

KARYA AKHIR

**HUBUNGAN EKSPRESI VEGF-A TERHADAP STATUS
LUMINAL DAN NON LUMINAL SUBTIPE MOLEKULAR
KANKER PAYUDARA PADA KANKER PAYUDARA
STADIUM LANJUT BAIK LOKAL MAUPUN METASTASIS
JAUH**

*CORRELATION OF VEGF-A EXPRESSION ON LUMINAL AND
NON LUMINAL STATUS OF MOLECULAR SUBTYPES OF
BREAST CANCER IN LATE STAGE BREAST CANCER PATIENTS*

TEDDY AGUNG SAPUTRA

C045172004



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS – 1 (Sp-1)
DEPARTEMEN ILMU BEDAH
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

KARYA AKHIR

**HUBUNGAN EKSPRESI VEGF-A TERHADAP STATUS
LUMINAL DAN NON LUMINAL SUBTIPE MOLEKULAR
KANKER PAYUDARA PADA KANKER PAYUDARA
STADIUM LANJUT BAIK LOKAL MAUPUN METASTASIS
JAUH**

*CORRELATION OF VEGF-A EXPRESSION ON LUMINAL AND
NON LUMINAL STATUS OF MOLECULAR SUBTYPES OF
BREAST CANCER IN LATE STAGE BREAST CANCER PATIENTS*

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Dokter Spesialis Bedah

Program Studi Ilmu Bedah

Disusun dan diajukan oleh:

TEDDY AGUNG SAPUTRA

C045172004

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS – 1 (Sp-1)
DEPARTEMEN ILMU BEDAH
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
2022**

LEMBAR PENGESAHAN KARYA TESIS

**HUBUNGAN EKSPRESI VEGF-A (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ALPHA)
TERHADAP STATUS LUMINAL DAN NON LUMINAL SUBTIPE MOLEKULAR KANKER
PAYUDARA PADA STADIUM LANJUT BAIK LOKAL MAUPUN METASTASIS JAUH**

Disusun dan diajukan oleh

TEDDY AGUNG SAPUTRA

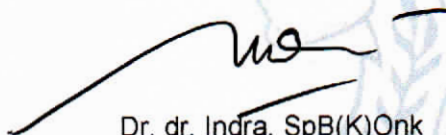
C045172004


Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian
yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu
Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 31 Oktober 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



Dr. dr. Indra, SpB(K)Onk
NIP. 197005052000121001


dr. Firdaus Hamid, SpMK, Ph.D
NIP. 197712312002121002

Ketua Program Studi

Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. dr. Sachraswaty R. Laiding, Sp.B, Sp.BP-RE(K)
NIP. 19760112 200604 2 001


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK
NIP. 19680530 199603 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : TEDDY AGUNG SAPUTRA

NIM : C045172004

Program Studi : Ilmu Bedah

JUDUL :

Hubungan Ekspresi VEGF-A Terhadap Status Luminal dan Non Luminal subtipe molekular kanker payudara pada Kanker payudara Stadium Lanjut baik lokal Maupun Metastasis Jauh

dengan ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa makalah ini adalah hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 Desember 2022



dr. Teddy Agung Saputra

DAFTAR ISI

Pernyataan Keaslian Tulisan	i
Lembar Pengesahan Karya Tulis	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Kata Pengantar	vii
Abstak	viii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum.....	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Untuk Ilmiah	6
1.4.2. Untuk Klinis.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Kanker Payudara.....	7
2.2. Epidemiologi	7
2.3. Etiologi dan Patogenesis	8
a. Kanker Payudara Hereditas	9
b. Kanker Payudara Sporadik	10
2.4. Stadium Klinis	11
2.5. Penanda Biomolekular.....	11
2.6. Angiogenesis	18
2.6.1. Proses Angiogenesis	20
2.6.2. Faktor Pencetus Angiogenesis	22
2.7. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	25
2.7.1. Biologi VEGF	25
2.7.2. Struktur VEGF.....	25
2.7.3. Regulasi Ekspresi VEGF.....	27

2.7.4. Reseptor VEGF	31
2.7.5. Sintesis dan Aktivasi Biologi VEGF	32
2.7.6. Metode Pemeriksaan VEGF	32
2.7.7. Peran VEGF dalam Angiogenesis Patologis.....	33
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	36
3.1. Kerangka Teori.....	39
3.2. Kerangka Konsep.....	40
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	41
4.1. Desain Penelitian.....	41
4.2. Lokasi Penelitian & Waktu Penelitian.....	41
4.3. Populasi dan sampel Penelitian	41
4.4. Besar Sample	42
4.5. Definisi Oprasional	43
4.6. Metode Analisis	44
4.7. Alur Penelitian	45
BAB V. HASIL PENELITIAN	46
5.1. Karakteristik Subyek Penelitian	46
5.2. Hasil Pemerisaan Imunohistokimia	47
5.3. Perbandingan Ekspresi VEGF-A Antara Subtipe molekuler Luminal dan Non Luminal	48
5.4. Hubunan Ekspresi VEGF-A Dengan Marker Molekuler	48
5.5. Hubungan Ekspresi VEGF-A dengan Karakteristik Subyek Penelitian	49
BAB VI. PEMBAHASAN	51
6.1. Karakteristik Pasien KPD Stadium Lanjut	51
6.2. Subtipe Molekuler Pasien KPD Stadium Lanjut dan Metastasis Jauh	52
6.3. Hubungan Ekspresi VEGF-A Dengan Subtipe Molekuler	54
6.4. Faktor-faktor Lain Yang Berhubungan Dengan Ekspresi VEGF-A	56
6.5. Keterbatasan Penelitian	57
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	59
7.1. Ringkasan Penelitian	59
7.2. Lokasi Penelitian & Waktu Penelitian.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Pembagian Subtipe payudara secara molekular	18
Tabel 2. Regulator Angiogenesis	20
Tabel 3. Gambaran subyek penelitian	46
Tabel 4. Hasil pemeriksaan imunohistokimia pasien KPD satdium lanjut	47
Tabel 5. Hasil perbandingan ekspresi VEGF-A antara luminal dan non luminal	48
Tabel 6. Hasil hubungan ekspresi VEGF-A dengan marker molekuler	49
Tabel 7. Hasil hubungan ekspresi VEGF-A dengan karakteristik subyek	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Peran Hipoksia pada angiogenesis Tumor	19
Gambar 2.	Angiogenesis : Formasi pembuluh darah baru.....	13
Gambar 3.	Molekul VEGF	28
Gambar 4.	Reseptor Transmembran VEGF dan ligant	29
Gambar 5.	Sinyal Transduksi dari ikatan VEGF pada reseptor VEGFR	29
Gambar 6.	Variasi ikatan VEGF dan reseptornya serta manifestasi klinisnya.....	30
Gambar 7.	Tahapan Angiogenesis pada Tumor	31
Gambar 8	Kerangka Teori	40
Gambar 9	Kerangka konsep	41
Gambar 10	Alur Penelitian	46

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini. Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada dosen pembimbing yaitu Dr.dr. Indra SpB(K)Onk, dr. Firdaus Hamid, , Sp.MK Ph.D dan Dr.dr. Berti Nelwan, Sp.PA atas segala kesabaran, waktu, bantuan, bimbingan, nasihat, dan arahan yang diberikan selama ini kepada penulis.

Rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan pula kepada dosen-dosen penguji yang telah memberikan arahan, saran dan masukan demi perbaikan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Rektor Universitas Hasanuddin, Dekan Fakultas Kedokteran, Ketua Departemen Ilmu Bedah, Ketua Program Studi Ilmu Bedah, Sekertaris Program Studi Ilmu Bedah, Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran atas kesempatan yang telah diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Terima kasih yang tak terhingga penulis ucapkan kepada ayahanda Yulizar Rismidi dan ibunda Saptida Gustin, adinda Amalia Yurisdia serta keluarga besar lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, yang telah mengerti, mendoakan, mendukung dan mencurahkan perhatian yang besar selama penulis menjalani pendidikan ini.

Terima kasih kepada saudara seperjuangan Residen Bedah Periode 1 Januari 2018 (*Anomali Family*) yang tanpa henti memotivasi dan mengingatkan untuk pantang menyerah dalam menyusun dan menyelesaikan karya akhir ini. Terima kasih atas dukungan dan bantuan dari segenap Residen Bedah Universitas Hasanuddin.

Terima kasih juga kepada seluruh staf pegawai bagian Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, terutama kepada kak Andi Esse Tenri Uleng, kak Marlina Rajab, Alm. mbak Nunung Mujiwiyanti, rekan-rekan sejawat dan perawat serta staf kamar operasi bedah yang telah banyak membantu selama proses pendidikan penulis.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para Guru Besar dan seluruh staf pengajar Departemen Ilmu Bedah atas segala bimbingan dan arahnya selama penulis mengikuti program pendidikan dokter spesialis bedah. Semoga ilmu yang

penulis dapatkan selama pendidikan ini dapat diamalkan dan memanfaatkan sebaik baiknya untuk kepentingan masyarakat luas.

Penulis juga menyampaikan terima kasih dan permohonan maaf kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, yang telah membantu dalam menyelesaikan karya akhir ini.

Saya senantiasa berdoa kepada Tuhan Yang Maha Esa untuk melimpahkan karunia dan kemurahan-Nya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan selama pendidikan, penelitian dan penyusunan karya akhir ini. Amin

Makassar, 01 Januari 2023

Yang menyatakan,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teddy Agung Saputra', with a large, stylized flourish at the end.

dr. Teddy Agung Saputra

ABSTRACT

TEDDY AGUNG SAPUTRA. *Correlation of VEGF-A Expression on Luminal and Non Luminal Status of Molecular Subtypes of Breast Cancer in Late Stage Breast Cancer Patients* (Supervised by Indra Indra, Salman Ardy Syamsu, Elridho Sampepajung, Berti Julian Nelwan, and Firdaus Hamid).

Molecular marker analysis have become important in breast cancer diagnosis and treatment, and may in fact reveal new mechanisms in breast cancer pathogenesis. Aside of the commonly used hormonal receptors and HER2, VEGF-A is increasingly shown to be important in breast cancer diagnosis and pathogenesis. We seek to elucidate the relationship between VEGF-A expression and breast cancer characteristics, including molecular markers. The St. Gallen consensus of 2013 further groups breast cancers according to these molecular subtypes into the luminal, HER-2 overexpressed, and basal-like / TNBC subtypes. Luminal subtypes show a strong expression of hormone receptors, TNBC and based-like subtype tend to be more aggressive and do not present any molecular marker, and HER-2 overexpressed cancers, while also more aggressive and potentially metastatic (Yersal & Barutca, 2014). All these molecular subtypes are connected to the expression of cellular growth factors that affect the tumors proliferative capacity, fitness and persistence. This study was an observational study that was carried out using a cross sectional study examined VEGF-A expression and molecular marker (ER, PR and HER2) of breast cancer tissue using immunohistochemistry (IHC), VEGF-A do not show any significant correlation with demographic characteristics, TNM staging, pathological grading, luminal or non luminal typing, or hormonal receptor markers, but show a significant positive correlation with HER-2 receptor, ($p = 0.036$). VEGF-A is positively correlated with HER-2 expression in breast tumor tissue, but do not show significant correlation with other breast cancer markers, including luminal typing or hormonal receptor. Further study needs to be conducted to understand the mechanistic interplay between FEGF and HER-2 in breast cancer pathogenesis.

Keywords: breast cancer, immunohistochemistry, molecular subtype, VEGF-A



ABSTRAK

TEDDY AGUNG SAPUTRA. *Hubungan ekspresi VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor Alpha) terhadap status luminal dan nonluminal subtype molekular kanker payudara pada stadium lanjut baik lokal maupun metastatis jauh* (dibimbing oleh Indra Indra, Salman Ardy Syamsu, Elridho Sampepayung, Berti Julian Nelman, dan Firdaus Hamid).

Analisis penanda molekuler telah menjadi bagian penting dalam diagnosis dan pengobatan kanker payudara yang pada kenyataannya dapat mengungkap mekanisme baru dalam patogenesis kanker payudara. Selain reseptor hormonal yang umum digunakan dan HER-2, VEGF-A terbukti mempunyai peranan penting dalam diagnosis dan patogenesis kanker payudara. Penelitian ini berusaha menjelaskan hubungan antara ekspresi VEGF-A dan karakteristik kanker payudara, termasuk penanda molekuler. Konsensus St. Gallen tahun 2013 mengelompokkan lebih lanjut kanker payudara menurut subtype molekuler ini ke dalam subtype luminal, HER-2 *Overexpression*, dan basal like/ TNBC. Subtipe luminal menunjukkan ekspresi reseptor hormon yang kuat. TNBC dan subtype basal like cenderung lebih agresif dan tidak menunjukkan penanda molekuler apa pun. Selain itu, subtype HER-2 *Overexpression* juga lebih agresif dan berpotensi bermetastasis (Yersal & Barutca, 2014). Semua subtype molekuler ini terhubung dengan ekspresi faktor pertumbuhan seluler yang mempengaruhi kapasitas proliferasi dan persistensi tumor. Penelitian ini merupakan penelitian observasional yang dilakukan dengan menggunakan studi *cross sectional* yang meneliti ekspresi VEGF-A dan penanda molekuler (ER, PR, dan HER2) jaringan kanker payudara menggunakan imunohistokimia (IHC). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa VEGF-A tidak memperlihatkan hubungan yang signifikan dengan subtype luminal atau nonluminal atau penanda reseptor hormonal, karakteristik demografi, stadium TNM, dan *grading histopatologis*. Akan tetapi, menunjukkan korelasi positif yang signifikan dengan reseptor HER-2 ($p = 0,036$). Studi lebih lanjut perlu dilakukan untuk memahami mekanisme interaksi antara VEGF dan HER-2 dalam *pathogenesis* kanker payudara.

Kata kunci: kanker payudara, imunohistokimia, subtype molekuler, VEGF-A



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Kanker payudara (KPD) sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan dunia dan merupakan kanker terbanyak kedua setelah kanker paru, diperkirakan lebih dari 1,67 juta kasus baru yang terdiagnosa tahun 2012, (25% dari seluruh jumlah kasus kanker). KPD merupakan urutan teratas penyebab kanker pada wanita dengan angka kematian yang masih relatif tinggi (324.000 kematian atau sekitar 14,3% pada negara berkembang dan 198.000 kematian pada negara maju).^(Ferlay J,2012)

Pada tahun 2018, berdasarkan *Surveillance Epidemiology and Result (SEER)* diperkirakan kasus baru sebesar 266.120 wanita didiagnosa dengan KPD atau sekitar 15,3 % dari seluruh kasus baru kanker. Sedangkan menurut data Globocan tahun 2018 angka kejadian KPD sebesar 11,6% atau sekitar 2,08 juta dari seluruh kasus baru kanker dan menempati urutan kedua terbanyak setelah kanker paru.^(Globocan, 2018) Di negara Arab kejadian KPD sekitar 14-42% dari seluruh kanker pada wanita. Menurut data *ASR (Arabic Surveillance Result)* angka insidensinya bervariasi mulai 10-50 kasus/100.000 wanita setiap tahunnya dan cenderung semakin meningkat. Pada pria diperkirakan 1.500 kasus baru atau 1 % dari semua kasus kanker payudara dan kurang lebih 400 orang yang meninggal setiap tahunnya^(Thomas 2002; Robson 2002; Apantaku 2002).

Di Indonesia belum ada data lengkap tentang insidens kanker payudara yang berdasarkan *population base*, sedangkan yang ada yaitu baru berdasarkan data dari rumah sakit di Indonesia (*hospital base*) dan *pathological based registry* yang dikumpulkan dari 13 Pusat Laboratorium Patologi di Indonesia. Tetapi diperkirakan sekitar 20.000 kasus baru pertahun dan lebih dari 50% kasus dalam stadium lanjut^(Sampepajung D 2010). Data dari Globocan tahun 2018 diperkirakan sekitar 58.256 kasus baru KPD sebesar 30,9% dengan angka kematian sekitar 22.692 atau sekitar 38,95% dan merupakan peringkat pertama penyebab kematian pada kanker wanita.^(Globocan, 2018) Sebagian besar pasien KPD di Indonesia datang berobat dalam stadium lanjut, 63% stadium III dan IV saat diagnosis.^(Rhodes and Yip, 2011.)

Penemuan dan uraian tentang onkogen dan tumor supressor gen meningkatkan pengetahuan tentang mekanisme genetik dan molekular patogenesis kanker. Sekalipun tampak sederhana tetapi tumorigenesis tetap merupakan suatu proses yang kompleks yang berlangsung melalui berbagai tahapan (*multysteps process*). Dengan demikian, apapun penyebabnya perkembangan kanker secara umum terjadi melalui beberapa tahap yaitu inisiasi, promosi dan progresi (Martin GS 1996, Lester 2010).

Untuk dapat terus tumbuh bahkan berinfiltrasi dan bermetastase, tumor membutuhkan oksigen dan nutrisi yang cukup melalui proses angiogenesis. Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah yang telah ada sebelumnya. Prosesnya mencakup aktivasi endothel, degradasi membran basalis, migrasi endothel, proliferasi endothel serta pembentukan lumen pembuluh darah. Angiogenesis merupakan proses yang sangat kompleks, yang diregulasi secara ketat oleh faktor pro angiogenik dan faktor antiangiogenik. Pertumbuhan tumor solid dan metastasisnya diketahui bergantung pada angiogenesis. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), yang menginduksi pertumbuhan jaringan kapiler disekeliling tumor dan bekerja sebagai mitogen yang sangat spesifik terhadap sel endotel, merupakan faktor penting dalam angiogenesis tumor. (Folkman 1995)

VEGF adalah sinyal kunci yang digunakan oleh sel yang kekurangan oksigen (*oxygen-hungry cells*) untuk memicu pertumbuhan pembuluh darah. *VEGF* adalah regulator utama angiogenesis abnormal bekerja dengan menstimulasi mitogenesis dari sel endotel dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Ekspresi *VEGF* berpotensi pada respon terhadap hipoksia dan aktifasi oleh onkogen. *VEGF*, yang juga disebut *vascular permeability factor* (*VPF*), termasuk kedalam keluarga *supergene VEGF-platelet-derived growth factor (PDGF)*. Anggota keluarga yang lain adalah *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* dan *VEGF-E*. *VEGF* juga bertindak sebagai mediator sekresi dan aktivasi enzim-enzim dalam proses degradasi matriks ekstra-seluler. *VEGF* merupakan faktor angiogenik penting pada berbagai tumor manusia dan overekspresinya ditemukan pada berbagai tumor termasuk tumor ovarium, serviks, dan payudara. Solid tumor dapat menghasilkan sitokin pro angiogenik dan sitokin anti angiogenik. Telah diterima secara luas bahwa aktifasi angiogenik dari suatu tumor adalah hasil dari ketidakseimbangan antara regulator positif dan negatif

dari neovaskularisasi. VEGF adalah stimulator angiogenesis spesifik yang poten dan diinduksi oleh sel tumor yang hipoksia. Beberapa penelitian telah membuktikan ekspresi VEGF berhubungan dengan progresi pada beberapa tumor. Level sitokin yang bersirkulasi tersebut mempunyai hubungan dengan beberapa tipe tumor seperti kanker colorectal, karsinoma hepatosellular dan clear cell renal cancer.

Sama seperti tumor lain, kanker payudara juga merupakan *angiogenic-dependent tumor*. Beberapa faktor pertumbuhan proangiogenik dan penghambat endogen angiogenesis telah diidentifikasi pada kanker payudara seperti VEGF yang merupakan regulator angiogenik yang terpenting dalam proses angiogenesis. Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa level VEGF serum signifikan meningkat pada penderita kanker payudara dan dapat digunakan sebagai marker angiogenesis yang kuat. Yamamoto (1996) dan Zhao (2004) mendapatkan bahwa VEGF yang bersirkulasi signifikan meningkat pada pasien KPD dan merupakan marker angiogenesis yang kuat. Gnerlich (2009) dan Ali ME (2011) mendapatkan hubungan yang signifikan antara serum VEGF dengan faktor prognostik. Beberapa peneliti lain seperti Linderholm (1998), Gasparini (1997), Kumar (2001), Byrne (2007) justru mendapatkan hasil yang berbeda, sehingga hubungan antara VEGF dan faktor prognostik konvensional masih belum jelas dan hasilnya masih bervariasi.^(Zhao J 2004)

Kanker payudara memiliki perilaku biologik yang sangat heterogen, sehingga diperlukan banyak parameter untuk menentukan faktor prognosis. Beberapa parameter faktor prognostik yang berhubungan terhadap panjang waktu bebas tumor (disease free survival) dan panjang ketahanan hidup (overall survival) yang akan dicapai pasien adalah Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2), Ki67 serta overekspresi VEGF. Berdasarkan variasi ekspresi gen (ER, PR, dan HER2), kanker payudara dapat diklasifikasikan ke dalam 4 subtipe molekuler utama, yaitu luminal A (ER+, PR+, HER2-, Ki-67 ≤14%), luminal B (ER+, PR+, HER2-, Ki-67 >14% atau ER+, PR+, HER2+, Ki-67 >14%), HER2+ (ER-, PR-, HER2+), dan Triple Negative (ER-, PR-, HER2-)

Seperti tumor padat lainnya karsinoma ini dapat tumbuh dan bermetastasis bila memperoleh oksigen dan nutrisi yang cukup. Tanpa adanya

suplai darah yang menyediakan oksigen dan nutrisi maka tumor akan diam/dormant. Suplai darah bisa terjadi apabila sel tumor mampu membentuk pembuluh darah baru, yang disebut angiogenesis. Angiogenesis merupakan faktor yang penting untuk pertumbuhan, invasi dan metastasis tumor serta diregulasi secara ketat oleh faktor-faktor proangiogenik dan antiangiogenik. Salah satu faktor angiogenik yang utama adalah Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Protein VEGF ini memperlihatkan peningkatan ekspresinya sebagai respon terhadap keadaan hipoksia pada ekspansi tumor yang berdiameter >2 mm melalui faktor transkripsi Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α).

Terdapat bukti yang menyatakan bahwa ekspresi yang berlebihan pada VEGF berkorelasi terhadap prognosis buruk. Dalam studi retrospektif sebelumnya Taneja et al dan Ali et al telah meneliti tingginya ekspresi VEGF mempunyai nilai prognostik buruk yang berpengaruh terhadap panjang waktu bebas tumor (disease free survival) terutama pada karsinoma payudara invasif tidak spesifik. Begitu juga pada penelitian zhang et al yang meneliti bahwa VEGF mempunyai peranan terhadap perkembangan dan metastasis kanker payudara sedangkan ekspresi dari ER dan PR yang negatif memiliki karakteristik invasi tumor yang kuat, angka kekambuhan yang tinggi serta memiliki kemampuan untuk bermetastasis. Penelitian yang dilakukan oleh Dujaily et al meneliti bahwa terdapat hubungan antara overekspresi HER-2 dengan tingginya ekspresi VEGF pada karsinoma payudara invasif tidak spesifik. Pada penelitian Sa-guanraksa et al memperlihatkan bahwa tingkat ekspresi VEGF yang tinggi berhubungan dengan subtipe molekular non-luminal A yang menyebabkan kurangnya respon terhadap terapi pada karsinoma stadium lanjut. Sebaliknya pada penelitian Liu et al menyatakan ekspresi VEGF merupakan faktor prognostik tetapi tidak sebagai faktor prediktif.

Sampai saat ini belum banyak penelitian yang menghubungkan antara overekspresi VEGF dengan status luminal dan non luminal pada subtipe molekular karsinoma payudara dan belum bisa menjelaskan apakah hubungan tersebut dapat menambah informasi tentang nilai-nilai faktor prognostik. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk mengetahui hubungan antara overekspresi VEGF dengan subtipe molekular Luminal dan Non Luminal karsinoma payudara stadium lanjut baik lokal maupun metastasis jauh.

1. 2. RUMUSAN MASALAH

Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya memperlihatkan masih adanya perbedaan mengenai peranan VEGF-A dalam berbagai keganasan pada manusia. Peranan biomarker ini pada karsinoma payudara juga belum sepenuhnya diketahui. Berdasarkan hal tersebut di atas, dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi VEGF-A dengan subtipe Luminal pada KPD stadium lanjut lokal maupun metastasis jauh ?
2. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi VEGF-A dengan Subtipe Non Luminal pada KPD stadium lanjut lokal maupun metastasis jauh?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan umum

mengetahuinya hubungan ekspresi VEGF-A terhadap Status luminal dan Non Luminal pada subype molekular pada penderita KPD stadium lanjut lokal maupun metastasis jauh.

2. Tujuan khusus

Menilai adanya hubungan antara ekspresi VEGF-A Status Luminal dan Non Luminal pada subtype molekular pada KPD stadium lanjut lokal maupun metastasis jauh di makassar.

1.4 HIPOTESIS PENELITIAN

Hipotesis yang dapat diajukan pada penelitian ini adalah terdapatnya hubungan antara ekspresi VEGF-A terhadap status luminal dan luminal dari subtipe molekular KPD

1.5 MANFAAT PENELITIAN

1. Bidang pelayanan

- a. Mendapatkan data mengenai ekspresi VEGF-A, sehingga dapat digunakan sebagai faktor prediktif tambahan.
- b. Digunakan sebagai acuan (biomarker) terhadap KPD stadium lanjut lokal maupun metastasis jauh.

2. Bidang akademik

- a. Menambah pengetahuan mengenai faktor prediktif serta pemahaman proses angiogenesis serta implikasi klinis pada penderita KPD.
- b. Data hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar untuk menentukan terapi pada KPD.
- c. Data untuk penelitian lanjutan di bidang angiogenesis dan metastasis khususnya pada penderita KPD.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KANKER PAYUDARA

Kanker payudara adalah suatu penyakit neoplasma ganas yang berasal dari jaringan parenkim atau stroma payudara. Penyakit ini oleh *World Health Organization (WHO)* dikelompokkan ke dalam *International Classification of Disease (ICD)* dengan nomor kode 174. (Sainsbury, 2000)

Kanker payudara adakalanya merupakan kanker payudara campuran, terdiri dari beberapa jenis morfologi sekaligus. Namun prinsip klasifikasi patologik lazimnya memberikan nama atas dasar komponen yang dominan. Gambaran histopatologis dari kanker payudara dibedakan menjadi 21 tipe dengan beberapa subtipe (WHO, 2003). Kebanyakan kanker payudara adalah adenokarsinoma, diantara yang paling sering adalah tipe Invasif ductal (80%), Invasif lobuler (5-10%), Tubuler (2%), Meduller (5-7%) dan musinosa (3%). Sifat dan perkembangannya dibedakan menjadi karsinoma insitu dan invasif. (Sukardja IDG, 2000, Lester, 2010)

2.2 EPIDEMIOLOGI

Insidens kanker payudara pada wanita di negara maju berkisar 200-250 per 100.000 wanita pertahun dan insidens ini bertambah sesuai dengan meningkatnya usia. Kanker payudara merupakan keganasan pada organ padat yang terbanyak didiagnosa pada wanita Amerika setelah keganasan pada bronchogenic, dan merupakan penyebab kematian terbanyak kedua akibat kanker setelah kanker paru^(Proznitz LR 2001).

Mortalitas kanker payudara sekitar 28% per 100.000 dan 19% kematian pada perempuan Amerika disebabkan karena kanker payudara. Insidens kanker payudara bervariasi antara satu negara dengan negara lainnya, paling tinggi di Amerika Serikat dan Eropa Barat. Insidens sedang di Eropa Timur, Eropa Selatan dan Amerika Selatan dan insidens paling rendah di benua Asia^(Willet WC 2000).

Di Indonesia penderita kanker payudara yang dilaporkan dari beberapa rumah sakit pada umumnya datang berobat pada stadium lanjut (stadium III dan IV). Siregar KB dari Rumah Sakit Pringadi Medan melaporkan kanker payudara stadium III dan IV sebanyak 76,9% dengan puncak frekuensi umur 31-50 tahun sebanyak 58,5 %. Azamris di Rumah Sakit M. Jamil Padang menemukan 57.9% pada Stadium III dan IV. Dari Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo Jakarta, Tjindarbumi D melaporkan Stadium III dan IV sebesar 70%, sedangkan Manuaba TW dari Rumah Sakit Sanglah Denpasar melaporkan kanker payudara Stadium III dan IV sebanyak 71 % dengan puncak frekuensi umur 35-50 tahun sebanyak 68%. Kanker payudara di Rumah Sakit kanker Dharmais Jakarta dilaporkan terus meningkat dari 221 kasus tahun 2003 dan menjadi 657 kasus pada tahun 2008 dimana 70% datang pada Stadium III dan IV. (Sampepajung D 2010)

Data di Sulawesi Selatan dalam periode 1997-2005 kanker payudara menempati urutan pertama angka kejadian kanker dengan angka sekitar 135 kasus pertahun. Data dari Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, penderita kanker payudara yang datang berobat dari tahun 2005-2009 adalah 768 pasien, dengan rata-rata 153 pasien pertahunnya, dengan puncak frekuensi pada umur 40-49 tahun sebesar 39,4%. Terdapat kecenderungan peningkatan insidens kanker payudara dari 136 pasien pada tahun 2005 hingga 165 pasien pada tahun 2009. Hal ini sesuai dengan beberapa literatur bahwa baik negara berkembang maupun negara maju, insidens kanker payudara dari tahun ke tahun cenderung semakin meningkat. (Sampepajung D 2010)

2.3 ETIOLOGI DAN PATOGENESIS

Etiologi pasti belum diketahui, beberapa faktor resiko yang dihubungkan dengan terjadinya kanker payudara adalah jenis kelamin, dimana jenis kelamin wanita dibanding dengan laki-laki berkisar antara 100:1, sedangkan faktor umur merupakan faktor resiko yang sangat penting dan diperkirakan 1 diantara 5.900 wanita pada kelompok umur 30 tahun dan 1 diantara 290 wanita pada kelompok umur 80 tahun. Dengan adanya riwayat keluarga yang menderita kanker payudara terutama saudara kandung baik itu tumor bersifat unilateral maupun bilateral dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker payudara. Mutasi genetik yang terjadi pada setiap individu merupakan faktor predisposisi terjadinya 5-10% familial kanker payudara seperti mutasi gen BRCA-1 dan BRCA-2. Ada

beberapa kelainan jinak pada payudara yang dikatakan mempunyai resiko dengan terjadinya kanker payudara adalah atypical ductal atau lobuler sampai 4-5 kali dibandingkan dengan tipe kelainan jinak lainnya. Faktor hormonal seperti umur pertama kali menarche, umur pada saat menopause, jumlah anak, umur pertama kali melahirkan anak aterm yang dihubungkan dengan lamanya paparan hormon estrogen dan berhubungan juga dengan derajat differensiasi sel kelenjar mamma yang menggambarkan bahwa semakin lama terpapar hormon estrogen semakin beresiko terjadinya kanker payudara. Paparan radiasi juga menjadi salah satu faktor resiko terjadinya kanker payudara disamping faktor kegemukan/obesitas dan peminum alkohol. (Solorzano, 2003)

Faktor resiko utama terjadinya pertumbuhan kanker payudara adalah faktor hormonal dan genetik. Faktor ini dapat digolongkan menjadi 2 bagian yaitu sporadik (kemungkinan berhubungan dengan hormon) dan herediter (mutasi gen).

a. Kanker Payudara Herediter

Kerentanan satu atau beberapa gen merupakan penyebab utama dari 12% kanker payudara. Probabilitas penyebab herediter meningkat terutama jika keluarga dekat (tingkat pertama) mengidap kanker payudara maupun kanker lainnya.

Mutasi gen BRCA-1 dan BRCA-2 merupakan penyebab tersering kanker payudara herediter. Penderita carier BRCA-1 dan BRCA-2 juga rentan terhadap kanker epitelial lain seperti prostat dan pankreas. BRCA-1 dan BRCA-2 merupakan gen dengan ukuran panjang lebih dari 80 kilobasa. Kanker payudara terkait BRCA-1 umumnya *poorly differentiated*, mempunyai gambaran medullary dan tidak mengekspresikan hormon reseptor maupun Her2/neu sehingga disebut *triple negative phenotype* dan kanker payudara terkait BRCA-2 juga cenderung *poorly differentiated* namun sering positif terhadap estrogen reseptor (ER). (Rosen, 2009, Lester, 2010)

b. Kanker Payudara Sporadik

Faktor resiko utama untuk jenis ini adalah berhubungan erat dengan faktor hormonal seperti jenis kelamin, usia saat menarkhe dan menopause, riwayat reproduksi dan menyusui serta pemakaian estrogen eksogen. Kanker ini sering terjadi pada wanita post menopause dan estrogen reseptor positif. Sekali sel premaligna dan malignan muncul, hormon dapat menstimulasi untuk dapat terus tumbuh. (Rosen, 2009, Lester, 2010)

Secara sederhana kanker dapat terjadi bila ada perubahan proto onkogen menjadi onkogen dan perubahan pada tumor supresor gen. Ekspresi proto onkogen dalam keadaan normal diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel normal. Aktivitas ini dikontrol oleh tumor supresor gen. Aktivasi proto onkogen menjadi onkogen dapat terjadi melalui perubahan struktural dalam gen, translokasi kromosom, amplifikasi gen atau mutasi beberapa elemen yang dalam keadaan normal berfungsi mengontrol ekspresi gen bersangkutan. Bila terjadi mutasi proto onkogen , merangsang ekspresi tumor supresor gen/anti onkogen menginduksi terhentinya siklus sel atau menginduksi terjadinya apoptosis. Apabila fungsi tumor supresor gen yang berfungsi sebagai *surveillance* terganggu akibat mutasi atau delesi/hilang, maka sel tersebut rentan untuk menjadi ganas. (Sukardja, 2000)

Dengan demikian, apapun penyebabnya sudah diterima secara luas bahwa perkembangan kanker secara umum terjadi melalui beberapa tahap (multistep) yaitu inisiasi, promosi dan progresi. Walaupun ada beberapa modifikasi sesuai dengan jenis karsinogen ditingkat molekuler, efek biokimia dari berbagai jenis karsinogen adalah sama, yaitu pada umumnya menyebabkan perubahan proto-onkogen menjadi onkogen melalui aktivasi onkogen (activating mutation) atau inaktivasi gen supresor (inactivating mutation). (Boedina S, 2011)

Pada tahun 1982 dibuat suatu indeks prognostik bagi pasien KPD primer yang *operable/early stage*. Indeks berdasarkan analisis retrospektif terhadap 9 faktor pada 387 pasien. Hanya 3 faktor yaitu ukuran tumor, stadium klinik dan grading histopatologis yang signifikan pada analisis tersebut. Status hormonal hampir mempunyai nilai yang signifikan. (Galea MH, 1992). Sebagai tambahan informasi prognostik dapat digunakan sebagai petunjuk terapi dan juga mengidentifikasi dari subgroup pasien yang mana yang perlu mendapat terapi

yang lebih agresif. Faktor prognostik sangat luas diteliti pada pada pasien KPD stadium dini, demikian juga pada stadium lokal lanjut. Sebaliknya sangat kurang penelitian yang melaporkan mengenai faktor prognostik pada KPD stadium lanjut/metastasis. Meskipun demikian telah diterima secara luas bahwa stadium klinik dan grading histopatologis merupakan faktor prognostik untuk stadium dini sampai stadium lanjut/metastasis. Demikian juga dengan status reseptor hormonal yang mempunyai nilai prognostik pada semua stadium KPD. (Masood S, 1995)

2.4 STADIUM KLINIK

Sistim staging atau stadium dari kanker adalah usaha untuk membatasi tingkatan kanker terhadap prediksi hasil luaran. Idealnya menghasilkan distribusi yang merata terhadap proses *outcome* nya dari stadium rendah hingga stadium tinggi. Dalam prakteknya, distribusi yang merata biasanya tidak memungkinkan karena heterogenitas dari kanker dan multiple kombinasi dari faktor-faktor yang berperan dalam hasil luaran. Karena hal tersebut sistem staging selalu direvisi secara kontinyu oleh *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

Sistem staging secara TNM (Tumor, Node dan Metastasis jauh) menurut AJCC digunakan untuk menetapkan status dari tumor primer, kelenjar limfe dan ada tidaknya metastase jauh. Secara umum dibagi empat stadium pada pasien kanker payudara dan dapat digunakan sebagai kesatuan dari outcomenya. Stadium I kanker payudara mempunyai disease-free survivalnya sekitar 80% saat ini. Stadium II merupakan grup yang heterogen, tetapi bernilai 50%-60% pada saat ini. Stadium III kanker payudara juga heterogen tetapi memiliki free survivalnya saat ini sekitar 30%-40%. Terakhir, hampir semua pasien dengan metastasis akan meninggal dengan kelainan ini, mayoritas wanita dengan stadium IV akan meninggal dalam 2 tahun pengamatan. (Prosnitz LR, 2001)

2.5 PENANDA BIOMOLEKULER

Dasar dari progresi suatu malignitas adalah proses dari pengaturan transisi epitelial-mesenkim, hipoksia, desmoplasia dan angiogenesis. Perkembangan kanker meliputi disregulasi signal proliferasi, faktor pertumbuhan

dan penghambat, aktivasi onkogen dan hilangnya kemampuan tumor suppressor gen. Peningkatan akan pemahaman dasar patofisiologi dari KPD berhubungan dengan ditemukannya teknik molekular baru, target terapi dan penanganan secara individual. Gambaran ekspresi gen tertentu dapat digunakan sebagai gen penanda terhadap faktor prognostik dan prediktif yang dapat membantu melihat karakteristik tumor atau sebagai acuan terapi secara individual.

Ketertarikan terhadap marker prognostik yang baru berdasarkan fakta bahwa pada pasien KPD stadium dini telah menunjukkan adanya metastasis secara mikroskopik pada saat didiagnosis. Beberapa tanda molekuler yang telah diteliti mempunyai nilai prognostik dan prediktif. Tanda prognostik adalah indikator terhadap agresifitas, tingkat invasi, penyebaran tumor dan berkorelasi dengan angka survival terhadap terapi sistemik yang diberikan dan dapat digunakan untuk menentukan pasien yang beresiko. Sedangkan tanda prediktif adalah hasil atau laporan yang dilakukan oleh klinisi untuk mendapatkan hasil terapi yang terbaik dan untuk menentukan rencana terapi yang akan datang.

Biomarker prediktif pada umumnya digunakan untuk memprediksi apakah pasien akan memberikan respon atau resisten terhadap kemoterapi tertentu. Biomarker prediktif penting dalam penatalaksanaan kanker, karena pasien dengan histologi yang sama dapat memberikan respon yang berbeda terhadap obat yang sama, dengan variasi antara 10-90%. Banyak terapi biologis baru hanya menunjukkan efikasi pada minoritas pasien, karena itu perlu adanya biomarker prediktif yang akurat. Selain memprediksi efikasi terapi, biomarker prediktif juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi dosis optimum suatu obat dan memprediksi toksisitas. (Duffy, 2013)

Untuk biomarker prediktif, *clinical end-point* adalah peningkatan OS setelah mendapat obat tertentu. Estrogen reseptor (ER) merupakan biomarker prediktif pertama yang direkomendasikan oleh *Tumor Marker Panel of the ASCO*, untuk digunakan secara rutin pada kanker payudara. ER digunakan untuk menseleksi pasien yang diduga akan memberikan respons baik terhadap terapi hormonal. Biomarker prediktif yang lain adalah HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) yang diekspresikan pada sekitar 25% pasien kanker payudara (identifikasi dengan immunohistokimia). Ekspresi HER2 digunakan

untuk menseleksi pasien kanker payudara yang diduga memberikan respons baik terhadap trastuzumab. (Pavlon *et al.*, 2013)

Subtipe Molekuler

Pembagian subtipe molekuler kanker payudara berdasarkan konsensus *St Gallen* 2013 dibagi menjadi empat subtipe. Pada masing-masing subtipe dipengaruhi oleh *Estrogen Receptor* (ER), *Progesteron Receptor* (PR), dan *human epidermal growth factor receptor-2*(HER-2). Pada subtipe molekuler luminal juga dipengaruhi oleh nilai Ki67 yang menggambarkan proliferasi dari sel.

Subtipe molekuler luminal, *Overexpression* HER-2 dan *Basal Like*/TNBC berhubungan erat dengan matur luminal, progenitor luminal dan progenitor sel dari jaringan payudara normal. Berdasarkan temuan itu, disimpulkan bahwa subtipe yang kurang terdiferensiasi kurang memiliki antigen yang beredar. Subtipe luminal ditandai oleh ekspresi gen yang terkait dengan reseptor hormon (HR) yang tinggi, sedangkan subtipe *Overexpression* HER-2 atau *Basal Like*/TNBC menunjukkan hubungan ekspresi gen yang rendah dengan HR (Geng *et al.*, 2014).

- **Luminal A**

Luminal A yang disertai ekspresi hormon, baik estrogen, progesteron maupun keduanya, dan tanpa ekspresi HER-2 (*human epidermal growth factor receptor-2*). Pada subtipe luminal A disertai ekspresi Ki67 yang rendah, dengan nilai kurang dari 14% (Goldhirsch *et al.*, 2013). Pada subtipe luminal A, terjadi ekspresi protein berlebihan yang berperan dalam lintasan metabolisme asam lemak dan lintasan transduksi sinyal selular yang menggunakan steroid, khususnya melalui ekspresi estrogen (Sorlie., 2007).

Luminal A merupakan subtipe paling sering ditemukan sekitar 50-60% dari seluruh subtipe kanker payudara. Pada luminal A terjadi peningkatan pada ER dan menurunnya proliferasi gen kanker terkait (Yersal& Barutca., 2014). Pasien kanker payudara dengan subtipe luminal A memiliki prognosis lebih baik dan memiliki tingkat kekambuhan lebih rendah dari subtipe lainnya (Zaha., 2014). Kanker payudara stadium

metastasis dengan luminal A penyebaran terbanyak terjadi ke tulang kemudian liver, paru, pleura dan otak (Soni *et al.*, 2015). Kanker payudara sub tipe luminal A berdasarkan multi gen ekspresi assay mempunyai angka rekurensi yang rendah (Goldhirsch *et al.*, 2013).

Luminal A lebih banyak dipengaruhi oleh *estrogen receptor*, estrogen merupakan hormon steroid yang berperan dalam pertumbuhan, perkembangan dan reproduksi. Estrogen mempunyai peranan penting pada perkembangan kanker payudara dan 1/3 dari kanker payudara distimulasi oleh estradiol. Cara kerja estrogen yaitu dengan berusaha menempati *estrogen receptor* α and β yang merupakan golongan hormon steroid *nuclear receptors* (NRs). *Estrogen receptor* merupakan golongan dari *nuclear receptors* (NRs) yang bekerja utama mengikat molekul lipofilic. *Estrogen receptor* di payudara bekerja pada siklus sel epitel kelenjar payudara pada fase G0 sampai fase S (Zhang *et al.*, 2013).

- **Luminal B**

Pada sub tipe luminal B dibagi menjadi 2 yaitu HER-2 + dan HER-2 -. Pada luminal B dengan HER-2 + disertai dengan ER + dan PR berapapun nilainya, sedangkan untuk nilai Ki67 yaitu berapapun nilainya. Pada Luminal B dengan HER-2 – disertai dengan ER+, PR -/ nilainya rendah dan nilai Ki67 > 20% (Goldhirsch *et al.*, 2013). Ekspresi Ki-67 berhubungan erat dengan proliferasi dan pertumbuhan sel tumor, secara luas digunakan untuk mengidentifikasi proses patologis sebagai penanda proliferasi. Secara klinis, ekspresi Ki-67 dapat dihubungkan dengan metastasis dan stadium klinis tumor (Li *et al.*, 2014).

Sub tipe luminal B ditemukan sekitar 15-20% dari seluruh sub tipe kanker payudara dan memiliki fenotipe lebih agresif, dengan tingkat keganasan tinggi, indeks proliferasi dan prognosis lebih buruk dibandingkan dengan luminal A (Yersal & Barutca S., 2014). Sub tipe ini memiliki tingkat kekambuhan lebih tinggi dan apabila hal tersebut terjadi maka, tingkat kelangsungan hidup menjadi lebih rendah dibandingkan dengan luminal A (Zaha., 2014). Seluruh pasien kanker payudara dengan sub tipe luminal diberikan hormon terapi karena dinilai memberikan hasil lebih baik dalam terapi (Phipps., 2010).

Kanker payudara pada luminal B menunjukkan ekspresi ER yang relatif rendah, ekspresi HER-2 yang bervariasi dan ekspresi proliferasi sel relatif tinggi yang menunjukkan prognosis yang lebih jelek dibandingkan dengan luminal A. Di Pakistan pada penderita kanker payudara dengan subtipe luminal B lebih banyak prevalensinya 69% dibandingkan dengan luminal A sebanyak 31 %. Jumlah pasien kanker payudara dengan subtipe luminal B usianya terbanyak antara 31 sampai 50 tahun. Karakteristik kanker payudara dengan subtipe luminal B mempunyai *grading* yang lebih tinggi dibandingkan subtipe luminal A (Hashmi *et al.*, 2018). Kanker payudara stadium metastasis dengan luminal B penyebaran terbanyak terjadi ke tulang kemudian liver, paru, pleura dan otak (Soni *et al.*, 2015).

- ***Triple Negative Breast Cancer/TNBC***

Basal-like terdiri atas banyak jenis. Salah satu jenis Basal-like sering ditemukan adalah *Triple Negative Breast Cancer/TNBC*. Pada klasifikasi IHC, Basal-like / TNBC (*Triple Negative Breast cancer*) merupakan subtipe tidak mengekspresikan ER, PR dan HER2. Perlu dijelaskan bahwa TNBC dan Basal-like tidak sepenuhnya sama, dan ada sekitar 20-30% hal ini tidak sesuai pada studi (Zaha., 2014). Seperti halnya HER2 positif, pasien dengan subtipe ini memiliki prognosis lebih buruk dibandingkan pasien dengan subtipe luminal. Pada subtipe HER2 positif dan Basal-like/TNBC, terapi disarankan adalah berbasis adjuvan kemoterapi (Phipps., 2010).

TNBC merupakan subtipe molekuler yang unik, secara alami agresif, pola metastasinya jelas dan memiliki sedikit target terapi. TNBC resikonya meningkat tiga kali pada pasien pre menopause dengan keturunan Afrika-Amerika. Berdasarkan *Carolina Breast Cancer Study*, TNBC banyak terjadi pada pasien usia *menarche* yang awal, banyak melahirkan, menyusui yang singkat, kelebihan berat badan dan usia pre-*menopause*. TNBC onsetnya terjadi pada usia muda, ukuran tumor yang lebih besar, biasanya dengan *grading* yang tinggi semakin tinggi *grading*nya dapat disertai nodul positif. Berdasarkan histopatologinya dengan subtipe TNBC mayoritas berasal dari duktal. TNBC memiliki prognosis yang paling jelek, dengan angka rekuren dan kematian yang tinggi dibandingkan dengan non triple negatif.

Rekurensinya banyak terjadi pada organ viscera dan jaringan *soft tissue* sedangkan pada bagian tulang jumlahnya lebih sedikit (Aysola., 2013).

- ***Overexpression* HER-2**

Subtipe HER-2 positif ditemukan sekitar 15-20% dari subtipe kanker payudara. HER-2 positif baik secara biologis ataupun klinis bersifat lebih agresif, dan memiliki tingkat metastasis ke otak dan paru-paru lebih tinggi dibandingkan dengan subtipe luminal (Yersal & Barutca ., 2014). Subtipe ini ditandai dengan peningkatan ekspresi gen HER-2 dan gen lain terkait dengan jalur HER2. Subtipe HER-2 positif memiliki prognosis buruk (Yersal & Barutca ., 2014, Zaha., 2014 & Phipps., 2010).

Gen HER-2 terdapat di q21 pada kromosom 17 yang berasal dari kanker payudara, *salivary gland adenocarcinoma*, dan MKN-7 kanker gaster. *Overexpression* protein HER-2 menandakan gen HER-2 terdapat pada kanker payudara melalui pewarnaan imunohistokimia. HER-2 positif bila imunohistokimia (IHC) 3+ dan lebih dari 10% sel tumor invasif dalam pewarnaan membran yang baik (Nitta., 2016). Pada subtipe ini 40-80% tumornya terdapat mutasi TP53 dan hampir semua gambaran histopatologinya grade III (Dai., 2015).

Overexpression HER-2 kanker payudara tidak ada hubungan dengan faktor resiko umur dan ras. *Overexpression* HER-2 memiliki prognosis yang jelek, sama dengan subtipe molekuler TNBC. Grading histopatologi subtipe *Overexpression* HER-2 lebih tinggi dibandingkan dari subtipe luminal (Dai., 2015).

Tabel 1. Pembagian Subtipe Payudara secara Molekuler

Subtipe molekuler	Derajat Histologi	Profil Imunologi	Rekomendasi Terapi sistemik	Prognosis
Luminal A	1 atau 2	ER/PR +, HER 2 -, Ki 67 rendah (< 14 %)	Hormonal terapi	Baik
Luminal B	2 atau 3	ER +, HER 2 -, Ki 67 tinggi ($\geq 20\%$), PgR - / rendah	Hormonal + Kemoterapi	Intermediete
		ER +, HER 2 +, Ki 67 rendah		
HER-2 <i>type</i> / Erb-B2 <i>overexpression</i>	2 atau 3	ER/PR -, HER 2 +	Hormonal + Kemoterapi + Targeted terapi	Buruk
Basal-like	3	ER/PR -, HER 2 -	Kemoterapi	Umumnya Buruk

Dikutip dari : Sobri *et al.*, 2017 & Goldhirsch *et al.*, 2013)

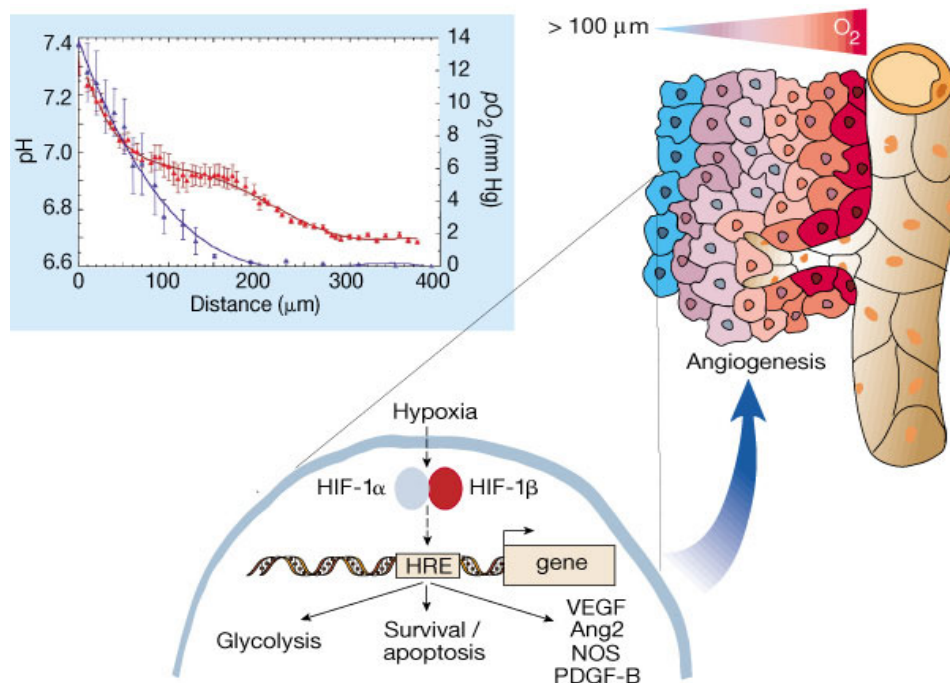
2.6 ANGIOGENESIS

Angiogenesis terjadi dalam tubuh sehat untuk memperbaiki luka atau memperbaiki sirkulasi darah dalam jaringan setelah trauma atau kerusakan lain. Dalam tubuh proses itu dikendalikan oleh *switch on/off* yang diperankan oleh faktor yang meningkatkan angiogenesis (*pro-angiogenic/angiogenic growth factors*) dan menghambat angiogenesis (*anti-angiogenic/angiogenic inhibitors*) secara berimbang sesuai yang dibutuhkan.

Sudah diterima secara luas bahwa kemampuan tumor untuk menginduksi pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) pada penjamu sangat berpengaruh pada pertumbuhan tumor dan metastasis. Aktivitas angiogenesis mengakibatkan ekspansi pertumbuhan tumor dan meningkatkan resiko metastase. Sebaliknya tumor primer yang tidak memiliki kemampuan angiogenesis kecil kemungkinannya untuk berkembang menjadi tumor besar yang dapat dideteksi secara klinis karena besarnya akan terbatas hanya beberapa juta sel saja dengan volume samapai 2 mm³. Pertumbuhan tumor primer maupun sekunder akan berlangsung baik bila tumor mendapat cukup

suplay darah melalui vaskularisasi untuk keperluan metabolisme dan proliferasi. Kemampuan angiogenesis menentukan tingkat keganasan tumor, karena itu analisis kemampuan angiogenesis tumor dapat berperan dalam menentukan prognosis dan penatalaksanaan penderita kanker. (Folkman J, 1995)

Baik angiogenesis fisiologik maupun angiogenesis tumor diregulasi oleh faktor-faktor pertumbuhan host di lingkungan tumor, yang beberapa diantaranya, seperti VEGF, adalah sangat spesifik untuk sel endotel, dan yang lainnya seperti *basic fibroblast growth factor (bFGF)* dan *matrix metalloproteinases (MMPs)*, mempunyai kerja yang lebih luas. Faktor aktivasi dapat dihasilkan oleh tumor itu sendiri, oleh jaringan sekitar tumor, atau oleh makrofag dan fibroblast yang menginfiltrasi tumor. Pada umumnya material aktivasi bekerja melalui reseptor permukaan sel endotel, dimana material aktivasi ini berperan sebagai ligan, yang utamanya menyebabkan sekresi faktor angiogenik lainnya. Selain itu, hipoksia, hipoglikemia, dan stres mekanik dapat menstimulir pelepasan faktor angiogenik (Rosen, 2009)



Gambar 1. Peranan hipoksia pada angiogenesis tumor (dikutip dari Folkman, 1995)

Selama pembentukan tumor terjadi gangguan keseimbangan antara produksi faktor pro dan anti angiogenik, dikenal dengan istilah *angiogenic switch*, yang memungkinkan berlangsungnya proliferasi dan pertumbuhan sel tumor.

Banyak faktor yang memberi kontribusi dalam perubahan keseimbangan itu, diantaranya adalah faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh tumor sendiri, perubahan lingkungan mikro (*microenvironment*), rekrutmen progenitor sel endotel dari sumsum tulang dan penekanan inhibitor angiogenesis alami. (Boedina S, 2011)

Tabel 2. Regulator angiogenesis^(Ferara N, 2005)

Pro-angiogenik	Anti angiogenik
VEGF Acidic Fibroblast Growth Factor Basic Fibroblast Growth Factor Transforming Growth Factor α . B Epidermal Growth Factor TNF- α IL-6, IL-8 Angiopoetin-1, 2	Trombospodin Angiostatin Endostatin Fibronectin fragment Prolactin (16kDa fragment) Retinoid Interferon- α , - β , - γ Vasculostatin

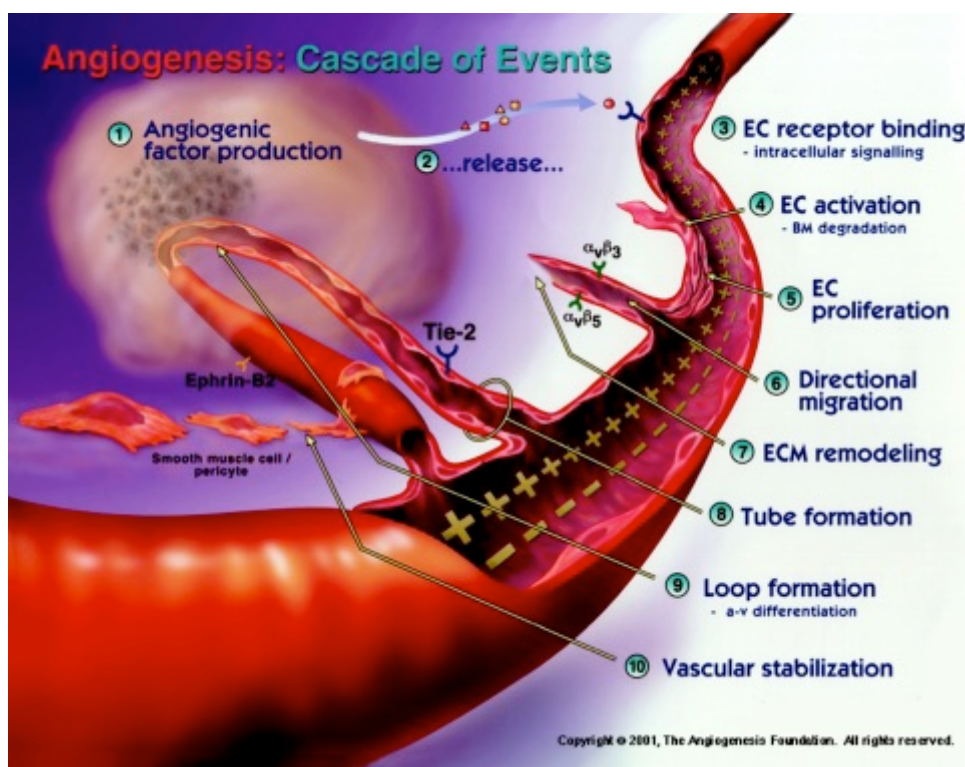
2.6.1 PROSES ANGIOGENESIS

Angiogenesis berlangsung melalui suatu proses yang berurutan : 1. Jaringan yang rusak memproduksi dan melepaskan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang berdifusi ke jaringan sekitarnya. 2. Faktor pertumbuhan angiogenik berikatan dengan reseptor spesifik yang terdapat pada sel endotel vaskuler terdekat. 3. Setelah *growth factor* berikatan dengan reseptornya sel endotel menjadi aktif. Sinyal pertumbuhan diteruskan dari permukaan sel ke nukleus. Sel endotel mulai membentuk endotel molekul baru termasuk berbagai enzim. 4. Enzim melarutkan protein yang membentuk lubang kecil pada membran basal. 5. Sel endotel mulai berproliferasi dan bermigrasi melalui lubang-lubang tersebut menuju ke jaringan yang rusak dipandu oleh SDF-1 α yang bertindak sebagai *homing signal* utama. 6. Molekul adhesi atau integrin berfungsi sebagai kait untuk membantu pembuluh darah baru untuk maju. 7. Enzim yang lain misalnya Matrix Metalloproteinase (MMP) diproduksi untuk menghancurkan jaringan di depan ujung pembuluh darah baru. 8. Sel endotel yang baru menggulung untuk membentuk pipa/pembuluh darah baru. 9. Setiap pembuluh darah berhubungan satu dengan yang lain supaya darah dapat bersirkulasi. 10.

Pembuluh darah baru mengalami stabilisasi dengan bantuan sel-sel otot yang menunjang struktur pembuluh darah.

Banyak bukti penelitian yang menyatakan bahwa angiogenesis atau neovaskularisasi merupakan proses penting untuk pertumbuhan tumor, bahkan beberapa penelitian mengungkapkan bahwa pertumbuhan tumor sangat bergantung pada angiogenesis (angiogenesis dependent). (Boedina S, 2011)

Hampir semua tumor padat menunjukkan vaskularisasi saat di diagnosis, tetapi tumor yang timbul spontan seringkali tidak angiogenik. Karena itu diduga ada proses yang mengubah sifat sel-sel tumor spontan tersebut menjadi angiogenik. Proses perubahan menjadi angiogenik terjadi fokal dan relatif tiba-tiba. Berbagai penelitian membuktikan bahwa sebagian besar tumor tumbuh tanpa neovaskularisasi, berada in situ dalam waktu yang lama, kemudian mengalami neovaskularisasi bila suatu subset sel tumor berubah menjadi fenotip yang angiogenik. Pada beberapa kasus perubahan menjadi fenotip angiogenik terjadi sebelum tumor berkembang penuh, misalnya pada stadium preneoplastik atau preinvasif. (Folkman J, 1995)



Gambar 2. Angiogenesis : formasi pembuluh darah baru (dikutip dari Rosen P, 2009)

Fase prevaskuler

Selama fase prevaskuler, pada saat tidak ada aktivitas angiogenik atau proses angiogenik tidak cukup, tumor tetap kecil dengan volume hanya beberapa mm³ saja. Pertumbuhan tumor sangat lambat dan *doubling time* sel tumor mungkin berlangsung beberapa tahun. Walaupun demikian, hal ini tidak berarti bahwa sel tumor berproliferasi lambat. Telah terbukti bahwa kecepatan berproliferasi sel tumor yang diukur dengan (*H*³)-*thymidin labelling index* (TL) pada fase prevaskuler menunjukkan indeks TL yang sama tinggi dengan tumor besar dengan neovaskularisasi. Tetapi tumor dalam fase prevaskuler telah mencapai keseimbangan dimana pembentukan sel baru diimbangi oleh sel yang mengalami apoptosis. (Folkman J, 1995)

Fase vaskuler

Pada fase vaskuler tumor tumbuh cepat, menjadi invasif dan potensi metastasis meningkat. Pada fase ini tumor bukan saja mendapat nutrisi dan oksigen tetapi sel-sel endotel pembuluh darah baru dapat merangsang pertumbuhan dengan cara parakrin mensekresi faktor pertumbuhan, misalnya FGF, PDGF, G-CSF, HB-EGF dan IGF serta berbagai sitokin seperti IL-1, IL-6 dan IL-8.

Hipoksia selalu terjadi dalam tumor yang berjarak < 100-200 µm dari pembuluh darah terdekat, karena sel-sel tumor lebih cepat berproliferasi dibanding sel-sel endotel yang direkrut untuk membentuk pembuluh darah yang pada umumnya tidak beraturan. Karena itu tumor berusaha untuk beradaptasi pada keadaan hipoksia kronik tersebut. Salah satu cara adalah menginduksi aktivitas faktor transkripsi HIF-1 yang terdiri dari HIF-1α dan HIF-1β. HIF-1 meningkatkan ekspresi gen yang menyandi enzim glikolitik dan gen VEGF. Disamping meningkatkan tekanan hidrostatis dan meningkatkan suplai nutrisi, oksigen dan pembuangan katabolit. Neovaskularisasi juga meningkatkan populasi sel yang berproliferasi. Hal ini memperbesar kemungkinan untuk membentuk varian dengan potensi metastasis yang tinggi yang memproduksi

enzim-enzim tertentu serta faktor pertumbuhan untuk dapat menembus organ sasaran dan kemudian hidup di dalamnya. (Folkman J,1995)

2.6.2 FAKTOR PENCETUS ANGIOGENESIS

Hipoksia

Faktor utama penyebab angiogenesis adalah hipoksia. Hipoksia meningkatkan ekspresi VEGF melalui peningkatan transkripsi dan stabilisasi mRNA. Tekanan oksigen yang rendah menstimulus *Hypoxia-Inducible Factor 1 α* (HIF-1 α) dan memicu sekresi faktor proangiogenik, utamanya *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang menstimulasi pembentukan pembuluh darah baru untuk mensuplai kebutuhan. Dalam kondisi hipoksia HIF-1 α akan berdimerisasi dengan HIF-1 β dan kompleks ini bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan promotor VEGF. Jika tekanan oksigen dipulihkan, produksi faktor proangiogenik dihambat, pembuluh darah matur bertahan dan berbagai regresi pembuluh darah immatur terjadi. (Lester SC, 2010)

Peran onkogen dan tumor supresor gen

Hipoksia menstimulus ekspresi VEGF dengan pola yang sama seperti produksi eritropoetin distimulai oleh tekanan oksigen rendah. Regulasi dari ekspresi VEGF melalui tekanan oksigen melibatkan supresor tumor yaitu protein von Hippel Lindau (vHL) yang menekan ekspresi VEGF melalui degradasi cepat dan transkripsi HIF1 α dibawah kondisi normal. Sebaliknya saat hipoksia HIF-1 α menjadi stabil dan menuju nukleus kemudian berikatan dengan HIF-1 β . Kompleks ini kemudian terkait pada sekuens gen VEGF yang disebut *Hypoxia respons element* (HRE) yang menstimulasi transkripsi gen VEGF dan menimbulkan ekspresi VEGF. Gen supresor p53 berperan dalam angiogenesis tumor dengan menekan transkripsi VEGF melalui trombospondin. Mutasi p53 berakibat trombospondin tidak bekerja sebagai inhibitor angiogenik. (Lester SC, 2010)

Banyak onkogen mempunyai implikasi pada proses angiogenesis tumor solid, karena kemampuannya menginduksi faktor pertumbuhan angiogenik seperti VEGF. Proto onkogen *c-src* mengkode protein tyrosine kinase yang

terlibat dalam regulasi ekspresi VEGF dan dalam membuat neovaskularisasi tumor yang sedang tumbuh. Onkogen *BCR-ABL* telah diidentifikasi mempunyai peran kunci dalam patogenesis molekular leukemia yang diketahui sebagai keganasan yang tergantung pada angiogenesis. Ekspresi onkogen *Ras* mutan merupakan salah satu perubahan genetik yang paling banyak dideteksi dan menginduksi ekspresi VEGF oleh onkogen H atau K-ras mutan yang telah dilaporkan pada berbagai macam sel kanker seperti kanker pankreas, kanker kolon dan kanker paru *non small cell*.

Sitokin dan mediator lain

Sejumlah faktor pertumbuhan, sitokin dan mediator lipid dapat meningkatkan ekspresi VEGF, termasuk epidermal growth factor, transforming growth factor ($TGF\alpha$ dan $TGF\beta$), FGF-2, Keratinocyte growth factor, TNF- α , IL-1, IL-6, Insulin like growth factor 1, hepatocyte growth factor, prostaglandin E1 dan E2. (Prosnitz LR,2001)

Hormon

VEGF diekspresikan oleh berbagai sel yang memproduksi hormon steroid (korteks adrenal, korpus luteum, sel leydig) dan sel yang dipengaruhi oleh hormon regulasi (ovarium dan uterus). Ekspresi VEGF berkorelasi dengan pasien karsinoma payudara dengan estrogen reseptor positif. (Prosnitz LR, 2001)

Ekspresi VEGF pada berbagai keganasan telah dihubungkan dengan prognostik yang jelek pada beberapa tumor seperti karsinoma payudara, ginjal, kolon, otak, ovarium, cervix, tiroid, prostat dan juga tulang. Namun data lain mengenai karsinoma hepatoselluler, menunjukkan tidak ada hubungan signifikan antara ekspresi VEGF dengan derajat differensiasi karsinoma hepatoselluler.

Bahwa kadar VEGF memicu sel bermitosis pada sel otot jantung dan adanya peningkatan formasi tubular sel endotel. Hal ini memungkinkan untuk dijadikan dasar adanya hubungan antara mitosis dan perubahan formasi tubuler pada karsinoma payudara. (Okano H, 2006)

2.7 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah glikoprotein proangiogenik yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, survival pada sel endotel serta meningkatkan permeabilitas kapiler.

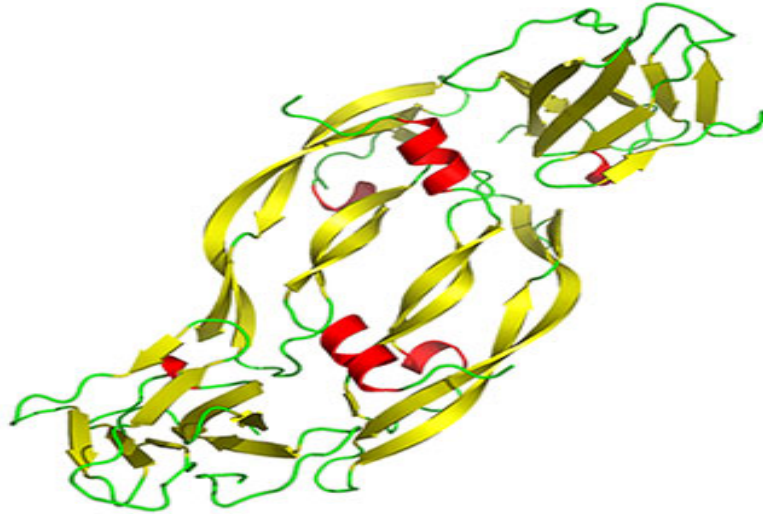
Sel tubuh memerlukan oksigen, yang digunakan sebagai energi menjalankan proses molekuler. Oksigen tersebut dikirimkan melalui darah, dan sebagian besar sel berada dalam rentang 10 milimeter dari pembuluh kapiler. Sel tumor juga tanpa pengecualian. Bila massa sel tumor telah lebih besar dari 1 milimeter, hal tersebut menyebabkan sel kekurangan oksigen dan energi kecuali dibentuk pembuluh darah baru. *Vascular endothelial growth factor* atau VEGF adalah sinyal kunci yang digunakan oleh sel yang kekurangan oksigen (*oxygen-hungry cells*) untuk memicu pertumbuhan pembuluh darah.

2.7.1 Biologi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Perkembangan pembuluh darah adalah kebutuhan utama dalam perkembangan dan diferensiasi organ selama embriogenesis, demikian juga pada penyembuhan luka serta fungsi reproduksi pada manusia dewasa. Angiogenesis juga terlibat dalam patogenesis berbagai penyakit seperti retinopati proliferatif, arthritis rheumatoid, termasuk pertumbuhan tumor.

2.7.2 Struktur VEGF dan Reseptor VEGF

VEGF pertama kali dideskripsikan sebagai protein yang mampu merangsang permeabilitas vaskuler dan proliferasi sel endotel dan diidentifikasi sebagai perangsang utama angiogenesis dan vaskulogenesis. VEGF adalah sebuah basa, 34-46-kDa *homodimeric, heparin-binding glycoprotein* dan gen VEGF berada di kromosom 6p12. VEGF, yang juga disebut VEGF-A atau *vascular permeability factor* (VPF), termasuk kedalam keluarga *supergene VEGF-platelet-derived growth factor (PDGF)*. Anggota keluarga yang lain adalah VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-E. Semua menunjukkan derajat yang bervariasi homolog dengan VEGF. *Splicing* alternatif gen VEGF menghasilkan empat asam amino isoform 121, 165, 189 dan 206 serta varian-varian lain yang lebih jarang. VEGF-165, adalah bentuk dominan dan sebagian terkait dan disekresi oleh matriks.



Gambar 3: Molekul VEGF (dikutip dari Sidhu, 2007)

VEGF-189 dan VEGF-206 merupakan dasar, dengan afinitas tinggi terhadap heparin dan tetap terkucil dalam matriks ekstra-selular, terikat pada proteoglikan-proteoglikan heparan sulfat. VEGF-121 bersifat asam, tidak mengikat heparin dan disekresikan. Bentuk matriks sekueter mungkin dilepaskan oleh kerja enzimatik, baik melalui kerja heparanase atau melalui celah plasmin untuk melepaskan suatu fragmen yang bersifat difusif (VEGF-110).

Kerja VEGF-165 terkait dengan aktivasi kaskade proteinase, termasuk yang mengarah kepada pembentukan plasmin, sehingga penganlepasan isoform VEGF yang terikat matriks menimbulkan mekanisme amplifikasi.^(Sidhu, 2007)

2.7.3. Regulasi Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF diatur oleh berbagai hormon, faktor pertumbuhan dan sitokin. Ekspresi mRNA VEGF meningkat pada kultur sel yang dirangsang dengan Interleukin-6 (IL-6), PDGF, EGF, TGF, prostaglandin E2, thyroid stimulating hormon (TSH) dan luteotrophic hormone. Sebagai tambahan, *nitric*

oxide dan produk-produk onkogen *v-Has-ras/v-raf* juga merangsang ekspresi VEGF.

Hipoksia merupakan rangsangan terkuat ekspresi VEGF baik pada *in vitro* maupun *in vivo*. *VEGF gene promoters*, mempunyai elemen *cis-acting enhancer* yang akan berikatan dengan *hypoxia inducible factor (HIF)*, suatu faktor transkripsi. Dengan ikatan pada reseptor VEGF dan terjadi transauto-posporilisasi dan aktivasi kaskade sinyal transduksi meliputi jalur Src, PLC-g, MAPK, STAT3 dan STAT5.

Ekspresi gen VEGF diregulasi oleh suatu stimulasi pejamu, termasuk estrogen, *nitric oxide (NO)* dan berbagai variasi *growth factor*, diantaranya *fibroblast growthfactor-4*, PDGF, *tumor necrosis factor alpha (TNF- α)*, *epidermal growth factor (EGF)*, *transforming growth factor beta (TGF- β)*, *keratinocyte growth factor*, *interleukin (IL)-6*, IL-1 β dan *insulin-like growth factor-1 (IGF-1)*.

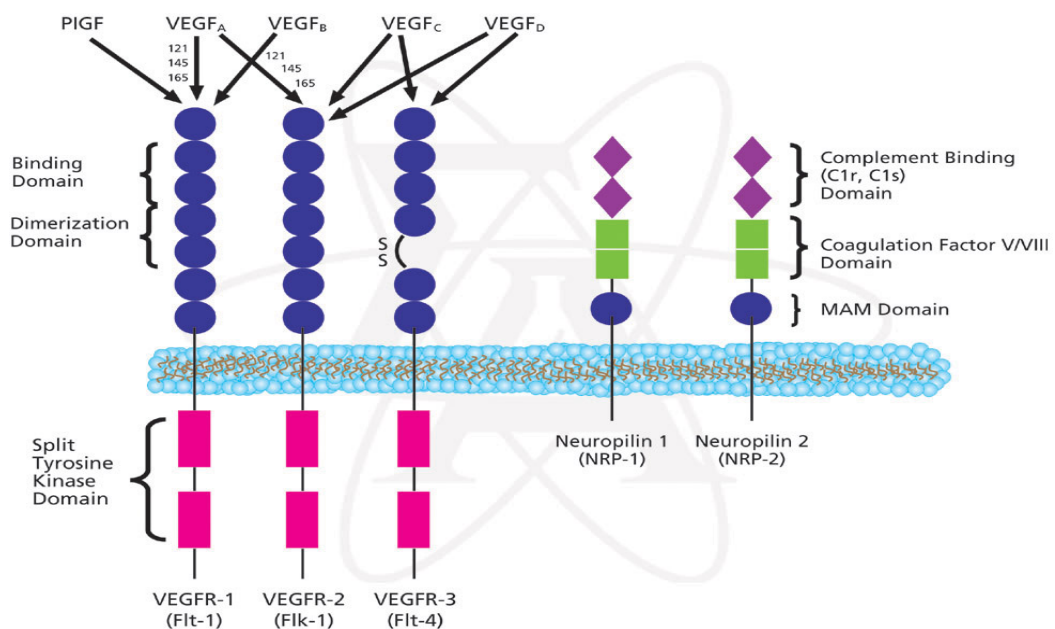
Konsisten dengan perannya pada angiogenesis tumor, ekspresi VEGF diregulasi oleh kejadian-kejadian genetik yang biasa terjadi pada transformasi maligna, seperti hilangnya gen-gen supresor tumor (misalnya p53) dan aktivasi onkogen seperti *ras*, *v-src* dan *HER-2*. Selebihnya ekspresi VEGF secara khusus lebih sensitif terhadap tekanan oksigen dan sangat terpengaruh oleh hipoksia yang menjadi karakter hampir semua tumor.

Dengan VEGF, hipoksia juga menimbulkan regulasi VEGFR-1 dan VEGFR-2 pada sel-sel endotelial. Peningkatan ekspresi gen-gen VEGFR juga diinduksi oleh pengikatan kepada VEGF itu sendiri, sehingga menimbulkan amplifikasi sinyal VEGF. TGF- β , yang juga menimbulkan peningkatan VEGF, telah ditemukan menurunkan regulasi kadar VEGFR mRNA pada sel-sel endotelial, sedangkan TNF- α dilaporkan mempunyai efek positif dan negatif terhadap ekspresi VEGFR-2.

2.7.4 Reseptor VEGF

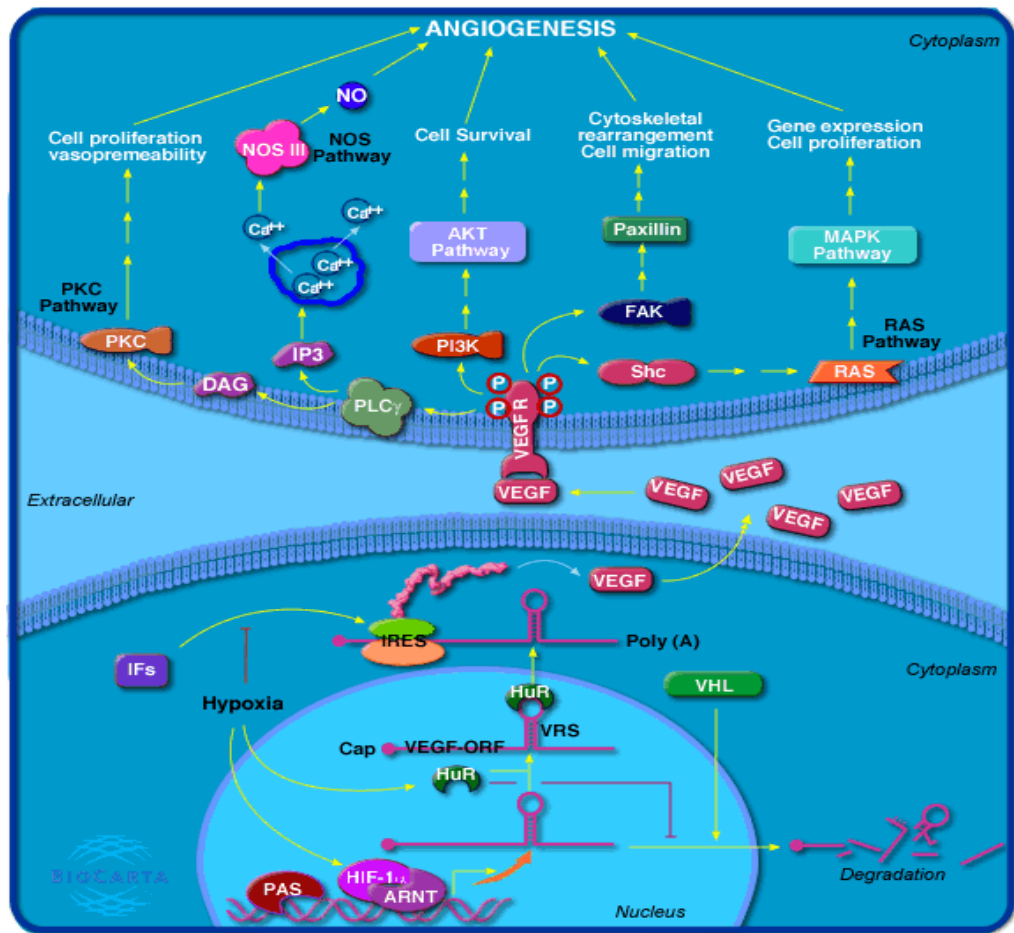
Sinyal kunci yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel, juga regenerasi dan remodeling jaringan dewasa, dilakukan melalui reseptor transmembran, dimana sebagian besar adalah reseptor tirosin kinase. Reseptor VEGF, VEGFR adalah suatu reseptor kelompok tirosin kinase.

Ligand VEGF menghantarkan efek angiogenik melalui ikatan yang spesifik dengan VEGF reseptor (VEGFR). Ikatan tersebut mengakibatkan perubahan konformasional pada reseptor berupa dimerisasi dan berlanjut dengan sinyal transduksi melalui domain tirosin kinase. Ada 3 reseptor primer dan 2 buah koreseptor yang akan mengikat VEGF dan keluarganya, yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 dan ko-reseptor Neuropilin-1 dan Neuropilin-2 yang tidak mempunyai domain/area intraselluler dan diduga meningkatkan afinitas VEGF pada reseptor primer. Beberapa afinitas ligan pada reseptor dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 4: Reseptor transmembran VEGF dan ligand meliputi : VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk1) dan VEGFR-3 (Flt-4), Neurpilin-1 dan Neuropilin-2 (dikutip dari Yancopoulos GD, 2000)

Ekspresi reseptor VEGF pada sel endotel berbeda diantara 3 jenis reseptor VEGFR-1, VEGFR-2 dan VEGFR-3. VEGFR-2 diekspresikan hampir pada semua sel endotel, sedangkan VEGFR-1 dan VEGFR-3 hanya diekspresikan pada pembuluh darah tertentu.

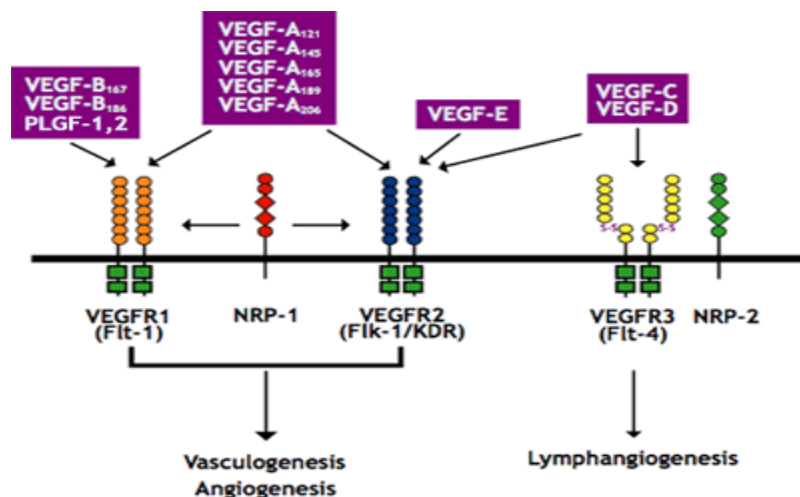


Gambar 5. Sinyal transduksi dari ikatan VEGF pada reseptor VEGFR(dikutip dari Yancopoulos GD, 2000)

- **VEGFR-1** : adalah glikoprotein transmembran berukuran 180 kDa, dan dapat terdeteksi ekspresinya pada hampir semua sel endotel. VEGFR-1 berperan sebagai reseptor dari VEGF, PLGF dan VEGF-B. VEGFR-1 adalah sinyal kunci untuk angiogenesis, terutama pada fase embriogenesis, tapi tidak banyak berperan pada angiogenesis patologis, misalnya pada pertumbuhan tumor.
- **VEGFR-2** : VEGFR-2 sebelumnya dinamakan KDR (kinase insert-domain containing receptor) flk-1 (fetal liver kinase-1), disandi oleh gen yang berlokasi pada *region 4q11-q13* , sebuah protein berukuran 230 kDa. Selama masa embrio, ekspresi mRNA VEGFR-2 terdistribusi pada kapiler, pembuluh darah dan endokardium. VEGFR-2 meningkat ekspresinya

dengan rangsangan hipoksia, dan berperan utama pada regulasi permeabilitas vaskuler. VEGFR-2 menghantarkan sinyal efek angiogenik meliputi :

1. permeabilitas vaskuler mikro
 2. proliferasi sel endotel
 3. invasi
 4. migrasi
 5. *survival*
- *VEGFR-3* : Protein VEGFR-3 (FLT4) mengikat VEGF-C dan VEGF-D. VEGFR-3 merangsang limfangiogenesis dan hanya ditemukan pada sel endotel aliran limfe dewasa. Didapatkan peran VEGFR-3 dalam menjaga integritas vaskuler dengan memodulasi aktifitas VEGFR-2.
 - *Neuropilin* : NRP-1 dan NRP-2 adalah suatu glikoprotein transmembran, terekspresi pada sel endotel pembuluh darah ataupun pembuluh darah pada tumor. Ikatan pada VEGF akan menyebabkan peningkatan migrasi sel endotel. NRP-1 dan NRP-2 keduanya adalah suatu protein reseptor transmembran yang berhubungan dengan regulasi proses angiogenesis. Reseptor neuropilin akan mengikat beberapa isoform dari VEGF meliputi : VEGF, VEGF-E, PlGF-2 dan VEGF-B. Penelitian terakhir mendapatkan bahwa reseptor NRP-2 juga berikatan dengan VEGF-C dan diekspresikan bersamaan dengan VEGFR-3 dan berperan dalam perkembangan saluran limfe. (Yancopoulos, 2000)



Gambar 6 : Variasi ikatan VEGF dan reseptornya serta manifestasi klinisnya(dikutip dari Hicklin DJ, 2005)

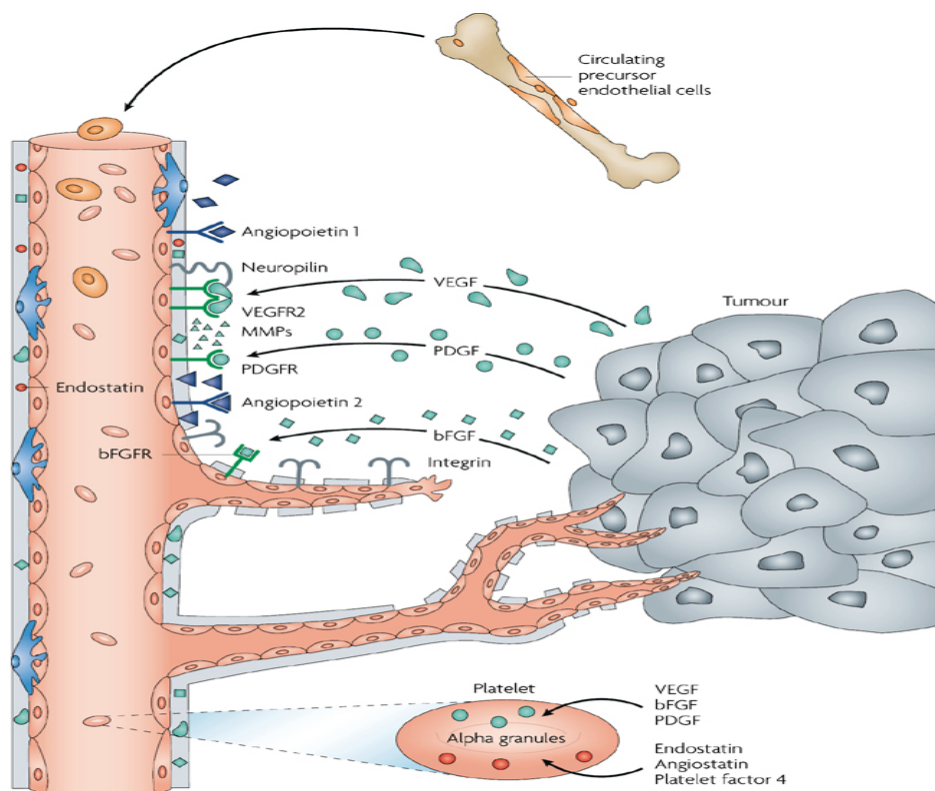
2.7.5 Sintesis dan Aktifitas Biologis VEGF

Sintesa VEGF

Sintesa VEGF dipicu oleh berbagai faktor. Faktor perangsang utama adalah hipoksia jaringan / sel, sedangkan faktor lainnya adalah berbagai sitokin (PDGF, EGF, IGF dll), Cox-2 serta berbagai onkogen.

Hipoksia akan menyebabkan ekspresi HIF-1 α , suatu faktor transkripsi, dan akan masuk ke dalam inti sel. Selanjutnya terjadi ikatan dengan *hipoksia respon element* (HRE) dan terjadi transkripsi gen VEGF. Kemudian terjadi sintesis m-RNA VEGF, terjadi translasi dan diproduksi protein VEGF dan berakhir dengan sekresi VEGF.

Di lain pihak, pada keadaan normal atau tidak adanya hipoksia maka akan terjadi supresi transkripsi gen VEGF dan degradasi m-RNA serta protein yang diproduksinya.



Nature Reviews | Drug Discovery

Gambar 7. Tahapan angiogenesis pada tumor (dikutip dari Folkman, 1995)

Aktifitas Biologis VEGF

VEGF menstimulasi migrasi dan proliferasi sel endotel pada arteri, vena dan kapiler dan merangsang angiogenesis baik *in vitro* ataupun *in vivo*. Demikian juga, VEGF merangsang migrasi dari monosit dan makrofag yang mempunyai reseptor VEGFR-1 di permukaannya. VEGF juga bersifat *pro-survival factor* yang merangsang ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan A1 pada sel endotel manusia. VEGF juga menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler.

Kerja VEGF dimediasi melalui pengikatan kepada dua reseptor tirosin kinase yaitu VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR; bentuk murin-nya dikenal sebagai Flk-1). Reseptor-reseptor tersebut diaktivasi oleh VEGF dengan mencetuskan fosforilasi berbagai protein yang aktif dalam kaskade transduksi sinyal. Anggota lain dari keluarga VEGF menunjukkan spesifisitas pengikatan reseptor yang berbeda, dimana VEGF-B dan *Placental Growth Factor* (PlGF) hanya mengikat dan mengaktivasi VEGFR-1. VEGF-C dan VEGF-D mengikat reseptor ketiga, VEGFR-3 (Flt-4) dan melakukan mediasi limfangiogenesis dan memperlihatkan beberapa aktivitas terhadap VEGFR-2. VEGFR-1 dan 2 ditemukan pada permukaan sel-sel endotelial, dimana mereka mengikat VEGF dengan afinitas tinggi. Walau VEGFR-1 berafinitas lebih tinggi, VEGFR-1 dipercaya bekerja sebagai reseptor umpan, mempengaruhi modulasi availabilitas VEGF terhadap VEGFR-2, reseptor utama sinyal VEGF. Kerja modulator lebih lanjut diperluas dengan adanya bentuk larut air dari VEGFR-1, yang mengikat VEGF dan dapat menghambat mitogenesis yang diinduksi VEGF, sebagaimana neuropilin, reseptor untuk kolapsin/semaforin. Neuropilin-2 terikat pada VEGFR-1, sedangkan neuropilin-1 terikat pada VEGF-165 dan meningkatkan afinitas terhadap VEGFR-2.

2.7.6 Metode pemeriksaan VEGF

Pemeriksaan VEGF dapat dilakukan dengan berbagai metode, dan hal ini kadang menimbulkan kesulitan untuk mengevaluasi/membandingkan hasil dari berbagai pemeriksaan tersebut. Macam pemeriksaan yang dilakukan adalah :

- RT-PCR dan *in-situ hybridisation* untuk evaluasi ekspresi m-RNA VEGF
- Intra-tumoral protein
- Immunohistokimia
- Western Blotting dan
- ELISA

2.7.7 Peran VEGF dalam Angiogenesis Patologis

VEGF adalah suatu *faktor pertumbuhan* yang berperan dalam regulasi vaskulogenesis, angiogenesis fisiologis dan angiogenesis patologis.

Vaskulogenesis dan Angiogenesis

Langkah pertama dalam rangkaian proses sistem pembuluh darah masa embrio adalah rangsangan pada ventro-lateral mesoderm oleh anggota dari fibroblast growth factor (FGF) dan keluarga transforming growth factor-beta (TGF). Vaskulogenesis bermula dengan diferensiasi dari hemangioblast dari mesoderm dan pembentukan agregat sel atau pulau pulau darah yang saling berhubungan. Proses vaskulogenesis tahap kedua dimana sel endotel menginvasi, melebur, dan membentuk pleksus kapiler primitif. VEGFR-1 sejak awal berperan dalam perkembangan hemangioblas.

Vaskularisasi terjadi setelah terjadi tonjolan sel endotel, diikuti migrasi, proliferasi dan remodeling membentuk pembuluh kapiler dari pleksus kapiler primitif. Proses ini dinamakan angiogenesis yang akhirnya membentuk *pohon pembuluh darah*, arteri dan vena. Angiogenesis dibedakan dengan vaskulogenesis pada tingkat seluler. Mekanisme molekuler yang mengendalikan kedua proses tersebut bisa tumpang tindih. Tidak seperti vaskulogenesis, angiogenesis juga terjadi pada masa dewasa, misalnya pada sistem reproduksi dewasa, penyembuhan luka, reparasi jaringan dan berbagai kondisi patologis.

Pertumbuhan dari suatu pembuluh darah dibagi menjadi dua, yaitu vaskulogenesis dan angiogenesis. Vaskulogenesis adalah pertumbuhan

pembuluh darah baru yang prekursornya berasal dari angioblast, sedangkan angiogenesis merupakan pertumbuhan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah sebelumnya atau dengan kata lain merupakan perluasan dari pembuluh darah sebelumnya. Proses vaskulogenesis terbatas pada saat embriogenesis sedangkan proses angiogenesis dapat terjadi pada saat perkembangan

VEGF adalah suatu *growth factor* yang penting dalam regulasi angiogenesis fisiologis dan angiogenesis patologis. VEGF juga memainkan berbagai peran, mulai dari suatu peran *pivotal* dalam vaskulogenesis embriogenik sampai kepada peran dalam delesi satu alel yang dapat mengakibatkan kematian mudigah. Sebagaimana telah diterangkan di atas, angiogenesis adalah suatu proses *multistep* dan VEGF bekerja pada beberapa tingkatan proses, yaitu:

- ✓ VEGF adalah suatu mitogen yang poten bagi sel-sel vaskular endotelial namun dengan beberapa pengecualian, VEGF tidak bersifat mitogenik bagi sel-sel tipe lain.
- ✓ VEGF bertindak sebagai mediator sekresi dan aktivasi enzim-enzim dalam proses degradasi matriks ekstra-seluler. VEGF bekerja pada sel-sel endotelial, menginduksi ekspresi aktivator dan inhibitor plasminogen, ekspresi reseptor urokinase dan ekspresi *matrix metalloproteinases* kolagenase interstisial dan gelatinase A, juga pada saat yang bersamaan menurunkan kadar inhibitor jaringan *metalloproteinases 1* dan *2*.
- ✓ VEGF bertindak sebagai suatu *survival factor* bagi sel-sel endotelial melalui inhibisi proses apoptosis. Kerja ini dimediasikan melalui induksi ekspresi protein-protein anti-apoptotik Bcl-2 dan Bcl-A1, regulasi *phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*, meningkatkan fosforilasi adhesi focal kinase dan stimulasi produksi sel-sel endotelial NO dan prostaglandin-12.
- ✓ VEGF adalah faktor penting dalam mobilisasi prekursor-prekursor sel-sel endotelial sumsum tulang dalam proses promosi vaskularisasi.
- ✓ VEGF juga mempunyai peran penting dalam modulasi migrasi sel-sel endotelial kepada lokasi angiogenesis.

Kerja VEGF lainnya termasuk meningkatkan permeabilitas vaskular, inhibisi diferensiasi sel-sel dendritik, regulasi transport heksosa ke dalam sel-sel endotelial, induksi faktor-faktor jaringan dan induksi migrasi monosit.

Sehubungan dengan jumlah VEGF yang diproduksi oleh tumor, terjadi suatu rangkaian umpan balik positif, yaitu promosi angiogenesis yang diinduksi oleh VEGF mempercepat pertumbuhan tumor akan menimbulkan peningkatan sekresi VEGF. Tipe amplifikasi ini dapat terus berlanjut melalui *upregulation* yang dimediasi oleh VEGF pada proses ekspresi reseptor-reseptor VEGF dalam sel-sel endotelial. Angiogenesis tumor juga mengikutsertakan sel-sel prekursor endotelial dari sumsum tulang dalam suatu proses yang tergantung pada VEGF dan dapat diabolisasi sepenuhnya bila sinyal-sinyal melalui VEGFR-1 dan VEGFR-2 diinhibisi.

Sejak didapatkannya korelasi antara KPD dan angiogenesis tumor dengan menggunakan MVD, banyak penelitian yang menggunakan parameter tersebut. Telah diterima secara luas bahwa IMD sebagai salah satu faktor prognostik standar independen. IMD juga dapat memprediksi OS. Sebagai tambahan, IMD memberikan informasi prognostik dan prediktif terhadap terapi tamoxifen berdasarkan status estrogen reseptor. Tingginya level VEGF mRNA didapatkan pada tipe invasif dan DCIS yang berhubungan dengan banyaknya pembuluh darah tumor. Pengukuran ekspresi VEGF dengan imunohistokimia atau ekstrak jaringan dengan immunoassay menunjukkan korelasi yang signifikan dengan jumlah MVD. Pada pasien dengan KGB negatif, VEGF merupakan prediktor independen yang kuat terhadap RFS dan OS.

Pengukuran marker untuk angiogenesis yang larut dalam sirkulasi lebih mempunyai keunggulan dibandingkan dengan pemeriksaan jaringan seperti imunohistokimia atau immunoassay. Sejak dilaporkan tingginya kadar konsentrasi VEGF serum pada pasien dengan kanker, banyak penelitian melaporkan hasil yang serupa pada KPD dan beberapa kanker lainnya dengan level yang tinggi pada yang bermetastasis. Korelasinya dengan prognosis juga telah dilaporkan pada beberapa kanker seperti kanker ovarium. Meskipun demikian, interpretasi beberapa studi sangat kompleks bahwa pengukuran VEGF serum banyak dihasilkan dari platelet akibat proses pengambilan sampel darah. Untuk

mengukur level sirkulasi basal dari VEGF serum, sampel sebaiknya diproses secepatnya sehingga akan memperlihatkan refleksi VEGF yang dihasilkan oleh sel tumor.^(Adams J, 2000)

Eksresi VEGF telah dilaporkan mempunyai nilai prognostik independen yang signifikan dan berhubungan dengan OS yang jelek pada KPD. Kelebihan biomarker darah dibandingkan dengan biomarker dari jaringan adalah minimal invasif, relatif mudah untuk dievaluasi dan beberapa penelitian melaporkan bahwa VEGF larut dapat dijadikan marker angiogenesis yang potensial.^(Gisterek I, 2008)

VEGF mempunyai peran utama didalam angiogenesis dan perkembangan tumor pada KPD. Ekspresi VEGF dapat diukur secara kuantitatif dengan metode ELISA dan semikuantitatif dengan imunohistokimia. Level VEGF pada jaringan tumor berkorelasi dengan status KGB dan OS. Byrne, dkk mendapatkan korelasi VEGF IMD dengan MVD yaitu pengukuran standar untuk angiogenesis tumor.^(Byrne, 2007)

Berdasarkan *evidence* tersebut, kami berhipotesa bahwa level serum VEGF yang bersirkulasi mungkin merefleksikan level VEGF didalam jaringan tumor pada wanita dengan KPD stadium dini dan lanjut. Kemudian menetapkan hubungan antara VEGF bersirkulasi dengan parameter faktor prognostik klinikopatologik yang sudah diterima secara luas.