendritic cells* pada penyakit Hodgkin, dilaporkan juga oleh peneliti lain⁵. Dalam hal ini terdapat protein LMP-1 dalam limfosit. Protein LMP-1 tersebut tidak berasal dari sel lain^{1,2,6}. Ada kemungkinan yang dapat ditarik dari fenomena ini. Pertama adalah bahwa limfosit yang mengekspresikan LMP-1 ini adalah bagian dari tumor dan merupakan sel tumor. Hal ini kurang sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa sel tumor yang patognomonis pada penyakit Hodgkin adalah sel Sternberg Reed, sedangkan limfosit menurut pendapat ini adalah sel reaktif^{15,16}. Pendapat tersebut diperkuat oleh penelitian tentang perbedaan ekspresi *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) dari sel Sternberg Reed dan limfosit pada penyakit Hodgkin¹⁶. Dari penelitian tersebut dinyatakan bahwa proliferasi neoplastik pada penyakit Hodgkin hanya dialami oleh sel Sternberg Reed sedangkan limfosit mengalami proliferasi non neoplastik. Kenyataan ini diperkuat oleh hasil penelitian hibridisasi *in situ*, bahwa pada jaringan kelenjar limfe dengan hiperplasi reaktif, bahkan normalpun kadang-kadang ditemukan hasil EBER positif^{17,18}. Oleh karena itu

penelitian khusus terhadap status lim- fosit pada penyakit Hodgkin perlu dituntaskan.

KESIMPULAN

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa dengan pemeriksaan ekspresi LMP-1 pada sel Sternberg Reed tampak peran EBV dalam onkogenesis penyakit Hodgkin di Yogyakarta yang cukup besar yaitu ekspresi sebesar 50% untuk semua kasus, dan 60% untuk sub tipe *lymphocytic depletion*.

KEPUSTAKAAN

1. Miller G. Epstein Barr Virus. Biology pathogenesis and medical aspects. In: Fields BN. editor. Virology. New York: D.M. Knipe, 1990.
2. Kieff, E., Leibowitz, D. Epstein Barr virus and its replication. In: Fields BN. editor. Virology. New York: D.M. Knipe 1990.
3. De Bruine PC. T cell non Hodgkin's lymphomas: Biological, virological and clinicopathological aspects. [dissertation] Amsterdam: Vrije Universiteit, 1994.
4. Delsol G, Brousset P, Chittal S, Huguet FR. Correlations of the expression of Epstein Barr virus latent membrane protein and in situ hybridization with biotinilated bam HI-W probes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 1992; 140: 247-53.
5. V Gorp J. Encoded latent membrane protein-1 of Epstein Barr virus on follicular dendritic cells in residual germinacentres on Hodgkin Disease *J Clin Path*, 1994; 47: 29-32.
6. Pallesen G, Dutoit SJH, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *The Lancet*, 1991; 337: 320-22.
7. Chan YK, Yip TT, Tsang WY, Lau WH, Wong CS, Ma VW. Detection of Epstein Barr virus in Hodgkin's disease occurring in an oriental population. *Human Pathol.*, 1995; 3: 314-18.
8. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein Virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer* 1993; 71: 3124-29.
9. Georgii A, Fischer R, Hubner K, Schwarze EW, Bernhards J. Classification of Hodgkin's disease biopsies by panel of four histopathologists. *Leuk-Lymphoma*, 1993; 4-5: 365-70.
10. Osorno AZ, Roman LN, Kongina DW, Garcia AM, Jaffe ES. Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein Barr virus sequences and correlations with histologic subtype. *Cancer*, 1995; 75: 1360-66.
11. Abu El Hassan MS, Ahmed ME, Al Fatah-Al Gadir, Hidaytalla A, Ahmed HM. Differences in presentation of Hodgkin's disease in Sudan and western countries. *Trop Geogr Med*, 1993; 1: 28-29.
12. Medeiros LJ, Greiner TC. Hodgkin's disease. *Cancer*, 1995; 75 (1 Suppl): 357- 69.
13. McFarlane GJ, Erstifeeva T, Boyle P, Grufferman S. International patterns in the occurrence of Hodgkin's disease in children and young adult males. *Int J Cancer*, 1995; 2: 165-69.
14. Chang KL, Albuja PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein Barr Virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru blood. 1993; 2: 496-501.
15. Lukes RS, Butler JJ, Hicks, E.B. Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathologic picture. *Cancer*, 1996; 3: 317-44.
16. Hel K, Lorenzen J, Hamsmann ML, Fellbaum C, Busch R, Fischer R. Which are the proliferating cells in Hodgkin's disease. *Veerh-Otsch Ges Pathol*, 1992; 76: 155-58.
17. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Detection of Epstein Barr Virus small RNAs in routine paraffine sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. *Histopathology*, 1994; 2: 101-11.
18. Brooks L, Thomas JA. The significance of Epstein Barr virus in the pathogenesis of lymphoid and epithelial neoplasia. *Current Diag Path*. 1995; 2: 127-98.