

CARCINOMA
BREAST

Hasil Penelitian

**HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN
EKSPRESI VEGF PADA INVASIVE DUCTAL KARSINOMA
PAYUDARA**

PPDS.IB. 04/10

SUP
h



Oleh :

Sugeng Suparno, dr

Pembimbing :

**Heru Purwanto, dr. SpB (K) Onk, MKes
Prof. Dr. Endang Joewarini, dr. SpPA (K)**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1
LABORATORIUM ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA/RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA
2007**

**HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN
EKSPRESI VEGF PADA INVASIVE DUCTAL KARSINOMA
PAYUDARA**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR

**Untuk memenuhi persyaratan dalam Program Pendidikan
Dokter Spesialis I Program Studi Ilmu Bedah
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Telah diuji di hadapan Panitia Ujian Karya Akhir
Pada hari Rabu, 19 Maret 2008**

Oleh :
Sugeng Suparno, dr

LEMBAR PENGESAHAN

**HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN
EKSPRESI VEGF PADA INVASIVE DUCTAL KARSINOMA
PAYUDARA**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

Oleh

Sugeng Suparno, dr

Disetujui oleh :

Pembimbing I :



Heru Purwanto, dr. SpB(K)Onk,MKes

Pembimbing II :

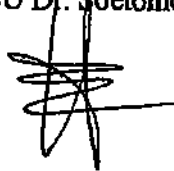


Prof. Dr. Endang Joewarini, dr. SpPA (K)

Mengetahui

la Ketua Program Studi Ilmu Bedah

FK Unair / RSUD. Soetomo Surabaya



Yoga Wijayahadi, dr., SpB(K) KL.

HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI VEGF PADA INVASIVE DUCTAL KARSINOMA PAYUDARA

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

**Telah disetujui oleh
Panitia Penguji pada tanggal 19 Maret 2008
Sebagai persyaratan dalam Program Pendidikan Ilmu Bedah
FK Unair / RSU. Dr. Soetomo Surabaya**

Panitia penguji karya akhir

Ketua :



Yoga Wijayahadi, dr., SpB(K) KL.

Anggota :

1. Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr., Sp.B(K)Onk

1.....

2. Prof. Dr. Paul Tahalele, dr., FCTS, FINACS

2.....

3. Heru Purwanto, dr. SpB(K)Onk,Mkes

3.....

4. Prof. Dr. Endang Joewarini, dr. SpPA (K)

4.....

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadiran Tuhan YME yang senantiasa melimpahkan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah akhir **HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI VEGF PADA INVASIVE DUCTAL KARSINOMA PAYUDARA** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan dokter spesialis bidang studi ilmu bedah di Laboratorium Ilmu Bedah FK UNAIR/RSUD Dr Soetomo Surabaya.

Laporan karya ilmiah akhir ini secara garis besar berisi latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian dan manfaat penelitian. Dibahas juga secara singkat landasan teori yang berkaitan dengan ekspresi *VEGF* pada *ductal carcinoma* payudara. Pada laporan ini juga dipaparkan tentang kerangka konseptual yang merupakan ringkasan dari konsep yang berhubungan dengan variabel-variabel yang diteliti beserta metodologi penelitiannya.

Saya menyadari bahwa dalam penulisan laporan karya tulis ilmiah akhir ini masih jauh dari sempurna, untuk itu dengan rendah hati saya mengharapkan kritik dan saran agar laporan karya tulis ilmiah akhir ini menjadi lebih baik dan lebih sempurna.

Akhir kata saya ucapkan terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada semua pihak yang telah ikut membimbing, mendidik dan membantu saya selama menempuh pendidikan program pendidikan spesialis saya.

Dalam kesempatan ini, saya menyatakan rasa terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi ilmu bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi ilmu bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
3. Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya sehingga dapat bekerja sekaligus menimba ilmu di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya.
4. Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr, SpB(K)Onk selaku Ketua Program Studi Ilmu Bedah sekaligus sebagai penguji dalam karya tulis ilmiah akhir saya , yang atas ketekunan, ketelitian dan kesabaran beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya serta menanamkan disiplin yang tinggi selama saya menempuh pendidikan.
5. Prof. Dr. Paul Tahalele, dr, SpB(K)TKV, selaku Ketua Bagian Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan sebagai tim penguji karya tulis ilmiah akhir saya, yang telah memberikan arahan dalam penelitian saya serta selalu memberikan motivasi dan bimbingan selama saya menjalani pendidikan.

6. Heru Purwanto, dr, SpB(K)Onk,MSc, sebagai pembimbing dalam karya tulis ilmiah akhir saya, yang atas ketekunan, kesabaran dan ketelitian beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya.
7. Prof. Dr. Endang Joewarini, dr. SpPA(K), selaku pembimbing dan penguji dibidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam membimbing saya serta memberi masukan dalam penelitian saya.
8. Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr MS,SpPA(K), FIAC, selaku pembimbing dibidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam melakukan pemeriksaan dan pembacaan imunohistokimia serta memberikan masukan dalam penelitian saya ini.
9. Budiono, dr, Mkes, yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing saya khususnya dalam bidang statistik dan metodologi penelitian.
10. Ary Wahyudiono, AMd, beserta karyawan di lingkungan laboratorium/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo telah banyak membantu selama menyelesaikan penelitian ini.
11. Seluruh teman sejawat / rekan residen, paramedis dan karyawan di lingkungan Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah banyak membantu dan jalinan kerjasama yang baik selama masa pendidikan maupun selama menyelesaikan penelitian ini.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini serta ucapan terima kasih yang tulus saya sampaikan kepada seluruh pasien yang telah memberikan peranan besar dalam penelitian ini.

13. Istri saya Sandra Kartika, dra, kedua anakku tersayang Maya Amanda, Natasya Amadea, terima kasih untuk seluruh cinta, kasih sayang, pengorbanan, kesabaran, pengertian dan dorongan yang terus menerus diberikan selama pendidikan

Surabaya, November 2007

Penulis

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

KATA PENGANTAR.....	i	
DAFTAR ISI	iv	
DAFTAR KATA SINGKATAN	viii	
DAFTAR TABEL DAN GAMBAR	ix	
DAFTAR LAMPIRAN	x	
BAB 1	PENDAHULUAN	
1.1	Permasalahan	1
1.2	Rumusan masalah	3
1.3	Tujuan penelitian	
1.3.1	Tujuan umum	3
1.3.2	Tujuan khusus	3
1.4	Manfaat penelitian	
1.4.1	Manfaat teoritis	3
1.4.2	Manfaat klinis	4
BAB 2	TINJAUAN KEPUSTAKAAN	
2.1	Karsinoma payudara.....	5
2.2	Prognosa pada kanker payudara.....	5
2.3	Grading histopatologi karsinoma payudara.....	6
2.4	Angiogenesis	
2.4.1	Definisi angiogenesis	7
2.4.2	Peranan angiogenesis	7
2.4.3	Mekanisme angiogenesis	8

	2.4.4 Aplikasi klinis angiogenesis	14
	2.4.5 Aspek biologi molekuler VEGF.....	16
	2.4.6 Pengukuran angiogenesis	22
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
	3.1 Kerangka konseptual	24
	3.2 Hipotesis penelitian	24
BAB 4	METODE PENELITIAN	
	4.1 Jenis dan rancangan penelitian	25
	4.2 Populasi, sampel, besar sampel, teknik pengambilan sampel, kriteria inklusi dan eksklusi	25
	4.3 Variabel penelitian	27
	4.4 Definisi Operasional	27
	4.5 Lokasi dan waktu penelitian	28
	4.6 Kerangka Operasional	29
	4.7 Tahap Penelitian	30
	4.8 Analisa data.....	31
BAB 5	HASIL PENELITIAN	
	5.1 Gambaran sampel penelitian.....	32
	5.2 Analisa Hasil Penelitian.....	33
BAB 6	PEMBAHASAN	
	6.1 Gambaran Umum Hasil Penelitian.....	38

6.2 Korelasi antara ekspresi VEGF dengan grading histopatologi	
Pada inasive ductal karsinoma payudara.....	38
6.3 Korelasi antara derajat ekspresi VEGF dengan ukuran tumor	
Dan metastase regional	41
6.4 Peran Fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan	
Imunohistokimia VEGF	41
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	47
KEPUSTAKAAN	48
LAMPIRAN	51

DAFTAR KATA SINGKATAN

VEGF	: Vascular endothelial growth factor
ECM	: Extraselluler matrik
uPA	: Urokinase plasminogen aktivator
MMP	: Matrik metalloproteinase
FGF	: Fibroblast growth factor
bFGF	: Basic fibroblast growth factor
PAI	: Plasminogen activator inhibitor
MCP	: Macrophage chemotactic factor
TNF α	: Tumor necrosis factor α
TIMP	: Tissue inhibitors of metalloproteinases
HSPG	: Heparan Sulphate Proteoglycans
HIF-1	: Hypoxia Inducible factor – 1
ARNT	: Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
VHL	: Von Hippel Lindau
IRES	: Internal ribosom entry site
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FSS	: Fluid Shear Stress
PI3K	: Phosphatidylinositol 3 kinase
Akt	: Antiapoptotic Kinase
PLC - γ	: Phospolipase C
IP3	: Inositol 1,4,5 triphosphate.

DAG	: Diacylglycerol
PKC	: Protein Kinase C
ERK1/2	: Extraceluler signal Regulated Kinase
AA	: Arachidonic Acid
COX –1	: Cyclooxygenase – 1
PAI-1	: Plasminogen activator inhibitor 1
MAGS	: microscopic angiogenesis grading system score

DAFTAR GAMBAR

Gb 1. Peran angiogenesis pada pertumbuhan tumor	7
Gb 2. Gambar skematis proses angiogenesis	9
Gb 3. Diagram yang menunjukkan keseimbangan antara regulator positif dan negatif angiogenesis	12
Gb 4. Percepatan pertumbuhan tumor karena peningkatan perfusi dan produksi faktor pertumbuhan parakrin akibat adanya neovaskularisasi	14
Gb 5. Kecenderungan tumor angiogenik untuk tumbuh pada tempat metastasis	15
Gb 6. Ilustrasi isoform VEGF	17
Gb 7. Interaksi VEGF dengan reseptornya	18
Gb 8. Peran VEGF dalam proses Angiogenesis	19
Gb 9. Jalur survival dan migrasi sel	21
Gb 10. Jalur proliferasi sel dan permeabilitas vascular	21
Gb 11. Kerangka konseptual penelitian	24
Gb 12 – 17 Gambar-gambar hasil pemeriksaan <i>VEGF</i>	35

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Faktor-faktor angiogenik endogen	13
Tabel 2.	Regulator negatif proliferasi sel endotelial endogen	13
Tabel 3.	Karakteristik umur dan grading histopatologi	32
Tabel 4.	Ekspresi VEGF	33
Tabel 5.	Hubungan antara grading histopatologi dengan intensitas ekspresi VEGF	33

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1: Teknik Pengecatan Imunohistokimia Dari Sediaan Blok Parafin
- Lampiran 2: Teknik pulasan imunohistokimia dengan antibodi *NCL-VEGF* dari sediaan parafin blok.
- Lampiran 3 : Analisis statistik
- Lampiran 4 : Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi *VEGF* pada karsinoma payudara.

**CORRELATION BETWEEN HISTOPATHOLOGY GRADING AND EXPRESSION
OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN INVASIVE
DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST**

Sugeng Suparno *, Heru Purwanto **, Endang Joewarini ***

* Dept. of Surgery, Fakultas of Medicine Airlangga University/ Dr. Soetomo Hospital, Surabaya

** Oncology Surgery Div., Dept. of Surgery, Fakultas of Medicine Airlangga University /Dr. Soetomo Hospital, Surabaya

*** Dept. of Pathology, Fakultas of Medicine Airlangga University/ Dr. Soetomo Hospital, Surabaya

ABSTRACT

Background : Carcinoma of the breast is still the leading cause of death due to malignancy in women between 40 to 44 years old . Carcinoma of the breast are 32 % of all malignancy in women and responsible for 19 % of death in women due to carcinoma. The developing of breast cancer correlated with the angiogenesis process within the tumor and that is why several studies revealed that the VEGF enzyme (one of the factors responsible for angiogenesis) is over expressed in breast carcinoma. It has been established that histopathology grading is one of the predominant prognostic factors of breast cancer. Several studies showed that there is correlation between expression of *VEGF* with histopathology grading in carcinoma of the breast.

Objective : To find the correlation between histopathology grading and expression of *VEGF* in breast invasive ductal carcinoma .

Method : Samples are all paraffin blocks of breast invasive ductal carcinoma patients stored in Department of Pathology Anatomy Dr. Soetomo Hospital Surabaya, in the year of 2007, regardless the stage of breast carcinoma, and stained for *VEGF* immunohistochemistry. Subject are documented from the medical record in Oncology Division, Department of Surgery Dr. Soetomo Hospital Surabaya.

Result : Twenty eight (85 %) showed positive *VEGF* expression, with 16 (48 %) with strong expression (+ 3), 9 (27,3 %) with moderate expression (+ 2), 3 sample (9%) with weak expression (+ 1) and 5 sample (15%) with negative expression.

Well differentiated histopathology grade showed positive and negative *VEGF* expression, with 2 samples (22,2 %) with strong expression (+3), 3 samples (33,3%) with moderate expression (+2), 1 sample (11,1 %) with weak expression (+ 1) and 3 samples (33,3%) negative expression. Moderate differentiated histopathology grade also showed positive and negative *VEGF* expression, with 5 samples (41,7 %) with strong expression (+3), 4 samples (33,3%) with moderate expression (+2), 2 samples (16,7 %) with weak expression (+ 1) and 1 sample (8,3%) negative expression. Poorly differentiated histopathology grade also showed positive and negative *VEGF* expression, with 9 samples (75 %) with strong expression (+3), 2 samples (16,7%) with moderate expression (+2), none sample (0 %) with weak expression (+ 1) and 1 sample (8,3%) negative expression. We found there was significant correlation between expression of *VEGF* and histopathology grading ($p = 0,011$), and the stronger expression of *VEGF* , the poorer the histopathology grading (correlation coefficient 0,439).

Conclusion : *VEGF* is over expressed in 28 samples (85%). There was significant correlation between expression of *VEGF* and histopathology grading, also the stronger expression of *VEGF* , the poorer histopathology grading.

Key words : *VEGF* over expression, histopathology grading in carcinoma of the breast.

**HUBUNGAN ANTARA GRADING HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)
PADA INVASIF DUCTAL CARCINOMA PAYUDARA**

Sugeng Suparno *, Heru Purwanto **, Endang Joewarini ***

* Lab. Ilmu Bedah, FK Unair/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

** Divisi Bedah Onkologi, Lab. Ilmu Bedah, FK Unair/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

*** Bagian/SMF Patologi Anatomi, FK Unair/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang : Karsinoma payudara masih merupakan penyebab kematian yang utama karena keganasan pada wanita. Ia merupakan 32% keganasan pada wanita dan bertanggung jawab untuk 19% kematian akibat keganasan pada wanita. Perkembangan karsinoma payudara berhubungan dengan proses angiogenesis di dalam tumor dan beberapa penelitian menunjukkan bahwa enzim VEGF (salah satu faktor yang bertanggung jawab untuk angiogenesis) diekspresikan berlebihan pada sebagian besar karsinoma payudara. Juga telah dibuktikan bahwa grading histopatologi adalah faktor prognostik dominan pada karsinoma payudara.

Tujuan : Meneliti apakah terdapat hubungan antara grading histopatologi dengan ekspresi VEGF pada *invasif ductal carcinoma* payudara.

Metodologi : Sampel adalah bahan blok parafin penderita *invasive ductal carcinoma* payudara yang tersimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, tahun 2007. Sebanyak 33 blok parafin dari berbagai stadium karsinoma payudara dilakukan pemeriksaan imunohistokimia VEGF. Data pasien diambil dari dokumen medik yang terdapat di poli Bedah Onkologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Hasil : Dari 33 sampel, didapatkan 28 (85 %) memperlihatkan ekspresi VEGF positif dengan 16 sampel (48%) memiliki ekspresi kuat (+ 3), 9 sampel (27 %) memiliki ekspresi sedang, 3 sampel (9 %) memiliki ekspresi lemah, dan 5 sampel (15%) tidak mengekspresikan VEGF. Pada grading *well differentiated* didapatkan 2 sampel (22,2%) ekspresi positif kuat (3+), 3 sampel (33,3%) memiliki ekspresi sedang (+2), 1 sampel

(11,1%) memiliki ekspresi lemah (+1), dan 3 sampel (33,3%) tidak mengekspresikan *VEGF*. Pada grading *moderately differentiated* didapatkan 5 sampel (41,7%) ekspresi positif kuat (3+), 4 sampel (33,3%) memiliki ekspresi sedang (+2), 2 sampel (16,7%) memiliki ekspresi lemah (+1), dan 1 sampel (8,3%) tidak mengekspresikan *VEGF*. Pada grading *poorly differentiated* didapatkan 9 sampel (75%) ekspresi positif kuat (3+), 2 sampel (16,7%) memiliki ekspresi sedang (+2), tidak ada sampel memiliki ekspresi lemah (+1), dan 1 sampel (8,3%) tidak mengekspresikan *VEGF*. Didapatkan adanya korelasi bermakna antara ekspresi *VEGF* dengan grading histopatologi ($p = 0,011$), dimana makin kuat ekspresi *VEGF*, makin jelek grading histopatologinya. Dengan korelasi yang kuat ditunjukkan oleh koefisien korelasi sebesar 0,439.

Kesimpulan : Didapatkan ekspresi *VEGF* yang positif pada 28 sampel (85%). Terdapat korelasi antara ekspresi *VEGF* dengan grading histopatologi pada *invasive ductal carcinoma* payudara. Makin kuat ekspresi *VEGF*, makin jelek grading histopatologinya.

Kata kunci : Ekspresi *VEGF*, grading histopatologi dari *invasive ductal* karsinoma payudara.

BAB 1

PENDAHULUAN



1. 1 Latar belakang masalah

Karsinoma payudara merupakan keganasan pada wanita yang menyebabkan kematian tertinggi pada wanita usia antara 40 sampai 44 tahun . Karsinoma payudara tercatat 32 % dari keseluruhan karsinoma pada wanita dan bertanggungjawab pada 19 % kematian akibat karsinoma pada wanita. Sekitar 180.200 karsinoma payudara terdiagnosis pada tahun 1997 di USA, dan kurang lebih 43.900 akan meninggal akibat kanker tersebut.⁽¹⁾ Pada tahun 1970 kemungkinan seorang wanita di Amerika Serikat terkena kanker payudara adalah 1 : 13, pada tahun 1980, 1 : 11 dan pada tahun 1996 frekuensinya adalah 1 : 8. ⁽¹⁾

Faktor prognostik dan prediktif penting diketahui dalam pengelolaan karsinoma payudara, untuk menerangkan perjalanan penyakit, memilih modalitas terapi, merencanakan terapi yang spesifik dan memprediksi hasil akhir terapi. Faktor prognostik kanker payudara yang sudah diidentifikasi antara lain ukuran tumor, status kelenjar getah bening, metastase, tipe histologi tumor, grading histopatologi, status reseptor estrogen progesteron dan ekspresi *HER-2/neu* ⁽²⁾

Pertumbuhan tumor memerlukan suatu proses angiogenesis yang merupakan proses perkembangan pembuluh darah dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya dan ini dapat dipakai sebagai faktor prognosis; hal ini terbukti dari berbagai penelitian⁽³⁻⁵⁾ Dengan adanya angiogenesis pada tumor maka tumor tersebut mendapat pasokan *nutrient* untuk tumbuh serta mempermudah terjadinya proses metastase ⁽³⁻⁵⁾ Pertumbuhan tumor memerlukan pasokan oksigen. Apabila telah tercapai suatu ukuran dimana pembuluh darah yang ada sudah tidak mampu memberikan pasokan oksigen maka akan terjadi proses

angiogenesis untuk memenuhi pasokan oksigen yang diperlukan. Tumor dapat mengeluarkan bahan-bahan yang bersifat angiogenik, yang terutama adalah *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Selain itu juga melibatkan faktor-faktor yang lain, seperti : sel endotel, makrofag, *extracellular matrix* (ECM) dan enzim-enzim protease yang saling bekerja sama. ^(3,5) Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sebelumnya sudah ada. Angiogenesis berperan pada proses fisiologis, seperti pertumbuhan embrio, penyembuhan luka, dan siklus menstruasi, maupun pada proses patologis seperti aterosklerosis, artritis, retinopati diabetik, dan psoriasis. ⁽⁶⁻⁸⁾ Berbagai penelitian tentang angiogenesis dan pertumbuhan tumor saat ini sedang berkembang pesat. Folkman (1972) mengemukakan bahwa pertumbuhan tumor solid bergantung pada proses angiogenesis dan bahwa pembesaran diameter tumor memerlukan juga peningkatan vaskularisasi. Angiogenesis mempengaruhi perilaku tumor. Peningkatan angiogenesis ini berhubungan dengan kecenderungan tumor untuk bermetastasis, prognosis yang buruk, dan penurunan angka ketahanan hidup. Pengukuran angiogenesis dapat dilakukan secara tidak langsung dengan mengukur aktivitas angiogenik melalui pengukuran kadar protein angiogenik dalam cairan tubuh maupun secara langsung dengan mengukur kepadatan mikrovaskuler dari spesimen biopsi secara mikroskopis. ⁽⁴⁾ Secara teori bila terdapat tumor dengan *VEGF* yang tinggi maka proses angiogenesis akan berlangsung lebih hebat oleh karena *VEGF* merupakan suatu *angiogenic growth factor* sehingga terjadi pertumbuhan tumor, metastase terjadi lebih cepat.

Grading histopatologi membagi suatu tumor dengan beberapa grading untuk menggambarkan derajat keganasan dari tumor tersebut sehingga tumor dengan grading histopatologi yang semakin jelek berarti tumor tersebut semakin mudah tumbuh dan

bermetastase. Pemeriksaan grading histopatologi dikerjakan bersamaan (secara rutin) dengan pemeriksaan morfologi, sedangkan pemeriksaan ekspresi *VEGF* melalui pemeriksaan imunohistokimia yang tidak rutin. Penelitian ini bertujuan apakah terdapat hubungan antara ekspresi *VEGF* dan grading histopatologi pada *invasive ductal carcinoma* pada payu dara

1.2 Rumusan masalah

Apakah terdapat korelasi antara grading histopatologi dan ekspresi *VEGF* pada *invasive ductal carcinoma* payudara

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Mengungkapkan korelasi grading histopatologi dan ekspresi *VEGF* pada *invasive ductal carcinoma* payudara.

1.3.2 Tujuan khusus :

Mengungkapkan adanya korelasi positif antara grading histopatologi dan ekspresi *VEGF* pada *invasive ductal carcinoma* payudara.

1.4 Manfaat penelitian.

1.4.1 Manfaat teoritis

Mengetahui korelasi antara grading histopatologi dan ekspresi *VEGF* pada *invasive ductal carcinoma* payudara sebagai salah satu faktor prognostik.

1.4.2 Manfaat klinis

- a. Ekspresi *VEGF* dapat digunakan sebagai parameter nilai prognostik penderita karsinoma payudara.
- b. Dengan mengetahui adanya ekspresi *VEGF* pada karsinoma payudara dapat dipertimbangkan penelitian penggunaan obat penghambat *VEGF* sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan tersebut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma payudara

Karsinoma payudara merupakan keganasan pada wanita yang menyebabkan kematian tertinggi pada wanita usia antara 40 sampai 44 tahun . Karsinoma payudara tercatat 32 % dari keseluruhan karsinoma pada wanita dan bertanggungjawab pada 19 % kematian akibat karsinoma pada wanita. Sekitar 180.200 karsinoma payudara terdiagnosis pada tahun 1997 di USA, dan kurang lebih 43.900 akan meninggal akibat kanker tersebut. ⁽¹⁾ Pada tahun 1970 kemungkinan seorang wanita di Amerika Serikat terkena kanker payudara adalah 1 : 13, pada tahun 1980, 1 : 11 dan pada tahun 1996 frekuensinya adalah 1 : 8. ^(1, 9)

Faktor prognostik dan prediktif penting diketahui dalam pengelolaan karsinoma payudara, untuk menerangkan perjalanan penyakit, memilih modalitas terapi, merencanakan terapi yang spesifik dan memprediksi hasil akhir terapi. Faktor prognostik kanker payudara yang sudah diidentifikasi antara lain ukuran tumor, status kelenjar getah bening, metastase, tipe histologi tumor, grading histopatologi, ekspresi *VEGF*, status reseptor estrogen progesteron dan ekspresi *HER-2/neu*. ⁽²⁾

2.2 Prognosa pada kanker payudara

Banyak faktor yang mempengaruhi prognosa kanker payudara antara lain ukuran tumor dimana tumor dengan diameter kurang dari 2 cm 5 yrsnya 98%, diameter tumor 2 – 5 cm 5 yrsnya 88%, sedangkan diameter lebih dari 5 cm 5 yrsnya menjadi 76%. Status kelenjar getah bening dimana bila tidak ada kelenjar getah bening yang terkena 10 yrsnya 70-80%,

bila 1 – 3 kelenjar yang terkena 10 yrsnya menjadi 35-40%, sedangkan 10 atau lebih kelenjar yang terkena maka 10 yrsnya menjadi 10-15%. Bila kanker payudara sudah mengadakan metastase ke tulang, paru-paru atau ke hati 5 yrsnya menjadi 16%. Usia penderita pada saat ditemukan tumor payudara kurang dari 45 th maka 5 yrsnya 79%, usia antara 45 – 64 th maka 5 yrsnya 84% sedangkan usia diatas 65 th 5 yrsnya menjadi 87%. Reseptor estrogen positif juga memperbaiki prognosa dengan meningkatkan disease free survival selama 5 th 10% lebih tinggi daripada yang negatif. Ekspresi *HER-2/neu* dan *VEGF* yang semakin kuat menyebabkan kanker tersebut semakin agresif sehingga menyebabkan prognosa yang semakin jelek. ^(9, 10)

2.3 Grading histologis invasive ductal carcinoma payudara

Diferensiasi *invasive ductal carcinoma* payudara berdasarkan konsep Bloom - Ricardson dibagi menjadi 3 subtype yaitu diferensiasi baik (well differentiated), diferensiasi sedang (moderately differentiated), dan diferensiasi jelek (poorly differentiated). Mengetahui diferensiasi sel adalah penting karena umumnya keganasan tumor sesuai dengan diferensiasi sel. Makin jelek diferensiasi selnya, makin ganas karsinoma tersebut. ⁽¹¹⁾

Grading histopatologis karsinoma payudara menurut sistem Bloom-Ricardson

Score	1	2	3
Tubule Formation	>75%	10-75%	<10%
Nuclear Pleomorphism	Small, uniform cells	Moderate increase in size and variation 2	Marked variation
Mitosis Count	Up to 7	8 to 14	15 or more

Score diferensiasi baik (well differentiated) : 3, 4, 5

Score diferensiasi sedang (moderately differentiated) : 6, 7

Score diferensiasi jelek (poorly differentiated) : 8, 9

2.4 Angiogenesis

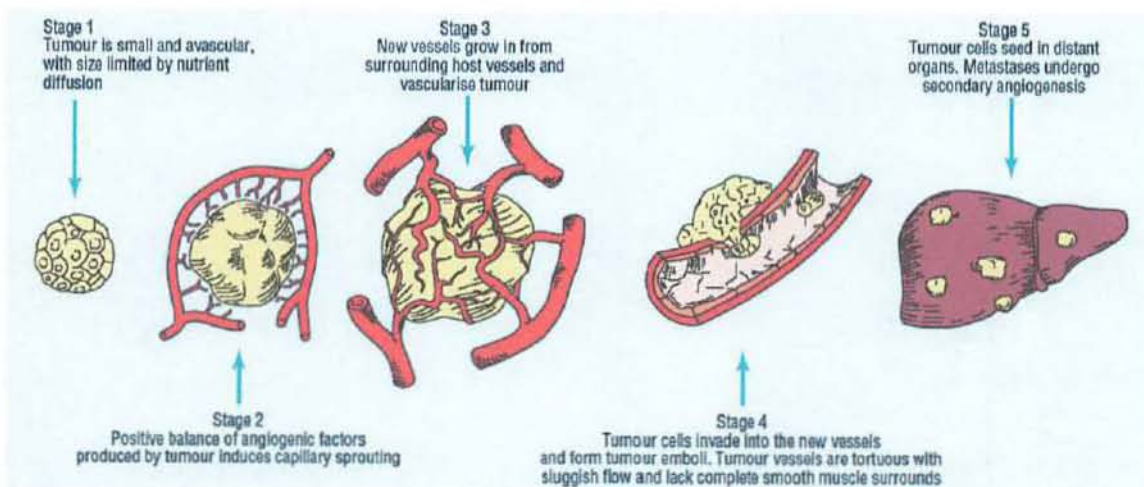
2.4.1 Definisi angiogenesis

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang telah ada.^(4, 12)

2.4.2 Peranan angiogenesis

Angiogenesis berperan pada proses fisiologis, seperti pertumbuhan embrio, penyembuhan luka, dan siklus menstruasi, maupun pada proses patologis seperti aterosklerosis, artritis, retinopati diabetik, dan psoriasis.⁽⁶⁻⁸⁾ Berbagai penelitian tentang angiogenesis dan pertumbuhan tumor saat ini sedang berkembang pesat.^(7, 8)

Vaskularisasi tumor merupakan proses vital untuk pertumbuhan neoplasma dari tumor yang kecil dan terlokalisir menjadi tumor yang besar dengan kemampuan untuk bermetastasis (Gambar 1.).⁽⁷⁾ Folkman (1972) mengemukakan bahwa pertumbuhan tumor solid bergantung pada proses angiogenesis dan bahwa pembesaran diameter tumor memerlukan juga peningkatan vaskularisasi.^(7, 8) Beberapa penelitian pada kanker payudara, buli-buli, dan lambung menunjukkan bahwa peningkatan angiogenesis berhubungan dengan timbulnya metastasis, prognosis yang buruk, dan penurunan angka ketahanan hidup. Hal ini berarti bahwa angiogenesis berhubungan dengan perilaku tumor.^(7, 8)



Gambar 1. Peran angiogenesis pada pertumbuhan tumor (dikutip dari Hayes AJ, Li LY, Lippman ME. Science, medicine, and the future: Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. BMJ 1999; 318: 853-6)

2.4.3 Mekanisme angiogenesis

Proses angiogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah dari pembuluh darah yang telah ada sebelumnya yang terdiri dari beberapa tahap dimana tahap dasar yang harus ada khususnya pada angiogenesis tumor adalah :

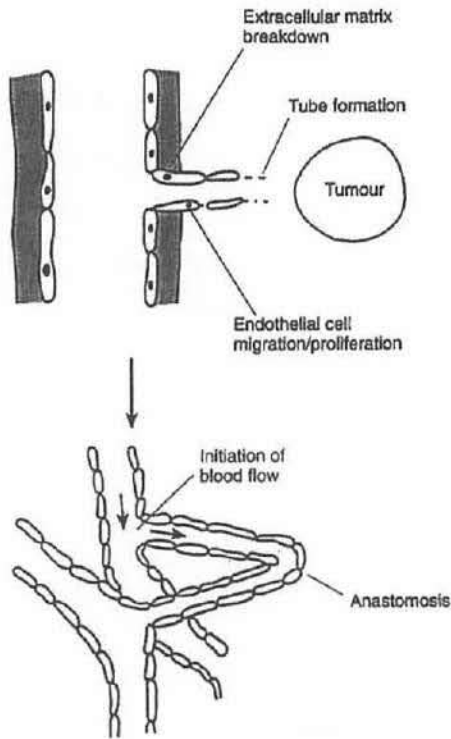
1. Degradasi ECM (*Extracellular matrix*)
2. Kemotaksis dan migrasi sel endotel
3. Proliferasi sel endotel

Pada angiogenesis tumor tidak terjadi tahap maturasi berupa recruitment perisit dan sel otot polos seperti pada proses angiogenesis di luar tumor sehingga kualitas pembuluh darah berbeda dengan pembuluh darah normal.

2.4.3.1 Degradasi ECM (*Extracellular matrix*)

Pada sekeliling pembuluh darah terdapat ECM, sehingga untuk melakukan proses angiogenesis diperlukan tahap awal berupa degradasi ECM tersebut. Enzim-enzim yang berperan dalam tahap ini adalah :

- a. Urokinase plasminogen aktivator (uPA)
- b. Matrik metalloproteinase (MMP)(Gambar 2.).^(8, 13)



Gambar 2. Gambar skematis proses angiogenesis (dikutip dari Zang HT, Bicknell R. Therapeutic Inhibition of Angiogenesis in: Murray JC (eds). Angiogenesis Protocols. New Jersey: Humana Press; 2001.p.3-26)

a. Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA)

Peran enzim tersebut adalah mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin mempunyai kemampuan melakukan degradasi ECM, selain itu plasmin dapat mengaktivasi enzim protease yang lain yaitu MMP. Urokinase plasminogen activator juga merangsang migrasi dan invasi sel endotel, setelah ECM terdegradasi maka sel endotel dari pembuluh darah yang ada akan melakukan migrasi ke daerah ECM tersebut. Urokinase plasminogen activator mempunyai reseptor yang terletak di permukaan sel. Beberapa growth factor yang dihasilkan oleh sel tumor seperti VEGF dan FGF bersifat merangsang pembentukan uPA tersebut, sedangkan plasminogen activator inhibitor (PAI) bersifat menghambat enzim tersebut.

b. Matrik metaloproteinase (MMP)

Matrik metaloproteinase (MMP) adalah enzim protease yang dapat mendegradasi ekstraseluler matrik (ECM). Kelompok MMP ini terbagi menjadi 16, mulai MMP-1 sampai MMP-16 yang masing-masing mempunyai fungsi degradasi spesifik. MMP-1, MMP-8 dan

MMP-13 akan mendegradasi kolagen jenis fibrilar sedangkan MMP-3, MMP-10 dan MMP-11 akan mendegradasi proteoglikan, laminin, fibronectin. Ekspresi dari MMP dirangsang oleh factor-factor angiogenik seperti fibroblast growth factor (FGF) dan vascular endothelial growth factor (VEGF) yang diproduksi oleh sel tumor.

2.4.3.2 Kemotaksis dan Migrasi Sel Endotel

Setelah terjadi proses degradasi ECM maka tahap selanjutnya adalah migrasi sel endotel melalui ECM yang telah terdegradasi, pada tahap ini terjadi proses kemotaksis. Makrofag berperan penting dalam proses kemotaksis tersebut. Tumor dapat mengaktifasi makrofag melalui pembentukan *macrophage chemotactic factor* (MCP1,2,3) dan VEGF yang juga merupakan suatu *chemotactic factor*. Selanjutnya makrofag yang telah teraktivasi tersebut berperan dalam proses angiogenesis melalui pembentukan FGF dan VEGF dimana kedua growth factor selain ikut mengaktifasi degradasi ECM melalui enzim protease juga merangsang langsung sel endotel untuk melakukan migrasi. Aktivasi sel endotel oleh makrofag selain melalui FGF dan VEGF, juga melalui IL-8 dan tumor necrosis factor (TNF α).

Pada tahap migrasi sel endotel diperlukan peran integrin, dimana integrin $\alpha\beta 3$ dan $\alpha\beta 5$ berfungsi sebagai suatu cell adhesion molecules yang mempermudah sel endotel untuk melakukan migrasi setelah ECM tersebut mengalami degradasi pada tahap sebelumnya.

2.4.3.3 Proliferasi Sel Endotel

Setelah tahap kemotaksis dan migrasi sel endotel maka tahap selanjutnya adalah tahap proliferasi sel endotel. Pada tahap ini diperlukan peranan *angiogenic growth factor* seperti VEGF dan FGF. Vascular endothelial growth factor merupakan factor yang paling penting dalam proses angiogenesis tumor.

a. Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular endothelial growth factor merupakan mitogen yang spesifik untuk sel endotel pembuluh darah dan berperan memicu terjadinya proliferasi sel endotel pembuluh darah dalam proses angiogenesis, dan merupakan growth factor penting dalam proses angiogenesis tumor. Selain berperan dalam tahap proliferasi sel endotel VEGF juga berperan dalam tahap-tahap sebelumnya, VEGF dapat merangsang urokinase plasminogen activator dan MMP yang berperan penting dalam tahap awal proses angiogenesis, yaitu degradasi ECM. Dalam tahap

migrasi dan kemotaksis VEGF berperan merangsang proses migrasi sel endotel serta dapat mengaktivasi makrofag yang berperan penting dalam tahap kemotaksis.

Reseptor VEGF (VEGFR) adalah tirosin kinase yang terbagi menjadi VEGFR1 dan VEGFR2 yang sebagian besar berada di permukaan sel endotel dan ditemukan juga pada sel tumor, adanya reseptor di sel tumor tersebut menunjukkan suatu mekanisme pengaturan autokrin dari VEGF yang dihasilkan oleh sel tumor. Selain itu terdapat pula VEGFR3 yang sebagian besar terdapat pada endotel limfatik. Reseptor VEGFR2 merupakan reseptor utama yang dapat menimbulkan efek biologis VEGF.

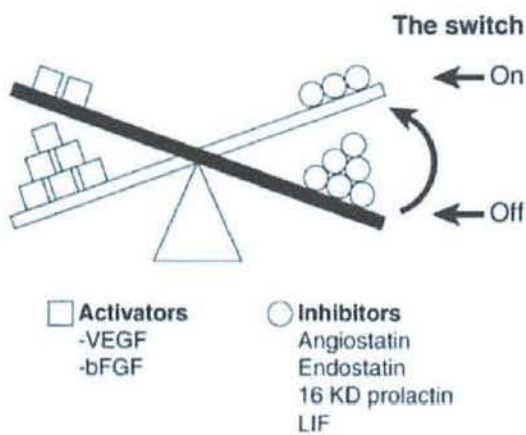
Derajat ekspresi VEGF banyak dipelajari melalui pengecatan secara immunohistokimia dengan menggunakan antibodi terhadap VEGF dan melalui pemeriksaan metode “ enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA). Oleh karena VEGF merupakan factor utama dalam proses angiogenesis tumor, sedangkan angiogenesis sendiri dapat menyebabkan tumor tumbuh lebih cepat serta mempertinggi kemungkinan terjadinya metastase suatu tumor, maka VEGF dapat digunakan sebagai factor prognostic suatu tumor. Beberapa penelitian mengenai hubungan antara ekspresi VEGF yang tinggi dengan prognosis yang buruk telah banyak dilakukan pada tumor gaster, tumor esophagus, tumor kolon dan tumor payudara.

b. Fibroblast Growth Factor

Fibroblast Growth Factor merupakan growth factor yang terikat pada permukaan sel endothel dan terdiri dari FGF1 dan FGF2, kerja FGF tidak spesifik, berbeda dengan VEGF yang merupakan mitogen spesifik dari sel endotel. Fibroblast growth factor terdapat pada ECM dan berperan dalam proses angiogenesis apabila telah terjadi degradasi ECM, FGF dapat dideteksi apabila tumor telah berkembang sedemikian besar sehingga mengalami hipoksia dan proses angiogenesis tahap awal berupa degradasi ECM telah terjadi (Bicknell, 1997). Hal ini dapat menjelaskan mengapa VEGF dianggap merupakan factor utama pada proses angiogenesis tumor. Selain itu tumor sendiri diduga juga mengeluarkan FGF sedangkan peran pasti dari FGF dalam proses angiogenesis tumor masih belum jelas, diduga FGF merangsang plasminogen activator dalam tahap degradasi ECM serta berperan merangsang migrasi dan proliferasi sel endotel (Bobik, 1997; Eatock, 2000).

Kebanyakan tumor menetap in situ selama beberapa bulan atau tahun tanpa adanya neovaskularisasi, tetapi selanjutnya menjadi hipervaskuler saat sekelompok sel berubah

menjadi fenotip angiogenik. Pada fase prevaskuler, tumor jarang yang berukuran lebih dari 2 sampai 3 milimeter dan biasanya belum terdeteksi secara klinis. Perubahan menjadi fenotip angiogenik merupakan proses yang kompleks yang melibatkan perubahan keseimbangan antara regulator positif dan negatif angiogenesis dimana terjadi stimulasi oleh berbagai faktor pertumbuhan proangiogenik dan pengurangan penghambat angiogenik. Proses ini melibatkan interaksi antara sel tumor, sel endotel, makrofag, fibroblas, dan matriks ekstraseluler yang kesemuanya memiliki kemampuan untuk melepaskan faktor-faktor yang mempengaruhi proses angiogenesis. Keseimbangan antara faktor proangiogenik dan penghambat angiogenesis inilah yang mempengaruhi fenotip angiogenik tumor (Gambar 3.).



Gambar 3. Diagram yang menunjukkan keseimbangan antara regulator positif dan negatif angiogenesis (dikutip dari Turner HE, Harris AL, Melmed S, et al.: Angiogenesis in Endocrine Tumor. *Endocrine Reviews*. 2003; 24: 600-632)

Sel tumor dapat menyebabkan ekspresi yang berlebihan dari satu atau lebih regulator positif angiogenesis, dapat memobilisasi protein proangiogenik dari matriks ekstraseluler, dapat menarik sel sekitar seperti makrofag yang memproduksi protein proangiogenik, atau gabungan dari proses-proses tersebut. Saat ini telah ditemukan 12 protein proangiogenik (Tabel 3.). *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan protein proangiogenik tersering yang ditemukan pada tumor. Aktivitas angiogenik dari kedua faktor tersebut dapat sinergistik. Bagaimanapun, peningkatan faktor proangiogenik saja tidak cukup untuk merubah sel tumor menjadi angiogenik. Diperlukan juga penurunan regulator negatif atau penghambat angiogenik (Tabel 4.). Penghambat

endogen ini pada keadaan normal berfungsi untuk mempertahankan endotel pembuluh darah dari rangsangan mitogenik. Pada keadaan normal waktu *turnover* dari sel endotelial pembuluh darah dapat mencapai 1000 hari, tetapi pada angiogenesis sel endotelial tersebut berproliferasi jauh lebih cepat dengan waktu *turnover* rata-rata 5 hari.

Tabel 1. Faktor-faktor angiogenik endogen (dikutip dari Folkman J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. NEJM. 1995; 333: 1757-1762)

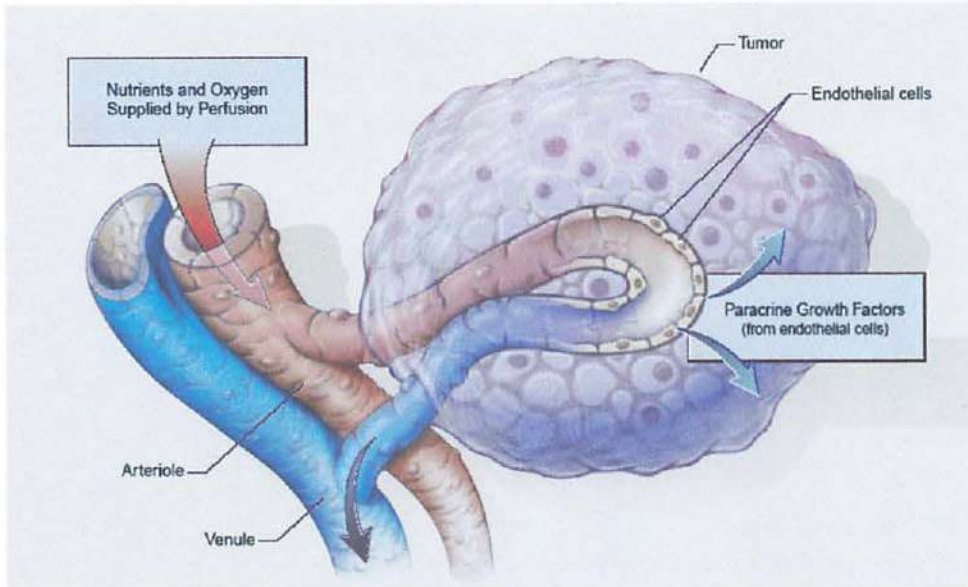
Fibroblast growth factors
 Basic
 Acidic
 Angiogenin
 Transforming growth factor α
 Transforming growth factor β
 Tumor necrosis factor α
 Vascular endothelial growth factor
 Platelet-derived endothelial-cell growth factor
 Granulocyte colony-stimulating factor
 Placental growth factor
 Interleukin-8
 Hepatocyte growth factor
 Proliferin

Tabel 2. Regulator negatif proliferasi sel endotelial endogen (dikutip dari Folkman J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. NEJM. 1995; 333: 1757-1762)

Platelet factor 4
 Thrombospondin-1
 Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)
 TIMP-1
 TIMP-2
 TIMP-3
 Prolactin
 Angiostatin
 bFGF soluble receptor
 Transforming growth factor β
 Interferon alfa
 Placental proliferin related protein

Pada tingkat seluler, angiogenesis menyebabkan pertumbuhan tumor melalui efek perfusi dan efek parakrin (Gambar 4). Pada jaringan yang padat, perfusi lebih efisien daripada difusi sederhana untuk menyuplai oksigen dan nutrisi serta mengeluarkan katabolit.

Efek parakrin merupakan hasil produksi faktor pertumbuhan oleh sel endotelial (misalnya bFGF, *insulin-like growth factor*, *platelet derived growth factor*, dan *granulocyte colony-stimulating factor*) atau pelepasannya oleh makrofag dan sel tuan rumah lainnya yang dihantarkan oleh pembuluh darah ke dalam tumor.



Gambar 4. Percepatan pertumbuhan tumor karena peningkatan perfusi dan produksi faktor pertumbuhan parakrin akibat adanya neovaskularisasi (dikutip dari Folkman J. *Clinical Applications of Research on Angiogenesis*. NEJM. 1995; 333: 1757-1762).

2.4.4 Aplikasi klinis angiogenesis

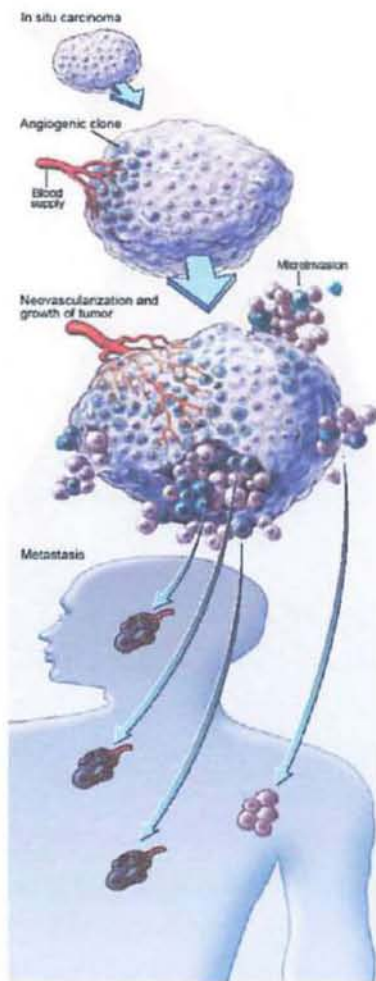
Aplikasi klinis pada penelitian angiogenesis ditujukan pada tiga tujuan: pengukuran angiogenesis untuk diagnosis dan prognosis, terapi akselerasi angiogenesis, dan terapi yang menghambat angiogenesis.

a. Aplikasi diagnostik dan prognosis

Pengukuran angiogenesis pada spesimen biopsi dapat membantu dalam memprediksi resiko metastasis dan rekurensi. Pengukuran kepadatan mikrovaskuler untuk mengukur angiogenesis pada karsinoma payudara telah dilakukan pada suatu penelitian multivariat dan menunjukkan bahwa pengukuran ini merupakan prediktor timbulnya metastasis yang lebih baik daripada grading tumor, ukuran tumor, adanya reseptor estrogen, atau faktor prognosis lainnya. Selain itu adanya hubungan positif antara angiogenesis tumor dengan resiko

metastasis, rekurensi tumor, maupun kematian juga telah dilaporkan pada berbagai jenis tumor lainnya.

Kepadatan mikrovaskuler sebagai prediktor resiko metastasis yang baik ini mungkin disebabkan karena semakin tinggi kepadatannya akan semakin meningkatkan area permukaan pembuluh darah sehingga memfasilitasi pelepasan sel tumor ke dalam sirkulasi darah. Sel angiogenik yang berasal dari tumor primer memiliki kecenderungan untuk berkembang pada daerah metastasis dibandingkan dengan sel nonangiogenik. Sel tumor yang bukan angiogenik dapat menjadi mikrometastasis yang tersembunyi sampai mereka berubah menjadi fenotip angiogenik (Gambar 5.).



Gambar 5. Kecenderungan tumor angiogenik untuk tumbuh pada tempat metastasis (dikutip dari Folkman J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. NEJM. 1995; 333: 1757-1762)

b. Terapi akselerasi angiogenesis

Beberapa studi praklinis dengan memasukkan bFGF telah menunjukkan adanya stimulasi angiogenesis untuk mempercepat penyembuhan ulkus duodenum pada tikus percobaan. Pada manusia, penggunaan bFGF menunjukkan adanya penyembuhan pada ulkus peptikum yang disebabkan obat antiinflamasi nonsteroidal. Penelitian-penelitian tersebut menduga bahwa angiogenesis dan faktor pertumbuhan lainnya berperan pada penyembuhan ulkus gastrointestinal. Terapi angiogenesis juga sedang dikembangkan untuk pengobatan aterosklerosis, penyakit jantung iskemik, dan iskemia ekstremitas serta klaudikasio.

c. Terapi penghambat angiogenesis

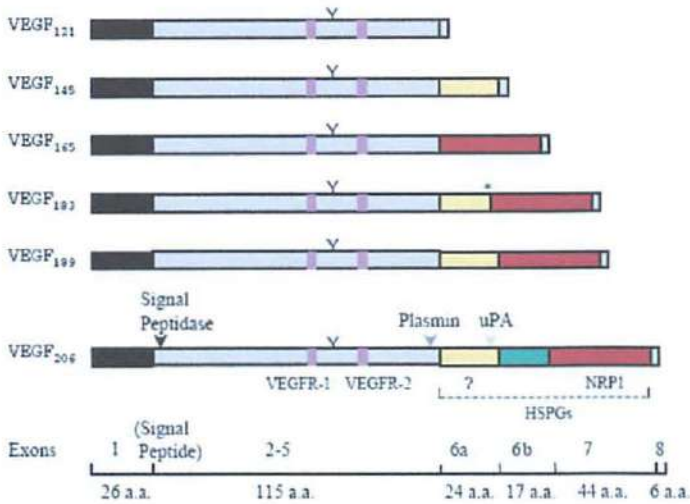
Saat ini sedang dilakukan berbagai penelitian mengenai penggunaan obat antiangiogenik baik pada penyakit non-neoplastik maupun neoplastik. Konsep terapi antiangiogenesis pertamakali dikembangkan pada awal tahun 1970 yang didasarkan pada observasi bahwa tumor yang tidak bervaskularisasi gagal untuk tumbuh melebihi beberapa milimeter. Obat anti angiogenik dapat digolongkan menjadi 4 golongan berdasarkan cara kerjanya, yaitu:

1. Menetralsir promotor angiogenik : menghambat efek positif faktor angiogenik yang diproduksi oleh tumor,
2. Penghambat angiogenik endogen: menggunakan protein penghambat endogen untuk melawan stimulasi angiogenik oleh tumor,
3. Sel target endotelial: menggunakan petanda spesifik untuk sel endotelial tumor untuk mengarahkan toksin atau antibodi ke vaskulatur tumor sehingga terjadi infarksi tumor,
4. Penghambat angiogenik sintetik: menghambat angiogenesis tumor dengan obat-obatan yang secara spesifik mencegah pembelahan sel endotelial.

2.4.5 Aspek Biologi Molekuler VEGF

VEGF yang ditemukan ada beberapa kelompok yaitu VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan VEGF-E. Yang paling berperan dalam angiogenesis yaitu VEGF A. Gene dari VEGF (VEGF A) manusia terdiri dari 8 ekson dipisah oleh 7 intron pada kromosom 6p21.3. ,

dimana melalui *mRNA splicing* menghasilkan 6 isoform, dimana perbedaannya adalah dari ada tidaknya ekson 6 dan 7, yaitu VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₉₃, VEGF₁₉₉, dan VEGF₂₀₆.^(14,15)



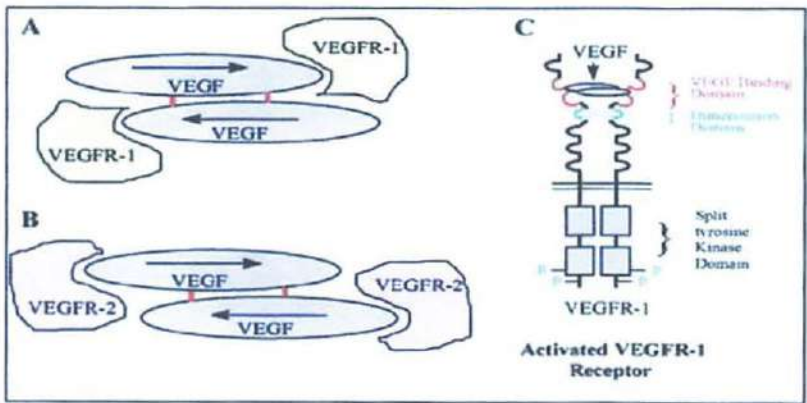
Gb 6. Ilustrasi isoform VEGF (Christopher, 2000).

VEGF₁₆₅ merupakan *predominant molecular species* dimana tidak memiliki ekson 6. VEGF₁₂₁ tidak memiliki ekson 6 dan 7 sehingga dibandingkan VEGF₁₆₅ maka VEGF₁₂₁ kekurangan 44 asam amino. VEGF₁₄₅ tidak memiliki ekson 7 dibandingkan VEGF₁₆₅, 183, 189 dan 206. Pada VEGF₂₀₆ mendapatkan tambahan 17 asam amino pada ekson 6. Kode transkripsi VEGF₁₂₁ dan VEGF₁₈₉ paling banyak ditemukan pada sel dan jaringan yang mengekspresikan gen VEGF. Sedangkan VEGF₂₀₆ paling jarang, hanya ditemukan pada jaringan hati janin manusia (7). Pada ekson 4 yaitu di Asp 63, Glu 64 dan Glu 67 terletak ikatan untuk reseptor VEGFR – 1; Arg82, Lys 84 dan His 86 terletak reseptor VEGFR – 2⁽¹⁶⁾ Dasar VEGF adalah heparin-binding, homodimer, glikoprotein 45.000 dalton. VEGF₁₆₅ merupakan isoform utama. VEGF₁₂₁ tidak bisa berikatan dengan heparin. Sedangkan VEGF₁₈₉ dan 206 lebih kuat berikatan dengan heparin dibandingkan VEGF₁₆₅. Kemampuan afinitas dengan heparin sangat menentukan bioavailabilitas dari VEGF.^(14, 15)

Reseptor utama untuk VEGF berjenis tyrosine kinase (RTKs) dan terdapat dua jenis yaitu VEGFR-1 flt-1 (fms like tyrosine kinase) dan VEGFR-2 KDR (Kinase Domain Region) flk-1 (fetal liver kinase-1). Terdapat satu subfamili reseptor yaitu VEGFR-3 flt-4.

Ketiganya memiliki tujuh *immunoglobulin (Ig) like domain* pada bagian ekstrasel, sebuah bagian transmembran selanjutnya tyrosine kinase pada bagian intrasel (Christopher, 2000-15). VEGFR-1 berikatan dengan VEGF-A dan VEGF-B; berekspresi pada sel trofoblas, monosit, dan sel mesengial ginjal. VEGFR-2 berikatan dengan VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-E ; berekspresi pada sel stem hematopoetin, megakariosit, sel progenitor retina. VEGFR-3 berikatan dengan VEGF-C dan VEGF-D; berekspresi pada pembuluh limfe. (Neufeld G, 1999-16; Napoleone Ferrara, 2001-14). Selain itu VEGFR-1 dan 2 mampu juga melakukan ekspresi pada beberapa jenis sel tumor. Beberapa jenis VEGF juga mampu berekspresi pada reseptor Neuropilins yang berguna untuk perkembangan axon syaraf. Heparan Sulphate Proteoglycans (HSPG) merupakan molekul serupa heparin dengan kandungan sulfat yang lebih rendah, berada di permukaan dan ekstrasel. Salah satu fungsi HSPG adalah mengembalikan aktivitas VEGF₁₆₅ setelah teroksidasi dan mempromosikan ikatan VEGFR-2. ⁽¹⁶⁾

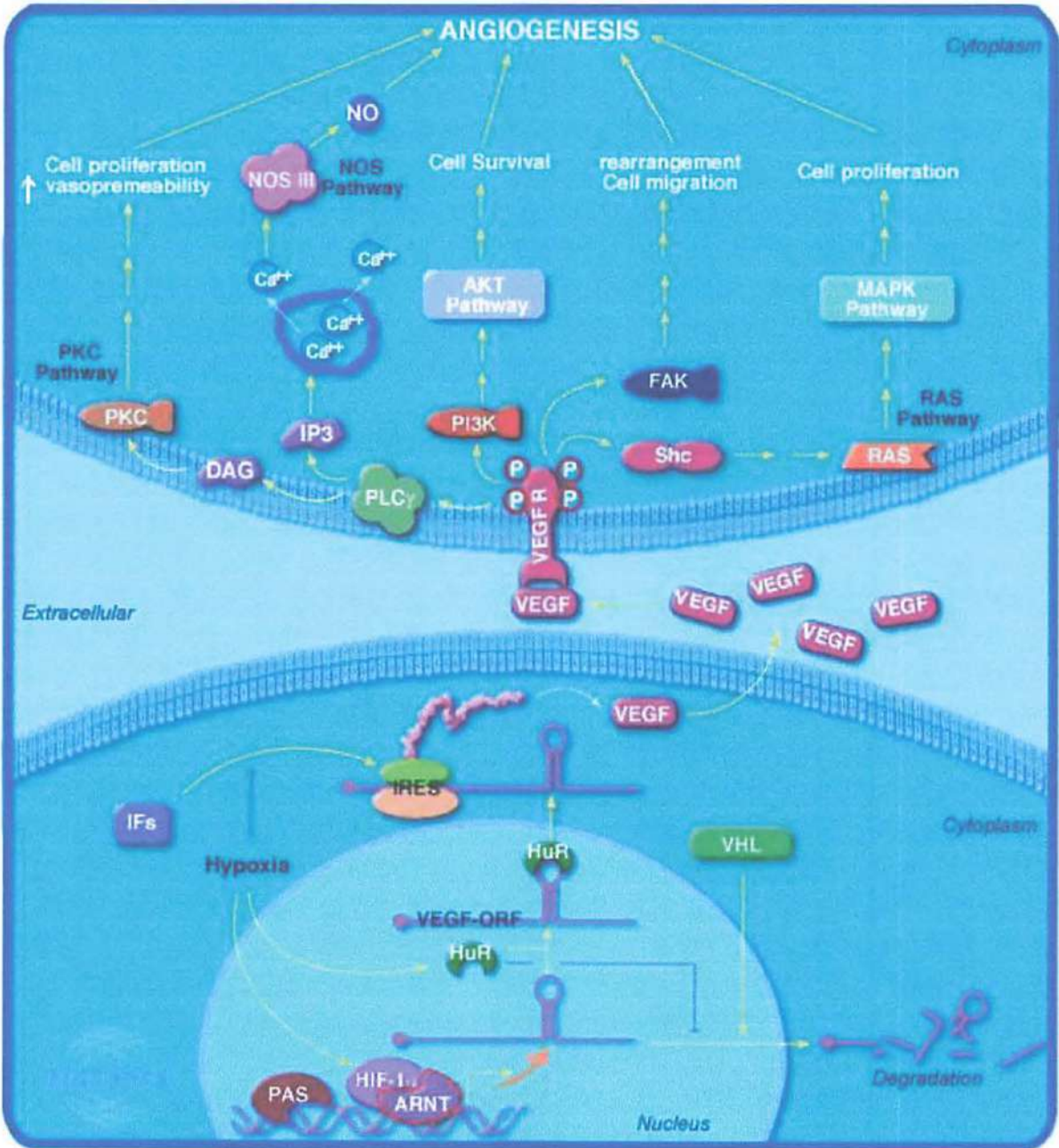
Interaksi VEGF dengan VEGFR-1 dan VEGFR-2 berbeda pada letak ikatan VEGF dengan VEGFR. Pada VEGFR-1 berikatan dengan VEGF pada akhir asam amino monomer VEGF. Sedangkan VEGFR-2 pada awal asam amino monomer VEGF. VEGF berikatan dengan VEGFR pada loop kedua dan ketiga di bagian immunoglobulin like domain. ⁽¹⁶⁾



Gb 7. Interaksi VEGF dengan reseptornya (Neufeld G, 1999).

Proses kompleks angiogenesis dimulai ketika sel pada suatu jaringan tubuh merespon kondisi hipoksia dengan meningkatkan produksi VEGF. VEGF akan disekresi dan berikatan dengan reseptor tyrosine kinase (VEGFR) yang berada di permukaan sel endotel pembuluh darah. Ikatan VEGF-VEGFR akan merangsang jalur kaskade signal di dalam intrasel yang

memulai proses angiogenesis. Peran VEGF dalam angiogenesis terdiri dari tiga fase yaitu tahap pertama produksi mRNA VEGF dan VEGF protein; tahap kedua, sekresi VEGF protein dan berikatan dengan reseptornya VEGFR di endotel sel pembuluh darah; tahap ketiga, jalur kaskade signal di dalam intrasel yang berperan dalam proses angiogenesis⁽¹⁷⁾



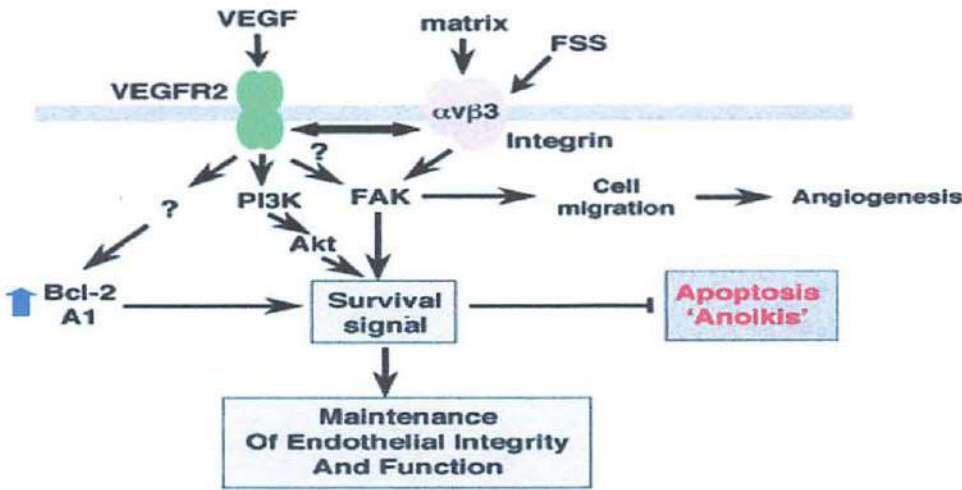
Gb 8. Peran VEGF dalam proses Angiogenesis (Korean Uni Gene Collection, 2003).

Ketika sel mengalami hipoksia, ekspresi mRNA VEGF terinduksi sebagai akibat peningkatan transkripsi mRNA VEGF dan penurunan degradasi mRNA VEGF. Hipoksia menginduksi Hypoxia Inducible factor – 1 (HIF-1) dan HIF-1 berikatan dengan Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) di inti sel untuk mengaktifasi VEGF gene transkripsi untuk membentuk mRNA VEGF, yang akan berikatan dengan protein HuR dimana hal ini akan mencegah proses degradasi mRNA VEGF oleh karena kondisi hipoksia (Gregg L. Semenza, 2001). Proses degradasi juga diinduksi oleh protein VHL (Von Hippel Lindau) (Levy, 1996). Jadi HIF-1 merupakan pengatur VEGF gene transkripsi dan HuR merupakan pengatur stabilitas mRNA VEGF. Beberapa sitokin inflamasi antara lain IL –1 dan TNF - α juga dapat menginduksi HIF –1. ^(18, 19)

MRNA VEGF akan keluar dari inti menjadi VEGF, memiliki IRES (*internal ribosom entry site*) yang akan tetap menjaga efektivitas VEGF protein dalam kondisi hipoksia. Hipoksia juga menyebabkan IFs (*Initiation Factor*) yang dapat menginduksi IRES untuk berfungsi. Tetapi belum ada penjelasan bagaimana hal itu dapat terjadi. Chaperone protein ORP 150 berperan dalam transpor intrasel VEGF protein dari retikulum endoplasma ke Aparatus Golgi untuk disekresikan keluar sel. ⁽¹⁹⁾

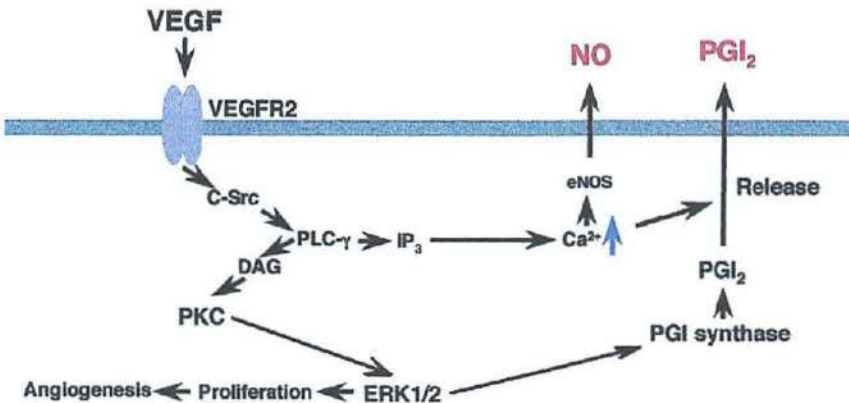
Proses diatas merupakan produksi VEGF sebagai tahap pertama proses angiogenesis. Sedangkan proses tahap kedua adalah sekresi protein VEGF dan berikatan dengan reseptornya VEGFR di endotel sel pembuluh darah. Pada tahap ketiga terjadi aktifasi jalur-jalur yang menunjang proses angiogenesis antara lain : proliferasi sel dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah melalui jalur PKC, jalur NO, sel survival melalui jalur AKT, migrasi sel, dan proliferasi sel melalui jalur RAS dan MAPK. ⁽¹⁷⁾

Jalur migrasi sel dan survival sel dimulai dari ikatan VEGF dengan VEGFR – 2 , dapat menyebabkan peningkatan tyrosine phosphorylation dari Focal Adhesion Kinase (FAK) yang sangat berperan dalam proses migrasi sel dibantu matrix – integrin dan Fluid Shear Stress (FSS) , sedangkan peningkatan Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) akan mengaktifasi Antiapoptotic Kinase (Akt) dibantu dengan peningkatan antiapoptotic protein (Bcl-2, A1). ⁽²⁰⁾



Gb 9. Jalur survival dan migrasi sel (Ian Zachary, 2001).

Jalur proliferasi sel dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah serta jalur NO dimulai dari ikatan VEGF dengan VEGFR – 2. VEGF akan mengaktifasi Phospholipase C (PLC - γ) dan membuat inositol 1,4,5 triphosphate (IP3). IP3 akan meningkatkan Calcium sitoplasma, peningkatan Calcium di sitoplasma akan menunjang produksi NO. PLC - γ akan meningkatkan produksi Diacylglycerol (DAG). DAG akan mengaktifasi Protein Kinase C (PKC); hal ini akan sangat menginduksi Extraceluler signal Regulated Kinase (ERK1/2) dan merangsang proliferasi sel endotel dalam proses angiogenesis. Selain itu ERK $\frac{1}{2}$ sangat berguna untuk pembentukan Arachidonic Acid (AA) serta Cyclooxygenase – 1 (COX –1) yang berpengaruh pada sintesa PGI₂ yang akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. (20, 21)



Gb 10. Jalur proliferasi sel dan permeabilitas vascular (Hood JD, 1998).

2.4.6 Pengukuran angiogenesis

Pengukuran angiogenesis dapat dilakukan secara tidak langsung dengan mengukur aktivitas angiogenik melalui pengukuran kadar protein angiogenik dalam cairan tubuh maupun secara langsung dengan mengukur kepadatan mikrovaskuler dari spesimen biopsi secara mikroskopis.⁽²²⁾

Pada pengukuran secara tidak langsung, diukur konsentrasi bFGF aktif dalam cairan serebrospinal pada penderita tumor otak atau dalam urin pada penderita hemangioma untuk mengetahui aktivitas angiogenik. Pengukuran kadar bFGF pada cairan serebrospinal selain berguna untuk membedakan tumor otak dengan hidrosefalus murni atau tumor diluar sistem saraf pusat, juga berguna sebagai faktor prognostik. Pengukuran kadar bFGF pada urin berguna untuk membedakan hemangioma dengan malformasi vaskuler.⁽²²⁾

Deteksi angiogenesis dengan mengukur kepadatan mikrovaskuler telah banyak dilakukan pada berbagai jenis tumor. Dari berbagai penelitian tersebut menunjukkan bahwa pengukuran kepadatan mikrovaskuler secara kuantitatif sangat berguna untuk menentukan adanya angiogenesis. Kepadatan mikrovaskuler ini berhubungan dengan konsentrasi dan ekspresi faktor pertumbuhan proangiogenik seperti FGF-2 dan VEGF. Selain itu kepadatan mikrovaskuler juga berhubungan dengan enzim yang berperan pada stadium dini angiogenesis seperti *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1). Penelitian tentang hubungan kepadatan mikrovaskuler dengan pertumbuhan tumor telah dilakukan pada karsinoma payudara, paru, dan urogenital.⁽⁶⁾

Pengukuran vaskularisasi tumor dikemukakan pertama kali oleh Folkman (1971) dengan mengembangkan *microscopic angiogenesis grading system* (MAGS) score yang dihitung berdasarkan pengukuran jumlah pembuluh darah, hiperplasia sel endotel, dan sitologi jaringan tumor. Saat ini banyak penelitian mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Weiridner (1991) dimana pembuluh darah diwarnai secara imunohistokimia dan jumlah dari pembuluh darah mikro dihitung pada area tumor yang paling vaskuler yang disebut sebagai *hot spot*.⁽¹⁴⁾

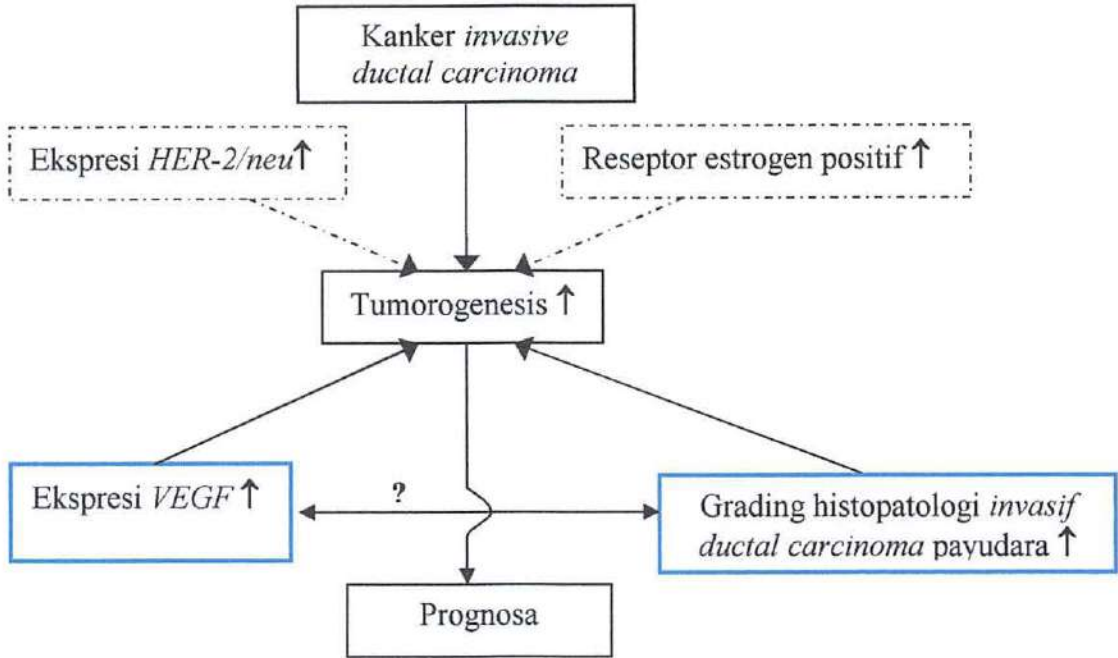
Pengukuran kepadatan mikrovaskuler pada berbagai jenis tumor telah dilakukan dengan menghitung jumlah pembuluh darah yang telah diwarnai secara imunohistokimia dengan menggunakan bermacam-macam antibodi sebagai petanda sel endotelial, baik pada

sediaan potong beku maupun pada blok parafin. Karena endotelium bersifat heterogen, pemilihan antibodi sangat mempengaruhi jumlah mikrovaskuler yang dapat dihitung. Pewarnaan vimentin, lektin, alkali fosfatase, dan kolagen tipe IV memiliki spesifitas yang rendah karena terdapat pada banyak elemen nonendotelial. Saat ini antibodi yang paling sering digunakan untuk mewarnai sel endotelial adalah antigen faktor VIII, CD 31, CD 34, dan *lectin ulex europaeus agglutinin 1* (UEA 1). Berbagai petanda ini memiliki perbedaan sensitivitas untuk mendeteksi sel endotelium. Petanda endotel yang paling spesifik dan sensitif yang tersedia untuk saat ini adalah CD 31 yang terdapat pada kebanyakan kapiler, sebagai antigen alternatif adalah CD 34, meskipun antigen ini juga ditampilkan oleh beberapa sel stroma, namun kedua jenis antigen ini jarang digunakan karena sulit didapatkan. Pewarnaan faktor VIII yang paling banyak digunakan pada berbagai penelitian karena relatif lebih mudah didapat tetapi antigen ini hanya dapat mengidentifikasi pembuluh darah yang besar dan tidak dapat mewarnai mikrovaskuler yang sangat kecil ^(6, 14)

Setelah dilakukan pewarnaan immunohistokimia pada pembuluh darah preparat, dilakukan pemeriksaan mikroskopik dengan pembesaran rendah (X40-100) untuk mengidentifikasi area *hot spot* angiogenik. ⁽¹⁴⁾ Area *hot spot* adalah daerah tumor yang memiliki vaskularisasi paling tinggi. Rasionalisasi pemeriksaan pada area *hot spot* didasarkan pada fakta bahwa perilaku tumor sangat berhubungan dengan daerah yang paling vaskuler pada tumor. ⁽⁶⁾ Selanjutnya jumlah pembuluh darah dihitung dengan pembesaran tinggi (X200-400) pada area tersebut. Meskipun jumlah *hot spot* bervariasi antara satu sampai lima, kebanyakan penelitian mendapatkan tiga *hot spot* dari preparat jaringan yang representatif. ⁽¹⁴⁾

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

Kerangka konseptual



: diteliti

Gambar 11. Kerangka konseptual penelitian

3.2 Hipotesis

Terdapat hubungan antara Grading Histopatologi yang makin jelek dengan peningkatan ekspresi *VEGF* pada invasive ductal karsinoma payudara

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui peningkatan ekspresi *VEGF* pada grading histopatologi *invasive ductal carcinoma* payudara. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *observasional analitik* dengan pendekatan *cross sectional*.

4.2 Populasi, sample, besar sample, teknik pengambilan sample, kriteria inklusi dan eksklusi

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah semua pasien *invasive ductal carcinoma* payudara yang berobat di poli bedah onkologi RSUD Dr.Sutomo Surabaya selama periode 2007 dan telah mempunyai hasil pemeriksaan histopatologi.

4.2.2 Besar sampel

Besarnya sampel ditentukan menurut perhitungan berdasarkan proporsi sampel tunggal ,dengan rumus sebagai berikut :

$$n = \left[\frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{0,5 \ln \frac{(1+r)}{(1-r)}} \right]^2 + 3$$

$$Z_{\alpha} 0,05 = 1,96$$

$$Z_{\beta} 0,20 = 0,842$$

$r = 0,5$ (Oleh karena korelasi antara ekspresi *VEGF* pada karsinoma payudara belum diketahui)

Rumus korelasi :

$$n = \left[\frac{1,96 + 0,842}{1 + 0,5} \right]^2 + 3$$

$$n = \left[\frac{0,5 \ln \frac{1 + 0,5}{1 - 0,5}}{1 - 0,5} \right]^2 + 3$$

$n = 29,05$ dibulatkan menjadi $30 \rightarrow + 10 \% = 33$.

4.2.3. Pengambilan sample

Sampel penelitian adalah pasien kanker payudara dengan PA: *invasive ductal carcinoma* payudara di RSUD Dr. Soetomo Surabaya selama periode 2007 yang memiliki blok parafin yang secara histopatologis menunjukkan karsinoma payudara *invasive ductal carcinoma* dan memiliki data-data yang lengkap.

Sampel dipilih secara *consecutive sampling* berdasarkan criteria inklusi dan eksklusi. Sampel yang terkumpul kemudian diperiksa secara imunohistokimia ekspresi *VEGF*.

4.2.4 Kriteria inklusi

1. Kasus primer (kasus yang belum pernah radioterapi dan kemoterapi preoperative).
2. Blok parafin karsinoma payudara *invasive ductal carcinoma* dengan kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk pemeriksaan imunohistokimia

4.2.5 Kriteria eksklusi

Didapatkan keganasan pada organ lain.

4.3 Variabel penelitian

Pada penelitian ini variable penelitian yang diteliti adalah:

1. Grading histopatologi Patologi Anatomi (dependen faktor)
2. Ekspresi *VEGF* (independen faktor)

4.4 Definisi Operasional

4.4.1 Grading Histopatologi

Grading histopatologi *invasive ductal carcinoma* payudara berdasarkan konsep Bloom – Rihardson dibagi menjadi 3 sub tipe yaitu diferensiasi baik (well differentiated), diferensiasi sedang (moderately differentiated), diferensiasi jelek (poorly differentiated)⁽²³⁾.
diferensiasi sesuai dengan yang ada di status DMK penderita.

Grading histopatologis karsinoma payudara menurut sistem Bloom-Ricardson

Score	1	2	3
Tubule Formation	>75%	10-75%	<10%
Nuclear Pleomorphism	Small, uniform cells	Moderate increase in size and variation 2	Marked variation
Mitosis Count	Up to 7	8 to 14	15 or more

Score diferensiasi baik (well differentiated) : 3, 4, 5

Score diferensiasi sedang (moderately differentiated): 6, 7

Score diferensiasi jelek (poorly differentiated) : 8, 9

4.4.2 Ekspresi *VEGF*

Merupakan ekspresi *VEGF* yang terjadi pada *invasif ductal carcinoma* payudara ,dimana perhitungannya berdasarkan prosentase tumor yang sitoplasma intinya tercat positif dengan

menggunakan antibodi terhadap *VEGF*. Ekspresi *VEGF* ditunjukkan dalam skala prosentase tumor positif dan dinilai secara semikuantitatif dengan skor⁽²⁴⁾ :

1. Rendah : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap *VEGF* dari 5 lapangan pandang pembesaran 200x kurang dari 5%
2. Sedang : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap *VEGF* dari 5 lapangan pandang pembesaran 200x antara 5 – 50%
3. Tinggi : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap *VEGF* dari 5 lapangan pandang pembesaran 200x lebih dari 50%

Penelitian oleh Zhou (2006) sel yang tercatat itu yang dihitung dan menggunakan skala prosentase tumor positif dan dinilai secara semikuantitatif dengan skor seperti di atas.

4.5 Lokasi dan waktu penelitian

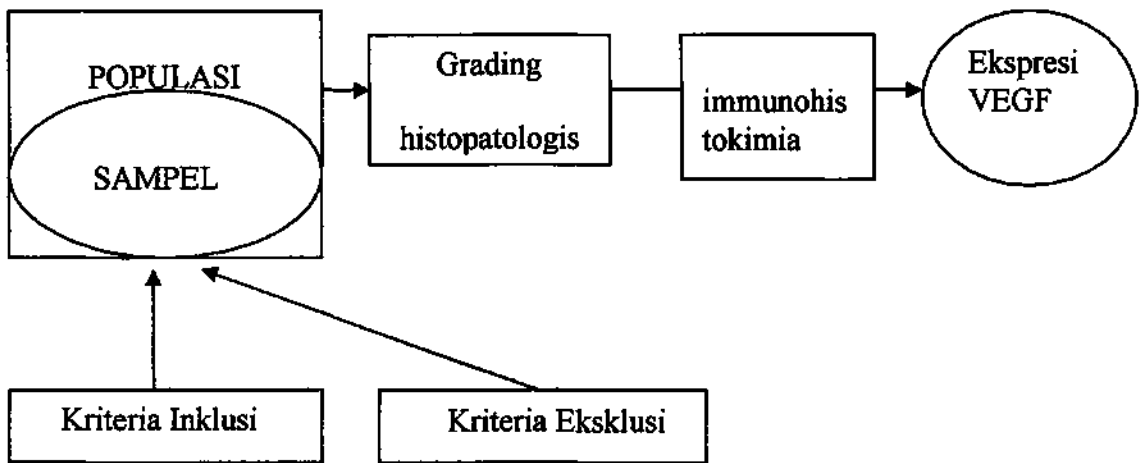
4.5.1 Lokasi

Dilakukan di poli Bedah Onkologi dan laboratorium Patologi Anatomi
RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

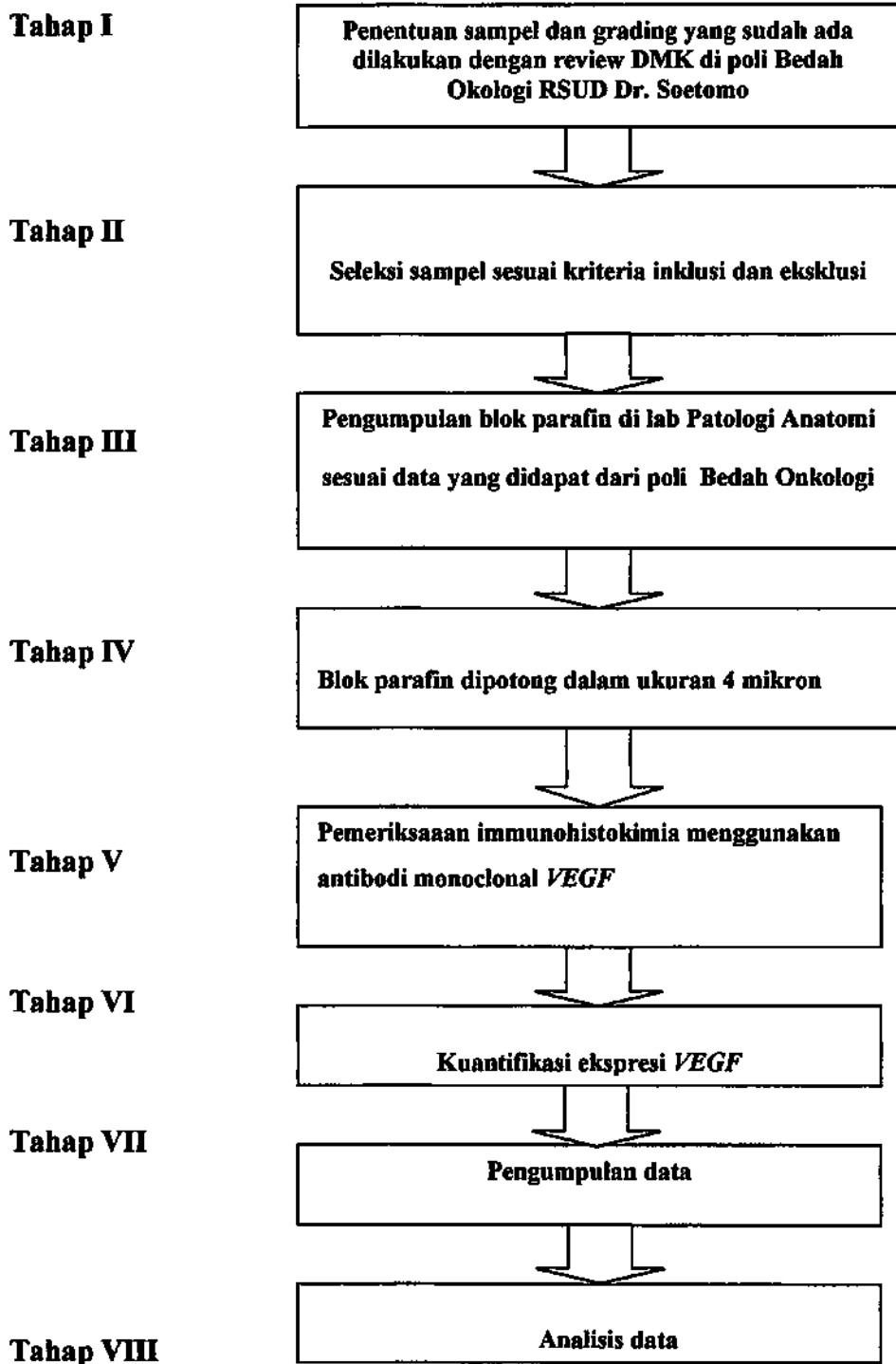
4.5.2 Waktu penelitian

Selama 3 bulan sejak pengumpulan sampel sampai analisa data.

4.6 Kerangka operasional



4.7 Tahap Penelitian



4.8 Analisa data

Analisa data terhadap korelasi ekspresi *VEGF* serta staging Patologi Anatomi menggunakan uji korelasi *Spearman rank-order correlation* . Skala yang dipakai adalah skala ordinal, yaitu untuk *VEGF* digunakan negatif (0) = tidak ada sel yang tercat ; rendah (+1) = sel yang tercat kurang 5% ; sedang (+2) = sel yang tercat 5-50% dan tinggi (+3) = sel yang tercat lebih dari 50%,⁽²⁴⁾ sementara untuk grading menggunakan diferensiasi baik (*well differentiated*), sedang (*moderately differentiated*), dan jelek (*poorly differentiated*).

BAB V**HASIL PENELITIAN****5.1 Gambaran Sampel Penelitian**

Data yang tersedia dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selama tahun 2007 sebanyak 33 sampel penelitian. Umur penderita dalam penelitian ini antara 24 tahun sampai dengan 73 tahun dengan rerata $47,3 \pm 10,1$ tahun, dengan kelompok umur terbanyak 40 – 49 tahun sebanyak 12 orang (36,4 %).

Tabel 3. Karakteristik umur dan grading histopatologi penderita *Invasif ductal carcinoma* payudara

GRADING HISTOPATOLOGI								
	Well diff (n=9)		Moderately diff (n=12)		Poorly diff (n=12)		Total (n=33)	
Umur (tahun)								
20 – 29	2	22,2%	-		-	-	2	6,1%
30 – 39	-	-	4	33,3%	3	25,0%	7	21,2%
40 – 49	3	33,3%	3	25,0%	6	50,0%	12	36,4%
50 – 59	4	44,4%	3	25,0%	1	8,3%	8	24,2%
>=60	-	-	2	16,7%	2	16,7%	4	12,1%
	9	100%	12	100%	12	100%	33	100%

Pada penelitian ini terdapat ekspresi *VEGF* pada sampel penelitian 28 penderita (85%) dimana 5 (15%) penderita tidak menunjukkan ekspresi. Dengan jumlah terbanyak 16 penderita (48 %) memiliki ekspresi kuat (+3). Ekspresi sedang (+2) terdapat pada 9

penderita (27 %), dan 3 penderita (9 %) yang memiliki ekspresi lemah serta 5 penderita (15 %) tidak menunjukkan ekspresi dimana keduanya dimasukkan dalam ekspresi (+1)

Tabel 4. Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF	Frekuensi (n=33)
0	5 (15 %)
+1	3 (9 %)
+2	9 (27%)
+3	16 (48 %)

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Tabel 5. Hubungan antara grading histopatologi dengan ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF	Grading histopatologi							
	Well diff		Moderately diff		Poorly diff		Total	
0	3	33,3%	1	8,3%	1	8,3%	5	15,2%
1+	1	11,1%	2	16,7%	-	-	3	9,1%
2+	3	33,3%	4	33,3%	2	16,7%	9	27,3%
3+	2	22,2%	5	41,7%	9	75,0%	16	48,4%
Total	9	100,0%	12	100,0%	12	100,0%	33	100,0%

Diuji dengan Korelasi Spearman; $p = 0,011$ dan $r = 0,439$

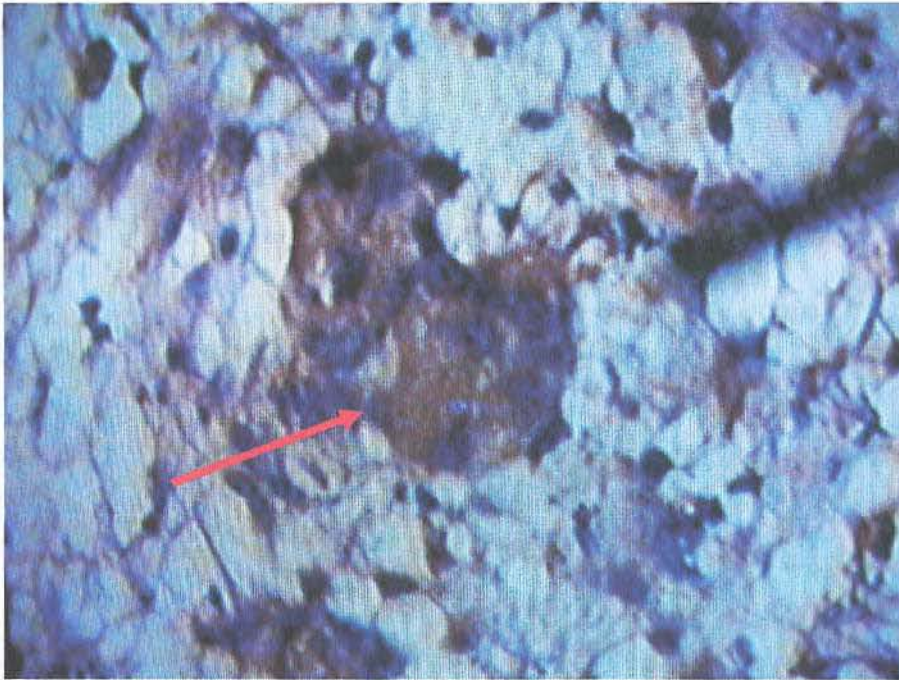
Hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil $p = 0,011$ yang artinya ada korelasi yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan Grading histopatologi pada *invasif ductal carcinoma* payudara. Kuatnya hubungan tersebut ditunjukkan oleh koefisien korelasi *Spearman* sebesar 0,439 yang artinya makin jelek Grading histopatologinya, makin kuat ekspresi VEGF, .

Pada penelitian ini, terdapat ekspresi *VEGF* pada invasive ductal payudara sebanyak 28 penderita (85%). Sebanyak 3 penderita (9,1%) karsinoma payudara dengan diferensiasi sel baik (*well differentiated*), 1 penderita (3%) karsinoma payudara dengan diferensiasi sedang (*moderate differentiated*) dan 1 penderita (3%) dengan diferensiasi jelek (*poorly differentiated*) yang tidak memperlihatkan ekspresi *VEGF* pada pemeriksaan imunohistokimia.

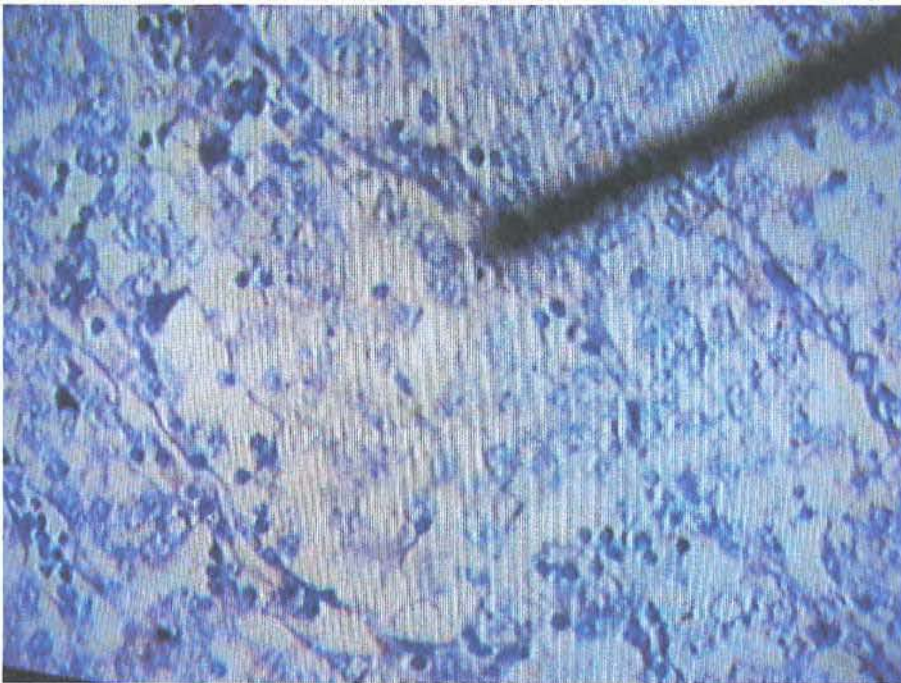
Pada karsinoma *invasif ductal carcinoma* payudara diferensiasi baik (*well differentiated*), ekspresi *VEGF* terbanyak 1+ (44,4%) dan 3 penderita (33,3%) ditemukan yang ekspresi 2+ sedangkan ekspresi 3+ pada 2 penderita (22,2%). Diferensiasi sedang (*moderately differentiated*) ekspresi *VEGF* terbanyak 3+ (41,7%), kemudian 2+ (33,3%) dan 1+ (25%). Diferensiasi jelek (*poorly differentiated*) ekspresi *VEGF* terbanyak 3+ (75%), kemudian diikuti 2+ (16,7%) dan 1+ (8,3%).

Hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan hasil $p = 0,011$ yang artinya ada korelasi yang bermakna antara diferensiasi sel dengan ekspresi *VEGF*. Korelasi yang kuat tersebut ditunjukkan oleh koefisien korelasi *Spearman* sebesar 0,439 yang artinya makin jelek diferensiasi sel, makin kuat ekspresi *VEGF*.

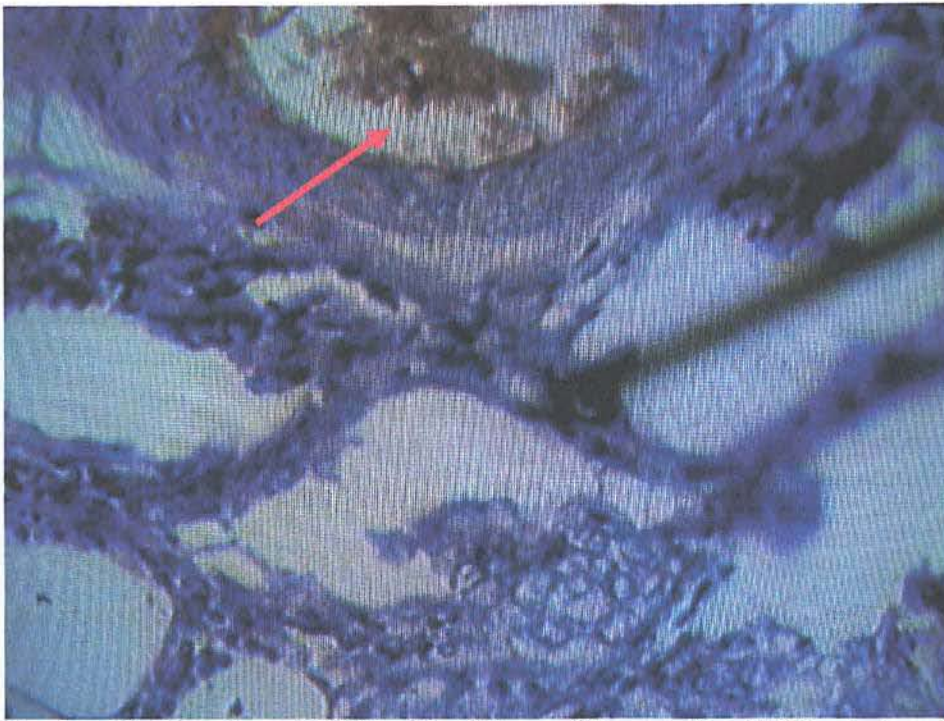
HASIL PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA *VEGF*



Gambar 12. No. sediaan T 379/07 : Sel-sel tercat yang menggambarkan ABN VEGF pada sitoplasma *Invasif ductal carcinoma* payudara. (Olympus BX 53 , 400x)



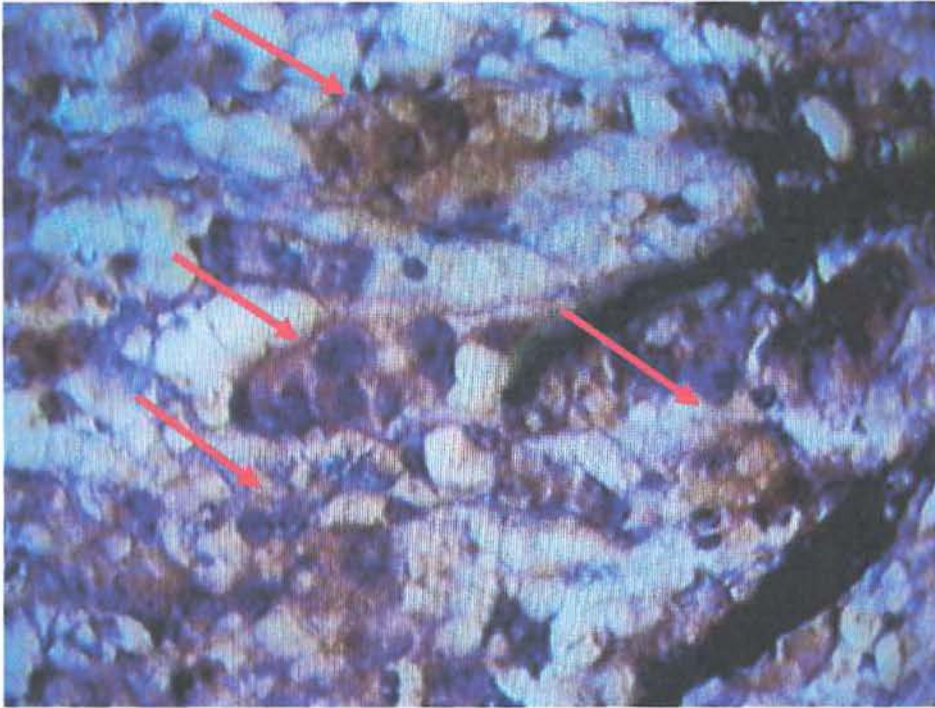
Gambar 13. No. sediaan T472/07 : Sel-sel Ca negatif dengan Abm VEGF pada *Invasif ductal carcinoma* payudara. (Olympus BX 53, 200x)



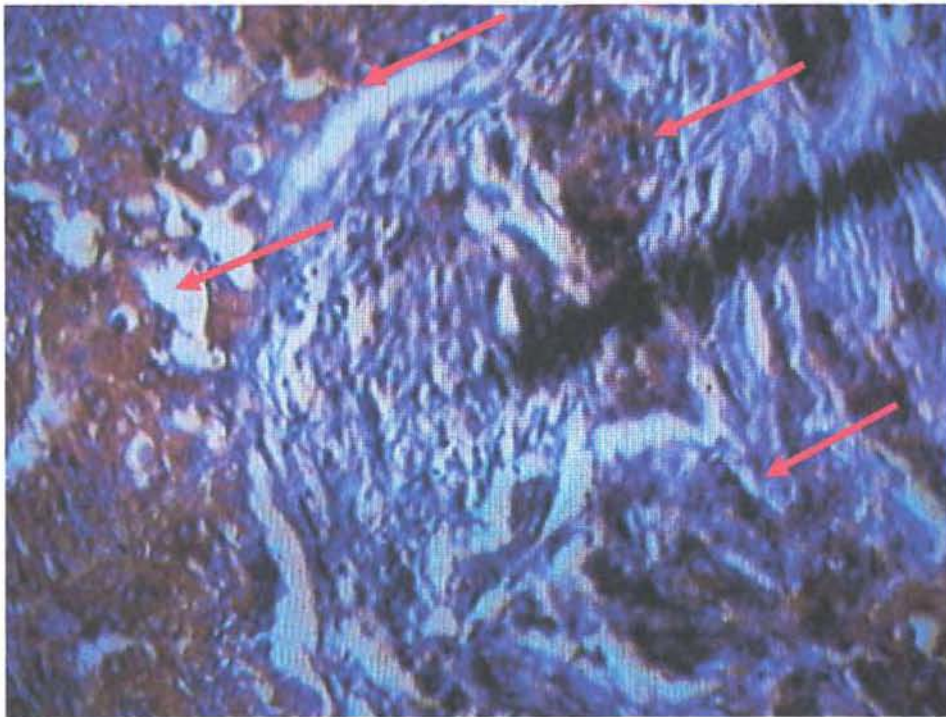
Gambar 14. No. sediaan T472/07 : Sel-sel Ca negatif dengan Abm VEGF pada *Invasif ductal carcinoma* payudara. Tampak sel darah merah dalam pembuluh darah (panah merah)(Olympus BX 53, 200x)



Gambar 15. No. sediaan T 1746/07 : Sel-sel yang tercat positif <5% Abm VEGF pada sitoplasma dari seluruh sel *Invasif ductal carcinoma* payudara. (Olympus BX 53 , 200x)



Gambar 16. No. sediaan T 1627/07 : Sel-sel yang tercat positif 30% Abm VEGF pada sitoplasma dari seluruh sel *Invasif ductal carcinoma* payudara. (Olympus BX 53 , 400x)



Gambar 17. No. sediaan T 3388/07 : Sel-sel yang tercat positif 60% Abm VEGF pada sitoplasma dari seluruh sel *Invasif ductal carcinoma* payudara. (Olympus BX 53 , 200x)

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Gambaran umum hasil penelitian

Pada penelitian ini diperiksa 33 blok parafin *invasif ductal carcinoma* payudara dengan berbagai stadium. Usia terbanyak pada penelitian ini yaitu kelompok umur 40 - 49 tahun, sebanyak 12 orang (36 %), hal ini tidak sesuai dengan kepustakaan bahwa insiden karsinoma payudara meningkat seiring dengan bertambahnya usia (Devita, 2001). Perbedaan ini disebabkan pada penelitian ini sampel yang diambil adalah penderita yang masih bisa dilakukan operasi, sedangkan kasus yang tidak dioperasi tidak dimasukkan kedalam populasi penelitian. Seluruh blok parafin diperiksa ekspresi *VEGF* dengan teknik imunohistokimia dan didapatkan ekspresi *VEGF* positif sebanyak 28 (85 %), hal ini tidak jauh berbeda dengan kepustakaan bahwa ekspresi *VEGF* positif pada 93 pasien (76%) dari 122 pasien yang diperiksa. ⁽²⁴⁾

6.2 Korelasi antara grading histopatologi dan ekspresi *VEGF* dengan pada *invasif ductal carcinoma* payudara.

Berdasarkan hasil pemeriksaan imunohistokimia, didapatkan ekspresi *VEGF* positif pada 28 sampel penelitian (85 %). Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi *VEGF* pada *carcinoma* payudara, hal ini tidak jauh berbeda sebagaimana pada penelitian Sheng Zhou menemukan bahwa terdapat korelasi ekspresi *VEGF* dengan grading histopatologi dari 122

pasien yang menampakkan ekspresi sebanyak 93 pasien (76%) dengan *invasif ductal carcinoma* payudara. Peningkatan ekspresi *VEGF* ditemukan di berbagai jenis tumor lainnya seperti tumor kolon, lambung, esofagus dan tumor kepala-leher. Hal ini meyakinkan kita tentang keterlibatan *VEGF* pada perkembangan sel tumor.^(9, 10, 12, 13)

Peningkatan *VEGF* mempunyai banyak peran dalam pertumbuhan sel neoplasma, yaitu meningkatkan pembelahan sel, menghambat apoptosis sel tumor, merubah adhesi sel, meningkatkan motilitas sel normal, menginduksi neovaskularisasi, menurunkan *immunosurveillance* dan merangsang faktor proangiogenik seperti *hypoxia*, *oncogenes (ras)*, *inactive tumor supresos gen p53*, *hippel landau gene*, *inducible nitrogen oxide synthase protomer (iNOS)*, *eIF4E*, *MVD* dan *IL-8*^(24, 25). *VEGF* yang terdapat pada karsinoma kolon memproduksi faktor proangiogenik dalam jumlah besar termasuk *VEGF*, sebagai kunci pengatur migrasi sel endothel dan pengaturan angiogenesis *in vitro*. Korelasi antara *COX-2* dengan *VEGF* juga terdapat pada sel-sel kanker prostat dan kanker payudara yang diteliti.⁽¹⁸⁾

Apoptosis adalah kematian sel yang dipicu oleh sel itu sendiri, atau kematian sel yang terprogram, disebut juga *Programmed Cell Death (PCD)*. Dalam keadaan yang fisiologis apoptosis terjadi pada sel-sel yang tua yang telah rusak atau sel yang tidak diperlukan lagi.^(12, 16) Adanya peningkatan ekspresi *VEGF* akan meningkatkan pelepasan *B cell lymphoma-2 (Bcl-2)* yaitu suatu protein yang membuat sel resisten terhadap apoptosis. Pada keadaan ini gen *Bcl-2* mengalami ekspresi yang berlebihan, sehingga sel yang seharusnya terbunuh melalui apoptosis menjadi tetap hidup. Dengan demikian peningkatan *VEGF* akan menghambat apoptosis sel tumor.^(12, 16, 26)

Brown dalam penelitiannya menyebutkan bahwa terdapat korelasi positif antara peningkatan ekspresi *VEGF* dengan beberapa parameter yang menunjukkan agresifitas

karsinoma payudara, yaitu ukuran tumor, metastase kelenjar getah bening aksila, grading histopatologis, status hormon reseptor negatif, laju proliferasi yang tinggi, ekspresi p53 dan ekspresi *HER-2/neu*.⁽²⁷⁾ Adanya *interlinked Signaling pathway* antara *HER-2/neu* dengan *VEGF* pada karsinoma payudara manusia, pada penelitian awal (Rugo,2004) menunjukkan peningkatan ekspresi *VEGF* bersamaan dengan peningkatan ekspresi *HER-2/neu*.

Peningkatan ekspresi *VEGF* berhubungan dengan prognosis yang buruk dan dari penelitian-penelitian terbaru menunjukkan adanya suatu hubungan antara ekspresi *VEGF* dengan grading histopatologi. Zhou dalam penelitiannya mengemukakan bahwa secara bermakna ekspresi *VEGF* lebih tinggi pada kelompok yang grading histopatologi yang semakin jelek pada 122 penderita *Invasif ductal carcinoma* payudara. Dimana pada *well differentiated* (43 pasien) masing-masing ekspresi *VEGF* sebagai berikut negatif pada 14 pasien (32,5%), positif 1 pada 19 pasien (44,2%), positif 2 pada 8 pasien (18,6%) dan positif 3 pada 2 pasien (4,7%). Pada *moderate differentiated* (40 pasien) yang negatif sebanyak 10 pasien (25%), positif 1 pada 12 pasien (30%), positif 2 pada 12 pasien (30%) dan positif 3 pada 6 pasien (15%). Sedangkan pada *poorly differentiated* (39 pasien) yang negatif sebanyak 5 pasien (12,8%), positif 1 pada 7 pasien (17,9%), positif 2 pada 14 pasien (35,9%) dan positif 3 pada 13 pasien (33,3%). Ekspresi *VEGF* berhubungan dengan *enhanced angiogenic effect, grow rapidly*, memfasilitasi invasi kanker, *recurrence, patient survival*, serta progresifitas kanker payudara seperti metastase pada kelenjar getah bening dan metastase jauh. Diharapkan ekspresi *VEGF* dapat dipergunakan sebagai salah satu parameter nilai prognostik pada penderita karsinoma payudara dan obat penghambat *VEGF* dapat dipergunakan sebagai pencegahan dan pengobatan karsinoma payudara pada wanita yang beresiko tinggi⁽²⁸⁾.

6.3 Korelasi antara ekspresi *VEGF* dengan ukuran tumor (T) dan metastase regional (N)

Pada uji korelasi antara ukuran tumor (T) dengan ekspresi *VEGF* menggunakan uji *Spearman* didapatkan hasil $p = 0,002$ dan $r = 0,527$, yang berarti bahwa terdapat korelasi antara ukuran tumor dengan ekspresi *VEGF*. Hal ini sesuai dengan penelitian *Zhou* dimana diameter tumor $>3\text{cm}$ ekspresi *VEGF* pada 42 pasien dari 51 pasien (82%).

Pada uji korelasi antara metastase regional (N) dengan ekspresi *VEGF* menggunakan uji *Spearman* didapatkan hasil $p = 0,189$ dan $r = 0,235$, yang berarti bahwa tidak terdapat korelasi antara metastase regional dengan ekspresi *VEGF*.

Zhou dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekspresi *VEGF* ada berkorelasi dengan grading histopatologi, stadium klinis, status kelenjar getah bening aksila dan status hormonal (*ER*).⁽²⁴⁾

6.4. Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan imunohistokimia *VEGF*

Pemeriksaan imunohistokimia adalah salah satu prosedur pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi adanya antigen tertentu pada potongan jaringan. Dasar pemeriksaan ini adalah adanya reaksi antigen antibodi dengan menggunakan antibodi yang sudah diberi label^(26, 27)

Preparasi jaringan memegang peranan penting dalam pemeriksaan imunohistokimia ini. Proses preparasi jaringan meliputi : fiksasi jaringan, dehidrasi, pembuatan parafin blok, pemotongan jaringan dengan mikrotom, deparafinisasi, *antigen retrieval*, dan pengecatan

imunohistokimia. Kesalahan salah satu dari langkah ini akan memberikan hasil pemeriksaan yang kurang baik.

Fiksasi jaringan dengan segera dan adekuat sangat esensial untuk mempertahankan morfologi jaringan. Dalam proses fiksasi jaringan masih banyak faktor yang mempengaruhi kualitas dari fiksasi itu, meliputi : pH, suhu, daya tembus cairan fiksasi, volume cairan fiksasi, konsentrasi cairan fiksasi dan lamanya proses fiksasi. Fiksasi yang tidak adekuat atau terlalu lama akan menurunkan kemampuan antigen dalam mengikat antibodi. Fiksasi atau pengawetan jaringan bertujuan untuk menghentikan dengan segera proses biokimia yang terjadi didalam sel. Jaringan yang masih segar dari operasi harus segera dimasukkan ke bahan fiksasi, keterlambatan fiksasi jaringan akan menyebabkan dekomposisi jaringan sehingga merusak morfologi jaringan dan antigen sel. Selain itu fiksasi jaringan juga berfungsi untuk menambah afinitas protoplasma terhadap pewarnaan, dan mempertahankan sel dari larutan hipotonis dan hipertonis ^(26, 27)

Fiksasi formalin umumnya lebih baik dalam mempertahankan antigen dibandingkan dengan bahan fiksasi yang lain. Cairan fiksasi yang digunakan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo selama ini adalah larutan formalin *buffer* yang terdiri atas *formaldehid* 38-40%, air suling, sodium hidrogen fosfat dan disodium hidrogen fosfat. Waktu optimum fiksasi menggunakan formalin tergantung ukuran blok jaringan dan jenis jaringan. Fiksasi antara 18 sampai 24 jam cukup optimal untuk mempertahankan jaringan. Fiksasi yang terlalu singkat menyebabkan timbulnya perubahan warna ditepi jaringan dan tidak ada sinyal warna ditengah jaringan. Fiksasi yang terlalu lama akan menyebabkan penutupan seluruh epitop antigen sehingga antigen tidak terdeteksi dengan antibodi, walaupun menggunakan tehnik *antigen retrieval*. Penggunaan formalin untuk fiksasi harus berhati-hati,

sebab formalin dapat menimbulkan reaksi alergi dikulit yang kuat (dermatitis kontak), dan bersifat karsinogenik. Iritasi nasal, kornea, dan paru juga bisa terjadi akibat rangsangan gas formalin^(26, 27, 29)

Fiksasi menggunakan formalin dapat mengakibatkan terjadinya perubahan kimia pada antigen yang ada dalam jaringan. Perubahan kimia yang terjadi dinamakan *cross-link*, yaitu berupa jembatan metilen (*methylene bridge*) antara formalin dan antigen. Adanya *cross-link* ini mengakibatkan antigen tertutup sehingga tidak terdeteksi oleh antibodi, hal ini menyebabkan pengecatan atau pemeriksaan imunohistokimia akan memberikan hasil yang kurang sempurna dan menimbulkan kesalahan dalam interpretasi hasil pemeriksaan^(27, 29)

Teknik antigen *retrieval* digunakan untuk menghilangkan *cross link* ini sehingga antigen dapat terbuka dan mempermudah penetrasi antibodi. Tehnik *antigen retrieval* ini dapat mengembalikan imunoreaktivitas dari antigen jaringan dengan cara *hydrolisis cross-link methylene bridge* yang terbentuk saat fiksasi formalin. Tehnik *antigen retrieval* yang dikenal dengan teknik *Antigen Retrieval Immunohistochemistry* (AR-IHC), mempunyai beberapa metode yaitu: *Heat induced epitope retrieval (HIER)*, dan *Proteolytic induced epitope retrieval (PIER)*. Metode *HIER* adalah metode pemanasan *microwave* (pemanasan suhu tinggi 120°C) atau *pressure techniques* menggunakan *pressure cooker* dalam cairan *retrieval* (Tris / EDTA atau *citrat buffer*). Metode *PIER* menggunakan enzim proteolitik (*proteinase k, trypsin, chymotrypsin, pepsin, atau pronase*). Kerugian tehnik *PIER* ini adalah enzim dapat merusak epitop antigen dan morfologi jaringan, selain itu metode ini membutuhkan waktu inkubasi dan ketepatan konsentrasi enzim. Kombinasi tehnik *PIER* dan *HIER* dapat digunakan sebagai alternatif bila semua metode *antigen retrieval* gagal mengembalikan imunoreaktivitas antigen. Proses *antigen retrieval* cukup dilakukan selama

20 menit. Proses yang terlalu singkat akan menghasilkan pengecatan yang lemah, sedangkan bila terlalu lama akan menyebabkan perubahan warna non spesifik dari latar belakang potongan jaringan. Pada penelitian ini digunakan teknik *antigen retrieval* metode HIER karena relatif lebih singkat, dan tidak merusak antigen dan morfologi jaringan⁽³⁰⁻³²⁾

Setelah dilakukan fiksasi, perlu dilakukan dehidrasi. Dehidrasi bertujuan membuang air dan menggantinya dengan larutan organik. Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan kedalam alkohol dengan beberapa konsentrasi. Alkohol bersifat hidrofobik, sehingga dapat menyerap cairan di dalam jaringan tanpa merusak struktur jaringan. Proses dehidrasi yang tidak adekuat dapat menyebabkan denaturasi protein oleh air, sehingga akan merusak struktur jaringan^(26, 27)

Blok parafin merupakan salah satu cara pengawetan jaringan dimana kita dapat memperoleh jaringan untuk bahan pemeriksaan histopatologi yang ukurannya lebih besar, dapat bertahan lama, antigen yang terkandung dalam jaringan dapat diselamatkan, dan penyimpanannya relatif mudah. Pembuatan blok parafin juga bertujuan agar pemotongan jaringan dengan mikrotom menjadi lebih mudah. Beberapa antigen tertentu tidak dapat bertahan dengan proses fiksasi dan pembuatan parafin blok. Dalam hal ini dapat digunakan teknik potong beku (*frozen section*) untuk pengecatan imunohistokimia. Pemeriksaan potong beku lebih baik dalam mempertahankan fungsi enzim dan antigen jaringan dibandingkan dengan pembuatan parafin blok. Kerugian dari teknik potong beku adalah : morfologi jaringan yang kurang baik, resolusi yang buruk pada pembesaran yang tinggi dari mikroskop, dibutuhkan penyimpanan yang khusus, teknik pemotongan yang lebih sulit dan lebih tebal dengan mikrotom karena kristal es tidak terpotong, dan keterbatasan preparat untuk disimpan lebih lama^(30, 31)

Deparafinisasi dilakukan setelah pemotongan jaringan. Deparafinisasi bertujuan untuk membuang seluruh parafin yang ada pada jaringan. Deparafinisasi yang kurang baik akan menghasilkan pengecatan yang kurang baik^(29, 30)

Terdapat 2 tehnik pengecatan untuk pemeriksaan imunohistokimia, yaitu metode langsung (*direct method*) dan metode tidak langsung (*indirect method*). Metode langsung menggunakan satu macam antibodi yang sudah dilakukan labelisasi untuk mendeteksi suatu antigen. Proses metode langsung ini tidak membutuhkan waktu yang lama, tetapi tidak sensitif karena hanya memberikan sinyal amplifikasi yang kecil. Saat ini metode langsung sudah banyak ditinggalkan seiring dengan dikembangkannya metode tidak langsung. Metode tidak langsung adalah tehnik pengecatan imunohistokimia yang menggunakan dua antibodi, yaitu antibodi primer dan sekunder. Antibodi primer adalah antibodi yang tidak dilabelisasi, dan akan melekat langsung dengan antigen, sedangkan antibodi sekunder adalah antibodi yang sudah dilabelisasi, dan akan melekat pada antibodi primer. Dengan tehnik labelisasi enzimatik dan pemberian substrat *chromogen*, akan memberikan perubahan warna. Metode tidak langsung ini lebih sensitif dalam mendeteksi antigen karena mempunyai sinyal amplifikasi yang kuat akibat reaksi antigen dengan antibodi. Antibodi sekunder dapat dilakukan labelisasi menggunakan *fluorescent dye* (*FITC*, *rhodamin*, atau *Texas red*), tehnik ini disebut *indirect immunofluorescent method*. Labelisasi antibodi sekunder juga bisa dilakukan dengan pemberian enzim peroksidase, *alkaline phosphatase*, atau glukose oksidase sehingga disebut sebagai tehnik *indirect immunoenzyme method*. Pada beberapa jaringan terdapat biotin endogen yang dapat menyebabkan timbulnya ikatan kompleks avidin – biotin, sehingga menyebabkan perubahan warna pada latar belakang preparat. Untuk mengatasi hal

ini dapat diberikan *dual endogenous enzyme block*, yang akan menutup aktifitas enzim yang tidak diperlukan⁽³⁰⁻³²⁾

Inkubasi pengecatan imnohistokimia ini memerlukan waktu satu malam, inkubasi ini memberikan kesempatan seluruh antigen dapat berikatan dengan antibodi. Pemberian peroksidase (H_2O_2) bertujuan menekan aktivitas peroksidase endogen, dengan demikian akan mengurangi pewarnaan pada latar belakang jaringan. Kualitas peroksidase yang kurang baik akan menyebabkan hasil pewarnaan menjadi kurang sempurna. Pemilihan bahan *chromogen* untuk memberikan perubahan warna harus sesuai dengan label *enzym* yang dipakai. Pada penelitian ini dipakai *enzym Horseradish peroksidase (HRP)* dan substrat *diaminobenzidine (DAB)*, karena bahan ini memberikan intensitas pewarnaan yang baik dan permanen. Kerugian dari bahan *chromogen* ini adalah adanya aktivitas *peroksidase* endogen menyebabkan hasil pewarnaan menjadi *false* positif. Teknik pengecatan imunohistokimia pada penelitian ini menggunakan metode tidak langsung, yang lebih baik dalam mengidentifikasi antigen dibandingkan dengan metode langsung⁽³⁰⁻³²⁾

Dari pembahasan mengenai proses peaparasi jaringan sampai pengecatan, terlihat bahwa banyak sekali faktor-faktor yang dapat menyebabkan hasil pengecatan imunohistokimia menjadi kurang sempurna. Untuk mendapatkan hasil pengecatan imunohistokimia yang baik maka diperlukan bahan preparat jaringan yang baik, bahan-bahan pengecatan yang baik, standarisasi kerja, dan tenaga yang terampil dan khusus dibidang ini.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Ada korelasi yang positif antara ekspresi *VEGF* dengan grading histopatologi pada *invasif ductal carcinoma* payudara.

SARAN

Adanya korelasi antara ekspresi *VEGF* dengan makin jeleknya grading histopatologi pada *invasif ductal carcinoma* payudara, maka :

1. Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang penggunaan obat penghambat *VEGF* (*bevacizumat*) untuk menghambat pertumbuhan karsinoma payudara.
2. Diharapkan ekspresi *VEGF* dapat dipergunakan sebagai salah satu parameter nilai prognostik pada penderita karsinoma payudara.
3. Diharapkan obat penghambat *VEGF* dapat dipergunakan sebagai tambahan terapi pada wanita dengan karsinoma payudara yang masuk kelompok resiko tinggi (ekspresi *VEGF*), serta digunakan juga untuk mengurangi angka residif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bland K, Vezeridis M, III EC. Breast. In: Schwart, editor. Principles of Surgery. 7th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1999. p. 554.
2. Dickson R, Lippman M. Cancer of the Breast. In: Freenan J, Rhyner A, Harris S, Scaramuzza T, editors. Cancer Principles and Practice of Oncology. 6 ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkin; 2001. p. 1663-725.
3. Abulafia O, Triest W, Sherer D. Angiogenesis in Malignancies of the Female Genital Tract. *Gynecol Oncol.* 1999;72:p.220-31.
4. Folkman J. Clinical Application of Research on Angiogenesis. *NEJM.* 1995;333:p.1757-62.
5. Gasparini G. Prognostic and Predictive Value Of Intratumoral Microvessel Density in Human Solid Tumours. In: Bicknell R, Lewis C, Ferrara N, editors. Tumor Angiogenesis. New York: Oxford University Press. p. 29-44.
6. Felmeden D, Blann A, Lip G. Angiogenesis: basic pathophysiology and implication for disease. *Europ Heart J* 2003;24:p.568-603.
7. Hayes A, Li L, Lippman M. Science, medicine, and the future: Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *BMJ.* 1999;318:p.853-6.
8. Turner H, Harris A, Melmed S. Angiogenesis in Endocrine Tumor. *Endocrine Reviews.* 2003(24):p.600-32.
9. Ellis L, RADIUSKY R, FIDLER I. Recent advance in the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. In: Bland K, Daly J, Karakausis C, editors. Surgical Oncology Contemporary Principles and Practice. New York: Mc Graw-Hill; 1999. p. 101-21.
10. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred E, Moore D, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:p.1875-87.
11. Sukardja I. Terapi kanker payudara lanjut. Seminar onkologi CIBA; 1996; Jakarta. 1996.

12. Dhar D, Kubota H, Kotoh K. Tumor Vascularity Predicts Recurrence in Differentiated Thyroid Carcinoma. *Am J Surg*. 1998;176:p.442-7.
13. Zang H, Bicknell R. Therapeutic Inhibition of Angiogenesis In: Murray J, editor. *Angiogenesis Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2001. p. 3-26.
14. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:p.4-25.
15. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors *J Cell Sci*. 2000;114:p.853-65.
16. Neufeld G, Cohen T, Genginovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13:p.9-22.
17. Korean_UniGene_Collection. Angiogenesis schematic. 2003 [updated 2003; cited 2007]; Available from: www.cgap.nci.nih.gov/pathway/biocardta/vegfpawthway.htm.
18. Levy A, Levy N, Goldberg M. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem*. 1996;271(25):p.492-7.
19. Semenza GL. Regulation of hypoxia - induced angiogenesis : a chaperone escort VEGF to the dance. *Clin Invest*. 2001;108:p.39-40.
20. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:p.1375-86.
21. Hood J, Meininger C, Ziche M, Granger H. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:p.1054-8.
22. Fox S. Microscopic Assessment of Angiogenesis In: Murray J, editor. *Angiogenesis Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2001. p. 29-46.
23. Rosai J. *Surgical Pathology*. 9 ed. New York: Mosby; 2004.
24. Zhou S, Wang G-P, Liu C, Zhou M. Eukaryotic Initiation Factor 4E(eIF4E) and angiogenesis prognostic markers for breast cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:p.231-43.
25. Montrucchio G, Sapino A, Bussolati B, Ghisolfi G, Rizea-savu S, Silvestro L, et al. Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. *Am J Pathol*. 1998;153(5):p.1589-96.

26. Abcam. IHC-Paraffin protocol (IHC-P). . 2007 [updated 2007; cited 2007]; Available from: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf
27. IHC_World. Methods and techniques for histologist and immunohistochemists. 2007 [updated 2007; cited 2007]; Available from.
28. Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:p.139-47.
29. Oral_pathology_associates_Inc. How tissue are processed. 2007 [updated 2007; cited 2007]; Available from: www.oralpathologyassociates.com/doctors/processingFrameset.htm.
30. Boenisch T. Staining methods : Handbook immunochemical staining methods- Dacocytomation. California; 2001 [updated 2001; cited 2007]; Available from: www.ftp.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemical%20staining.
31. GenWay_Biotech_Inc. Immunohistochemistry. 2007 [updated 2007; cited 2007]; Available from: www.ftp.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemical%20staining.
32. Hahn M. Histology and immunohistochemistry. Institute of bioscience and bioengineering; 2005 [updated 2005; cited 2007]; Available from: <http://www.bioc.rice.edu/bios576/immuno/immuno.m>.

Lampiran 1

TEKNIK PENGECATAN *HEMATOKSILIN EOSIN CARA MEYER*

1. Sediaan dicelup dalam larutan *xilol* bak I selama 5 menit.
2. Pindahkan dalam larutan *xilol* bak II selama 5 menit dan ke dalam larutan *xilol* bak III, selama 5 menit.
3. Masukkan dalam alkohol 96% bak I dan II masing-masing 2 menit, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 menit.
4. Cuci dalam air mengalir selama ± 10 menit.
5. Masukkan dalam larutan *meyer* hematoksilin selama 15 menit.
6. Cuci kembali dengan air mengalir selama 20 menit.
7. Dimasukkan bak *eosin* 1 % selama 1 menit.
8. Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 2 menit kemudian alkohol 96% bak II dan III masing-masing 2 menit.
9. Terakhir dimasukkan dalam *xilol* bak I, II, dan III masing-masing 5 menit
10. Ditutup dengan *entelan* dan *cover glass*.

(Prosedur tetap pembuatan histopatologi instalasi patologi anatomi FK Unair, Surabaya, 1997)

Lampiran 2. Teknik Pengecatan Imunohistokimia Dari Sediaan Blok Parafin

1. Slide ditempatkan dalam rak pengecatan dan dilakukan dewax (deparanifikasi) dengan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit.
2. Hidrasi dengan:
 - a. Alkohol absolut 100% selama 3 menit
 - b. Alkohol 96% selama 3 menit
 - c. Alkohol 70% selama 3 menit
3. Cuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
4. Dilakukan tahap mikrowave selama 10 menit dengan buffer sitrat pH 6.
5. Diberi garis pap pen, selanjutnya dicuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
6. Ditetesi *dual endogenous enzyme block*, inkubasi selama 5 sampai 10 menit, dicuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
7. Ditetesi *primary antibody* atau *negative control*, inkubasi selama 1 jam, dicuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
8. Ditetesi *peroxydase labelled polymer*, inkubasi selama 30 menit, dicuci dengan Tris HCl buffer pH 7,6 sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
9. Ditetesi *substrate-chromogen*, inkubasi selama 5 sampai 10 menit, dicuci dengan aquades sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
10. Dilakukan *counterstain* dengan Meyer Hematoxillin sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit, dicuci *aquadest*, kemudian dilanjutkan ke air mengalir sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.
11. Dilakukan *mounting* dengan entelan.

Lampiran 3. Hasil Analisis Statistik

Ekspresi VEGF * Grading Histopatologi Crosstabulation

		Grading Histopatologi			Total	
		Well diff	Moderately diff	poorly diff		
Ekspresi VEGF	-	Count	3	1	1	5
		% within Grading Histopatologi	33.3%	8.3%	8.3%	15.2%
	1+	Count	1	2		3
		% within Grading Histopatologi	11.1%	16.7%		9.1%
	2+	Count	3	4	2	9
		% within Grading Histopatologi	33.3%	33.3%	16.7%	27.3%
	3+	Count	2	5	9	16
		% within Grading Histopatologi	22.2%	41.7%	75.0%	48.5%
Total		Count	9	12	12	33
		% within Grading Histopatologi	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Nonparametric Correlations

Correlations

		Ekspresi VEGF	Grading Histopatologi
Spearman's rho	Ekspresi VEGF	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.439*
		N	33
	Grading Histopatologi	Correlation Coefficient	.439*
		Sig. (2-tailed)	.011
		N	33

*. Correlation is significant at the .05 level (2-tailed).

Ekspresi VEGF * Tumor Crosstabulation

		Tumor			Total	
		T1	T2	T4		
Ekspresi VEGF	-	Count	2	3		5
		% within Tumor	33.3%	20.0%		15.2%
	1+	Count	1	1	1	3
		% within Tumor	16.7%	6.7%	8.3%	9.1%
	2+	Count	2	6	1	9
		% within Tumor	33.3%	40.0%	8.3%	27.3%
	3+	Count	1	5	10	16
		% within Tumor	16.7%	33.3%	83.3%	48.5%
Total	Count	6	15	12	33	
	% within Tumor	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Nonparametric Correlations

Correlations

			Ekspresi VEGF	Tumor
Spearman's rho	Ekspresi VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.527**
		Sig. (2-tailed)	.	.002
		N	33	33
	Tumor	Correlation Coefficient	.527**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.002	.
		N	33	33

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Ekspresi VEGF * Nodul Crosstabulation

		Nodul			Total	
		N0	N1	N2		
Ekspresi VEGF	-	Count	3	2		5
		% within Nodul	17.6%	14.3%		15.2%
	1+	Count	2	1		3
		% within Nodul	11.8%	7.1%		9.1%
	2+	Count	6	2	1	9
		% within Nodul	35.3%	14.3%	50.0%	27.3%
	3+	Count	6	9	1	16
		% within Nodul	35.3%	64.3%	50.0%	48.5%
Total	Count	17	14	2	33	
	% within Nodul	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Nonparametric Correlations

Correlations

			Ekspresi VEGF	Nodul
Spearman's rho	Ekspresi VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.235
		Sig. (2-tailed)	.	.189
		N	33	33
	Nodul	Correlation Coefficient	.235	1.000
		Sig. (2-tailed)	.189	.
		N	33	33

Lampiran 4.

**PENELITIAN IMUNOHISTOKIMIA
Dr.SUGENG SUPARNO (VEGF)**

NO	REGISTER	NO PA	GRADING HISTOPATOLOGI	INTENSITAS EKSPRESI VEGF	% SEL POSITIF
1	10629026	T379/07	POORLY DIFF	STRONG	80%
2	10660895	T058/07	WELL DIFF	-	-
3	10675473	T472/07	POORLY DIFF	-	-
4	10604268	T1168/07	POORLY DIFF	MEDIUM	30%
5	10623140	T1376/07	WELL DIFF	MEDIUM	<5%
6	60026266	T1627/07	MODERATE DIFF	STRONG	30%
7	60026680	T1746/07	MODERATE DIFF	MEDIUM	<5%
8	10675144	T1574/07	POORLY DIFF	MEDIUM	75%
9	10726302	T2870/07	WELL DIFF	-	-
10	10645689	T2972/07	POORLY DIFF	STRONG	80%
11	10618322	T1807/07	POORLY DIFF	MEDIUM	25%
12	10704834	T2111/07	MODERATE DIFF	MEDIUM	25%
13	10709890	T3516/07	MODERATE DIFF	STRONG	80%
14	60027881	T2381/07	WELL DIFF	MEDIUM	40%
15	10173514	T3388/07	POORLY DIFF	STRONG-MEDIUM	60%
16	10692114	T3966/07	POORLY DIFF	MEDIUM	60%
17	10738512	T3725/07	MODERATE DIFF	MEDIUM	<5%
18	10740476	T3896/07	WELL DIFF	STRONG-MEDIUM	70%
19	10688096	T3975/07	MODERATE DIFF	MEDIUM	20%
20	10745293	T4296/07	WELL DIFF	MEDIUM	60%
21	10693158	T4393/07	WELL DIFF	STRONG-MEDIUM	30%
22	10669378	T4978/07	POORLY DIFF	STRONG	60%
23	10686636	T799/07	WELL DIFF	MEDIUM	20%
24	10623760	T4808/07	MODERATE DIFF	STRONG-MEDIUM	80%
25	10692345	T3988/07	MODERATE DIFF	STRONG	40%
26	10561372	T3845/07	MODERATE DIFF	STRONG	60%
27	10560924	T5091/07	MODERATE DIFF	STRONG-MEDIUM	80%
28	10729956	T5310/07	MODERATE DIFF	-	-
29	10549395	T4430/07	MODERATE DIFF	STRONG	80%
30	10672377	T4769/07	POORLY DIFF	STRONG	75%
31	10733566	T4807/07	POORLY DIFF	MEDIUM	55%
32	10752820	T5259/07	POORLY DIFF	STRONG	55%
33	10778075	T6937/07	WELL DIFF	-	-

Surabaya, 2 Januari 2008

Divisi Imunohistokimia Departemen Patologi Anatomi FK Unair



Prof. Dr. Juliati Hood A., dr., MS, SpPA(K), FIAC