

## Analisis Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Kepadatan Mikrovaskuler pada *Invasive Breast Carcinoma of No Special Type Grade 3* dengan Metastasis Kelenjar Getah Bening Aksila

Maria Niasari, Faroek Hoesin

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga  
Surabaya

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Karsinoma payudara adalah keganasan paling sering pada wanita di seluruh dunia. Jenis histologi tersering adalah *invasive carcinoma of no special type (invasive carcinoma NST)*. Metastasis kelenjar getah bening merupakan faktor prognostik yang bermakna. Proses metastasis melibatkan angiogenesis dengan VEGF sebagai faktor pertumbuhan yang penting. Kepadatan mikrovaskuler merupakan penghitungan kuantitatif terhadap pembuluh darah kapiler intra tumoral yang mencerminkan hasil proses angiogenesis. Peran VEGF dan kepadatan mikrovaskuler pada mekanisme proses angiogenesis potensial diterapkan pada terapi antiangiogenesis pada karsinoma payudara. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis ekspresi VEGF dan kepadatan mikrovaskuler pada *invasive carcinoma NST grade 3* dengan metastasis kelenjar getah bening aksila.

#### Metode

Studi *cross sectional* dengan sampel yang terdiri atas 9 sampel masing-masing pada kelompok N0, N1, N2, dan N3 yang didiagnosis *invasive carcinoma NST* selama periode Januari sampai Desember 2012 di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya. Dilakukan pulasan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal VEGF dan CD31. Ekspresi VEGF dinyatakan secara semikuantitatif dalam skor 0, 1, 2, dan 3. Kepadatan mikrovaskuler merupakan rata-rata pembuluh darah kapiler yang terpulas positif dengan CD31 pada 5 lapangan pandang besar. Perbedaan ekspresi dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, dan *Anova*. Korelasi antara variabel dianalisis dengan uji statistik Spearman.

#### Hasil

Terdapat perbedaan yang bermakna pada ekspresi VEGF antara N0 dan N1 ( $p=0,015$ ), N0 dan N2 ( $p=0,031$ ), dan N0 dan N3 ( $p=0,017$ ). Terdapat korelasi antara ekspresi VEGF dengan metastasis kelenjar getah bening aksila ( $r=0,455$ ,  $p=0,005$ ,  $p<0,05$ ). Terdapat korelasi antara ekspresi VEGF dengan kepadatan mikrovaskuler pada *invasive carcinoma NST grade 3*. ( $r=0,348$ ,  $p=0,037$ ,  $p<0,05$ ). Tidak terdapat korelasi antara kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis kelenjar getah bening aksila. ( $p=0,085$ ,  $p>0,05$ ).

#### Kesimpulan

VEGF berperan pada angiogenesis dan metastasis kelenjar getah bening aksila pada *invasive carcinoma NST grade 3*.

**Kata kunci:** CD31, kanker payudara, metastasis kelenjar getah bening aksila, VEGF.

### ABSTRACT

#### Background

Breast carcinoma is the most common malignancy in women worldwide. The most common histologic type is *invasive carcinoma of no special type (invasive carcinoma NST)*. Axillary lymph nodes metastasis in breast cancer is a significant prognostic factor. Metastatic process involves angiogenesis, in which VEGF plays an important role. Microvessel density is a quantitative measurement of intra tumoral vessels that reflects the result of angiogenesis. The role of VEGF and microvessel density in the mechanism of angiogenesis is a potential target for anti angiogenic therapy in breast cancer. This study analyzed the expression of VEGF and microvessel density in *invasive breast carcinoma NST grade 3* with axillary lymph nodes metastasis.

#### Methods

Study design was *cross sectional*. Samples consisted of 9 samples in each groups: N0, N1, N2, and N3. The diagnosis of *invasive carcinoma NST* was made on Dr Soetomo hospital Surabaya during January until December 2012. Samples were stained with monoclonal antibody of VEGF and CD31. VEGF expression was scored semi-quantitatively into 0, 1, 2, and 3. The microvessel density was the average of vessels stained positively by CD31 in 5 high power fields. The differences between variables were analyzed by Kruskal Wallis, Mann Whitney, and *Anova*. The correlation between VEGF expression and microvessel density was analyzed by Spearman correlation test.

#### Results

The statistic test revealed that there were significant differences between N0-N1 ( $p=0.015$ ), N0-N2 ( $p=0.031$ ) and N0-N3 ( $p=0.017$ ). There was a significant correlation between VEGF expression and axillary lymph nodes metastasis. ( $r=0.455$ ,  $p=0.005$ ,  $p<0.05$ ) and there was also a significant correlation between VEGF expression and microvessel density in *invasive carcinoma NST grade 3*. ( $r=0.348$ ,  $p=0.037$ ,  $p<0.05$ ). There was no correlation between microvessel density and axillary lymph nodes metastasis. ( $p=0.085$ ,  $p>0.05$ ).

#### Conclusion

VEGF plays a role in angiogenesis that influences axillary lymph nodes metastasis in *invasive carcinoma NST grade 3*.

**Key words :** axillary lymph nodes metastasis, breast cancer, CD31, VEGF.

**PENDAHULUAN**

Kanker payudara adalah keganasan yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia. Kanker payudara merupakan 23% dari seluruh neoplasma ganas pada wanita dan merupakan peringkat pertama kanker pada wanita di negara maju.<sup>1</sup> Di Indonesia, menurut data Pathology Based Cancer Registry yang dilakukan oleh Yayasan Kanker Indonesia, kanker payudara menduduki peringkat pertama keganasan pada wanita. Dari total penderita kanker payudara, 72% penderita datang berobat dalam stadium lanjut.<sup>2</sup>

Metastasis ke kelenjar getah bening aksila merupakan faktor prognostik yang paling bermakna pada karsinoma payudara.<sup>3</sup> *Disease-free survival* dan *overall survival* akan menurun seiring dengan penambahan satu kelenjar getah bening aksila yang positif mengalami metastasis.<sup>4</sup> Jumlah kelenjar getah bening yang positif metastasis menentukan staging, selanjutnya staging akan menentukan keputusan tindakan terapi.<sup>5</sup>

Metastasis kanker payudara ke kelenjar getah bening aksila dipengaruhi oleh angiogenesis. VEGF merupakan faktor pertumbuhan yang disebutkan dalam berbagai kepustakaan berperan penting dalam angiogenesis, termasuk pada kanker payudara. Proses angiogenesis menghasilkan pembuluh-pembuluh darah baru yang mendukung progresi dan invasi sel tumor. *Microvessel density* atau kepadatan mikrovaskuler mencerminkan hasil interaksi dari faktor pro dan anti angiogenik. Kepadatan mikrovaskuler merupakan perhitungan secara kuantitatif pada pembuluh darah yang dilakukan dengan memberikan penanda yang spesifik terhadap sel endothel vaskuler.<sup>6</sup> Salah satu penanda pembuluh darah yang secara luas digunakan adalah CD31.<sup>7</sup> Kepadatan mikrovaskuler disebut juga potensial sebagai faktor prognostik untuk kanker payudara, meskipun tidak rutin diperiksa secara klinis.<sup>3</sup>

Tujuan penelitian ini untuk menganalisis ekspresi VEGF dan kepadatan mikrovaskuler pada *invasive carcinoma NST grade 3*.

**METODE PENELITIAN**

Rancangan penelitian ini adalah observasional analitik dengan menggunakan pendekatan *cross sectional*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo dengan menggunakan blok parafin yang telah didiag-

nosis secara histopatologik sebagai *invasive carcinoma of no special type (invasive carcinoma NST)* di RSUD dr. Soetomo Surabaya pada tahun 2012. Dilakukan *total sampling* pada kelompok N3, sebanyak 9 kasus, sedangkan pada kelompok N0, N1, dan N2 dilakukan *random sampling* dan didapatkan masing-masing 9 kasus, sehingga seluruh sampel berjumlah 36 kasus.

Penelitian ini menggunakan pulasan imunohistokimia VEGF dan CD31 pada blok parafin yang diambil dari tumor payudara jenis *invasive carcinoma NST grade 3*. VEGF diperiksa dengan antibodi *monoclonal VEGF clone VG1*(Dako) dan terpulaskan positif pada sitoplasma sel tumor. Ekspresi VEGF dinilai secara semikuantitatif dengan menggunakan skor: skor negatif jika tidak terpulaskan, skor positif 1 jika terpulaskan <10%, skor positif 2 jika terpulaskan 10-50% dan skor positif 3 jika terpulaskan >50%. Pulaskan CD31 dilakukan dengan antibodi *monoclonal CD31* (Dako), terpulaskan pada membran endothel pembuluh darah. Jumlah pembuluh darah dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler dengan pembesaran 400x pada 5 area *hot spot* intra tumoral. Kepadatan mikrovaskuler dinyatakan dalam rata-rata jumlah pembuluh darah dari kelima area *hot spot* tersebut.

Analisis data untuk mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada kelompok N0, N1, N2, dan N3 digunakan uji statistik Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui perbedaan ekspresi antara satu kelompok dengan kelompok yang lain digunakan uji statistik Mann-Whitney. Untuk mengetahui perbedaan kepadatan mikrovaskuler digunakan uji statistik Anova. Untuk mengetahui korelasi antar variabel dalam penelitian ini dilakukan uji statistik Spearman. Uji statistik bermakna jika  $p < 0,05$ .

**HASIL**

Pada penelitian ini didapatkan 36 sampel, seluruh sampel berjenis histologik *invasive carcinoma NST* dan seluruhnya merupakan *grade 3*.

Tabel 1. Distribusi usia penderita *invasive carcinoma NST grade 3*.

Umur (tahun)	Frekuensi	%
31-40	1	2,8
41-50	14	38,9
51-60	16	44,4
61-70	3	8,3
>70	2	5,6

Data usia yang diperoleh pada penelitian ini yang paling muda adalah 35 tahun dan yang paling tua 84 tahun, dengan rerata umur penderita pada kasus 52,33 tahun. Usia penderita tumor *invasive carcinoma* NST *grade 3* paling banyak berada pada rentang 51-60 tahun yaitu sebanyak 16 orang (44,4%).

Tabel 2. Lokasi tumor.

Lokasi tumor	Frekuensi	%
Mamma sinistra	21	58,3
Mamma dextra	15	41,7

Tabel 3. Lokasi tumor berdasarkan kuadran.

Lokasi tumor	Frekuensi	%
Kuadran lateral atas	14	38,9
Kuadran lateral bawah	2	5,6
Kuadran medial atas	7	19,4
Kuadran medial bawah	1	2,8
Kuadransentral	12	33,3

Lokasi tumor pada *mamma sinistra* sedikit lebih banyak dari *mamma dextra*. Lokasi tumor terbanyak pada kuadran lateral atas, sedangkan lokasi tumor yang paling jarang terdapat pada kuadran medial bawah.

Tabel 4. Distribusi ukuran tumor.

Ukuran tumor (Sistem TNM)	Frekuensi	%
T1	3	8,3
T2	13	36,1
T3	9	25,0
T4	11	30,6

Pengelompokan ukuran tumor dilakukan berdasarkan sistem TNM. Kelompok terbesar adalah pasien dalam kelompok T2 yaitu sejumlah 13 orang (36,1%), dan kelompok terkecil adalah pasien dalam stadium T1 yaitu sejumlah 3 orang (8,3%).

Ekspresi VEGF dinilai menggunakan semikuantitatif, dalam rentang skor 0 atau negatif hingga skor +3. Secara keseluruhan, skor VEGF terbanyak adalah skor 1 sebanyak 13 kasus (36,11%), VEGF skor 0 (negatif) terdapat 13 kasus (36,11%), skor 2 terdiri dari 6 kasus (16,67%) dan skor 3 terdapat pada 4 kasus (11,11%).

Tabel 5. Ekspresi VEGF pada *Invasive Breast Carcinoma of NST Grade 3*

Kelompok	Ekspresi VEGF			
	0 / Negatif	+1	+2	+3
N0	6 (16,67%)	3 (8,33%)	0	0
N1	3 (8,33%)	4 (11,11%)	1 (2,78%)	1 (2,78%)
N2	2 (5,56%)	4 (11,11%)	3 (8,33%)	0
N3	2 (5,56%)	2 (5,56%)	2 (5,56%)	3 (8,33%)

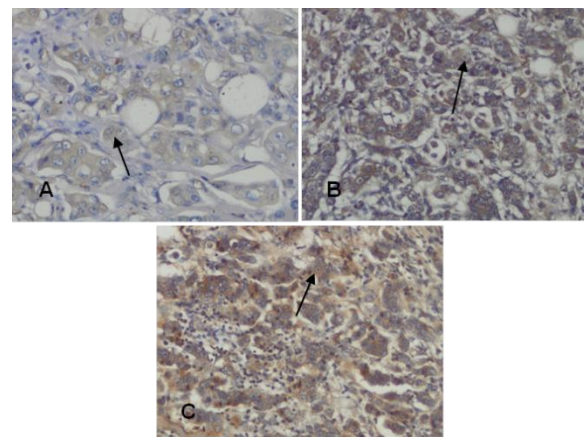
Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis, didapatkan hasil  $p=0,043$  ( $p<0,05$ ), yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi VEGF pada N0, N1, N2, dan N3. Selanjutnya dilakukan analisis Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan ekspresi VEGF pada tiap-tiap kelompok dan didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 6. Hasil uji statistik Mann-Whitney ekspresi VEGF

	N0	N1	N2	N3
N0				
N1	0,015*			
N2	0,031*	0,638		
N3	0,017*	0,234	0,292	

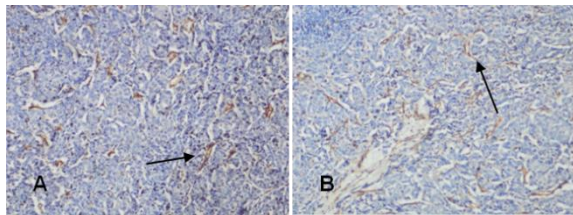
Dari Tabel di atas dapat dilihat bahwa perbedaan yang bermakna pada ekspresi VEGF didapatkan antara kelompok N0-N1 dengan nilai  $p=0,015$  ( $p<0,05$ ), antara kelompok N0-N2 dengan nilai  $p=0,031$  ( $p<0,05$ ) dan antara kelompok N0-N3 dengan nilai  $p=0,017$  ( $p<0,05$ ). Sementara antara N1-N2, N1-N3, dan N2-N3 tidak didapatkan perbedaan ekspresi VEGF yang bermakna. Ekspresi VEGF ditunjukkan dalam Gambar 1.

**Ekspresi VEGF**



Gambar 1. Ekspresi VEGF (imunohistokimia, 200x). A. *Invasive carcinoma* NST *grade 3* dengan Ekspresi VEGF skor +1, terpulas coklat pada kurang dari 10% sitoplasma sel tumor. B. *Invasive carcinoma* NST *grade 3* dengan Ekspresi VEGF skor +2, terpulas coklat pada 11-50% sitoplasma sel tumor. C. *Invasive carcinoma* NST *grade 3* dengan ekspresi VEGF skor +3, terpulas coklat pada lebih dari 50% sitoplasma sel tumor.

**Kepadatan Mikrovaskuler**



Gambar 2. Kepadatan mikrovaskuler pada invasive carcinoma NST grade 3. A. Kepadatan mikrovaskuler kurang dari rata-rata (kurang dari 14,12/lpb); B. Kepadatan mikrovaskuler lebih dari rata-rata (lebih dari 14,12/lpb).

Hasil perhitungan rerata nilai kepadatan pembuluh darah terlihat dalam Tabel 7.

Tabel 7. Rerata, standar deviasi, nilai median, nilai minimum dan nilai maksimum dari kepadatan mikrovaskuler.

Kelompok	N	x̄	Kepadatan mikrovaskuler			p
			SD	Median	Maks	
N0	9	10,51	4,48	8,6	5,8	0,065
N1	9	14,84	7,35	11,6	9,2	
N2	9	17,91	6,57	16,2	9,0	
N3	9	13,24	3,59	12,6	9,0	

Dengan melihat Tabel 7, didapatkan rerata kepadatan mikrovaskuler pada kelompok N0 adalah paling rendah, pada kelompok N2 paling tinggi, sedangkan pada kelompok N3 lebih rendah daripada N2. Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan *Anova*, didapatkan hasil  $p=0,065$  ( $p>0,05$ ), yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kepadatan mikrovaskuler dengan status N0, N1, N2, dan N3.

Korelasi antara ekspresi VEGF dan kepadatan mikrovaskuler pada *invasive carcinoma of NST grade 3* dengan metastasis kelenjar getah bening aksila dianalisis dengan korelasi Spearman, dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 8, dalam korelasi antara VEGF dengan metastasis kelenjar getah bening aksila didapatkan hasil  $r=0,455$  dengan nilai  $p=0,005$  ( $p<0,05$ ), yang artinya terdapat korelasi positif yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan metastasis kelenjar getah bening aksila. Korelasi antara kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis kelenjar getah bening aksila didapatkan nilai  $p=0,85$  ( $p>0,05$ ), yang artinya tidak terdapat korelasi yang bermakna antara kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis

kelenjar getah bening aksila. Dalam korelasi antara VEGF dan kepadatan mikrovaskuler didapatkan hasil  $r=0,348$  dengan nilai  $p=0,037$  ( $p<0,05$ ), yang artinya terdapat korelasi positif yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan kepadatan mikrovaskuler.

Tabel 8. Korelasi ekspresi VEGF, kepadatan mikrovaskuler, dan metastasis kelenjar getah bening aksila.

	Spearman's rho	VEGF	Kepadatan mikrovaskuler	Metastasis KGB aksila
VEGF	Koefisien korelasi	-	0,348*	0,455*
	Harga p		0,037	0,005
Kepadatan mikrovaskuler	Koefisien korelasi	0,348*	-	0,291
	Harga p	0,037	-	0,85
Metastasis KGB aksila	Koefisien korelasi	0,455*	0,291	-
	Harga p	0,005	0,85	-

**DISKUSI**

**Karakteristik sampel penelitian**

Pada penelitian ini diambil sampel sebanyak 36 blok parafin *invasive carcinoma NST grade 3*. Pemilihan jenis histologis *invasive carcinoma NST* dan pemilihan *grade 3* dilakukan untuk mendapatkan sampel yang homogen. *Invasive carcinoma NST* dipilih karena jenis histologik ini merupakan tipe terbanyak dari karsinoma payudara. Penelitian terdahulu juga menyebutkan terdapat peran VEGF dan kepadatan mikrovaskuler pada metastasis kelenjar getah bening aksila pada *invasive carcinoma NST*, dan bukan tipe *special subtype* yang lain.<sup>9</sup> Pemilihan *grade 3* dilakukan karena *grade* ini terdapat paling banyak dan memiliki prognosis yang buruk.<sup>3</sup>

Data lokasi tumor yang didapatkan pada penelitian ini paling banyak terdapat pada kuadran lateral atas. Hal ini sesuai dengan kepustakaan yang menyatakan bahwa *invasive carcinoma NST* paling banyak terjadi di kuadran lateral atas yaitu lebih dari 50% kasus.<sup>10</sup> Data ukuran tumor yang didapatkan pada penelitian ini terbanyak adalah pasien dalam kelompok T2 yaitu sejumlah 13 orang (36,11%), dan kelompok terkecil adalah pasien dalam stadium T1 yaitu sejumlah 3 orang (8,33%).

**Ekspresi VEGF pada *Invasive Carcinoma NST Grade 3***

*Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ada-

lah *heparin-binding glycoprotein*, yang merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang memiliki peran penting dalam proses angiogenesis. VEGF, yang dihasilkan oleh sel tumor dan sel stromal, akan berikatan dengan reseptor VEGF (VEGFR) pada membran sel endotel. Setelah berikatan dengan VEGF, VEGFR akan mengaktifkan berbagai pathway dengan hasil akhir angiogenesis.<sup>8</sup> Proses angiogenesis diperlukan bagi neoplasma tidak hanya untuk tumbuh, melainkan juga untuk proses metastasis. Proses angiogenesis berperan menyediakan sejumlah pembuluh darah sebagai sarana bagi sel tumor untuk menyebar. Proses angiogenesis juga berperan menyediakan sejumlah pembuluh darah sebagai pengantar oksigen dan nutrisi ke sel tumor yang telah menyebar sehingga sel tumor dapat bertahan hidup dan berkoloni di lokasi metastasis.<sup>9</sup>

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan antibodi *monoclonal VEGF clone VG1* yang melabel isoform VEGF-121, VEGF-165, dan VEGF-189. Pemilihan antibodi ini dilakukan karena sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa isoform VEGF yang terbanyak terekspresi pada karsinoma payudara adalah VEGF-121 dan VEGF-165. Selain itu terdapat juga ekspresi VEGF-189, VEGF-183, dan VEGF-145.<sup>9</sup>

Analisis statistik antara ekspresi VEGF dan status kelenjar getah bening aksila pada penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna. Selanjutnya dilakukan analisis antar kelompok didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok N0-N1, N0-N2, dan N0-N3. Perbedaan ini bermakna karena perbandingan dilakukan antara kelompok tanpa metastasis (N0) dengan kelompok dengan metastasis kelenjar getah bening aksila (N1, N2, dan N3). Hasil ini serupa dengan penelitian Hue *et al.*<sup>12</sup> dan Comsa *et al.*<sup>11</sup> yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi VEGF antara tumor tanpa metastasis dengan tumor yang sudah bermetastasis.

Sementara antara kelompok N1-N2, N1-N3, dan N2-N3 didapatkan nilai  $p > 0,05$ , yang artinya tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok tersebut. Hal ini disebabkan karena kelompok yang dibandingkan ekspresinya tersebut adalah kelompok yang sama-sama telah mengalami metastasis kelenjar getah bening aksila. Perbedaan ekspresi VEGF

ditunjukkan antara tumor tanpa metastasis dengan tumor bermetastasis. Tetapi antara kelompok yang sama-sama sudah mengalami metastasis, tidak didapatkan perbedaan ekspresi VEGF. Dengan demikian jumlah kelenjar getah bening yang mengalami metastasis tidak menentukan perbedaan ekspresi VEGF.<sup>7</sup>

### Kepadatan Mikrovaskuler pada *Invasive Carcinoma NST Grade 3*

Pada penelitian ini digunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi *monoclonal CD31*. Pemilihan antibodi CD31 dilakukan berdasarkan kepustakaan yang menyebutkan bahwa kepadatan mikrovaskuler merupakan faktor prognostik yang lebih akurat bila diperiksa dengan CD 31 dan CD 34, dibandingkan bila diperiksa dengan faktor VIII. Antibodi CD31 memiliki kelebihan dibandingkan dengan CD34 karena CD34 juga diekspresikan oleh sel stroma pada beberapa neoplasma, sedangkan CD31 diekspresikan oleh sel endotel kapiler. Sel endotel pembuluh limfe juga sebagian mengekspresikan CD31.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini kepadatan mikrovaskuler mengalami peningkatan dari kelompok N0, N1, dan paling tinggi pada N2. Walaupun demikian peningkatan ini tidak konsisten karena pada kelompok N3, yang memiliki jumlah metastasis pada kelenjar getah bening aksila yang lebih banyak, ternyata mempunyai kepadatan mikrovaskuler yang lebih rendah daripada kelompok N2.

Uji statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal kepadatan mikrovaskuler antara kelompok N0, N1, N2, dan N3 pada *invasive carcinoma NST grade 3* ( $p=0,065$ ). Hasil ini tidak sesuai dengan kepustakaan yang menyebutkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kepadatan mikrovaskuler antara tumor yang bermetastasis dengan tumor yang tidak bermetastasis.<sup>11,14</sup> Namun terdapat pula beberapa pendapat yang menyatakan bahwa kepadatan mikrovaskuler pada karsinoma payudara yang sudah bermetastasis ke kelenjar getah bening tidak selalu lebih tinggi daripada tumor yang tidak bermetastasis.<sup>15</sup>

**Korelasi antara ekspresi VEGF dan kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis kelenjar getah bening pada *Invasive Carcinoma NST Grade 3***

Analisis statistik antara ekspresi VEGF dengan metastasis kelenjar getah bening aksila pada penelitian ini menunjukkan hubungan bermakna dengan  $p=0,005$  ( $p<0,05$ ) dengan koefisien korelasi 0,455. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi VEGF seiring dengan peningkatan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening aksila, sesuai dengan penelitian sebelumnya.<sup>11,12</sup>

Hasil ini menunjukkan bahwa dalam *invasive carcinoma NST grade 3*, VEGF merupakan merupakan faktor yang mempengaruhi kejadian metastasis kelenjar getah bening aksila. Pada *invasive carcinoma NST grade 3*, sel tumor akan mensekresi VEGF. VEGF ini selanjutnya berikatan dengan reseptor VEGF (VEGFR) pada membran sel endotel kapiler intra tumoral. Ikatan yang terbentuk akan mengaktifkan sejumlah *second messenger* dan selanjutnya mengaktifkan 3 *pathway* yang penting. *Pathway* pertama adalah *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/NF-kB* yang mempromosi *survival* sel. *Pathway* kedua adalah *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang mempromosi proliferasi sel. Sedangkan *pathway* ketiga adalah *Ras/extracellular signal-regulated kinase* (ERK) yang mempromosi proliferasi sel, *survival*, diferensiasi, migrasi, dan angiogenesis.<sup>8,16</sup>

Sel *invasive carcinoma NST grade 3* selanjutnya akan intravasasi ke dalam pembuluh darah dan pembuluh limfe tersebut, menyebar bersama sistem vaskuler dan sistem limfatik, *homing* pada kelenjar getah bening aksila dan berkoloni membentuk massa metastasis. Dengan demikian peningkatan ekspresi VEGF pada *invasive carcinoma NST grade 3* berkorelasi dengan peningkatan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening aksila.

Uji analisis menunjukkan tidak terdapat hubungan yang bermakna antara kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis kelenjar getah bening aksila pada *invasive carcinoma NST grade 3* dengan  $p=0,085$  ( $p>0,05$ ). Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Cimpean *et al.*<sup>17</sup> Namun hasil ini tidak sesuai dengan penelitian oleh Comsa *et al.*<sup>11</sup> dan Pyakurel *et al.*<sup>14</sup> yang menyatakan bahwa terdapat korelasi yang bermakna antara kepadatan mikrovaskuler

dengan metastasis kelenjar getah bening aksila pada karsinoma payudara.

Uzzan *et al.*<sup>13</sup> menyatakan bahwa tumor tidak memerlukan mikrovaskuler dalam jumlah besar untuk bermetastasis. Mikrovaskuler adalah sarana yang diperlukan bagi tumor untuk menyebar dan memperoleh nutrisi, namun tidak selalu diperlukan kuantitas yang besar. Penelitian Choi *et al.*<sup>18</sup> menyimpulkan bahwa metastasis *invasive carcinoma NST* ke kelenjar getah bening aksila berkorelasi dengan kepadatan pembuluh limfe, yang diperiksa dengan antibodi spesifik terhadap sel endotel pembuluh limfe, dan tidak berkorelasi dengan kepadatan pembuluh darah, yang diperiksa dengan *marker* untuk sel endotel.

Hasil perhitungan kepadatan mikrovaskuler yang bervariasi dan hasil statistik yang tidak bermakna disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain jenis antibodi yang digunakan, subyektivitas pemeriksa dalam menginterpretasi dan menghitung pembuluh darah kapiler, dan heterogenitas tumor.<sup>13,18</sup> Solusi untuk mengurangi faktor subyektivitas adalah dengan menggunakan metode perhitungan yang lebih obyektif. Suatu alat khusus yang banyak dipakai dalam penelitian tentang kepadatan mikrovaskuler adalah *Chalkley graticule, image processing technique*, dan *imaging analysis software*.<sup>19</sup>

Pada penelitian ini terdapat korelasi positif antara ekspresi VEGF dengan kepadatan mikrovaskuler pada *invasive carcinoma NST grade 3*. Hasil analisis dengan korelasi Spearman didapatkan  $r=0,348$  dengan nilai  $p=0,037$  ( $p<0,05$ ). Peningkatan ekspresi VEGF seiring dengan peningkatan kepadatan mikrovaskuler. Hasil yang sama ditunjukkan pada penelitian sebelumnya.<sup>11,14</sup> Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara VEGF sebagai faktor pertumbuhan yang menyebabkan terjadinya angiogenesis dengan hasil proses angiogenesis secara kuantitatif yaitu jumlah pembuluh darah kapiler yang berbentuk.

Mekanisme perkembangan sel endotel menjadi pembuluh darah terjadi melalui *Notch pathway*. VEGF yang disekresi oleh sel tumor, akan berikatan dengan VEGFR pada *endothelial tip cell*. Interaksi ini menghasilkan *signal transduction* yang akan mengaktifkan transkripsi gen. Proses transkripsi gen menghasilkan *up-regulation Dll4-mRNA*. Dll4 pada *endothelial tip cell* akan berikatan dengan reseptor Notch pada

*stalk cell*. Interaksi ini akan menyebabkan reseptor mengalami *proteolytic cleavage*, menghasilkan *Notch intracellular domain* yang akan ditranslokasi ke nucleus dan mengaktifasi gen. Proses ini menghasilkan *sprouting angiogenesis*, yaitu terbentuknya cabang pembuluh darah baru dari pembuluh darah lama yang telah ada, melalui migrasi *cell tip*. Dengan demikian, peningkatan ekspresi VEGF juga meningkatkan ekspresi *ligand* yang mengaktifkan *Notch signaling pathway* dan berperan dalam regulasi percabangan dan densitas pembuluh darah. Peningkatan ekspresi VEGF seiring dengan peningkatan kepadatan mikrovaskuler.<sup>16</sup>

**KESIMPULAN**

Ekspresi VEGF pada *invasive carcinoma* NST *grade3* dengan metastasis pada kelenjar getah bening aksila (N1, N2, dan N3) lebih tinggi daripada tanpa metastasis pada kelenjar getah bening aksila (N0). Terdapat korelasi antara ekspresi VEGF dengan kepadatan mikrovaskuler dan metastasis kelenjar getah bening aksila. Peningkatan ekspresi VEGF seiring dengan peningkatan kepadatan mikrovaskuler dan metastasis kelenjar getah bening aksila. Tidak terdapat perbedaan kepadatan mikrovaskuler antara status kelenjar getah bening aksila N0, N1, N2, dan N3 pada *invasive carcinoma* NST *grade 3*. Tidak terdapat korelasi antara kepadatan mikrovaskuler dengan metastasis kelenjar getah bening aksila.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Alteri R, Bandi P, Brinton L, Casares C, Cokkinides V, Gansler T, *et al*. American Cancer Society. Breast cancer facts and figures 2011-2012. (cited 2014 Aug 15) Available from: www.cancer.org.
2. International Agency for Research on Cancer. Latest world cancer statistics. World Health Organization Press Release. 2013. (Cited 2014 Sept 26). Available from: www.iarc.fc
3. Bradley KT. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Newspath. Pathol News Med Comm*; 2008: 1-5.
4. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. World Health Organization Classifications of Tumors of the breast. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC; 2012.
5. Jatoi I, Hilsenbeck S, Clark G, Osborne K. Significance of axillary lymph node

- metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 2334-40.
6. Ingelholm P, Pedersen L, Holck S. Quantification of microvessel density of breast carcinoma: An assessment of the inter-and intraobserver variation. *Breast*. 1999; 8: 251-6.
7. Ch'ng ES, Jaafar H, Sharif SE. Breast tumor angiogenesis and tumor-associated macrophages: histopathologist's perspective. *Pathol Res Int*. 2011: 1-13.
8. Roberts E, Cossigny D, Quan G. The role of Vascular Endothelial Growth Factor in metastatic prostate cancer to the skeleton. Hindawi Publishing Cooperation. *Prostate Cancer*. 2013; 1-8.
9. Filho AL, Lopes JM, Schmitt FC. Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol*. 2010; 1-10.
10. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
11. Comsa S, Cimpean AN, Ceausu R, Suciuc C, Raica M. Correlation between vascular endothelial growth factor expression, microvascular density in tumor tissues and TNM staging in breast cancer. *Arch Biol Sci. Belgrade*. 2012; 64: 409-17.
12. Hue Z, Fan C, Livasy C, He X, Oh DS, Ewend MG, *et al*. A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcome. *BMC Medicine*. 2009; 7: 1-14.
13. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*. 2004; 64: 2941-55.
14. Pyakurel D, Karki S, Agrawal C. A study on microvascular density in breast carcinoma. *J Pathol Nepal*. 2014; 4: 570-5.
15. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB. The prognostic value of angiogenesis by chalcley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006; 6: 139-46.
16. Kerbel R. Molecular origin of cancer-tumor angiogenesis. *The New Engl J Med*. 2008; 358: 2039-49.
17. Cimpean AM, Raica M, Suciuc C, Tatucu D, Sarb S, Muresan AM. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A) as individual prognostic factor in invasive breast

- carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008; 49: 303-8.
18. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, *et al.* Angiogenic and lymphangiogenesis microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol.* 2005; 18: 143-52.
19. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol. Histopathol.* 2008; 23: 601-7.