

The Differences Between Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Expression in Fleshy and Atrophy Pterygium

Reza Satrio, Winarto, Siti Sundari

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Diponegoro University
Kariadi Hospital, Semarang, Central Java

ABSTRACT

Background: Pterygium is a conjunctival fibrovascular degenerative process which fleshy type was different to atrophy type, in which post operative recurrences was high especially fleshy type. The exact pathogenesis were not clearly understood, it was reported that many inflammation mediators had a play role, including Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). Objective of the study was to revealed a different expression of TNF- α in fleshy and atrophy type.

Method: Cross-sectional study design have been done with independent variable was TNF- α and dependant variable was pterygium type. Samples consist of 20 patients fleshy type and 20 patients atrophy type, both groups were given fluorometholone eye drop for 1 week prior surgery to suppress the degree of inflammation. The baseline data was recorded e.g. demography, the size of pterygium, Tear Break Up Time (TBUT), Schirmer test and Ferning test. Pterygium excission followed by limbal stem cell graft, and examination of TNF- α expression by immunohistochemistry. TNF- α expression was analyzed using 2 x 2 table.

Result: Baseline data of both groups were not significantly different, except TBUT ($p=0.000$) and the clinical characteristic of pterygium ($p=0.000$). TNF- α expression in fleshy type tend to be higher (total Allred score mean 4.70) but not significantly different than atrophic type (total Allred score mean 4.54 and $p=0.61$). Previous fluorometholone treatment prior to surgery might be suppressed the inflammatory cytokine.

Conclusion: No significant difference of the TNF- α expressions between fleshy and atrophy type of pterygium.

Keywords: pterygium, fleshy type, atrophy type, TNF- α , immunohistochemistry

Pterigium adalah suatu proses degenerasi konjungtiva yang ditandai dengan pertumbuhan jaringan fibrovaskular berbentuk segitiga di lateral atau medial apertura palpebra yang tumbuh ke arah kornea.^{1,2}

Penelitian telah membuktikan bahwa paparan ultraviolet- β akan meningkatkan sekresi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α pada penderita pterigium. Struktur histopatologi pterigium terdiri dari proliferasi

sel, infiltrat inflamasi, dan *remodelling extra cellular matrix* menunjukkan adanya pengaruh dari multi sitokin pro-inflamasi, *growth factor*, dan matriks metalo-proteinase (MMP). Secara klinis, pterigium terlihat meradang (*inflamed*) karena keberadaan sitokin pro-inflamasi IL-1, IL-6, dan IL-8, sedangkan gambaran vaskularisasi disebabkan oleh faktor pro-angiogenik seperti IL-6, IL-8, VEGF, TNF- α . TNF adalah sentral sitokin pleiotropik yang berfungsi untuk

homeostasis dari sistem kekebalan tubuh, pengatur sel, aktivasi differensiasi dan kematian sel. TNF- α didapatkan di sel epitel, sel endotel pembuluh darah, membran basalis pembuluh darah, epitel pembuluh darah, fibroblast dan sel inflamasi pada pterigium. TNF- α akan meningkatkan *messenger ribonucleic acid* (mRNA) dan protein ekspresi MMP-1 dan MMP-3 secara signifikan pada jaringan pterigium jika dibandingkan dengan konjungtiva normal. Peran MMP-1, MMP-3, dan MMP-9 pada kepala pterigium adalah memecah lapisan membran Bowman sehingga memudahkan pterigium untuk menempel pada permukaan kornea, selain itu MMP-1 juga berperan terhadap aktivasi fibroblas di kepala pterigium.⁸⁻¹²

Pterigium secara klinis terdiri dari beberapa tipe, yaitu proliferasif, degeneratif, atrofi, intermedia, *fleshy*, *inflamed* dan *non-inflamed*.^{2,5,6} Pterigium menyebabkan ketidaknyamanan pada pasien dan gangguan penglihatan, bahkan pada kasus yang tak ditangani dapat menyebabkan kebutaan. Pada pterigium *fleshy*, didapatkan jaringan fibrovaskuler yang lebih tebal; hal ini sangat mungkin karena peningkatan MMP yang dimotori oleh TNF- α lebih tinggi dibandingkan pada pterigium atrofi.^{2,13-17}

Pterygium zone adalah negara yang berada pada 40° lintang utara dan lintang selatan, dimana prevalensi pterigium mencapai 22% sedangkan negara di luarnya hanya sebesar 2%. Pterigium banyak didapatkan pada penderita yang bekerja di luar (*outdoor*) yang menunjukkan peran besar dari pajanan sinar matahari. Prevalensi pterigium pada penduduk dunia rata-rata sekitar 0,7-31%, sedangkan Indonesia berada di *pterygium zone* sehingga prevalensinya diperkirakan juga tinggi.³

Pengetahuan tentang mekanisme molekuler, imunologi atau biokimiawi yang terlibat pada patogenesis pterigium mungkin dapat digunakan sebagai dasar untuk aplikasi pengobatan pterigium yang kurang invasif.⁸⁻¹² TNF- α adalah salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan pada patogenesis pterigium serta berhubungan dengan pterigium *fleshy*, sehingga peran TNF- α pada pterigium penting untuk diketahui. Sementara itu sampai saat ini data yang membandingkan ekspresi sitokin TNF- α pada jaringan pterigium *fleshy* dan atrofi secara *in vivo* belum pernah dilaporkan.

MATERIAL DAN METODE

Disain penelitian adalah belah lintang (*cross sectional*), dimana variabel independen dan variabel dependen diperiksa pada saat yang sama. Variabel independen adalah TNF- α dan variabel dependen adalah tipe pterigium, yaitu *fleshy* atau atrofi.

Populasi adalah penderita pterigium yang periksa ke poliklinik mata di RSUP dr. Kariadi, RSU William Booth, dan Balai Kesehatan Indera Masyarakat (BKIM) Semarang pada rentang waktu dari Juli hingga November 2013. Sampel adalah semua penderita pterigium primer tipe *fleshy* dan atrofi berdasar kriteria Donald Tan dengan kriteria inklusi usia ≥ 20 tahun dan setuju sebagai subyek penelitian. Kriteria eksklusi adalah kelainan konjungtiva, pernah dilakukan operasi konjungtiva sebelumnya, perubahan struktur anatomi palpebra, infeksi aktif pada *ocular surface*, menggunakan anti VEGF topikal dan steroid topikal lebih dari 1 minggu. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif pada kedua tipe pterigium sampai jumlah sampel terpenuhi, kemudian diminta persetujuan dan menandatangani *informed consent*.

Semua sampel dilakukan pemeriksaan oftalmologis dasar, termasuk pemeriksaan *tear break up time* (TBUT), tes *ferning* dan *Schirmer test*, dan pemeriksaan laboratorium dasar guna memenuhi persyaratan tindakan operasi, serta diberi tetes mata fluorometholone 3 kali satu tetes/hari selama 3 hari.

Tindakan operasi yang dilakukan adalah eksisi pterigium diikuti teknik *limbal stem-cell graft*, dilakukan oleh satu orang spesialis mata. Sebelum operasi, jaringan pterigium diukur panjang dan lebarnya. Jaringan pterigium yang telah diambil segera difiksasi dalam larutan *Buffer Neutral Fomalin 10%*, kemudian dikirim ke departemen Patologi Anamtomi untuk pemeriksaan imunohisto-kimia. Analisa statistik yang digunakan adalah uji beda dua kelompok.

Sebelum pelaksanaan penelitian, proposal penelitian sudah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran (KEPK) dari Fakultas Kedokteran UNDIP/RSUP dr. Kariadi Semarang.

HASIL

Didapatkan sampel sebanyak 40 orang yang terdiri dari 20 penderita pterigium *fleshy* dan 20 penderita pterigium atrofi.

Perbedaan karakteristik umum kedua kelompok yang meliputi jenis kelamin, umur, lingkungan tempat tinggal, pekerjaan, tes Schirmer dan tes Ferning tidak bermakna (*Fisher test* dengan nilai $p=1,00$).

Usia dibagi menjadi kelompok usia <40 tahun dan kelompok usia ≥ 40 tahun; lingkungan tempat tinggal dibagi menjadi dataran tinggi dan dataran rendah; sedangkan pekerjaan dibagi menjadi *indoor* dan *outdoor*.

Perbedaan bermakna didapatkan pada TBUT (tabel 1), mungkin disebabkan pada *fleshy* permukaan kornea lebih menonjol sehingga integritas *tear film* lebih rapuh.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan TBUT (n=40)

TBUT	Jenis Pterigium		Total
	<i>Fleshy</i> n (%)	Atrofi n (%)	
<10 detik	20 (100%)	6 (30,0%)	26 (65,0%)
≥ 10 detik	0	14 (70,0%)	14 (35,0%)
Total	20 (100%)	20 (100%)	40 (100%)

Chi-Square test, p value=0,000

Stabilitas air mata dapat dipengaruhi oleh beberapa kondisi, yaitu penyakit kelenjar Meibom, disfungsi kelenjar Meibom, peningkatan ukuran aperture palpebra, pemakaian lensa kontak, dan *poor globe congruity*. Pterigium dapat menyebabkan kondisi *ocular surface* menjadi kurang baik, sehingga menjadikan stabilitas air mata tidak stabil, terutama jenis pterigium *fleshy*.¹⁸

Pterigium tipe *fleshy* secara klinis badannya (*pterygium body*) lebih tebal dan lebar (tabel 2) karena proliferasi jaringan fibrovaskuler lebih banyak. Diduga pengaruh sitokin pro-inflamasi, *growth factor*, dan faktor pro-angigenik lebih banyak pada tipe *fleshy* dibandingkan tipe atrofi.^{11,12}

Kepala pterigium (*pterygium head*) pada tipe *fleshy* lebih panjang dibandingkan tipe atrofi (tabel 3) yang menunjukkan sifat *invasiveness* ke kornea lebih besar. Ini berarti bahwa ancaman pertumbuhan ke arah kornea sampai menutupi aksis visual juga lebih besar sehingga perlu tindakan operatif segera dan mendapatkan perhatian lebih agar tidak terjadi rekurensi.^{1,5}

Tabel 2. Perbedaan *pterygium body* pada 2 kelompok (n=40)

Jenis Pterigium	Rerata (mm)	Standar Deviasi (SD)
<i>Fleshy</i>	6,075	0,438
Atrofi	4,150	0,328

t-test, p value=0,000

Tabel 3. Perbedaan *pterygium head* pada 2 kelompok (n=40)

Jenis Pterigium	Rerata (mm)	Standar Deviasi (SD)
<i>Fleshy</i>	4,450	0,841
Atrofi	2,450	0,394

t-test, p value=0,000

DISKUSI

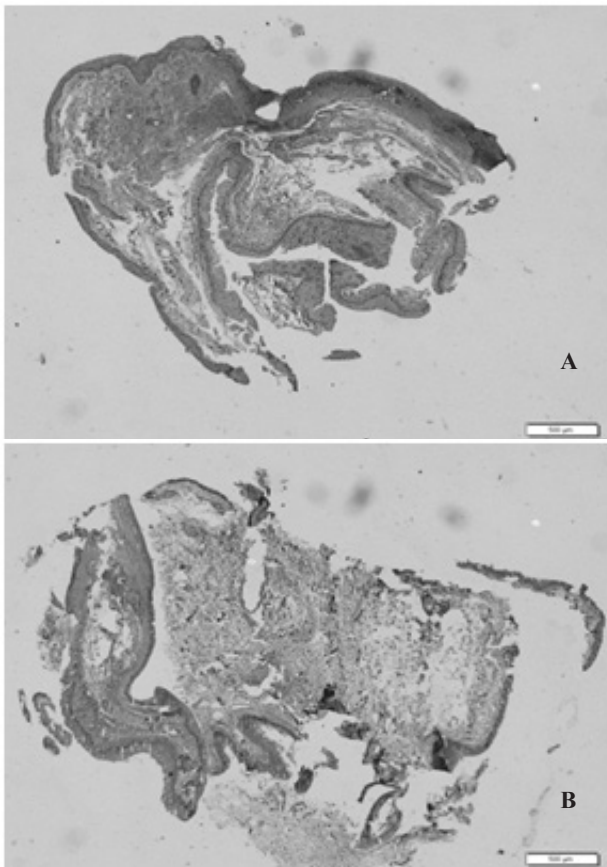
Berbagai faktor yang mungkin berpengaruh terhadap patogenesis pterigium pada kedua kelompok tidak berbeda secara bermakna. Usia <40 tahun tidak berbeda dengan usia ≥ 40 tahun, bertempat tinggal di dataran tinggi tidak berbeda dengan yang bertempat tinggal di dataran rendah, demikian juga bekerja di luar ruangan tidak berbeda dengan yang bekerja di dalam ruangan.

Kedua kelompok yang secara klinis berbeda kemudian dibandingkan apakah pada jaringan pterigium terdapat perbedaan ekspresi TNF- α atau tidak. Jaringan pterigium dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan DAB, diperiksa menggunakan mikroskop cahaya, didapatkan warna kecokelatan pada sel dengan ekspresi TNF- α .

Untuk membedakan ekspresi TNF- α pada jaringan pterigium. Jaringan pterigium pada kedua kelompok dilakukan pemeriksaan imunohistokimia, kemudian pada preparat dilakukan penghitungan ekspresi berdasarkan *Allred score*. Sel dengan ekspresi TNF- α , pada pemeriksaan menggunakan pembesaran 400x, terlihat sebagai bintik berwarna cokelat. Penghitungan *Allred score* terdiri dari *proportional score*, yaitu persentase inti sel yang terwarnai pada 5 lapang pandang dan *intensity score* yaitu tingkat kegelapan warna cokelat yang menunjukkan intensitas yang lebih tinggi, kemudian kedua skor tersebut dijumlah sebagai *total score* (tabel 4).

Pada tabel 4, terlihat bahwa *total score* antara kedua kelompok terdapat kecenderungan pada tipe *fleshy* lebih banyak ekspresi TNF- α , walaupun secara statistik perbedaannya tidak bermakna ($p=0,432$); dengan kata lain, kedua

kelompok tidak berbeda dalam hal ekspresi TNF- α di jaringan pterigium.



Gambar 1. Ekspresi TNF- α (tanda panah) pada jaringan pterigium. A) Pterigium atrofi; dan B) Pterigium *fleshy* (pembesaran 100x)

Tabel 4. Rerata *total score* ekspresi TNF- α dari kedua kelompok berdasarkan *Allred Score* (n=40)

Jenis Pterigium	n	Rerata	Standar Deviasi (SD)
<i>Fleshy</i>	20	4,86	1,05
Atrofi	20	4,52	1,60

t-test, p value=0,432

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian oleh Zhang Jun Hwa dkk yang melakukan pemeriksaan secara *Radioimmunoassay* dan *bioactivity assay*, yaitu IL-6 dan TNF- α dalam supernatan jaringan kultur pterigium lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dari kultur konjungtiva normal ($p < 0,01$) dan pada pterigium progresif dibandingkan pterigium yang tenang ($p < 0,05$).¹⁷

Pterigium tipe *fleshy* secara klinis terlihat tandaradang yang jelas dengan vaskularisasi lebih besar, nyata dan lebih banyak, sedangkan pada

tipe atrofi tanda radang minimal, vaskularisasi kecil dan sedikit. Pada keadaan demikian, jika pada tipe *fleshy* dilakukan operasi eksisi jaringan pterigium, dikhawatirkan terjadi perdarahan yang banyak sehingga pada pasca operasi akan terdapat peradangan yang hebat. Oleh karena itu, tanda peradangan ditekan dengan cara diberikan *fluorometholone* tetes mata selama 1 minggu sebelum operasi dilakukan. Kedua kelompok mendapat perlakuan yang sama, maka kedua kelompok diberi *fluorometholone* tetes mata.

Pada penelitian ini, didapatkan bahwa ekspresi TNF- α pada jaringan pterigium tipe *fleshy* tidak berbeda dengan tipe atrofi. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh pemberian *fluorometholone* tetes mata sebelum operasi. *Fluorometholone* adalah obat golongan steroid yang mempunyai efek anti inflamasi, menekan berbagai mediator inflamasi dan pengaruhnya pada fase akut, dengan efek samping minimal terutama efeknya terhadap peningkatan tekanan bola mata.¹⁹ Pemberian *fluorometholone* pra operatif selama 1 minggu dapat menekan sitokin yang ada pada jaringan pterigium. Hal ini tampak pada respon klinis, yaitu dengan menurunnya tanda radang. Tindakan operatif baru dilakukan setelah tanda radang pada tipe *fleshy* sudah berkurang. Intervensi pengobatan menggunakan obat anti inflamasi steroid atau non steroid dapat menekan mediator inflamasi, yang dapat dinilai dari segi klinis.¹⁹ Kelemahan penelitian ini adalah penggunaan *fluorometholone* tetes mata selama 1 minggu sebelum operasi yang dapat menekan ekspresi mediator inflamasi.

KESIMPULAN

Mekanisme patogenesis pterigium belum diketahui secara pasti, walaupun telah dilakukan berbagai penelitian. Rekurensi pasca eksisi pterigium cukup tinggi, terutama pada tipe *fleshy*, yang kemungkinan disebabkan oleh adanya berbagai sitokin pro-inflamasi dan *growth factor*, di antaranya adalah TNF- α . Pada penelitian ini, ekspresi TNF- α pada jaringan pterigium *fleshy* tidak berbeda dengan tipe atrofi. Hal ini mungkin karena pengaruh pemberian tetes mata *fluorometholone* pra operatif. Penelitian

mengenai pengaruh sitokin atau *growth factor* pada pterigium masih dapat dikembangkan.

REFERENSI

- Solomon A, Li DQ, Lee SB, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterigium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41(8):2154-63.
- Tan DTH. Pterigium. In: Edward J. Holland, Mark J. Mannis, Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management: Springer-Verlag New York, Inc; 2002:65-89.
- Asokan R, Venkatasubbu RS, Velumuri L, Lingam V, George R. Prevalence and associated factors for pterigium and pinguecula in a South Indian population. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2012;32(1):39-44.
- Peckar CO. The aetiology and histo-pathogenesis of pterigium. A review of the literature and a hypothesis. *Documenta Ophthalmologica Advances in Ophthalmology*. 1972;31(1):141-57.
- Anduze AL. Pterigium: A Practical Guide to Management. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd: New Delhi; 2009:23-33.
- Soediro S, Natadisastra G, Supardi I, Hernowo BS, Maskoen AM. Hypersensitivity Reaction in Inflamed Pterigium. 2011. Available from: http://www.mkb-online.org/index.php?option=com_content&view=article&id=366:hypersensitivity-reaction-in-inflamed-pterigium-&catid=1:kumpulan-artikel&Itemid=55.
- Mutlu FM, Sobaci G, Tatar T, Yildirim E. A comparative study of recurrent pterigium surgery: limbal conjunctival autograft transplantation versus mitomycin C with conjunctival flap. *Ophthalmology*. 1999;106(4):817-21.
- Tsai YY, Lee H, Tseng SH, Cheng YW, Tsai CH, Hsu CM, et al. Evaluation of TNF-alpha and IL-1beta polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterigium. *Eye (Lond)*. 2005;19(5):571-4.
- Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterigium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(6):2430-7.
- Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterigium epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(11):3430-7.
- Kollias G, Sfikakis PP. Preface. In: *TNF pathophysiology: molecular and cellular mechanisms*. Karger: Basel; 2010. VIIp.
- Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterigium. *Acta histochemica*. 1996;98(2):195-201.
- Siak JJ, Ng SL, Seet LF, Beuerman RW, Tong L. The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterigium. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(1):230-6.
- Li DQ, Lee SB, Gunja-Smith Z, Liu Y, Solomon A, Meller D, et al. Overexpression of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) by pterigium head fibroblasts. *Archives of ophthalmology*. 2001;119(1):71-80.
- Zeng J, Jiang D, Liu X, Tang L. [Expression of matrix metalloproteinase in human pterygia]. *Yan ke xue bao = Eye science / "Yan ke xue bao" bian ji bu*. 2004;20(4):242-5. Epub 2005/01/20.
- Zhang J, Jin W, Lin Y, Zhang G. [Cytokine assays for pterigium]. [*Zhonghua yan ke za zhi*] Chinese journal of ophthalmology. 1999;35(1):16-8.
- Zhang J, Jin W, Lin Y, Zhang G. Significance of the abnormal secretion of IL-6 and TNF- α in the pterigium [*Zhonghua yan ke za zhi*] Chinese journal of ophthalmology 1999;15.
- Zakaria N, De Groot V, Tassignon MJ. Tear film biomarkers as prognostic indicators for recurrent pterigium. *Bulletin de la Societe belge d'ophtalmologie*. 2011(317):53-4.
- Zhu L, Zhang C, Chuck RS. Topical steroid and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Molecular vision*. 2012;18:1803-12.
- Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2:9-39.
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. *Imunologi dasar*. Edisi ke delapan. Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, 2009:217-55.