

Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* dan Peningkatan *Microvessel Density* pada Karsinoma Nasofaring Tidak Berkeratin

Muina¹, Salmiah Agus¹, Sukri Rahman²

¹Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas

²Bagian Telinga Hidung Tenggorokan, RSUP M. Djamil Padang

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma nasofaring (KNF) tidak berkeratin mempunyai prognosis yang buruk. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan biomolekuler penanda progresivitas pada KNF sehingga ekspresi VEGF ini digunakan sebagai marker biologis terapi target. VEGF berperan penting pada angiogenesis yang terlihat dengan peningkatan *microvessel density* (MVD). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi VEGF dan MVD pada KNF tidak berkeratin.

Metode

Penelitian analitik dengan menggunakan desain potong lintang komparatif pada 44 sampel blok parafin penderita KNF tidak berkeratin, didapatkan masing-masing 22 blok parafin subtype tidak berkeratin berdiferensiasi dan yang tidakberdiferensiasi. Masing-masing sampel dilakukan pemeriksaan ekspresi VEGF dan CD31 dengan metode pewarnaan imunohistokimia *Labeled Streptavidin Biotin Complex* dilakukan dengan prosedur manual. Antibodi primer yang digunakan adalah VEGF dan CD31 dari *Dako, Glostrup, Denmark*. Data dianalisis dengan uji statistik *chi-square*.

Hasil

Ekspresi VEGF ditemukan sebesar 68,2%. Pada KNF yang tidak berkeratin menunjukkan ekspresi VEGF didapatkan MVD tumor yang tinggi (66,7%). Secara statistik terdapat hubungan bermakna antara ekspresi VEGF dan MVD ($p=0,001$).

Kesimpulan

Ekspresi VEGF pada KNF tidak berkeratin menunjukkan peningkatan MVD.

Kata kunci: ekspresi VEGF, karsinoma nasofaring, MVD, subtype histopatologi tidak berkeratin.

ABSTRACT

Background

Non keratinized nasopharyngeal carcinoma (NPC) have a poor prognosis. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) is a biomolecular markers for malignancy NPC of VEGF expression has been used as a biological marker targeted therapy. VEGF plays important role in angiogenesis as seen as increasing *microvessel density* (MVD). This study aimed to analyze correlation between VEGF expression and MVD in NPC nonkeratinized.

Methods

Analytical research using cross-sectional comparative study in 44 samples anatomic pathology paraffin blocks of NPC patients, respectively 22 paraffin blocks of NPC are nonkeratinized differentiated and undifferentiated subtypes. Each sample examined VEGF and CD31 expression by *Labeled Streptavidin Biotin Complex* immunohistochemical staining methods. VEGF and CD31 primary antibody from *Dako, Glostrup, Denmark*. The data were analyzed by *chi-square* test.

Results

There were 68.2% positive VEGF expression. On NPC with VEGF expression showed higher MVD (66.7%). Statistically there is a significant correlation between expression VEGF and MVD ($p=0.001$).

Conclusions

VEGF expression on non keratinized KNF showed MVD increasing.

Key words: MVD, nasopharyngeal carcinoma, nonkeratinizing subtype, VEGF expression.

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah suatu karsinoma epitel skuamosa yang terjadi pada dinding lateral nasofaring.^{1,2} Penyebab tumor ganas ini bersifat multifaktorial yaitu letak geografis, kelainan genetik, etnis, makanan, paparan lingkungan dan infeksi virus Epstein Barr.^{1,3}

Menurut data epidemiologi, insiden KNF jarang ditemukan, rata-rata lebih kecil 0,5% dari seluruh karsinoma.^{4,5} Insiden KNF meningkat pada suku Kanton yang disebut sebagai manusia perahu yaitu 54,7 per 100.000 penduduk per tahun.⁴ Indonesia termasuk salah satu negara dengan prevalensi KNF yang tinggi, yaitu sebesar 6,2 per 100.000 penduduk per tahun.⁴ Data registrasi kanker Indonesia berdasarkan histopatologi tahun 2011 menunjukkan bahwa KNF menempati urutan pertama dari semua tumor ganas primer pada laki-laki.⁶ Menurut penelitian, ditemukan KNF tidak berkeratin sebanyak 99% di Hongkong dan 92% di Tunisia.

KNF merupakan tumor agresif yang mempunyai prognosis buruk. Hal ini disebabkan terlambatnya deteksi dini, kurangnya pemahaman mekanisme seluler, kurangnya penggunaan biomarker dan rendahnya respon terapi yang ada selama ini.² Angka harapan hidup pada KNF stadium I menunjukkan 72-90%, tetapi pada stadium III dan IV menurun sampai 55-30%. Hal itu tergantung rekurensi atau metastasis.² Angiogenesis merupakan proses fundamental pada pertumbuhan tumor, invasi dan metastasis.⁸⁻¹²

Vascular endothelial growth factor (VEGF) sebagai induksi primer angiogenesis dan menstimulasi proses ini dengan mengikat reseptor yang diekspresikan sel endotel yang berdekatan dengan tumor.^{9,12} Ekspresi VEGF pada sel-sel tumor distimulasi oleh *hypoxia-inducible transcription factor* (HIF), faktor pertumbuhan, hormon, sitokin, onkogen dan gen supresor tumor.⁹ Hal ini penting bagi pasokan oksigen, gizi dan proliferasi sel tumor serta potensi invasi dan metastasis karena pembuluh vaskuler yang baru terbentuk merupakan target inisiasi dari invasi sel tumor. Ekspresi VEGF menyebabkan peningkatan MVD tumor, yang akan menyebabkan KNF menjadi lebih progresif dan masuk pada stadium lanjut.^{9,12}

Ekspresi VEGF dihubungkan dengan stadium tumor yang lanjut, metastasis kelenjar limfe dan meningkatnya risiko kematian.¹² Penelitian menunjukkan bahwa MVD dan ekspresi

VEGF meningkat pada KNF stadium lanjut dibandingkan dengan stadium dini.¹³ Penelitian lain pada stadium lanjut menunjukkan ekspresi VEGF 66,9% yang dihubungkan dengan adanya metastasis ke kelenjar limfe dan kasus rekurensi.¹⁴ Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan antara ekspresi VEGF dan peningkatan MVD pada KNF subtype tidak berkeratin.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan desain *cross sectional comparative study*. Populasi penelitian adalah blok parafin yang telah didiagnosis KNF di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, RSUP M. Djamil Padang, RSI Ibnu Sina Padang, RSI Siti Rahmah Padang, RSU Ahmad Mochtar Bukit Tinggi pada Januari 2012- Desember 2014.

Sampel penelitian sebanyak 44 kasus merupakan sampel yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah semua blok parafin penderita KNF di lima tempat tersebut di atas dengan subtype KNF tidak berkeratin berdiferensiasi dan yang tidak berdiferensiasi. Kriteria eksklusi adalah kasus KNF yang blok parafinnya tidak ditemukan, atau blok parafinnya rusak atau tidak cukup mengandung jaringan untuk pemeriksaan VEGF dan CD31. Sampel didapatkan sebanyak 44 kasus dengan cara *simple random sampling*.

Kasus KNF dilakukan *review* berdasarkan klasifikasi WHO 2005. Karsinoma tidak berkeratin berdiferensiasi adalah tumor ganas berbentuk lembaran atau sarang-sarang dan sering dengan pertumbuhan plexiform terdiri atas sel-sel yang kohesif. Sel-sel tumor menunjukkan batas sel yang jelas dan masih ditemukan jembatan interseluler yang samar-samar. Karsinoma tidak berkeratin tidak berdiferensiasi adalah tumor yang tersusun berbentuk *syncytial* dengan batas sel yang tidak jelas. Inti besar bulat sampai oval, vesikuler, kromatin kasar dan nukleoli nyata.

Pemotongan ulang blok parafin dilakukan untuk pewarnaan imunohistokimia VEGF dan CD31 (untuk menilai MVD). Teknik pewarnaan imunohistokimia VEGF dan CD31 menggunakan metoda *Labeled Streptavidin Biotin Complex* dilakukan dengan prosedur manual. Antibodi primer yang digunakan adalah VEGF dan CD31 dari *Dako, Glostrup, Denmark* dengan pengenceran 1:100. Ekspresi VEGF

berdasarkan kriteria yaitu skor 0, ekspresi pada sel tumor kurang dari 10%. Skor 1 (+) ditemukan ekspresi pada sel tumor 11%- 20%. Skor 2 (++) jika ekspresi pada sel tumor 21%-50%. Skor 3 (+++) didapatkan ekspresi pada sel tumor lebih dari 50%. Ekspresi jika skor 1(+), 2 (++) dan 3 (+++) pada sitoplasma dan atau membran sel berwarna coklat.¹⁰

Microvessel density dinilai dengan ekspresi CD31, yang terwarnai coklat pada membran sel. Sel endotel yang terwarnai dihitung sebanyak lima lapang pandang yang berbeda pada setiap slaid. Skor rata-rata ditentukan dan digunakan sebagai hasil akhir. MVD yang tinggi jika didapatkan ≥ 25 sel endotel yang terwarnai sedangkan < 25 sel endotel yang terwarnai merupakan MVD yang rendah.

Data yang didapat diolah dan dianalisis dengan metode statistik yang sesuai. Analisis univariat, berupa deskripsi yaitu karakteristik umum dan subtype histopatologik KNF serta ekspresi VEGF. Analisis bivariat menggunakan uji statistik *chi-square* untuk menganalisis hubungan ekspresi VEGF dengan MVD pada KNF tidak berkeratin.

HASIL

Tabel 1. Perbedaan karakteristik umum dan subtype histopatologik.

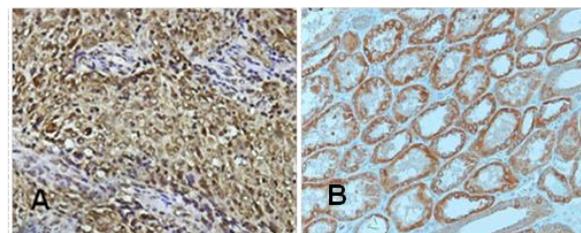
| Karakteristik | f | % |
|--|----|-------|
| Kelompok umur (tahun) | | |
| <30 | 11 | 13,25 |
| 30-39 | 10 | 12,5 |
| 40-49 | 30 | 36,14 |
| 50-59 | 26 | 31,33 |
| >60 | 6 | 7,23 |
| Jenis kelamin | | |
| Laki-laki | 54 | 65,1 |
| Perempuan | 29 | 34,9 |
| Subtipe histopatologik | | |
| Karsinoma sel skuamosa berkeratin | 0 | 0 |
| Karsinoma tidak berkeratin berdiferensiasi | 44 | 53 |
| Karsinoma tidak berkeratin tidak berdiferensiasi | 39 | 47 |
| Karsinoma sel skuamosa basaloid | 0 | 0 |
| Total | 83 | 100 |

Pada Tabel 1 ditemukan kelompok umur yang terbanyak adalah 40-49 tahun yaitu 36,14% dengan umur termuda ialah 12 tahun dan tertua 74 tahun. Jenis kelamin laki-laki lebih banyak ditemukan yaitu 65,1%. Subtipe histopatologik tidak berkeratin berdiferensiasi lebih banyak yaitu 53%.

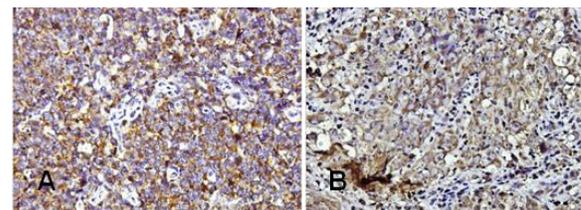
Tabel 2. Perbedaan ekspresi VEGF pada KNF subtype tidak berkeratin.

| Ekspresi VEGF | F | % |
|---------------|----|------|
| Positif | 30 | 68,2 |
| Negatif | 14 | 31,8 |

Tabel 2 memperlihatkan bahwa sebagian besar (68,2%) KNF subtype tidak berkeratin mengalami ekspresi VEGF. Gambaran mikroskopik ekspresi VEGF positif 3 pada KNF tidak berkeratin berdiferensiasi dan kontrol positif VEGF dapat dilihat pada Gambar 1 sedangkan yang tidak berdiferensiasi pada Gambar 2.



Gambar 1. Gambaran mikroskopik ekspresi VEGF pada KNF tidak berkeratin berdiferensiasi. A. Positif 3 ditandai warna coklat pada membran dan atau sitoplasma pada >50% sel tumor (pembesaran 400x); B. Kontrol positif VEGF pada ginjal normal (pembesaran 200x).



Gambar 2. Gambaran mikroskopik ekspresi VEGF pada KNF tidak berkeratin tidak berdiferensiasi. A. Positif 3 ditandai warna coklat pada membran dan atau sitoplasma pada >50% sel tumor (pembesaran 400x); B. Positif 2 ditandai warna coklat pada membran dan atau sitoplasma pada 21%-50% (pembesaran 400x).

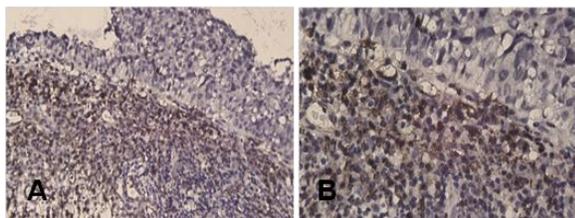
Tabel 3. Perbedaan ekspresi VEGF berdasarkan KNF subtype tidak berkeratin.

| Subtipe histopatologik | VEGF | | Total F (%) |
|--|---------------|---------------|-------------|
| | Positif F (%) | Negatif F (%) | |
| Tidak berkeratin berdiferensiasi | 16 (72,7) | 6 (27,3) | 22 (100) |
| Tidak berkeratin tidak berdiferensiasi | 14 (63,6) | 8 (36,4) | 22 (100) |

Tabel 4. Perbedaan MVD berdasarkan KNF sub tipe tidak berkeratin.

| Subtipe histopatologik | MVD | | Total F (%) |
|--|--------------|--------------|-------------|
| | Tinggi F (%) | Rendah F (%) | |
| Tidak berkeratin berdiferensiasi | 12 (54,5) | 10 (45,5) | 22 (100) |
| Tidak berkeratin tidak berdiferensiasi | 8 (36,4) | 14 (63,6) | 22 (100) |

Pada Tabel 3 menunjukkan ekspresi VEGF pada KNF tidak berkeratin berdiferensiasi yaitu 72,7% dan yang tidak berdiferensiasi 63,6%. Pada Tabel 4 menunjukkan bahwa pada KNF subtipe tidak berkeratin berdiferensiasi mempunyai MVD yang tinggi sebesar 54,5%. Gambaran mikroskopik MVD dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Gambaran mikroskopik MVD yang terwarnai coklat (membran sel) dengan CD31. A MVD yang tinggi (pembesaran 200x); B. MVD yang tinggi (pembesaran 400x).

Tabel 5. Hubungan ekspresi VEGF dengan MVD.

| VEGF | MVD | | Total F (%) |
|---------|--------------|--------------|-------------|
| | Tinggi F (%) | Rendah F (%) | |
| Positif | 20 (66,7) | 10 (33,3) | 30 (100) |
| Negatif | 0 (0) | 14 (100) | 14 (100) |

p = 0,001

Pada Tabel 5 menunjukkan KNF dengan ekspresi VEGF didapatkan MVD yang tinggi sebesar 66,7% sedangkan pada yang tidak mengalami ekspresi VEGF tidak satupun dengan nilai MVD yang tinggi. Secara statistik terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan MVD dengan nilai p=0,001.

DISKUSI

Pada penelitian ini ditemukan KNF subtipe histopatologik tidak berkeratin berdiferensiasi yaitu 53% dan KNF tidak berkeratin tidak berdiferensiasi yaitu 47%. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa kasus KNF subtipe tidak berkeratin

berdiferensiasi 66%,¹⁰ dan 23%¹⁵ dan yang tidak berkeratin tidak berdiferensiasi 34%¹⁰ dan 68,4%.¹⁵ Hal tersebut diduga penyebab tumor ganas yang bersifat multifaktorial menurut perbedaan letak geografis, kelainan genetik, etnis, makanan, paparan lingkungan dan infeksi virus Epstein Barr serta nitrosamin.^{1,3}

Penelitian ini menemukan insiden KNF 1,86:2 pada laki-laki dibandingkan perempuan. Peneliti terdahulu melaporkan insiden 3:1.5¹⁶; dan 2,89:1.¹⁰ Hal ini diduga oleh paparan rokok, paparan debu kayu yang lebih banyak pada laki-laki.

Pada penelitian ini dilaporka kelompok umur 40-49 tahun 65,1%). Umur termuda kasus KNF adalah 12 tahun sedangkan yang tertua 74 tahun. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa KNF dapat mengenai semua umur dengan insiden meningkat setelah umur 30 tahun dan mencapai puncak pada umur 40-60 tahun;^{5,17} dan 32,9%.¹⁸ Hal ini diduga karena paparan karsinogen membutuhkan waktu yang cukup lama sampai terjadinya suatu keganasan.

Pada penelitian ini ekspresi VEGF KNF tidak berkeratin berdiferensiasi didapatkan 68,2%, berkeratin dan berdiferensiasi 31,8%, sedangkan berdasarkan subtipe tidak berkeratin berdiferensiasi didapatkan 16 kasus (72,7%) dan subtipe tidak berkeratin tidak berdiferensiasi 14 kasus (63,6%). Berdasarkan MVD ditemukan KNF subtipe tidak berkeratin berdiferensiasi 54,5% dan tidak berkeratin tidak berdiferensiasi 36,4%. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa KNF tidak berkeratin mempunyai perilaku yang lebih agresif dan tingkat proliferasi lebih tinggi dibanding subtipe berkeratin;¹⁸ dan dihubungkan dengan metastasis ke kelenjar limfe.¹³

KNF dengan ekspresi VEGF didapatkan MVD 66,7% sedangkan yang tidak mengalami ekspresi VEGF tidak satupun menunjukkan nilai MVD yang tinggi, yang secara statistik menunjukkan hubungan pada nilai p=0,001. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa KNF stadium III dan IV ditemukan ekspresi VEGF dan MVD yang meningkat tetapi secara statistik ditemukan hubungan yang tidak bermakna (p>0,05);^{13,18}

Karsinogenesis dan progresivitas tumor tergantung pada pembentukan pembuluh vas-kuler baru sekitar tumor yang diregulasi oleh VEGF di mana VEGF ini dilepaskan oleh sel-sel tumor. *Microvessel density* (MVD) digunakan untuk menilai progresi suatu tumor; sehingga

MVD yang tinggi dihubungkan dengan faktor prognosis yang buruk. Invasi dan metastasis pada KNF menunjukkan adanya hubungan yang erat antara MVD yang tinggi dan ekspresi VEGF; sehingga hal ini dapat digunakan untuk memprediksi terjadinya metastasis pada pasien KNF.

Pada penelitian ini ditemukan ekspresi VEGF dan MVD yang tinggi pada KNF tidak berkeratin. Hal ini menunjukkan adanya prognosis buruk dan mempunyai progresifitas yang tinggi.

KESIMPULAN

Eksresi VEGF pada KNF tidak berkeratin menunjukkan peningkatan MVD.

DAFTAR PUSTAKA

1. Zeng MS, Zeng YX. Pathogenesis and etiology of nasopharyngeal carcinoma. In: Lu JJ, Cooper JS, Lee AWM, editors. Nasopharyngeal cancer multidisciplinary management. Berlin Heidelberg: Springer; 2010.
2. Tulalamba W, Janvilisri T. Nasopharyngeal carcinoma signaling pathway: an update on molecular biomarkers. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012: 594681. Doi:10.1155/2012/594681 Epub 2012 Mar 5.
3. Lutzky VP, Moss DJ, Chin D, Coman WB, Parsons PG, Boyle GM. Biomarkers for cancers of the head and neck. *Clin Med ENT.* 2008; 1: 5-15.
4. Adham M, Kurniawan AN, Muhtadi IK, Roezin A, Hermani B, Gondhowiarjo S, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chin J Cancer.* 2012; 31: 185-96.
5. Thompson LDR. Malignant neoplasma of the nasal cavity, paranasal sinuses and nasopharynx. In Goldblum JR, editor. *Head and Neck Patholog.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
6. Badan registrasi kanker perhimpunan dokter spesialis patologi anatomi. Kanker di Indonesia tahun 2011 data histopatologik. Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI. Jakarta: Yayasan Kanker Indonesia; 2012.
7. Chan, JKC, Pilch, BZ, Wenig, BM & Lee, AWM. Tumor of the nasopharynx. In Barnes, L, Eveson, JW, Reichart, P & Sidranky, D

- editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetic of Head and Neck Tumours.* France: IARC Press, Lyon; 2005.
8. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev Med.* 2006; 57:1-18.
9. Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Oncol Hematol Rev.* 2007; 62: 179-213.
10. Li YH, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Hou JH, Xie D, *et al.* Elevated expressions of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Translat Med.* 2008; 6: 1-11.
11. Oh SH, Kim WY, Lee OH, Kang JH, Woo JK, Kim JH, *et al.* IGFBP-3 supresses VEGF expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2012; 103: 1259-66.
12. Troy DJ, Weissfeld LJ, Youk OA. Expression of EGFR, VEGF, and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck Pathol.* 2013; 7: 344-55.
13. Wu HG, Sunagawa M, En LJ, Shimada S, Gang Z, Tokeshi Y, *et al.* The relationship between microvessel density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the extension of nasopharyngeal carcinoma. *The Laryngoscope.* Lippincott Williams & Wilkins Inc; 2000.
14. Sha D, He YJ. Expression and clinical significance of VEGF and its receptors Flt-1 and KDR in nasopharyngeal carcinoma. *Ai Zheng.* 2006; 25(2): 229-34.
15. Fachiroh J, Sangrajang S, Johansson M, Renard H, Gaborieau V, Chindavijak ACS, *et al.* Tobacco consumption and genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma (NPC) in Thailand. *Cancer Causes Control.* 2012; 23: 1995-2002.
16. Slootweg PJ, Richardson M. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive system. In Gnepp DR, editor. *Diagnostic surgical pathology of the head and neck.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2009.
17. Ren ZF, Liu WS, Qin HD, Xu YF, Yu DD, Feng QS, *et al.* Effect of family history of cancers and environmental factors on risk of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China. *Cancer Epidemiol.* 2010; 39: 419-24.

Eksresi Vascular Endothelial Growth Factor dan Peningkatan
Muina, Salmiah Agus, Sukri Rahman

18. Kurnianda J, Hardianti MS, Harijadi, Hariadi
KWT, Purwanto I, Haryana SM, *et al.*
Elevation of vascular endothelial growth

factor in Indonesia advanced stage
nasopharyngeal carcinoma. Kobe J Med
Sci. 2009; 55: 36-44.