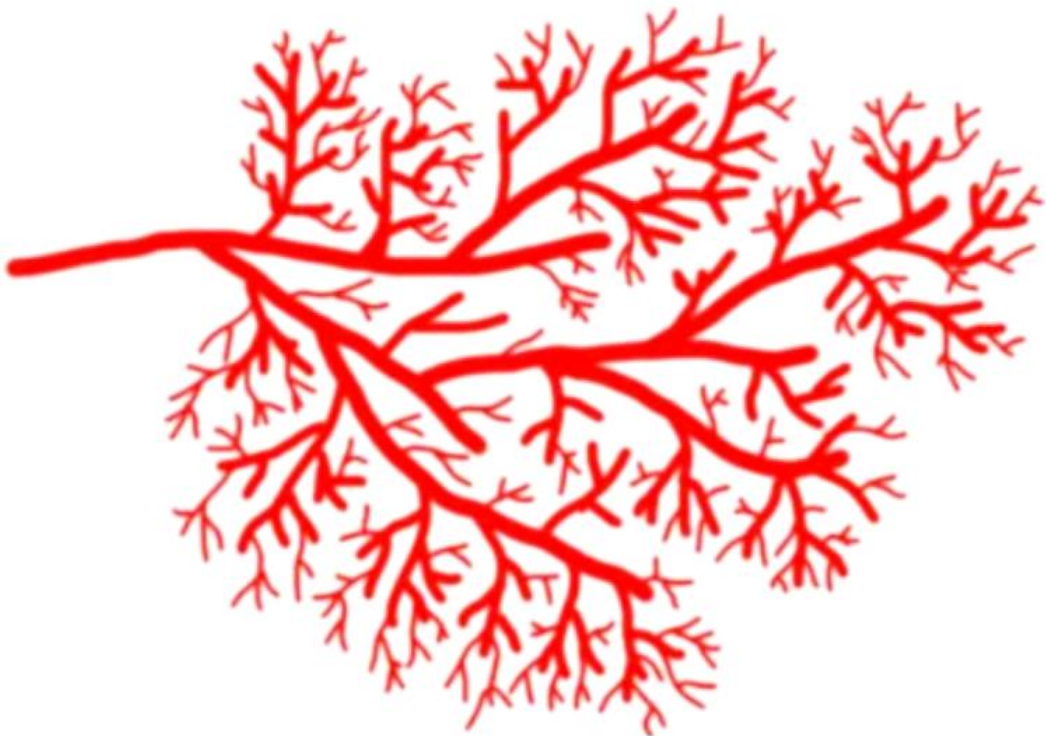


ANTI-ANGIOGENESIS SEBAGAI TARGET TERAPI KANKER KOLOREKTAL

(Buku ini disusun dengan latar belakang penelitian penulis mengenai angiogenesis kanker)



Rahmawati Minhajat

KATA SAMBUTAN

Saya mengucapkan selamat kepada penulis atas diterbitkannya buku ini yang berjudul “Anti-angiogenesis sebagai target terapi kanker kolorektal”, dimana buku ini disusun sangat terkait dengan latar belakang kompetensi penulis dan juga didasari oleh hasil-hasil penelitian penulis baik selama masa pendidikan doktoral di Japan maupun setelahnya.

Kejadian kanker terus meningkat sehingga berdampak pada peningkatan morbiditas dan mortalitas, oleh karena itu diperlukan penelitian yang lebih luas untuk mendapatkan terapi yang efektif untuk pasien kanker. Buku ini ditulis oleh penulis yang mempunyai latar belakang keahlian klinis dan riset serta publikasi mengenai kanker sehingga dapat dijadikan sumber informasi dan kepustakaan yang tepat bagi mahasiswa, dosen, peneliti serta dokter umum dan spesialis.

Saya berharap buku ini dapat bermanfaat dalam menambah pengetahuan dan berdampak pada proses edukasi, peningkatan minat meneliti dalam bidang terkait dan lebih jauh akan berdampak pada penurunan morbiditas dan mortalitas kanker.

Makassar, November 2020.

Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS,

Prof. Dr. Budu, Ph.D, SpM (K)

PENGANTAR PENULIS

Kanker kolorektal adalah penyakit keganasan usus besar, umumnya berasal dari sel mukosa normal yang berubah menjadi adenoma dan selanjutnya secara progresif menjadi karsinoma. Kanker kolorektal menjadi permasalahan global dimana berdasarkan data terkini, secara umum kanker kolorektal menempati urutan ketiga terbanyak insiden kanker dan urutan kedua penyebab kematian akibat kanker (IARC, Globocan 2018).

Pertumbuhan dan metastasis kanker kolorektal sangat dipengaruhi oleh adanya angiogenesis. Angiogenesis pada kanker merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah setempat yang ada disekitar tumor primer. Angiogenesis memungkinkan pertumbuhan sel kanker dan metastasis melalui tersedianya nutrisi dan oksigen untuk sel kanker dan jaringan sekitarnya, dan juga sebagai sarana metastasis. Implikasi klinis yang paling penting dari ditemukannya angiogenesis pada kanker adalah pengembangan terapi anti-angiogenesis yang saat ini sudah digunakan pada kasus kanker tertentu, yaitu sebagai terapi yang targetnya menghambat pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) di disekitar tumor.

Tujuan utama penulisan dan penerbitan buku ini adalah memberikan informasi yang lebih detail dan terkini mengenai target terapi anti-angiogenesis khususnya pada kanker kolorektal yang terkait dengan hasil penelitian penulis. Kami berharap buku ini akan bermanfaat bagi pembacanya.

Makassar, November 2020
Penulis,

Rahmawati Minhajat

DAFTAR ISI

1. Bab I. Pendahuluan.....	5
2. Bab II. Karsinogenesis Kanker Kolorektal.....	8
3. BAB III. Metastasis Kanker Kolorektal.....	13
4. BAB IV. Gejala Klinis Kanker Kolorektal.....	16
5. BAB V. Prognosis Kanker Kolorektal.....	18
6. BAB VI. Angiogenesis Pada Kanker.....	19
7. BAB VII. Peranan Angiogenesis Pada Pertumbuhan Tumor.....	32
8. BAB VIII. Peranan Angiogenesis Pada Metastasis Kanker Kolorektal.....	36
9. BAB IX. Angiogenesis Sebagai Target Terapi Kanker Kolorektal.....	39
10. BAB X. Terapi Anti-Angiogenesis Kanker Kolorektal.....	45
11. BAB XI. Pembahasan Singkat Hasil Penelitian Penulis.....	49
12. Daftar Pustaka.....	56

BAB I

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh terjadinya pertumbuhan sel yang tidak normal, dimana pertumbuhan sel terjadi secara cepat dan tanpa kendali. Karsinogenesis adalah proses di mana sel-sel normal bertransformasi menjadi sel kanker. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya perubahan pada tingkat genetik, epigenetik dan seluler secara progresif yang selanjutnya akan memprogram ulang sel tersebut sehingga terjadi pembelahan sel yang tidak terkontrol dan membentuk massa ganas (Hanahan D et al,2000; Coleman WB, 2006).

Kanker kolorektal (KKR) adalah penyakit keganasan usus besar, umumnya berasal dari sel mukosa normal yang berubah menjadi adenoma dan selanjutnya secara progresif menjadi karsinoma, dimana sebagian besar KKR muncul melalui proses tersebut, meskipun sebagian kecil dapat terjadi secara *de novo* (Fearon ER et al, 1990). Secara umum KKR merupakan hasil dari rangkaian perubahan genetik (*multistep carcinogenesis*) yang muncul sebagai konsekuensi adanya akumulasi dari instabilitas genetik dan epigenetik yang merubah sel epitel kolon normal menjadi sel karsinoma. Hilangnya stabilitas genomik yang menghasilkan perubahan pada gen merupakan langkah kunci terjadinya perubahan molekuler pada tahap awal proses karsinogenesis kolorektal. Ada dua kelompok perubahan molekuler pada instabilitas genetik KKR yaitu instabilitas kromosom (*chromosomal instability*) dan instabilitas mikrosatelit (*microsatellite instability*). Dilaporkan juga adanya instabilitas epigenetik pada karsinogenesis KKR terutama adanya metilasi DNA yang menyimpang (*aberrant DNA methylation*) (Tejpar S et al 2002; Weitz J et al 2005). Kanker kolorektal dipicu oleh suatu seri mutasi dan perubahan genetik yang menyebabkan sel normal mukosa kolon mengalami transformasi menjadi adenoma dan selanjutnya secara progresif menjadi sel-sel yang ganas. Mutasi gen tersebut tidak hanya menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol tetapi selanjutnya juga dapat merubah struktur disekitarnya antara lain hilangnya *intercellular adhesion*, ekspresi enzim-enzim yang

merusak membran basalis, peningkatan motilitas sel dan juga kemampuan sel kanker tersebut untuk bertumbuh ditempat yang jauh (Tejpar S et al 2002; Weitz J et al 2005).

Berdasarkan data WHO 2018, insiden kanker di seluruh dunia sebanyak 18.1 juta (17%) dan yang meninggal sebanyak 9,5 juta pasien, dan diprediksi bahwa insiden kanker pada tahun 2040 akan meningkat menjadi 29,9 juta kasus. Kanker kolorektal menjadi permasalahan global, dimana secara umum (untuk kedua jenis kelamin) KKR menempati urutan ketiga (10,2%) terbanyak insiden kanker dan menempati urutan kedua (9,2%) penyebab kematian akibat kanker. Bila dibedakan berdasarkan jenis kelamin, insiden KKR menempati urutan ke-tiga (10,9%) pada laki-laki dan menempati urutan ke-dua (9,5%) pada perempuan. Berdasarkan mortalitasnya, KKR menempati urutan ke-empat (9%) pada laki-laki dan urutan ke-tiga (9,5%) penyebab kematian akibat kanker pada perempuan (IARC, Globocan 2018). Sekitar 55% KKR terjadi di negara maju, namun 52% angka kematian teruma terjadi di negara berkembang. Ada variasi geografis yang luas dalam insiden di seluruh dunia dan pola geografis yang sangat mirip pada pria dan wanita. Di Negara Barat, KKR lebih sering pada usia diatas 50 tahun, akan tetapi di Indonesia banyak ditemukan pada usia yang lebih muda serta tidak ditemukan perbedaan signifikan antara insiden KKR pada perempuan dan laki-laki (Sudoyo AW et al,2010; WHO 2012).

Kanker kolorektal cenderung menyebar secara lambat dan tetap terlokalisir untuk waktu yang lama. Dengan demikian kanker kolorektal berpotensi untuk dapat diterapi, tentunya apabila terdeteksi secara dini dan segera diterapi sebelum menyebar ke jaringan sekitarnya, ke kelenjar getah bening atau ke organ lain sehingga harapan hidup dapat ditingkatkan. Dilaporkan bahwa dari semua pasien yang terdiagnosis KKR, sekitar 70% *resectable* untuk penyembuhan pada presentasi awal, akan tetapi sekitar 30-50% kambuh, dimana 60-80% kekambuhan terjadi pada 2 tahun pertama setelah reseksi dan 90% kekambuhan terjadi dalam 4 tahun pertama setelah reseksi (Jong Pil Ryuk, 2014).

Secara luas dikenal ada dua tipe KKR yaitu tipe sporadik (70%) dan herediter (30%), dimana baik yang bersifat sporadik maupun herediter disebabkan oleh akumulasi dari mutasi sejumlah gen (Fearon ER et al, 1990: Mármol I et al, 2017). Kanker kolorektal tumbuh secara lambat dan membutuhkan waktu yang lama sampai timbulnya gejala, akan tetapi beberapa kasus tanpa gejala dapat terdeteksi pada saat skrining. Manifestasi klinik kanker kolorektal tergantung pada besar dan lokasi tumor. Kebanyakan kasus KKR sudah berada pada stadium lanjut pada saat terdiagnosis sehingga prognosinya juga menjadi lebih buruk. Penyebab utama kematian pada KKR adalah akibat terjadinya metastasis. Ada beberapa mekanisme terjadinya metastasis pada KKR yaitu melalui invasi langsung, transperitonium, hematogen dan limfogen, dimana metastasis jauh KKR terbanyak ditemukan di hati. Salah satu jalur metastasis adalah secara hematogen melalui neovascular angiogenesis, dimana untuk dapat bermetastasis sel-sel kanker harus mengembangkan jaringan vaskular. Angiogenesis tidak hanya menyediakan nutrisi bagi tumor untuk tumbuh tetapi juga menyiapkan sarana sebagai jalan keluar bagi sel-sel tumor untuk bermetastasis (Bielenberg DR et al, 2015). Oleh karena itu, angiogenesis dijadikan salah satu target terapi kanker kolorektal yang dapat memberikan hasil terapi yang lebih baik.

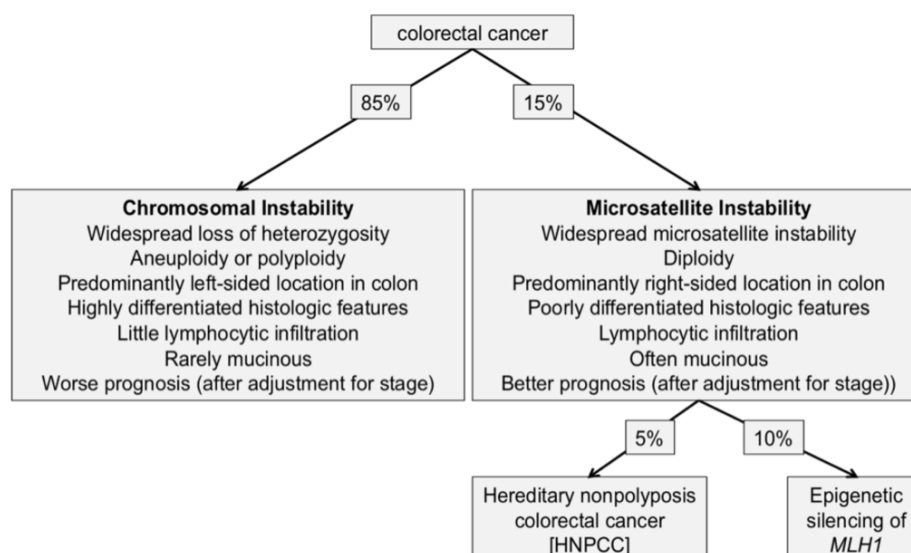
BAB II

KARSINOGENESIS KANKER KOLOREKTAL

Pada keadaan normal, proses proliferasi sel mukosa kolorektal akan terjadi sesuai dengan kebutuhan melalui siklus sel normal yang dikendalikan secara terpadu oleh fungsi proto-onkogen, gen supresor tumor, dan gen *gatekeeper* secara seimbang. Jika terjadi ketidakseimbangan fungsi ketiga gen ini, atau salah satu tidak berfungsi dengan baik karena mutasi, maka keadaan ini akan menyebabkan penyimpangan siklus sel. Pertumbuhan sel tidak normal pada proses terbentuknya kanker dapat terjadi melalui tiga mekanisme, yaitu perpendekan waktu siklus sel sehingga akan menghasilkan lebih banyak sel dalam satuan waktu, penurunan jumlah kematian sel akibat gangguan proses apoptosis, dan masuknya kembali populasi sel yang tidak aktif berproliferasi ke dalam siklus proliferasi. Gabungan mutasi dari ketiga kelompok gen tersebut akan menyebabkan penyimpangan siklus sel, yang sering terjadi adalah mutasi gen yang berperan dalam mekanisme kontrol sehingga tidak berfungsi baik, akibatnya sel akan bertumbuh tanpa kontrol (yang sering terjadi pada manusia adalah mutasi gen p53). Akhirnya akan terjadi pertumbuhan sel yang tidak diperlukan, tanpa kendali yang merupakan awal dari proses karsinogenesis.

Secara umum, KKR merupakan hasil dari rangkaian perubahan genetik (*multistep carcinogenesis*) yang muncul sebagai konsekuensi adanya akumulasi dari instabilitas genetik dan epigenetik yang merubah sel epitel kolon normal menjadi sel karsinoma. Hilangnya stabilitas genomik yang menghasilkan perubahan pada gen merupakan langkah kunci terjadinya perubahan molekular pada tahap awal proses tumorigenesis kolorektal. Banyak kelainan genetik yang dikaitkan dengan keganasan kolorektal, diantaranya adalah sindroma polyposis. Namun demikian, sindroma polyposis hanya terhitung <1% dari semua kanker kolorektal. Selain itu, terdapat *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC* atau *syndrome lynch*) terhitung 2-3% dari kanker kolorektal. Kanker kolorektal terjadi sebagai

akibat kerusakan genetik pada lokus yang mengontrol pertumbuhan sel. Perubahan dari kolonosit normal menjadi jaringan adenomatosa dan akhirnya menjadi karsinoma melibatkan sejumlah mutasi gen yang mempercepat pertumbuhan sel. Terdapat dua mekanisme yang menimbulkan instabilitas genom dan berujung pada terjadinya KKR, yakni : instabilitas kromosom (*chromosomal instability*) dan instabilitas mikrosatelit (*microsatellite instability*). Dilaporkan juga adanya instabilitas epigenetik pada KKR terutama adanya metilasi DNA yang menyimpang (*aberrant DNA methylation*). Namun, meskipun telah ditemukan sejak dua dekade terakhir tetapi penelitian mengenai epigenetik ini belum dilakukan secara luas. Umumnya KKR melalui mekanisme *Chromosomal Instability (CIN)* yang menyebabkan penyebaran materi genetik yang tidak berimbang pada anak sel sehingga timbul aneuploidy. *Microsatellite Instability (MIN)* adalah suatu kondisi hipermutabilitas genetik (presidiposisi mutasi) disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *mismatch repair (MMR)* yaitu gen yang berperan mengenali dan memperbaiki kesalahan atau ketidakcocokan yang terjadi selama proses replikasi DNA dan rekombinasi, dan juga memperbaiki beberapa bentuk kerusakan DNA. Hal tersebut berkaitan erat dengan mekanisme terbentuknya kanker pada HNPCC.



Gambar 1. *The two genetic pathways of colorectal cancer (modified from de la Chapelle, NEJM 2003).*

Instabilitas Kromosom (*Chromosomal Instability/CIN*)

Sekitar 65-70% kasus KKR sporadik terjadi melalui jalur CIN yang ditandai oleh adanya ketidakseimbangan yang luas pada jumlah kromosom (aneuploidi) dan hilangnya heterozigositas (Loss of Heterozygosity/LOH). Hal ini dapat terjadi akibat defek pada segregasi kromosom, stabilitas telomerase, dan respon kerusakan DNA.

Awalnya proses kejadian KKR yang melibatkan mutasi somatik terjadi pada gen *adenomatous polyposis coli* (APC). Gen APC mengatur kematian sel, dimana mutasi pada gen ini menyebabkan proliferasi yang tidak terkontrol dan selanjutnya berkembang menjadi adenoma. Mutasi pada protoonkogen selular K-ras yang biasanya terjadi pada adenoma kolon yang berukuran besar akan menyebabkan gangguan pertumbuhan sel yang tidak normal. Transisi dari adenoma ke karsinoma merupakan akibat mutasi gen supresor tumor p53. Dalam keadaan normal protein dari gen p53 menyebabkan sel dengan kerusakan DNA tetap dapat mengalami replikasi yang menghasilkan sel-sel dengan kerusakan DNA yang lebih parah. Replikasi sel-sel dengan kehilangan sejumlah segmen pada kromosom yang berisi beberapa alel (misalnya *loss of heterozygosity*). Hal ini dapat menyebabkan kehilangan gen supresor tumor yang lain seperti *Deleted in Colon Cancer* (DCC) yang merupakan tahap akhir dari transformasi ke arah keganasan. Karsinogenesis kolon tidak selalu membutuhkan semua jenis mutasi diatas dan tampaknya masih ada kerusakan genetik yang lain yang berperan namun belum ditemukan saat ini. Bagaimanapun juga model mutasi gen yang dijelaskan diatas dapat menjadi kerangka konsep untuk memahami proses karsinogen KKR.

Instabilitas mikrosatelit (MSI)

Pada instabilitas mikrosatelit terjadi peningkatan risiko terjadinya mutasi yang mempengaruhi satu atau lebih pasangan basa DNA secara acak sepanjang genom. Penyebab MSI dikaitkan dengan hilangnya fungsi sistem DNA MMR (*mismatch repair*). Korelasi antara MSI dan inaktivasi sistem MMR dimana MSI terjadi pada 15% -20% KKR sporadis dan lebih dari 95% pada

pasien dengan sindrom Lynch, suatu sindrom famili KKR yang menyebabkan peningkatan risiko KKR, hal tersebut menunjukkan bahwa inaktivasi famili gen MMR adalah penyebab KKR dengan mikrosatelit yang tidak stabil. Sebaliknya, pada sebagian besar KKR, mekanisme yang bertanggung jawab menyebabkan terjadinya CIN dan *CpG island methylator phenotype* (CIMP) masih diidentifikasi. Dengan demikian, MSI merupakan penanda hilangnya aktivitas DNA MMR. Pada analisis DNA tumor, sudah jelas bahwa dalam beberapa tumor, urutan genetik dengan urutan nukleotida berulang singkat dapat menjadi lebih pendek atau lebih panjang jika dibandingkan dengan DNA nontumor dari individu yang sama.

Suatu mikrosatelit dapat memanjang pada sel anak jika ada pengulangan pasangan nukleotida sepanjang untai baru yang disintesis selama sintesis DNA atau dapat memendek jika untai cetakan mikrosatelit menghilang selama replikasi DNA. Perubahan pada panjangnya mikrosatelit pada DNA genomik disebut sebagai MSI. Di laboratorium, MSI diidentifikasi dengan menggunakan elektroforesis. Meskipun sistem DNA MMR mengenali dan secara langsung memperbaiki nukleotida tunggal yang mengalami *mismatch*, aspek ini biasanya tidak tampak ketika memeriksa MSI tumor. Jika ketidakcocokan (*mismatch*) muncul pada lokasi coding regio gen tertentu, titik baru mutasi akan terbentuk dan dapat mempengaruhi ekspresi dan /atau fungsi gen. Proses mutasi DNA awalnya bersifat acak pada MSI kanker mempengaruhi setiap mikrosatelit yang rentan pengulangan; namun, pada akhirnya klon yang mengalami mutasi pada gen regulator sehingga menguntungkan untuk pertumbuhan dan promosi pembentukan kanker. Berbeda dengan kanker kolorektal yang sporadik, HNPCC adalah akibat dari instabilitas mikrosatelit dimana mutasi pada gen MMR (*mismatch repair*) yang berfungsi memperbaiki gangguan replikasi DNA dan berakibat pada pembentukan kanker. Protein yang dihasilkan oleh gen-gen MMR dapat mendeteksi dan memperbaiki gangguan replikasi DNA pada sel (fase pasca mitosis). Sel-sel yang kehilangan aktivitas perbaikan ketidakcocokan (MMR) ini tampaknya masih memerlukan mutasi sebelum mengalami karsinogenesis oleh karena semua sel kolon memiliki satu gen lengkap maka mutasi somatik kedua diperlukan sebelum fungsi MMR hilang. Mekanisme *second hit* ini yang

menjelaskan tidak munculnya polyposis pada HNPCC. HNPCC dapat dibedakan dari kanker kolorektal sporadik biasanya muncul pada usia lebih muda (± 40 tahun), risiko mendapat tumor sinkronous lebih tinggi, letak tumor sebelah kanan dan lebih sering tumor mucinosa. HNPCC dibagi dalam 2 varian yaitu sindroma Lynch I dan II. *Syndroma Lynch I* terisolir, kanker kolorektal muncul awal sedangkan *syndroma Lynch II*, bersamaan dengan karsinoma di tempat lain (misalnya endometrium, ovum, traktus digestivus).

BAB III

METASTASIS KANKER KOLOREKTAL

Penyebab utama kematian pada KKR adalah akibat adanya metastasis. Terjadinya metastasis melibatkan interaksi yang sangat kompleks antar sel tumor sendiri dengan matriks ekstraselluler, membrana basalis, dan reseptor pada endotel vaskuler serta sel imun tubuh. Selain hal tersebut, metastasis juga dipengaruhi oleh topografi anatomi dan tempat sel bermetastasis. Walaupun topografi anatomi sangat berperan, namun masih banyak hal yang tidak dapat dijelaskan pada terjadinya metastasis. Metastasis KKR dapat terjadi melalui proses invasi langsung, transperitoneal, hematogen dan limfogen. Konsep dasar terjadinya metastasis diawali oleh proses terlepasnya sel-sel tumor dari kelompoknya (*detachment*) yang disertai oleh rusaknya *adhesion molecule* sehingga sel tumor dapat menembus matrix extracellular (ECM) yang berada di sekitar sel tumor yang selanjutnya proses metastasis akan dipengaruhi oleh adanya pelepasan *angiogenic growth factors*, pelepasan *lymphangiogenic growth factors*, dan juga adanya pengaruh faktor mekanik, pelepasan enzim proteolitik serta motilitas sel kanker. Penelitian membuktikan bahwa pada KKR terjadi disfungsi *epithelial cadherin* (*E-cadherin*) yang merupakan *adhesion molecule* yang menyebabkan terjadinya peregangan antar sel-sel tumor primer. Lebih jauh dilaporkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi marker-marker angiogenesis dan limfangiogenesis pada KKR.

Kebanyakan pasien KKR dengan metastasis juga terjadi metastase ke hepar. Metastasi dapat terjadi melalui rute vena mesenterial, vena kolika atau vena mesenterika inferior dan vena porta, sel-sel kanker akhirnya sampai ke hepar. Aliran limfe berjalan melalui saluran limfe di mesenterium yang berada di sepanjang arteri dan vena. Di dalam mesenterium kebanyakan metastase kelenjar limfe terdapat di sepanjang aorta. Penyebaran dapat juga terjadi di dalam rongga peritoneum karena sel-sel tumor yang tumbuh menembus sampai di serosa terlepas dan melekat pada peritoneum dan bertumbuh lanjut. Selain itu, hipotesis “*seed and soil*”

menggambarkan tropisme tumor tertentu untuk organ tertentu. Ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa tumor tertentu memiliki reseptor faktor pertumbuhan spesifik yang biasanya dikeluarkan dari jaringan organ tertentu. Sebagai contoh, sel-sel kanker kolon yang mengekspresikan reseptor cMET yang berada di hati sehingga kecenderungan sel kanker bermetastasis ke hati.

Tiga mekanisme terjadinya metastasis yaitu melalui invasi lokal, angiogenesis dan lymphangiogenesis. Satu faktor prognostik terpenting pada KKR adalah penyebaran (stadium) tumor pada saat diagnosis ditetapkan yang sekaligus penting untuk penentuan tindakan yang akan diambil. Lebih jauh, prognosis buruk KKR dihubungkan dengan adanya penyebaran ke limfonodus jika dibandingkan bila penyebaran hanya terbatas pada dinding kolon. Dengan adanya metastasis ke limfonodus, *5-years survival* akan menurun dari 90% ke 60%, mendukung bahwa hal tersebut sangat mempengaruhi prognosis KKR. Metastasis ke limfonodus regional ditemukan pada 40-70% kasus pada saat direseksi. Invasi ke pembuluh darah vena ditemukan pada lebih 60% kasus. Metastasis sering ke hepar, cavum peritoneum, paru-paru, diikuti kelenjar adrenal, ovarium dan tulang. Metastasis ke otak sangat jarang karena jalur limfatik dan vena dari rektum menuju vena cava inferior maka metastasis kanker rektum lebih sering muncul pertama kali di paru-paru. Berbeda dengan kolon dimana jalur limfatik dan vena menuju vena porta maka metastasis kanker kolon pertama kali paling sering di hepar.

Angiogenesis sangat berperan pada pertumbuhan KKR dan metastasis. Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah setempat yang ada disekitar tumor melalui mekanisme *sprouting*. Angiogenesis memungkinkan pertumbuhan tumor dan metastasis melalui tersedianya nutrisi dan oksigen untuk sel tumor dan jaringan sekitarnya, dan juga sarana dimana sel dapat lepas dari tumor primernya dan melalui aliran darah akan bermetastasis ketempat yang lebih jauh. Dilaporkan bahwa pertumbuhan tumor dan metastasis sangat tergantung pada tumor angiogenesis, dimana tumor tidak dapat

bertumbuh lebih dari 1-2 mm dalam diameter tanpa adanya angiogenesis dan dilaporkan pula bahwa peningkatan tumor angiogenesis dihubungkan dengan prognosis buruk.

BAB 1V

GEJALA KLINIS KANKER KOLOREKTAL

Gejala umum KKR meliputi; perdarahan pada usus besar, ditandai dengan ditemukannya darah pada feces saat buang air besar, perubahan kebiasaan buang air besar meliputi frekwensi dan konsistensi (diare atau sembelit) tanpa sebab yang jelas, berlangsung lebih dari enam minggu, ada penurunan berat badan tanpa sebab yang jelas, rasa sakit di perut atau bagian belakang, perut masih terasa penuh meskipun sudah buang air besar, kadang-kadang kanker dapat menyebabkan obstruksi pada usus besar yang tampak pada beberapa gejala seperti kesakitan, sulit buang air besar dan rasa kembung.

Tanda dan gejala KKR berdasarkan letaknya; usus besar secara klinis dibagi menjadi bagian kiri dan kanan sejalan dengan suplai darah yang diterima. Arteri mesenterika superior memperdarahi bagian kanan (caecum, kolon asenden dan dua pertiga proksimal kolon transversum), dan arteri mesenterika inferior yang memperdarahi belahan kiri (sepertiga distal kolon transversum, kolon desenden dan sigmoid, dan bagian proksimal rektum). Tanda dan gejala dari KKR sangat bervariasi dan tidak spesifik. Keluhan utama pasien dengan KKR berhubungan dengan besar dan lokasi dari tumor. Kanker yang berada pada kolon kanan, dimana isi kolon berupa cairan, cenderung tetap tersamar hingga kondisi lanjut. Kecil kecenderungan menyebabkan obstruksi karena lumen usus lebih besar dan feces masih encer. Gejala klinis sering berupa rasa penuh, nyeri abdomen, perdarahan dan simptomatik anemia (menyebabkan kelemahan, pusing dan penurunan berat badan). Kanker yang berada pada kolon kiri cenderung mengakibatkan perubahan pola defekasi sebagai akibat iritasi dan respon refleks, perdarahan, mengecilnya ukuran feces, dan konstipasi karena lesi kolon kiri yang cenderung melingkar mengakibatkan obstruksi. Kanker yang berada di kolon kanan seringkali tidak menyebabkan perubahan pada pola buang air besar (meskipun besar). Kanker yang memproduksi mukus dapat menyebabkan diare. Pasien mungkin memperhatikan perubahan

warna feses menjadi gelap, tetapi kanker seringkali menyebabkan perdarahan samar yang tidak disadari oleh pasien. Kehilangan darah dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan anemia defisiensi besi. Ketika seorang wanita post menopause atau seorang pria dewasa mengalami anemia defisiensi besi, maka kemungkinan KKR harus dipikirkan dan pemeriksaan yang tepat harus dilakukan. Karena perdarahan yang disebabkan oleh KKR biasanya bersifat samar atau intermitten, hasil negatif dari tes darah samar (*occult blood test*) tidak dapat menyingkirkan kemungkinan adanya kanker kolorektal. Sakit perut bagian bawah biasanya berhubungan dengan kanker yang berada pada kolon kiri, yang mereda setelah buang air besar. Pasien ini biasanya menyadari adanya perubahan pada pola buang air besar serta adanya darah yang berwarna merah keluar bersamaan dengan buang air besar. Gejala lain yang jarang adalah penurunan berat badan dan demam. Meskipun kemungkinannya kecil tetapi KKR dapat menjadi tempat utama intususepsi, sehingga jika ditemukan orang dewasa yang mempunyai gejala obstruksi total atau parsial dengan intususepsi, kolonoskopi dan double kontras barium enema harus dilakukan untuk menyingkirkan kemungkinan KKR.

Gejala akut dari pasien biasanya adalah obstruksi atau perforasi, sehingga jika ditemukan pasien usia lanjut dengan gejala obstruksi, maka kemungkinan besar penyebabnya adalah kanker. Obstruksi total muncul pada < 10% pasien KKR, tetapi hal ini adalah sebuah keadaan darurat yang membutuhkan penegakan diagnosis secara cepat dan penanganan bedah. Pasien dengan total obstruksi mungkin mengeluh tidak bisa flatus atau buang air besar, kram perut dan perut yang menegang. Jika obstruksi tersebut tidak mendapat terapi maka akan terjadi iskemia dan nekrosis kolon, lebih jauh lagi nekrosis akan menyebabkan peritonitis dan sepsis. Perforasi juga dapat terjadi pada kanker primer, dan hal ini dapat disalahartikan sebagai akut divertikulosis. Pada kasus metastasis, perforasi juga bisa terjadi pada vesika urinaria. Metastasis ke hepar dapat memberi gejala ikterus.

BAB V

PROGNOSIS KANKER KOLOREKTAL

Setiap orang berbeda dan begitupun responnya terhadap terapi yang diberikan. Namun, dengan terapi yang cepat dan tepat, prognosis seseorang dengan KKR akan memberikan harapan yang lebih baik. Tingkat kelangsungan hidup pasien KKR tergantung pada stadium kanker pada saat diagnosis dan respons individu terhadap pengobatan. Selain itu, banyak penemuan baru berpotensi memperbaiki pengobatan KKR, begitu pula dengan prognosinya.

Tingkat ketahanan hidup dalam lima tahun pasien KKR berdasarkan stadium klasifikasi Dukes berbeda sesuai beratnya penyakit. Duke A >90%, Dukes B 60-80%, Dukes C 20-50% dan Dukes D <5% pasien bertahan hidup dalam 5 tahun. Derajat diferensiasi gambaran histologi jaringan KKR secara signifikan juga mempengaruhi tingkat survival disamping stadium. Pasien dengan gambaran histologi diferensiasi baik (*well differentiated*) mempunyai survival 5 tahun yang lebih baik dibandingkan dengan gambaran diferensiasi buruk (*poor differentiated karsinoma*). Lokasi kanker terlihat sebagai faktor prognostik yang independen. Pada stadium yang sama pasien dengan kanker yang berada di rektum mempunyai prognosis yang lebih buruk bila dibandingkan dengan kanker yang berada di kolon.

Prognosis pasien kanker kolorektal dipengaruhi oleh beberapa parameter antara lain jenis kelamin, umur, reseksi tumor primer, banyaknya lesi metastasis dan derajat diferensiasi tumor. Prognosis pasien KKR dapat diketahui dengan menentukan stadiumnya. Klasifikasi berdasarkan Dukes dan Sistem TNM (*American Joint Committee of Cancer*) banyak digunakan untuk menentukan stadium KKR, dimana pada kedua klasifikasi tersebut yang dinilai adalah dalamnya invasi sel kanker pada dinding usus, metastasis ke limfonodus dan adanya metastasis jauh ke organ lain. Stadium tersebut dapat ditentukan melalui evaluasi klinis, radiologis dan histologis (August DA et 1985; Compton CC, 2003; Hamilton W et al, 2005)

BAB VI

ANGIOGENESIS PADA KANKER

Angiogenesis pada kanker merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah setempat yang ada disekitar tumor primer. Angiogenesis memungkinkan pertumbuhan sel kanker dan metastasis melalui tersedianya nutrisi dan oksigen untuk sel kanker dan jaringan sekitarnya, dan juga sebagai sarana metastasis dimana sel kanker dapat lepas dari tumor primernya dan melalui aliran darah angiogenesis sel tumor akan bermetastasis ketempat yang lebih jauh (Folkman J et al, 1990).

Angiogenesis pertama kali diobservasi pada abad 18 oleh John Hunter, seorang ahli bedah dan anatomi dari Scotland yang melakukan observasi lebih detail pada pembentukan pembuluh darah baru di daerah luka atau inflamasi. Pada tahun 1907, Emil Goldmann melaporkan karakteristik abnormal dari pembuluh darah di sekitar tumor dan dalam dekade berikutnya, studi tentang tumor angiogenesis jauh lebih maju yang memungkinkan untuk mempelajari karakteristik morfologis perkembangan pembuluh darah pada hewan hidup. Pada tahun 1971, Judah Folkman melaporkan berdasarkan hasil penelitiannya bahwa pertumbuhan tumor dan metastasis tergantung pada angiogenesis, dimana tumor tidak dapat bertumbuh lebih dari 1-2 mm dalam diameter tanpa adanya angiogenesis dan dilaporkan pula bahwa peningkatan angiogenesis di sekitar tumor dihubungkan dengan prognosis buruk dan mengusulkan bahwa penghambatan angiogenesis pada tumor dapat menjadi strategi untuk menghambat pertumbuhan kanker dan metastasis (Stephenson J. A et al, 2013). Lebih jauh lagi, penelitian kami tahun 2006 secara histopatologi telah buktikan bahwa densitas angiogenesis pada KKR juga penting dalam memprediksi perjalanan penyakit (Minhajat R, 2006). Namun, implikasi klinis yang mungkin paling penting dari angiogenesis pada KKR adalah pengembangan terapi anti-angiogenesis, yaitu terapi yang targetnya menghambat angiogenesis di disekitar kanker sehingga kanker tidak dapat bertumbuh dan menjadi rusak.

Terdapat enam ciri khas perubahan yang terjadi pada sel normal menjadi sel kanker, yaitu: 1) sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri, 2) tidak sensitif terhadap sinyal anti pertumbuhan, 3) dapat menghindar dari mekanisme apoptosis, 4) memiliki potensi yang tidak terbatas untuk bereplikasi, 5) mampu mencukupi kebutuhan oksigen dan nutrisinya sendiri melalui pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), serta 6) mampu menginvasi jaringan sekitarnya dan dapat bermetastasis.

Saat ini secara luas diterima teori yang menyatakan bahwa '*angiogenic switch*' akan tidak aktif (*off*) ketika efek molekul pro-angiogenik seimbang dengan molekul anti-angiogenik, dan akan aktif (*on*) ketika keseimbangan tersebut lebih bergeser pada efek pro-angiogenik sehingga memicu proses angiogenesis. Berbagai sinyal yang memicu '*angiogenic switch*' tersebut telah ditemukan, termasuk pemicu dalam bentuk stres metabolik (misalnya; pO₂ rendah, pH rendah atau hipoglikemia), stres mekanik (misalnya; tekanan yang dihasilkan oleh proliferasi sel), respons imun/inflamasi (misalnya; sel imun/inflamasi yang telah menginfiltrasi ke jaringan), dan mutasi genetik (misalnya; aktivasi onkogen atau delesi gen penekan tumor "*tumour-suppressor genes*" yang mengendalikan produksi regulator angiogenesis). Bagaimana mekanisme interaksi antara faktor lingkungan dan genetik mempengaruhi angiogenesis dan pertumbuhan tumor adalah suatu masalah yang kompleks dan sebagian besar belum diketahui. Molekul pro- dan anti-angiogenik dapat berasal dari sel kanker, sel endotel, sel stroma, sel darah dan matriks ekstraseluler. Kontribusi relatif molekul-molekul tersebut cenderung berubah/berbeda pada jenis tumor dan lokasi tumor yang berbeda. Hal tersebut juga cenderung berbeda pada proses pertumbuhan tumor, regresi dan relaps.

A. MEKANISME ANGIOGENESIS PADA TUMOR

Setidaknya ada empat mekanisme seluler yang dapat menghasilkan pembentukan vaskularisasi tumor, yaitu; *co-option*, intususepsi, *sprouting* (angiogenesis), dan vasculogenesis. Sel tumor dapat berkooptisi dan tumbuh di sekitar pembuluh darah yang ada disekitar tumor untuk membentuk *perivascular cuffs*. Namun, *perivascular cuff* ini tidak dapat tumbuh melampaui batas difusi nutrisi yang dibutuhkan, dan sebenarnya dapat menyebabkan kolaps pembuluh darah karena tekanan yang dihasilkan oleh pertumbuhan sel tumor (*solid stress*). Alternatif lain pembentukan pembuluh darah disekitar tumor adalah melalui mekanisme intususeptif. Pembuluh darah yang ada disekitar tumor dapat membesar sebagai respons terhadap faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh tumor, selanjutnya ruang jaringan interstitial dapat tumbuh pada lumen yang membesar dan mempartisi lumen untuk membentuk jaringan pembuluh darah yang lebih luas. Mekanisme lainnya adalah melalui proses vasculogenesis dimana precursor sel endotel (angioblasts) dari bone marrow atau darah perifer menuju ke daerah tumor dan berkontribusi pada pembentukan pembuluh darah baru sekitar tumor (vasculogenesis). Diantara keempat mekanisme pembentukan pembuluh darah baru pada tumor, mekanisme angiogenesis yang paling banyak diteliti dan dilaporkan. Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari proliferasi sel endotel yang ada pada pembuluh darah di daerah tumor.

Angiogenesis memungkinkan pertumbuhan tumor dan metastasis melalui tersedianya nutrisi dan oksigen untuk sel tumor dan jaringan sekitarnya, dan juga dapat menjadi sarana dimana sel dapat lepas dari tumor primernya dan melalui aliran darah akan bermetastasis ketempat yang lebih jauh. Dilaporkan bahwa pertumbuhan tumor dan metastasis sangat tergantung pada tumor angiogenesis, dimana tumor tidak dapat bertumbuh lebih dari 1-2 mm dalam diameter tanpa adanya angiogenesis dan dilaporkan pula bahwa peningkatan angiogenesis di sekitar tumor dihubungkan dengan prognosis buruk. Sebagaimana jaringan

normal, tumor membutuhkan pertumbuhan pembuluh darah baru yang memungkinkan terpenuhinya kebutuhan oksigen dan nutrisi agar tumor dapat tumbuh dan menyebar. Pembentukan pembuluh darah baru ini dimulai dari sel endotel vaskuler setempat (*pre-existing vasculature*). Neovaskularisasi secara luas mempromosikan tumor dengan memasok nutrisi, oksigen, dan melepaskan faktor pertumbuhan. Hipoksia pada solid tumor muncul pada jarak $\geq 70 \mu\text{m}$ dari pembuluh darah fungsional dan secara umum diterima bahwa tumor tidak akan tumbuh lebih dari 1-2 mm² tanpa adanya angiogenesis.

Angiogenesis yang terjadi pada kanker ditandai oleh adanya peningkatan proliferasi sel endotel, dimana angiogenesis kanker yang terbentuk memperlihatkan morfologi vaskuler yang atipikal. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pada angiogenesis kanker, tidak tampak hirarki arteriole dimana hubungan kapiler dan venula tidak ada. Sel endotel, pericytes, sel otot polos, dan membran basalis yang menyusun pembuluh darah juga abnormal. Sel-sel endotel juga tidak membentuk lapisan tunggal yang ketat (*tight monolayer*) sebagaimana pada pembuluh darah normal, pembuluh darah pada kanker tetap bocor, hal ini berkontribusi terhadap tingginya tekanan interstitial pada sebagian besar tumor. Selain itu, pericytes hanya terikat secara longgar ke sel endotel pada pembuluh darah tumor dan dapat menyebabkan lemahnya dinding pembuluh darah sehingga meningkatkan risiko terjadinya perdarahan. Selain itu, membran basalis vaskular memiliki ketebalan yang tidak teratur dan juga hanya terikat longgar dengan sel endotel.

Telah diketahui secara umum bahwa dalam kondisi sel yang sehat, tekanan oksigen adalah kunci dalam pengaturan angiogenesis, dimana sel endotel (EC) dan sel otot polos (SMC) memiliki berbagai mekanisme penginderaan oksigen, termasuk *oxygen-sensitive* NADPH oxidases, sintase nitrat oksida endotelial sintase (eNOS), dan *heme-oxygenases*. Sel-sel pembuluh darah juga mengekspresikan kelas yang berbeda dari sensor oksigen yang berinteraksi dengan kelompok *hypoxia-inducible transcription factor* (HIF), yang merupakan

molekul yang penting untuk menyampaikan adaptasi terhadap perubahan tekanan oksigen. Masing-masing dari tiga isoform HIF-alfa (HIF-1-3) dapat heterodimerisasi dengan subunit nuklir reseptor aril hidrokarbon (HIF / ARNT) untuk membentuk kompleks transkripsional aktif yang menginisiasi ekspresi ratusan gen, termasuk yang mengatur kelangsungan hidup sel, metabolisme, dan angiogenesis. Untuk tumbuh atau bermetastasis lokal, jaringan tumor juga membutuhkan oksigen dan nutrisi yang akan disediakan oleh pembuluh darah, karena fungsi utama pembuluh darah adalah membawa oksigen yang kita hirup. Karena oksigen adalah kunci dalam pertumbuhan sel (baik sel sehat maupun sel kanker), maka sel tumor yang hipoksia tidak akan membelah. Pada kanker yang tumbuh, sel endotel sangat aktif karena pelepasan banyak protein, seperti EGF, estrogen, acidic (a) dan basic (b) FGF, IL-8, prostaglandin E1 dan E2, TNF-alfa, dan VEGF, yang dapat mengaktifkan pertumbuhan dan motilitas sel endotel ketika produksi faktor-faktor anti-angiogenik (inhibitor) berkurang. Lebih jauh lagi, regulasi angiogenesis tumor merupakan hasil dari keseimbangan yang kompleks antara berbagai faktor stimulator dan inhibitor yang disekresikan oleh sel-sel tumor dan sel-sel yang menginfiltrasi stromal tumor. Sel-sel neoplastik ganas mempromosikan angiogenesis dengan mengeluarkan faktor pertumbuhan antara lain *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dimana faktor pertumbuhan tersebut dapat merangsang proliferasi dan migrasi endotel. Aktivasi endotel pada pembuluh darah yang ada di lokasi tumor merupakan proses penting terjadinya angiogenesis yang selanjutnya diikuti oleh proses proliferasi endotel kemudian migrasi menembus target area disekitarnya, penyusunan sel endotel membentuk suatu tabung kapiler baru, selanjutnya diikuti oleh sintesa membrane basalis dan maturasi pembuluh darah baru dengan pembentukan lumen vaskular.

Setiap sel dalam lingkungan mikro tumor dipengaruhi oleh sel yang ada disekitarnya, serta oleh komponen stromal tumor. Secara alami transformasi onkogenik atau responnya terhadap hipoksia, tumor sel melepaskan berbagai faktor yang mulai mengubah lingkungannya. Faktor-faktor ini menyebabkan remodeling matriks ekstraseluler (ECM) untuk mengakomodasi pertumbuhan dan progresi tumor. Fibroblast segera menyimpan protein ECM yang membantu remodelling yang diperlukan oleh tumor untuk ekspansi dan juga melepaskan enzim yang dapat memecah komponen

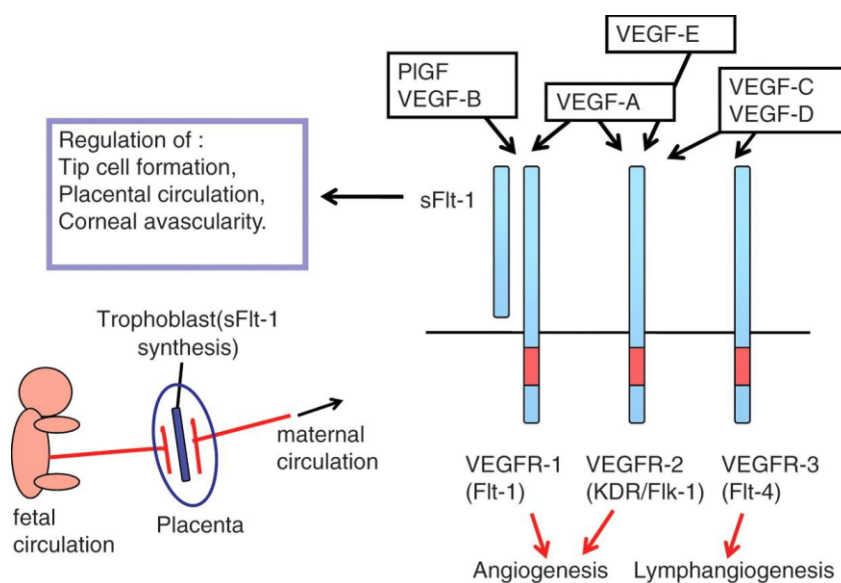
membran basalis untuk membentuk fragmen yang mempengaruhi fungsi integrin sel yang ada disekitarnya. Kompartemen ECM juga mengandung komponen seperti *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *thrombospondins* (TSPs), *disintegrin and metalloprotease family* (ADAM), *secreted protein, acidic and rich in cysteine* (SPARC), *syndecans* dan *perlecan*, yang mempunyai kapasitas untuk mengatur penyerapan atau pelepasan faktor terlarut dalam matriks. Sel tumor dan sel endotel yang diaktifkan melepaskan berbagai faktor terlarut yang menginduksi mobilisasi dan *homing* sel myeloid dari sumsum tulang dan diferensiasinya menjadi makrofag atau neutrophil dalam lingkungan tumor. Dalam lingkungan yang dinamis ini, integrin dan reseptor pada permukaan sel endotel mengenali dan mengikat faktor yang menginisiasi jalur sinyal intraseluler (*intracellular signaling pathways*), mengarah ke perubahan fenotipik yang mempromosikan migrasi, invasi, survival dan proliferasi yang diperlukan untuk tumbuh (*sprouting*). Reseptor dari jalur yang berbeda dapat menekan atau meningkatkan aktivasi seluler. Interaksi antara sel-sel endotel dan lingkungannya akan meregulasi hubungannya dengan sel-sel perivaskular atau makrofag yang ada disekitar tumor dan menentukan, apakah mereka menjadi sel ujung (*tip cell*) atau sel tangkai (*stalk cell*).

Meskipun banyak faktor yang berperan pada mekanisme angiogenesis tumor, namun penelitian penulis secara khusus fokus pada peranan protein VEGF dan Endoglin (CD105) serta membandingkan kedua faktor tersebut pada angiogenesis tumor dengan menggunakan berbagai metode terutama metode imunohistokimia dan ELISA (Minhajati R et al, 2006).

B. PERANAN VEGF PADA ANGIOGENESIS TUMOR

Vaskular endothelial growth factor (VEGF) adalah faktor seluler multifungsi yang dapat menginduksi pembentukan pembuluh darah baru, meningkatkan permeabilitas kapiler melalui pengaruhnya langsung pada sel endotel, menstimulasi mitosis sel endotel dan memainkan peranan penting pada pembentukan sistem vaskular baru dan pertumbuhan sel kanker. VEGF dan reseptornya telah dibuktikan memainkan peranan penting pada proses angiogenesis, bukan hanya pada kondisi fisiologis tetapi juga pada kondisi patologis, misalnya pada kanker. Protein VEGF dapat dideteksi dalam darah dan cairan tubuh pada keadaan inflamasi atau tumor dan telah dilaporkan kadarnya meningkat dalam serum pasien dengan tumor ganas. VEGF termasuk di dalam famili supergen *Platelet*

Derived Growth Factor (PDGF). Beberapa famili gen VEGF yang telah diketahui adalah VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan VEGF-E. Terdapat tiga reseptor dari VEGF, reseptor VEGF-A adalah *vascular endothelial growth factor receptor-1* dan -2 (VEGFR-1 dan -2) yang berperan penting pada fisiologis dan patologis angiogenesis termasuk tumor angiogenesis, sedangkan VEGF-C/D reseptornya pada VEGFR-3 yang berperan mengatur angiogenesis pada awal embriogenesis tetapi fungsi umumnya adalah regulator penting pada limfangiogenesis. Efek dari VEGF tidak saja tergantung pada ekspresi VEGF pada sel tumor tetapi juga tergantung pada reseptor VEGF di sel endotel.



Gambar 2. Sistem VEGF dan VEGFR. VEGF-A dan reseptornya memainkan peranan utama vaskulogenesis dan angiogenesis (Shibuya M, *Gene & Cancer* 2011).

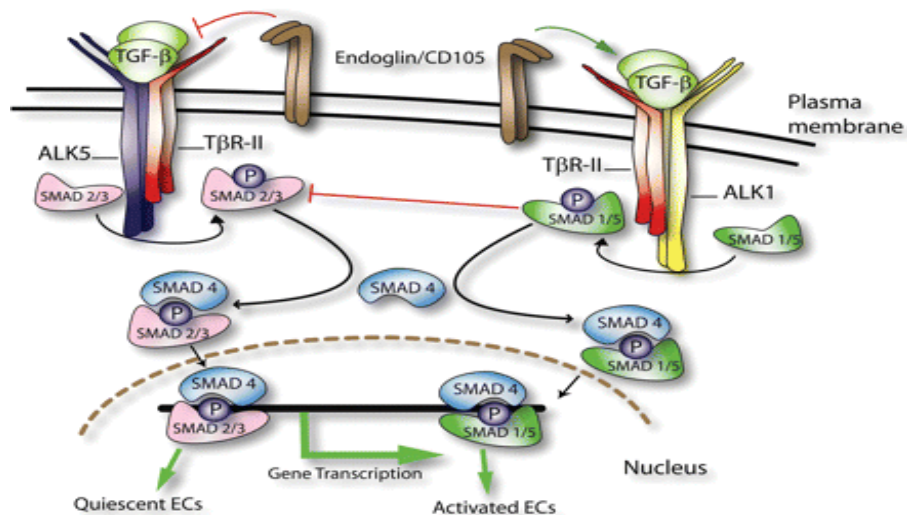
Vascular Endothelial Growth Factor-A yang disebut juga sebagai VEGF merupakan regulator penting untuk fisiologi sel endotel dan dikenal sebagai faktor pertumbuhan utama yang relatif spesifik untuk sel endotel. VEGF-A merupakan suatu dimerik glikoprotein esensial untuk berbagai proses angiogenik pada kondisi normal atau abnormal, seperti vaskularisasi tumor, terutama melalui interaksinya dengan dua reseptor tyrosine kinase, VEGFR-1 [juga dikenal sebagai Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase-1*)] dan VEGFR-2 [juga dikenal sebagai Flk-1 (*fetal liver kinase-1*) dan, pada manusia, sebagai KDR (*kinase insert domain-containing receptor*)]. VEGF-A memperlihatkan dua aktifitas biologis utama; pertama adalah kemampuannya untuk menstimulasi proliferasi sel endotel vascular dan

yang kedua adalah kemampuannya meningkatkan permeabilitas vaskular. VEGF-A juga mempromosikan kelangsungan hidup dan migrasi sel endotel. Reseptor VEGF adalah tipikal reseptor tyrosin kinase (TKRs) yang mempunyai domain ekstraseluler untuk ikatan ligan, domain transmembran, dan domain sitoplasma, termasuk domain tyrosin kinase. VEGF-A mengikat dan mengaktifkan VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR / Flk-1). VEGFR-1 memiliki afinitas yang tinggi untuk VEGF-A ($K_d = 1 \sim 10:00$), satu level lebih tinggi dari VEGFR-2, sedangkan aktivitas tyrosine kinase kira-kira 10 kali lipat lebih lemah dibandingkan VEGFR-2. Sinyal utama proangiogenik dihasilkan oleh ligan yang mengaktifkan VEGFR-2, dimana VEGFR-2 berperan pada pertumbuhan dan pertahanan hidup endothelium, sedangkan VEGFR-1 memainkan peranan penting pada kondisi patologis misalnya kanker, iskemia dan inflamasi. Pada solid tumor, VEGF-A dan reseptornya terlibat dalam pertumbuhan kanker, invasi dan metastasis jauh sebagaimana tumor angiogenesis. Ekspresi gen VEGF diatur oleh berbagai stimuli, antara lain hipoksia, faktor pertumbuhan, mutasi transformasi p53, estrogen, promotor tumor dan nitrik oksida (NO). Meskipun semua stimuli tersebut bertanggung jawab atas peningkatan regulasi gen VEGF, yang cukup menarik adalah hipoksia karena pentingnya dan keterlibatannya pada regulasi transkripsi yang unik. Saat ini sudah jelas bahwa HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) merupakan kunci mediator respon hipoksia. HIF-1 adalah suatu aktivator transkripsi yang terdiri dari subunit HIF-1 α dan HIF-1 β . keduanya HIF-1 α dan HIF-1 β diekspresikan pada berbagai tipe tumor, sedangkan dalam kondisi oksigenasi normal HIF-1 jarang terdeteksi.

Dalam kondisi normal, VEGF diekspresikan lemah pada berbagai jaringan manusia, tetapi ekspresi VEGF yang sangat tinggi dapat dideteksi pada daerah dimana angiogenesis fisiologis dibutuhkan, seperti pada jaringan fetus atau placenta, atau pada kondisi patologis seperti tumor atau penyakit inflamasi. Penelitian kami membuktikan bahwa ekspresi VEGF dan reseptornya sangat tinggi pada kanker kolorektal metastasis dan endotel sel pada pembuluh darah sekitar tumor. Secara konsekuen, VEGF dikenali sebagai faktor angiogenik yang dominan pada kanker kolorektal dan penilaian terhadap ekspresi VEGF dapat bermanfaat dalam memprediksi metastasis dimana ekspresi VEGF lebih meningkat pada pasien tumor metastasis bila dibandingkan dengan tumor non metastasis dan ekspresi VEGF yang tinggi dihubungkan dengan stadium lanjut kanker dan prognosis yang buruk (Minhajati R et al, 2006).

C. PERANAN ENDOGLIN (CD105) PADA ANGIOGENESIS TUMOR

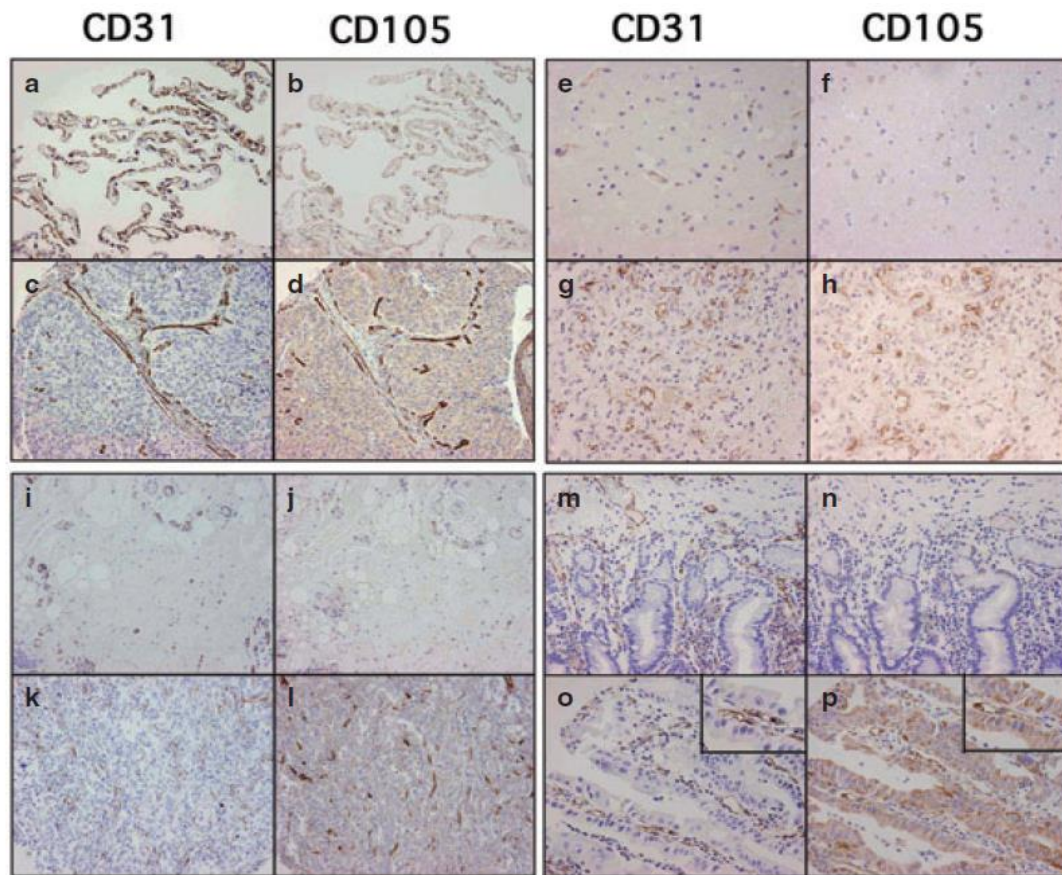
Endoglin (CD105) merupakan suatu *cell adhesion molecules* yang diekspresikan pada permukaan sel dengan lokasi gen pada 9q34, merupakan 180 kDa homodimerik transmembran glikoprotein, suatu komponen dari kompleks reseptor TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*) yang merupakan sitokin pleotropik yang memodulasi angiogenesis melalui regulasi fungsi sel termasuk proliferasi, differensiasi dan migrasi. Endoglin (CD105) mengikat TGF- β 1 dan 3 dan memodulasi signal TGF- β melalui interaksinya dengan TGF- β reseptor I dan/atau II. Endoglin merupakan koreseptor penunjang tipe III (TGF- β RIII) untuk TGF- β RII, *activin like kinase-1* (ALK-1) dan ALK-5 yang berinteraksi dengan TGF- β family. TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activin, terikat pada CD105 melalui ikatannya dengan reseptor TGF- β II. Dilaporkan bahwa level ekspresi CD105 pada sel endotel dapat mempengaruhi respon endotel terhadap TGF- β yang memodulasi proliferasinya. Pada sel endotel, TGF- β dapat mengaktifkan 2 jalur reseptor tipe 1 yang efeknya saling bertentangan: ALK-5 menginduksi fosforilasi Smad 2/3 dan ALK-1 mempromosikan fosforilasi Smad 1/5. Endoglin mengikat TGF- β melalui ikatannya dengan TGF- β RII. Hasil ikatan tersebut terjadi perubahan fosforilasi melalui jalur sinyal TGF- β /ALK-1 dan menginduksi penghambatan secara tidak langsung jalur sinyal ALK-5. Setelah teraktivasi, Smads terfosforilasi membentuk kompleks heteromerik dengan mediator umum Smad 4, yang dalam nukleus aktif sebagai kompleks faktor transkripsi yang mengatur aktivitas transkripsi gen target.



Gambar 3. A schematic hypothetical role of endoglin/CD105 in TGF- β /ALK-1 and TGF- β /ALK-5 signalling pathways in endothelial cells (Fonsatti E et al, *Cardiovascular Research*,2010).

Penelitian kami sebelumnya telah membuktikan bahwa CD105 secara eksklusif diekspresikan pada sel endotel angiogenesis kanker kolorektal dan beberapa karsinoma pada organ lain yang dinilai melalui ekspresinya yang positif pada sel endotel dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Sebaliknya CD105 hampir tidak diekspresikan pada sel endotel kapiler jaringan normal disekitar tumor. Lebih jauh lagi, ekspresi CD105 pada sel endotel sangat selektif tanpa *cross-reactivity* yang signifikan dengan sel inflamasi, sel stroma pada jaringan neoplasma maupun sel endotel pembuluh limfe (Minhajati R et al, 2006).

Endoglin adalah reseptor molekul TGF- β 1 yang ekspresinya meningkat pada tumor angiogenesis dan sekresinya diinduksi oleh adanya hipoksia. Sebagaimana keberadaannya terutama pada neovaskularisasi, CD105 sangat bermanfaat dalam menilai adanya pembentukan pembuluh darah baru pada malignansi. Berdasarkan hal tersebut, saat ini CD105 diterima sebagai target potensial untuk terapi antiangiogenesis, khususnya pada pasien kanker dengan resiko metastasis. Penelitian kami pada beberapa solid tumor memperlihatkan, antibody CD105 tereksprei kuat terutama pada sel endotel angiogenesis tumor, akan tetapi ekspresi CD105 lemah atau negatif pada sel endotel vaskuler jaringan normal disekitar tumor (Minhajati R et al, 2006) (gambar 4).



Gambar 4. Expression of CD31 (as pan-endothelial marker) and CD105 as shown by immunohistochemistry. (a,b,e,f,i,j,m,n) Adjacent non-cancerous areas and (c,d,g,h,k,l,o,p) cancerous areas of (a–d) lung, (e–h) brain, (i–l) breast, and (m–p) stomach. Small newly formed vessels or capillaries are (d,h,l,p) intensely positive for CD105 in cancerous areas, but (b,f,j,n) negative in adjacent non-cancerous areas. Cancer cells are positive for CD105 (p, inset). (a,c,e,g,i,k,m,o) CD31 is universally positive in various blood vessels of cancerous and adjacent non-cancerous areas. Original magnification, X200. (Minhajati R et al. Pathol Int 2006)

Protein CD105 tidak hanya diekspresikan pada permukaan sel tetapi dapat juga dideteksi dalam darah dalam bentuk soluble. Telah dibuktikan adanya peningkatan yang kontinyu dalam plasma darah pasien dengan metastasis kanker kolorektal dan juga dilaporkan bahwa level konsentrasi endoglin dalam sirkulasi berhubungan positif dengan stadium berdasarkan kriteria DUKES'. Pada pasien KKR, terdapat perbedaan level antara pasien tanpa metastasis dan pasien dengan metastasis secara statistik (Minhajati R et al, 2020) (Gambar 5).

Tabel 3. Analisis Kadar Protein CD105 dan VEGF Berdasarkan Metastase

Variabel	Metastase	n	Mean	SD	p
CD105	Ada	54	4,59	1,35	0,002
	Tidak Ada	34	3,71	1,24	
VEGF	Ada	54	650,27	635,58	0,625
	Tidak Ada	34	546,58	491,01	

Mann-Whitney test. CD105 (ng/ml), VEGF VEGF (pg/ml)

Minhajati R et al, JCOL accepted 2020

Demikian pula ekspresi CD105 berhubungan dengan kelangsungan hidup, dimana pasien dengan *microvessel density* (MVD) yang lebih tinggi (≥ 115 MVD) memperlihatkan prognosis yang lebih buruk.

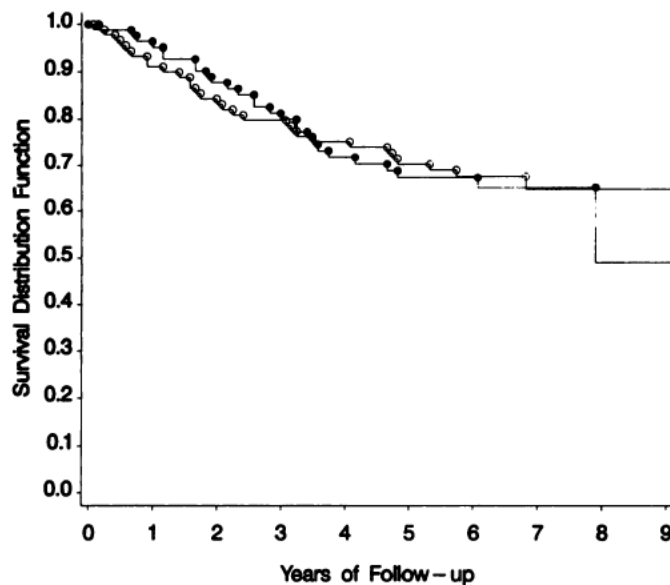


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves for the overall series according to MVD. Patients with tumors displaying MVD values of 115 or more (○) are compared with patients with carcinomas showing MVD values of less than 115 (●).

Gambar 5. Bossi P et al, Cancer Res, 1995

Dilaporkan pula, bahwa peningkatan serum endoglin dihubungkan dengan peningkatan metastasis pada pasien dengan solid tumor termasuk KKR. Berdasarkan data-data yang ada, CD105 saat ini muncul sebagai target yang potensial dalam menghambat tumor angiogenesis, yang dipertimbangkan dapat mengatasi adanya resistensi tumor terhadap antiangiogenesis pada jalur VEGF.

BAB VII

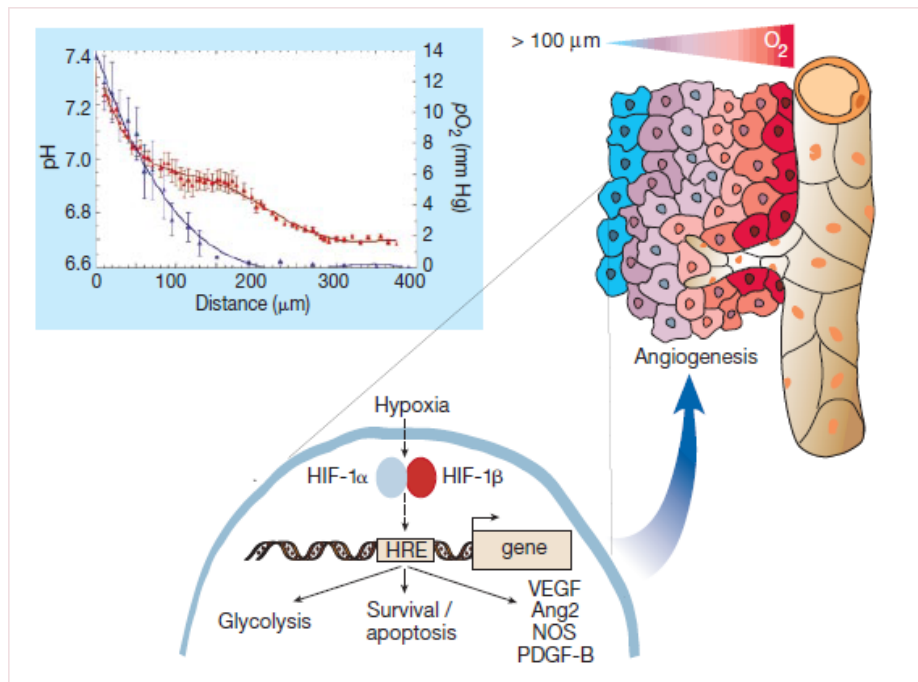
PERANAN ANGIOGENESIS PADA PERTUMBUHAN TUMOR

Sel kanker berasal dari transformasi atau mutasi sel epitel normal. Proliferasi sel yang tidak terkontrol menghasilkan massa sel dalam kompartemen epitel atau menonjol keluar dari permukaan, misalnya pada lumen kolon pada kanker kolorektal. Stadium ini disebut ‘*carcinoma in situ*’ atau ‘*intraepitelial neoplasma*’ dan ini dianggap sebagai pre-kanker. Sebagaimana tumor jinak yang terlokalisir tidak mempunyai peluang untuk menyebar karena lapisan epitel tidak mempunyai vaskularisasi, oksigenasi dan nutrisi tumor yang terlokalisir tersebut didapatkan melalui proses difusi dari kapiler yang berada dibawah membran basalis lapisan epitelium. Apabila keseimbangan dapat tercapai antara proliferasi sel tumor dan apoptosis maka massa tumor tidak bertambah. Secara *in vitro*, sel-sel tumor yang tumbuh secara sferoid memiliki batas atas ukuran berdasarkan jarak dimana nutrisi dapat berdifusi dalam media ke dalam inti sferoid. Demikian pula, pertumbuhan tumor pada organ *ex vivo* hanya dapat berkembang hingga ~ 1–2 mm. Secara *In vivo*, tumor tidak dapat bertumbuh melebihi batas difusi nutrisi dari kapiler terdekat, yaitu sekitar 100-500 mikron, kecuali ada pembuluh darah baru tumbuh sekitar tumor. Proses dimana neovaskular terkait tumor (*tumor-associated neovessels*) ini tumbuh dari pembuluh darah yang ada disekitar tumor pertama kali dilaporkan sebagai "tumor angiogenesis" oleh Dr. Judah Folkman pada tahun 1971, dengan hipotesanya bahwa "sel endotel (EC) dapat membatasi ekspansi tumor" dan bahwa "untuk setiap peningkatan diameter tumor harus ada peningkatan vaskularisasi tumor". Indeks mitosis sel tumor dan EC di kapiler saling bergantung dengan hubungan simbiosis seperti dalam ekosistem. Bahkan, ia berhipotesis bahwa tumor harus mengeluarkan faktor yang disebut "tumor angiogenesis factor (TAF)".

Dari sudut pandang EC, angiogenesis tumor dan angiogenesis pada jaringan normal sangat mirip, perberbedaan terutama pada sumber mitogen EC atau kemoatraktan. Demikian

pula, neovaskularisasi tumor berbeda pada sel-sel tumor yang berasal dari epitel yang kondisi normalnya epitelium tidak mempunyai vaskularisasi dibandingkan dengan tumor yang ada pada dermis atau lamina propria yang mempunyai vaskularisasi. Tumor yang terlokalisir intraepitelium membutuhkan invasi awal menembus membrane basalis untuk mendapatkan akses ke pembuluh darah pada jaringan dibawah epitelium, kondisi ini disebut fase pertumbuhan vertikal. Perbedaan kedua adalah bahwa proses angiogenesis normal terbatas waktu sedangkan angiogenesis tumor akan terus berlanjut selama tumor ada. Ketika ekspansi tumor terjadi, sel-sel tumor bagian dalam semakin jauh dan tidak terjangkau oleh suplai darah dan menjadi relatif hipoksia. Kondisi hipoksia ini akan meningkatkan ekspresi berbagai faktor pertumbuhan angiogenik. Secara singkat, proses angiogenesis melalui tahap-tahap sebagai berikut:

1. Tumor sel melepaskan faktor pertumbuhan angiogenik (*angiogenic growth factors*), seperti VEGF dan FGF, untuk menarik EC menuju massa tumor.
2. Sel endotel (dan sel lainnya) mensekresi enzim untuk mendegradasi protein dalam membrane basalis kapiler atau venula post kapiler (tidak pernah arteri).
3. Sel endotel (yang berperan sebagai *tip-cell*) mulai bermigrasi atau bertumbuh ke arah sumber stimulan.
4. Sel endotel terus bermigrasi dan sel tangkai (yang ada di belakang *tip cells*) berproliferasi dan menyusun sejajar membentuk lapisan tunggal.
5. Sel endotel yang tersusun sejajar kemudian berubah dan membentuk lumen yang berada pada bagian tengah pembuluh darah yang baru terbentuk.
6. Darah diperfusi ke dalam lumen pembuluh darah baru.



Gambar 5. Role of hypoxia in tumour angiogenesis. Because of the irregular pattern and organization of the tumour vasculature, some cells in tumours are located more than 100 μm (the diffusion limit for oxygen) away from blood vessels and become hypoxic (red-to-blue gradient indicates progressive hypoxia). Tumour cells survive fluctuations in oxygen tensions, in part because clones are selected in hypoxic tumours that switch to a proangiogenic phenotype. HIFs increase transcription of several angiogenic genes (for example, genes encoding VEGF, PDGF-BB and NOS). HIFs also affect cellular survival/apoptosis pathways. Inset: relationship between the distance of tumour cells from nearby vessels and their degree of hypoxia (blue symbols) and acidosis (red symbols). (*J Natl Cancer Inst.* 2002).

Tipikal pembuluh darah yang baru umumnya tidak tampak berjalan lurus tapi berjalan melingkar/berkelok (membentuk semacam *loop*) dan mempunyai interkoneksi untuk membentuk pleksus di dalam tumor. Kapiler terkait tumor merupakan kapiler abnormal. Secara singkat digambarkan bahwa, vaskuler tumor berjalan berkelok, cacat dan hiperplastik. Karena tingginya ekspresi VEGF (dan faktor lain) di lingkungan tumor, vaskuler tumor tersebut juga sangat permeabel dan mudah bocor. Hal ini menyebabkan volume cairan yang tinggi dalam lingkungan mikro tumor dan tekanan cairan interstitial yang tinggi. Sebagaimana kapiler normal distabilkan oleh sel-sel otot polos dan pericytes yang mengelilingi kapiler untuk mendukung struktur dan patensi serta untuk mempromosikan kelangsungan hidup dan

fungsinya. Sebaliknya, vaskuler tumor adalah vaskuler yang bersifat imatur, memperlihatkan pergantian (*turnover*) yang cepat dan umumnya tidak memiliki pericyte yang cukup.

Inisiasi angiogenesis tumor adalah titik penting dalam perkembangan tumor dan disebut "saklar angiogenik" ("*angiogenic switch*"). Ciri khas kanker ini memperlihatkan pergeseran dari tumor yang dorman (tenang) ke pertumbuhan yang progresif. Hal yang penting, tumor jinak dan kanker ganas memiliki potensi angiogenik ketika sel-sel tersebut tumbuh dalam ukuran yang membutuhkan vaskularisasi tambahan. Banyak sel dalam lingkungan mikro tumor, selain sel tumor sendiri, dapat mengeluarkan faktor angiogenik yang menyebabkan peningkatan vaskularisasi, yang paling menonjol adalah fibroblas dan makrofag yang ada disekitar tumor. Suatu penelitian dimana sel tumor bersama dengan fibroblast disekitarnya diisolasi dari sel kanker payudara manusia, yang disebut *tumor-associated fibroblasts* (CAF), secara dramatis meningkatkan angiogenesis tumor dan juga tingkat pertumbuhan tumor. Secara khusus, CAF mengeluarkan SDF1, yang mempromosikan pembentukan neovaskular. *Tumor-associated macrophages* (TAM) melepaskan matrix metalloproteinase-9 (MMP9) ke lingkungan mikro tumor, dengan adanya MMP9 selanjutnya akan memungkinkan pertumbuhan, motilitas dan permeabilitas pembuluh darah baru.

Peranan angiogenesis pada pertumbuhan tumor bukan hanya untuk menjamin suplay oksigen dan nutrisi untuk sel tumor tetapi juga mempertahankan kondisi lingkungan tumor. Selain itu, umumnya tumor dihubungkan dengan sel imun yang mempromosikan tumor (*tumor promoting immune cells*) dimana angiogenesis membawa sel-sel imun tersebut ke dalam tumor, sel-sel imun tersebut terutama menghasilkan sinyal sitokin yang dibutuhkan oleh tumor. Lebih jauh lagi, angiogenesis menyediakan sarana bagi sel kanker untuk berpindah dan bermetastasis ke tempat yang jauh dari asalnya.

BAB VIII

PERANAN ANGIOGENESIS PADA METASTASIS KANKER KOLOREKTAL

Kanker primer jarang menyebabkan kematian pasien (kecuali kanker paru-paru, otak dan hati). Sebaliknya, sebagian besar kematian kanker disebabkan oleh karena komplikasi yang terkait dengan metastasis. Istilah metastasis mengacu pada berpindahnya sel kanker dari satu bagian tubuh ke bagian yang lain. Penyebaran sel kanker dari organ ke organ sangat tidak efisien; hanya 0,01% sel yang meninggalkan tempat primernya untuk bermetastasis jauh. Karena tumor terdiri dari milyaran sel kanker, 1-4 juta sel kanker dapat masuk ke dalam sirkulasi setiap hari untuk 1 gram tumor. Selain itu, ratusan koloni sel metastasis dapat muncul dalam organ individu dan dapat menyebabkan pertumbuhan yang tidak terbatas. Hal tersebut dapat menyebabkan tergantinya jaringan normal oleh tumor di organ-organ penting, seperti paru-paru, hati, otak dan sumsum tulang. Secara umum, metastasis adalah tahap terakhir dalam perkembangan kanker. Proses metastasis digambarkan sebagai kaskade kejadian yang saling terkait dan berurutan. Tahap-tahap metastasis sama untuk sebagian besar tumor ganas, namun rute dan tujuan dapat bervariasi:

1. **Angiogenesis:** untuk dapat bermetastasis sel-sel kanker harus mengembangkan jaringan vaskular (atau limfatik). Jaringan neovaskular tidak hanya menyediakan nutrisi bagi tumor untuk tumbuh tetapi juga menyiapkan sarana sebagai jalan keluar bagi sel-sel tumor untuk memasuki sirkulasi. Secara umum, semakin besar tumor dan densitas (kepadatan) vaskular di dalam tumor, semakin besar kemungkinan sel tumor “*escape*” meninggalkan lokasi primernya.
2. **Intravasasi:** Sel-sel tumor ganas harus melepaskan diri dari sel-sel tetangga dan matriks, invasi menembus membran basalis kapiler dan bermigrasi melalui barrier endotel untuk memasuki aliran darah. Transisi ke fenotip mesenchymal diperkirakan

hal yang membantu dalam proses migrasi ini. Secara alternatif, sel-sel tumor yang terlepas dapat tersapu dalam campuran cairan dan sel-sel kanker dapat mengalir ke kapiler limfatik. Semua cairan limfatik pada akhirnya didaur ulang ke dalam sistem vena, dengan demikian dapat menyebabkan sel-sel tumor masuk ke dalam sistem sirkulasi.

3. **Bertahan hidup dalam sirkulasi:** *Shear stress* yang disebabkan oleh adanya pulsasi akibat aliran darah dan konsentrasi serum yang tinggi merupakan lingkungan yang tidak ramah untuk sel-sel tumor. Sebagian besar sel-sel tumor yang bersirkulasi akan mati dalam 24 jam pertama oleh gesekan/erosi atau sitotoksitas langsung serta lisis oleh adanya sel-sel natural killer (NK) yang menjalankan fungsinya dalam pengawasan imun. Trombosit melindungi sel-sel tumor pada jam-jam pertama setelah intravasasi, dan TGF- β yang berasal dari platelet dapat meningkatkan ekstravasasi sel tumor melalui jalur EMT (*epithelial to mesenchymal transition*).
4. **Ekstravasasi:** Sel-sel tumor diperkirakan berpindah melalui celah antar-endotel untuk ekstravasasi ke organ yang jauh. Studi terbaru menunjukkan limfosit (dan mungkin sel tumor) secara diapedesis juga dapat terjadi melalui rute transelular. Meskipun sel-sel tumor ekstravasasi melalui venula, sel-sel tersebut sering bermigrasi ke arteriol di mana keadaan oksigenasi lebih tinggi. Sel-sel kanker tidak tinggal diam pada tempat pertama dimana vaskular ditemui. Interaksi sel tumor dengan host akan menentukan pola metastasis.
5. **Pembentukan tumor sekunder:** Extravasasi tidak selalu menghasilkan metastasis yang berhasil. Sebagian besar sel kanker tunggal yang keluar dari sirkulasi dapat mengalami apoptosis, dieliminasi oleh sel-sel imun, atau hanya bersifat tidak aktif. Sel-sel kanker juga dapat membentuk makrometastasis, sel-sel ganas tersebut harus berproliferasi dan kembali menjalani proses angiogenesis untuk menghasilkan tumor

sekunder yang relevan secara klinis. Sel tumor yang metastasis dapat bermetastasis ke lokasi sekunder atau bahkan dapat tertanam kembali pada tumor primernya.

Angiogenesis berperan dalam menyiapkan sarana untuk sel kanker bermetastasis, namun pericyte yang ada pada vascular tersebut juga memainkan peranan penting pada metastasis. Pericyte membantu mengontrol patensi lumen kapiler yang juga penting pada penyebaran sel kanker. Selain ekstrasvasasi, sel-sel kanker yang bersirkulasi (CTCs) juga dapat menempel pada microvaskular organ yang jauh dan mulai tumbuh secara intraluminal. Sel-sel ini akhirnya dapat menyebabkan ruptur dinding vaskular sehingga sel kanker mendapatkan akses ke jaringan di bawahnya. *Circulating tumor cells* (CTC) juga merepresentasikan “metastasis intermedia ” karena mengindikasikan satu langkah dari proses metastasis. Dengan demikian, CTCs juga saat ini dijadikan marker untuk menilai efikasi suatu terapi pada uji praklinis dan klinis. Hipotesis “*seed and soil*” menggambarkan tropisme tumor tertentu untuk organ tertentu. Ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa tumor tertentu memiliki reseptor faktor pertumbuhan spesifik yang biasanya dikeluarkan dari organ tertentu. Sebagai contoh, sel-sel kanker kolon yang mengekspresikan reseptor cMET yang berada di hati sehingga kecenderungan sel kanker bermetastasis ke hati.

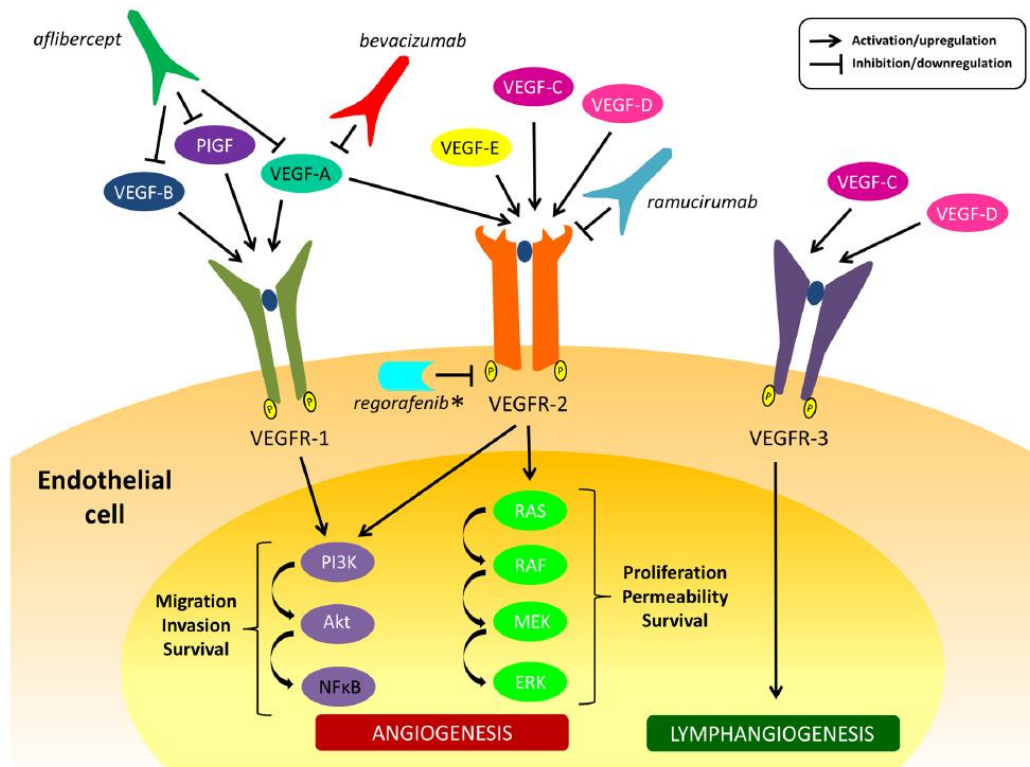
Salah satu bukti kuat yang menghubungkan angiogenesis dan metastasis adalah bahwa kepadatan microvaskular tumor berkorelasi dengan peningkatan potensi metastasis dan juga survival buruk pasien pada hampir semua jenis keganasan. Penelitian kami sebelumnya dengan menggunakan metode imunohistokimia dan tissue microarray, kami menghitung densitas mikrovaskuler melalui ekspresi protein VEGF dan CD105 pada jaringan kanker kolorektal. Penelitian ini menemukan bahwa densitas angiogenesis meningkat signifikan pada adenokarsinoma kolorektal yang berdiferensiasi buruk dan juga pada tumor metastasis atau stadium IV dibandingkan dengan stadium yang lebih rendah (Minhajati R et al, 2006).

BAB IX

ANGIOGENESIS SEBAGAI TARGET TERAPI KANKER KOLOREKTAL

Hubungan antara neo-angiogenesis dan tumor proliferasi pertama kali dijelaskan hampir 50 tahun yang lalu, tetapi manfaat klinis bevacizumab (anti-VEGF) pada pasien KKR baru dilaporkan pada tahun 2004. Beberapa jalur reseptor faktor pertumbuhan dapat mempromosikan angiogenesis tumor, tetapi protein famili VEGF dan reseptornya memainkan peran sentral, memicu jalur sinyal multiple yang berefek pada kelangsungan hidup sel endotel, migrasi, mitogenesis, diferensiasi, dan permeabilitas vascular. Saat ini diketahui ada enam efektor pada VEGF famili yang disekresikan oleh sel tumor (VEGF-A,B,C,D dan plasenta faktor pertumbuhan (PIGF) 1 dan 2), mengikat tiga jenis reseptor berbeda (VEGFR-1, VEGFR-2, dan VEGFR-3). Interaksi antara VEGF dan reseptornya mengarah pada dimerisasi dua reseptor. Selanjutnya, tirosin domain kinase dari setiap reseptor memfosforilasi yang lain, hal ini memulai kaskade pensinyalan yang melibatkan aktivasi dari beberapa jalur seperti Ras-Raf-MAPK, Scr-FAK, atau AKT-mTOR. Jalur VEGF diatur oleh beberapa faktor pertumbuhan, *epidermal growth factors* (EGF), *platelet-derived growth factors* (PDGF), *hepatocyte growth factors* (HGF), dan sitokin lainnya. Adanya peningkatan kadar VEGF dalam sirkulasi terbukti dapat menjadi prediktif adanya metastasis hati dan paru. Kadar serum VEGF yang tinggi dikaitkan dengan perlangsungan hidup yang lebih buruk pada kasus KKR.

Angiogenesis tumor dapat diblokir melalui beberapa cara. Antibodi monoklonal anti-angiogenik mengikat dan menetralkan target spesifik seperti VEGF-A (bevacizumab) atau VEGFR-2 (ramucirumab). Aflibercept adalah protein fusi rekombinan yang menghambat jalur VEGF-A, VEGF-B, dan PIGF, yang dapat membantu mengatasi resistensi atau adanya “*escape mechanism*” tumor terhadap terapi bevacizumab.



Gambar 6. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and targeted therapies. PIGF placental growth factor, VEGFR vascular endothelial growth factor receptor, PI3K phosphoinositide 3-kinase, Akt protein kinase B, NFκB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, RAS rat sarcoma, RAF rapidly accelerated fibrosarcoma, MEK mitogen-activated protein kinase, ERK extracellular signal-regulated kinases. *Regorafenib also inhibits multiple targets in addition to VEGFR-2, not shown in this figure: PDGFR, FGF, KIT, RET, RAF1, B-RAF, and B-RAF-V600E. (Lopes A et al, 2019)

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kepadatan angiogenesis tumor selain sangat berhubungan dengan pertumbuhan, metastasis, stadium dan prognosis kanker, juga penting dalam memprediksi respon kanker terhadap kemoterapi atau radioterapi. Angiogenesis pada tumor memiliki fenotip yang lebih agresif dan tingkat mikrovaskular intra-tumoral secara signifikan dapat memprediksi respon yang buruk terhadap kemoterapi. Namun, implikasi klinis yang mungkin paling penting dari angiogenesis tumor adalah pengembangan terapi anti-angiogenesis yang menargetkan pada angiogenesis tumor bukan pada sel-sel kanker.

Inhibitor angiogenesis dirancang untuk memblokir pembentukan pembuluh darah baru, dan dengan demikian pertumbuhan tumor akan dihentikan tetapi tidak dihilangkan; karenanya, anti-angiogenesis sebagai monoterapi tidak efektif pada manusia, perlu dikombinasi dengan obat kemoterapi konvensional. Inhibitor ini terkadang tidak dapat mengeliminasi tumor dan

untuk mencapai pengobatan yang optimal, kombinasi anti-angiogenesis dan kemoterapi konvensional masih diperlukan. Secara umum, inhibitor angiogenesis tumor dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok inhibitor utama, yaitu:

1. Inhibitor langsung yang menargetkan sel-sel endotelial yang ada pada pembuluh darah yang sedang tumbuh.
2. Inhibitor tidak langsung yang menargetkan baik sel tumor ataupun sel stromal tumor.

Pada penghambatan angiogenesis secara langsung, inhibitor seperti angiostatin, endostatin, arrestin, canstatin, dan tumstatin dikenal sebagai fragmen yang dilepaskan pada proteolisis molekul ECM yang berbeda dan mencegah proliferasi dan bermigrasi sel-sel endotel vaskular sebagai respons terhadap suatu spektrum penginduksi angiogenesis, termasuk VEGF, bFGF, IL-8, dan PDGF. Juga telah dilaporkan bahwa efek anti-angiogenik secara langsung dapat dikaitkan dengan reseptor integrin disertai beberapa jalur pensinyalan intraseluler (*intracellular signaling pathways*). Inhibitor angiogenesis tidak langsung akan menghambat ekspresi atau aktivitas protein pro-angiogenik seperti EGFR, misalnya gefitinib, molekul kecil yang dikenal sebagai tirosin EGFR kinase inhibitor (TKI) pada sel kanker kolon, payudara, ovarium dan gaster manusia. Dilaporkan bahwa untuk terapi anti-angiogenik inhibitor langsung atau tidak langsung, keseimbangan antara faktor pro-angiogenik dan anti-angiogenik akan dipulihkan melalui pengurangan permeabilitas pembuluh darah dan hipoksia dan peningkatan homogenitas aliran darah dan cakupan sel perivascular. Berdasarkan data dari penelitian preklinik dengan menggunakan model xenograft kanker kolorektal metastasis, bevacizumab (Anti-VEGF) memperlihatkan aktivitas antitumor baik sebagai terapi tunggal maupun kombinasi dengan kemoterapi atau radioterapi, dimana sebagai parameternya adalah berkurangnya berat, ukuran, pertumbuhan tumor, permeabilitas vascular, serta diameter dan

densitas vaskular kanker. Mekanisme yang mendasari adalah bevacizumab memperbaiki terapi sitotoksik melalui “normalisasi” vascular tumor.

Bevacizumab adalah agen anti-VEGF pertama yang disetujui sebagai terapi lini pertama untuk pasien KKR metastasis. Dalam evaluasi sebagai agen lini pertama, bevacizumab dikaitkan dengan peningkatan median OS dibandingkan dengan plasebo pada 813 pasien dengan KKR metastasis yang belum pernah mendapat pengobatan sebelumnya (HR 0.66); $p < 0,001$). Semua pasien yang mendapat IFL (irinotecan, bolus fuorouracil, dan leucovorin) sebagai kemoterapi dasar, namun capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) atau fuorouracil / asam folinat plus oxaliplatin (FOLFOX) juga dapat menjadi pilihan yang baik. Sebuah studi fase III menegaskan tidak adanya perbedaan antara FOLFIRI (5-fuoruracil, leucovorin, dan irinotecan) dan FOLFOX kombinasi bevacizumab pada pasien KKR metastasis yang belum pernah mendapat pengobatan sebelumnya. Pedoman ESMO 2016 merekomendasikan semua kemoterapi doublet dengan bevacizumab sebagai pengobatan lini pertama, terutama pada pasien dengan KKR metastasis positif mutasi gen RAS. Dalam meta-analisis dari sembilan penelitian dan 3710 pasien dengan KKR metastasis, penambahan bevacizumab ke kemoterapi secara signifikan memperpanjang PFS (*progression-free survival*) (Lopez A et al, 2019).

Dalam satu dekade terakhir, insiden KKR telah menurun rata-rata sebesar 2,7% setiap tahun, tetapi diperkirakan hampir 135.500 kasus baru didiagnosis di AS pada tahun 2017. Secara umumnya dihubungkan dengan hasil yang baik yaitu *5- years overall survival* (OS) adalah sekitar 65% pada kasus KKR tanpa metastasis, namun menurun menjadi 15% pada kasus KKR dengan metastasis jauh. Dilaporkan bahwa tidak semua pasien memperoleh manfaat klinis dari pengobatan bevacizumab (anti-VEGF) serta durasi respon pada pasien sangat bervariasi. Adanya resistensi terhadap terapi anti-angiogenesis dengan target VEGF diduga akibat adanya mekanisme menghindar (*escape mechanism*) sel tumor dan jaringan sekitarnya dari dependensinya terhadap VEGF.

Apabila angiogenesis pada kanker tidak memungkinkan terjadi karena beberapa sebab, maka sel kanker akan mampu memprogram ulang dirinya untuk membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) sebagai strategi cadangan. Aktivasi jalur *transforming growth factor beta* (TGF- β) tampaknya memainkan peranan penting dalam menginisiasi angiogenesis pada sel kanker KKR. Hal ini membuka jalan banyak penelitian untuk mendapatkan pendekatan terapeutik baru KKR yang lebih potensial.

Endoglin (CD105) merupakan suatu *cell adhesion molecules* yang diekspresikan pada permukaan sel endotel dengan lokasi gen pada 9q34, merupakan 180 kDa homodimerik transmembran glikoprotein, suatu komponen dari kompleks reseptor TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*) yang merupakan sitokin pleotropik yang memodulasi angiogenesis melalui regulasi fungsi sel termasuk proliferasi, differensiasi dan migrasi. CD105 mengikat TGF- β 1 dan 3 dan memodulasi signal TGF- β melalui interaksinya dengan TGF- β reseptor I dan/atau II. CD105 merupakan koreseptor penunjang tipe III (TGF- β RIII) untuk TGF- β RII, activin like kinase-1 (ALK-1) dan ALK-5 yang berinteraksi dengan TGF- β family. Dilaporkan bahwa level ekspresi CD105 pada sel endotel dapat mempengaruhi respon endotel terhadap TGF- β yang memodulasi proliferasinya. Penelitian kami sebelumnya telah membuktikan bahwa CD105 secara eksklusif diekspresikan pada sel endotel angiogenesis KKR dan beberapa karsinoma pada organ lain yang dinilai melalui ekspresinya yang positif pada sel endotel angiogenesis. Sebaliknya CD105 hampir tidak diekspresikan pada sel endotel kapiler jaringan normal disekitar tumor. Lebih jauh lagi, ekspresi CD105 pada sel endotel sangat selektif tanpa *cross-reactivity* yang signifikan dengan sel inflamasi, sel stroma pada jaringan neoplasma maupun sel endotel pembuluh limfe (Minhajati R et al, 2006). Lebih jauh, penelitian kami yang lain dengan menggunakan xenograft model, membuktikan bahwa terjadi penurunan jumlah vaskularisasi sekitar tumor setelah pemberian anti-CD105 antibodi dan terjadi penghambatan pertumbuhan tumor dan metastasis ke organ lain (Minhajati R, 2009, ringkasan hasil penelitian ini terlampir pada bab berikutnya).

Beberapa tahun terakhir ini, penelitian multisenter mulai dilakukan untuk mengkombinasi anti-CD105 (TCRC105) dengan bevacizumab (anti-VEGF). Pada penelitian kami didapatkan rerata kadar protein CD105 berbeda signifikan ($p=0,003$) antara yang mendapat dan tidak mendapat terapi bevacizumab, dimana kadar protein CD105 signifikan lebih tinggi pada subyek yang mendapat obat bevacizumab (5,11 ng/ml) dibandingkan dengan subyek yang tidak mendapat bevacizumab (4,06 ng/l). Berbeda dengan CD105, meskipun juga terdapat perbedaan signifikan ($p=0.002$) antara yang mendapat bevacizumab dengan subyek yang tidak mendapat bevacizumab, namun kadar protein VEGF signifikan lebih tinggi pada subyek yang tidak mendapat bevacizumab (671,24 pg/ml) dibandingkan subyek yang mendapatkan obat bevacizumab (388,56 pg/ml). Gambaran kadar protein CD105 dan VEGF yang terbalik dimana kadar protein CD105 lebih tinggi dan kadar protein VEGF lebih rendah pada subyek yang telah mendapat bevacizumab dapat mendukung suatu teori adanya “*escape mechanism*” pada kegagalan terapi anti-angiogenesis (anti-VEGF) (Minhajati R et al, 2020).

BAB X

TERAPI ANTI-ANGIOGENESIS KANKER KOLOREKTAL

Terapi anti-angiogenik telah memperbaiki prognosis kanker kolorektal dalam 15 tahun terakhir. Bevacizumab memperlihatkan manfaatnya dalam kombinasi dengan kemoterapi dalam berbagai kondisi, termasuk sebagai terapi lini pertama atau kedua, dan juga sebagai strategi terapi pemeliharaan. Saat ini, pedoman penatalaksanaan KKR berdasarkan *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) maupun berdasarkan *European Society Medical Oncology* (ESMO), terapi standar untuk KKR metastasis terdiri dari kemoterapi yang dikombinasikan dengan antibodi yang dipilih sesuai dengan status mutasi K-RAS dan N-RAS (panel gen pan-RAS). Untuk semua mutasi pan-RAS KKR metastasis direkomendasikan menggunakan anti-VEGF antibody (bevacizumab). Anti-EGFR antibody cetuximab atau panitumumab hanya diberikan untuk pan-RAS *wildtype* KKR metastasis. Monoclonal antibody bevacizumab (anti-VEGF) kombinasi dengan bolus 5-FU/leucovorin/Irinotecan dan kombinasi dengan 5-FU/leucovorin atau kombinasi tunggal dengan capecitabine memperlihatkan hasil berupa peningkatan RR, PFS dan OS.

Sampai saat ini total ada empat obat yang menghambat angiogenesis yang telah disetujui oleh FDA yaitu bevacizumab, aflibercept, ramucirumab dan regorafenib untuk terapi KKR metastasis, diantara obat tersebut hanya bevacizumab yang direkomendasikan untuk terapi pasien KKR metastasis yang naif kemoterapi.

Table 1 Food and Drug Administration-approved antiangiogenic drugs for the treatment of metastatic colorectal cancer

Agent	Class	Target	Indication	Approved for	Recommended dose
Bevacizumab	Humanized Moab	VEGF-A	First- and second-line	Use in combination with oxaliplatin and irinotecan-based chemotherapy	5 mg/kg or 10 mg/kg <i>i.v.</i> every 2 wk
Aflibercept	Fully human Moab	VEGF-A, -B, and PlGF	Second-line	Use in combination with FOLFIRI	4 mg/kg <i>i.v.</i> every 2 wk
Ramucirumab	Fully human Moab	The extracellular domain of VEGFR-2	Second-line	Use in combination with FOLFIRI	8 mg/kg <i>i.v.</i> every 2 wk
Regorafenib	Oral multikinase inhibitor	VEGFR-1, -2, and -3 (in addition to RET, KIT, PDGFR, and FGFR)	Beyond second-line	Single-use	160 mg once daily, days 1-21 of 28-d cycle

Moab: Monoclonal antibody; VEGF: Vascular endothelial growth factor; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; PlGF: Placental growth factor; PDGF: Platelet derived growth factor; FGFR: Fibroblast growth factor; FOLFIRI: 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan.

Kanat O et al, *World J Clin Oncol* 2019

Sebagaimana telah dibahas pada bab sebelumnya, bevacizumab adalah *murine-derived monoclonal antibody* (muMAb) yang menghambat angiogenesis dengan menargetkan VEGF-A. Diantara kelompok VEGF, VEGF-A adalah sitokin angiogenik penting yang diproduksi oleh sel-sel kanker dan stroma, yang sifatnya tergantung pada *hypoxiainducible factor-1* (HIF-1). Ini memicu sinyal angiogenik melalui interaksi dengan reseptor tirosin kinase permukaan sel endotel [VEGF receptor-1 (VEGFR-1) dan -2 (VEGFR-2)]. Pengikatan VEGF-A ke domain ekstraseluler reseptor akan menginduksi dimerisasi dan autofosforilasi dan aktivasi jalur intraseluler berikutnya yang berkontribusi pada proliferasi sel (misalnya, fosfolipase-C-*gamma* dan *extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway*), migrasi (misalnya, *focal adhesion kinase* and *p38 pathway*), dan kelangsungan hidup (misalnya, jalur fosfatidylinositol 3-kinase/Akt). Kelompok VEGF lainnya, seperti VEGF-B, -C, dan -D, dan Placental growth factors (PlGF) memainkan peran pendukung dalam proses angiogenesis.

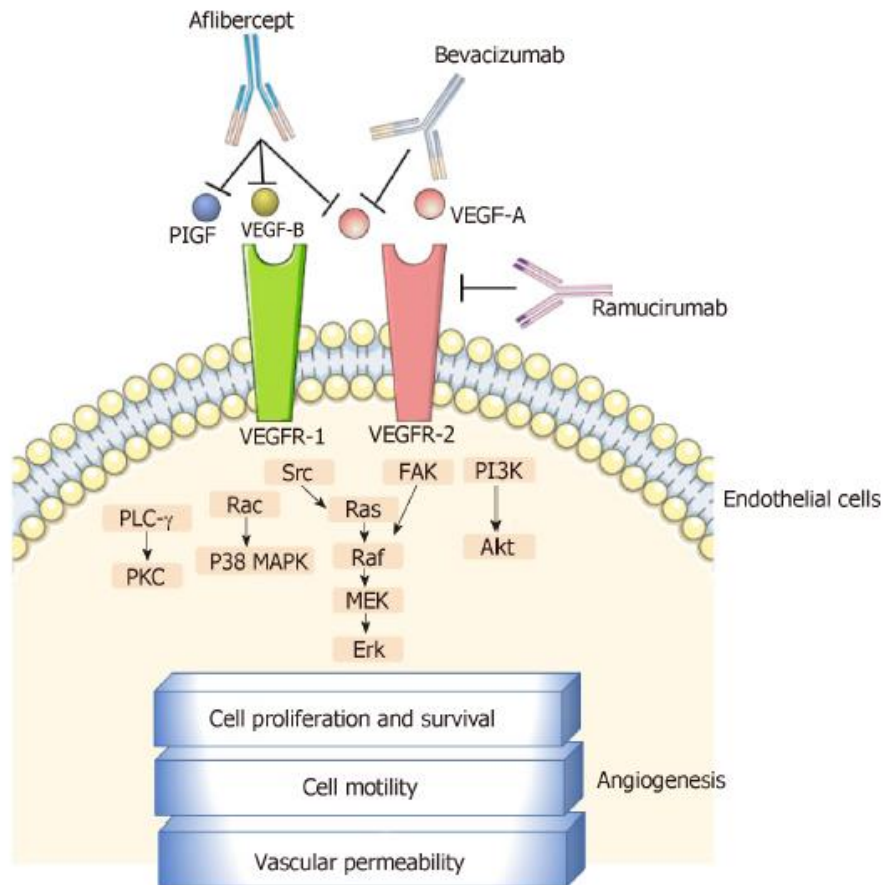


Figure 1 Approved anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer and their mechanisms of action. VEGF: Vascular endothelial growth factor; PlGF: Placental growth factor; FAK: Focal adhesion kinase; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; PLC-γ: Phospholipase C gamma; PKC: Protein kinase C; MAPK: Mitogen-activated protein kinases; Erk: Extracellular signal-regulated kinase.

Kanat O et al, World J Clin Oncol 2019

Terapi sistemik untuk kanker kolorektal metastatis mencakup kemoterapi yang dikombinasikan dengan agen biologik. Fluoropyrimidines, oxaliplatin, dan irinotecan adalah kemoterapi konvensional, variasi dua atau tiga regimen obat tersebut ditambahkan agen biologik yaitu anti-VEGF atau anti-EGFR, tergantung pada faktor spesifik tumor dan faktor spesifik pasien kanker kolorektal metastasis.

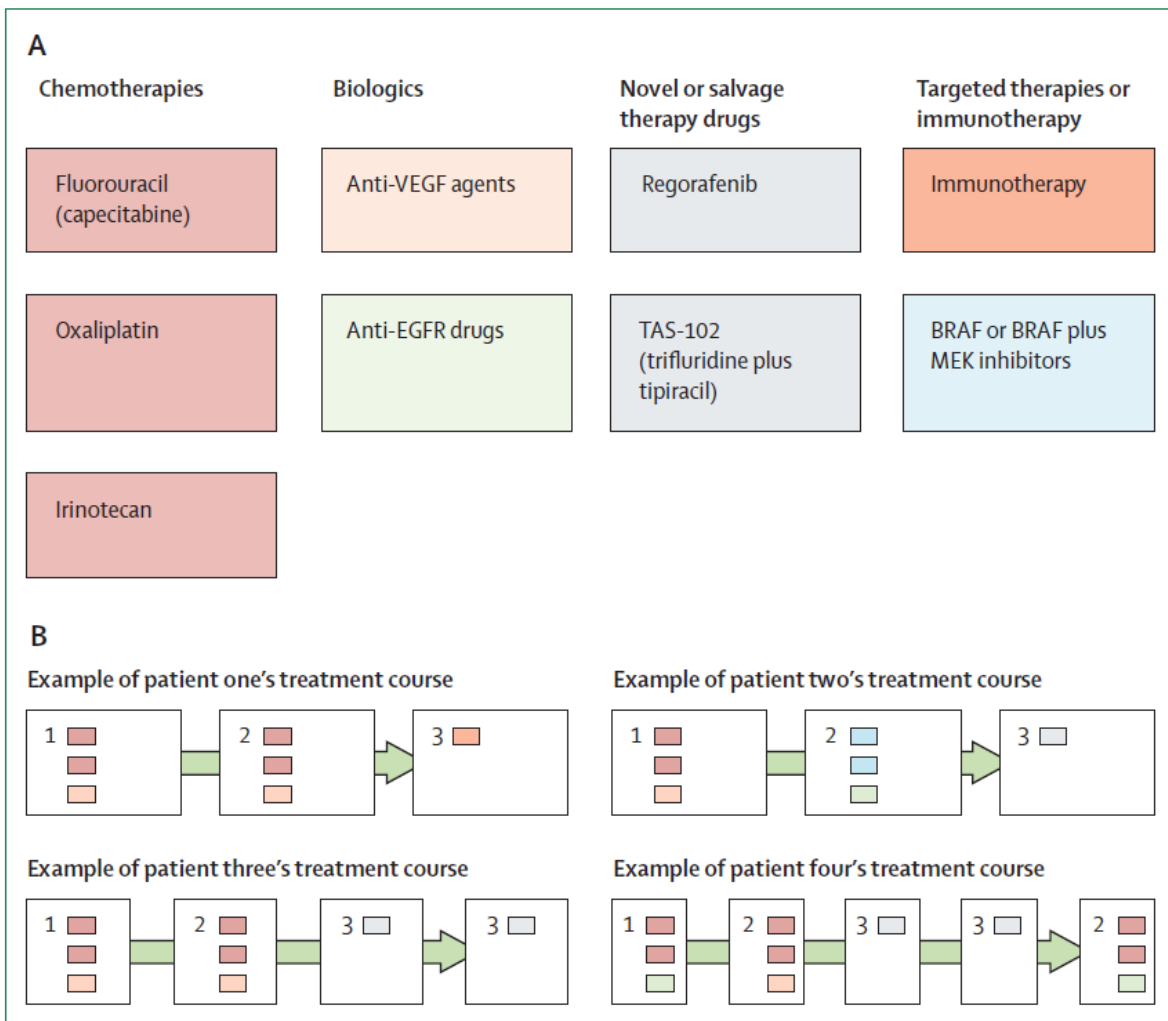


Figure 7: Classes of drugs used in patients with metastatic colorectal cancer. Different classes of drugs available for patients with metastatic colorectal cancer (A), often used in combination (eg, two or three chemotherapy drugs paired with a biologic). Patients with metastatic colorectal cancer are often treated with multiple treatment regimens one after another (B) depending on patient-related and tumour-related factors (eg, sidedness, mutations, or mismatch repair status—such as immunotherapy for microsatellite instability-high tumours). Dekker E et al, *Lancet* 2019.

BAB XI

Anti-CD105 Inhibits Primary Cancer Growth and Secondary Hematogenous Metastasis in a Xenograft Model

Sebagaimana yang telah dilaporkan bahwa meskipun penggunaan anti-angiogenesis memberikan hasil yang baik, namun tidak semua pasien memperoleh manfaat klinis dari pengobatan bevacizumab (anti-VEGF) serta durasi respon pada pasien sangat bervariasi. Adanya resistensi terhadap terapi anti-angiogenesis dengan target VEGF diduga akibat adanya mekanisme menghindar (*escape mechanism*) sel tumor dan jaringan sekitarnya dari dependensinya terhadap VEGF. Apabila angiogenesis pada kanker tidak memungkinkan terjadi karena beberapa sebab, maka sel kanker akan mampu memprogram ulang dirinya untuk membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) sebagai strategi cadangan. Aktivasi jalur *transforming growth factor beta* (TGF- β) tampaknya memainkan peranan penting dalam menginisiasi angiogenesis pada sel kanker KKR.

Pada bab ini ditampilkan secara ringkas hasil penelitian eksperimental penulis yang mengevaluasi efek anti-angiogenesis Endoglin (CD105) pada kanker kolorektal dengan menggunakan model xenograft pada *SCID mouse* dan *cell line* kanker kolorektal. Endoglin adalah transmembrane glikoprotein, suatu komponen dari kompleks reseptor TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*) yang merupakan sitokin pleotropik yang memodulasi angiogenesis melalui regulasi fungsi sel termasuk proliferasi, differensiasi dan migrasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji efikasi CD105 pada model kanker kolorektal pada *SCID mouse*.

Cell line WiDr kanker kolorektal, ditumbuhkan dalam media RPMI-1640 yang diberi suplemen dengan 5% serum fetal bovine, 2 mM L-glutamine dan 1.5 g/L Sodium Bicarbonate, 50mg/ml gentamicin sulfate dan disimpan dalam inkubator dengan kelembaban 5% CO₂ pada suhu 37°C. Sel-sel kemudian ditanam satu lapisan dalam labu kultur 25 cm².

Sel dipanen pada fase pertumbuhan eksponensial dengan diberikan tripsin. Konsentrasi sel ditentukan dengan hemositometer.

Untuk uji proliferasi, sel kanker dikultur dalam chamber slideTM selama 6 jam, kemudian diinkubasi dengan antibodi anti-CD105 selama 24 jam. Setelah fiksasi dengan aseton dingin, sel-sel direaksikan dengan *monoclonal mouse anti-human Ki67* antigen (MIB-1, DakoCytomation, Denmark) pada pengenceran 1:50 kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 4°C, dicuci, dan kemudian diinkubasi dengan *secondary antibody goat anti-mouse IgG* selama 30 menit pada suhu kamar. Ekspresi positif Ki67 pada inti dihitung dari 10 area.

Pada penelitian ini digunakan 20 tikus SCID jantan berumur 5 minggu C.B-17 / Icr (20-25 g). Semua tikus dipelihara dalam kondisi bebas patogen tertentu di *Center for Animal Experimentation, Saga University School of Medicine (Saga, Japan)*. Semua tikus diberi makanan standar dan air ad libitum. Sel kanker yang disiapkan dari sel yang tumbuh secara eksponensial yang dipanen dengan pemberian larutan EDTA 0,25% trypsin-0,01 dan disuspensi kembali dalam PBS pada konsentrasi akhir $3 \cdot 10^7$ sel per ml. Kemudian $1 \cdot 10^7$ sel per tikus disuntikkan subkutis di punggung (kelompok SC, n = 13) dan vena di ekor (kelompok, hematogen n = 11). Eksperimen anti-angiogenesis dimulai 4 minggu setelah implantasi sel kanker ketika tumor berkembang menjadi ukuran diameter 20-25 mm. Perlakuan untuk kelompok SC dibagi menjadi dua kelompok berikut: kelompok kontrol yang tidak diberi *anti-mouse CD105 monoclonal antibody* (n = 3) dan kelompok injeksi intra peritoneal dengan *anti-mouse CD105 monoclonal antibody*, pada 50µg/2 hari. Evaluasi pada tumor metastasis paru dibagi dalam kelompok kontrol yang tidak mendapat antibodi anti-CD105 (n = 3) dan kelompok yang mendapat antibodi anti-CD105 (n = 8). Dosis yang disuntikkan sama dengan dosis kelompok tumor subkutan. Pertumbuhan tumor dan morbiditas hewan coba dimonitor setiap hari. Berat badan dan ukuran tumor diukur seminggu sekali. Ukuran tumor dihitung menggunakan rumus berikut: Ukuran = panjang x lebar, dan dinyatakan dalam mm². Untuk

evaluasi area nekrotik pada kelompok SC dan area tumor pada metastasis paru, slide jaringan dengan pewarnaan HE discan dan kemudian dianalisis menggunakan *NIH image software program*, kemudian masing-masing dihitung menggunakan rumus berikut dan dinyatakan sebagai%: area nekrotik / total area, dan area tumor / seluruh potongan area paru.

Jaringan tumor subkutan segera dibekukan setelah hewan coba dimatikan, kemudian dipotong dengan cryostat dengan ketebalan 6 μ , dan difiksasi dengan aseton dingin. Potongan jaringan diinkubasi dengan *primary antibody rat-anti mouse CD105 monoclonal antibody* dengan pengenceran 1:100. Kemudian dibiarkan semalam pada suhu 4°C, dicuci lalu diinkubasi dengan *secondary antibody Rabbit Anti-Rat IgG*, selama 30 menit pada suhu ruangan. Positif ekspresi CD105 pada pembuluh darah dihitung dan dinyatakan dalam rata-rata dari 5 area *hot spot* dan dinyatakan sebagai *microvessel density (MVD)*.

Hasil penelitian ini secara ringkas ditampilkan dalam gambar dan tabel berikut.

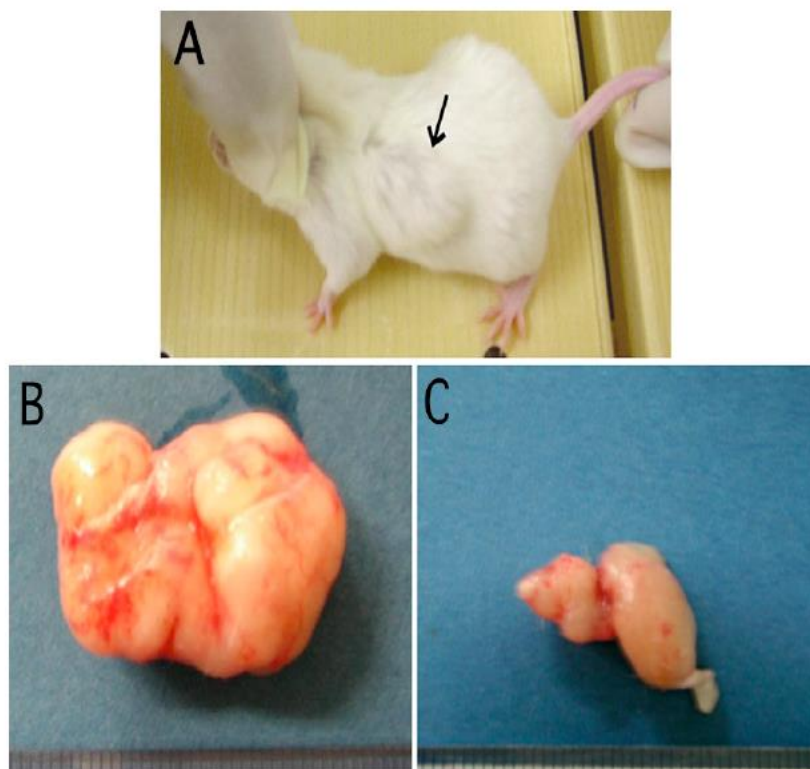


Fig. (1). Cancer development in the SCID mouse. **A)** Subcutaneous implantation of the colon cancer cells forms a cancer nodule in the subcutis (arrow). **B)** An enucleated cancer nodule is large 8 weeks after the implantation (Control). **C)** The cancer nodule shrunk after each 2-day administration of anti-CD105 antibody for 4 weeks. (Minhajati R et al, *Vascular Disease Prevention*, 2009)

Table 1. A Summary of the Body Weight and Tumor Status in Both the Subcutaneous Implantation Group and the Hematogenous Metastatic Cancer Group

Group	Body Weight or Tumor Size	Subgroup	Start	4 Weeks After Transplant	8 Weeks After Transplant
Subcutaneous group	Body weight (g)	Control group	19.1 ± 0.3	23 ± 0.4	23.0 ± 0.2
		Treatment group	19.3 ± 0.4	23.2 ± 0.8	21.8 ± 2.8
	Tumor size (mm)	Control group		171.2 ± 13.6	180.5 ± 63.2
		Treatment group		163.5 ± 23.0	131.6 ± 36.3
Hematogenous lung group	Body weight (g)	Control group	19.1 ± 0.1	22.3 ± 3.5	19.1 ± 0.3
		Treatment group	19.4 ± 0.5	22.3 ± 0.5	21.1 ± 3.7

(Minhajet R et al, *Vascular Disease Prevention*, 2009)

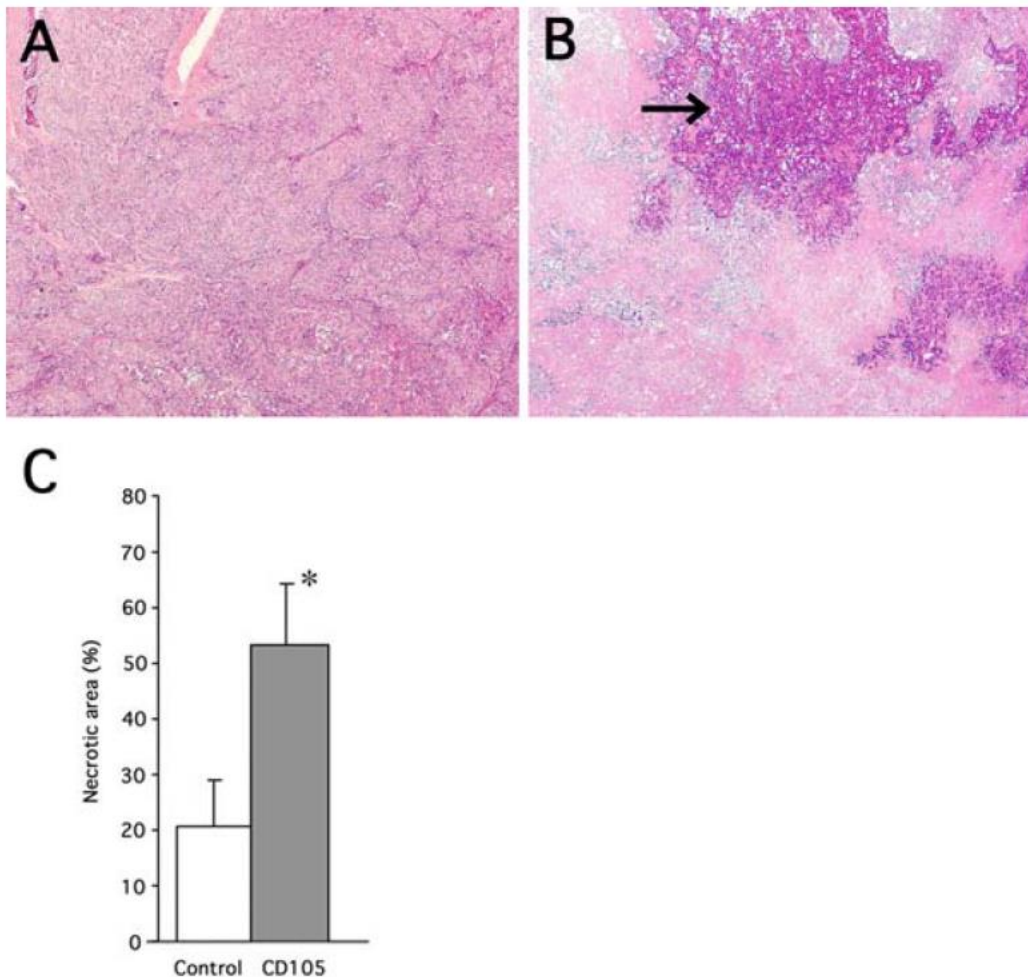


Fig. (2). Effect of anti-CD105 antibody administration. **A)** Necrosis of the cancer tissue is scanty in the control. x40. **B)** Necrotic area occupies almost half of the cancer lesion by anti-CD105 antibody treatment. Red islands are the remaining cancer tissue (arrow). x40. **C)** Relative necrotic area in the whole cancer lesion (%). Effect on the cancer necrosis is much greater in the anti-CD105 antibody group. * $P < 0.05$. (Minhajet R et al, *Vascular Disease Prevention*, 2009)

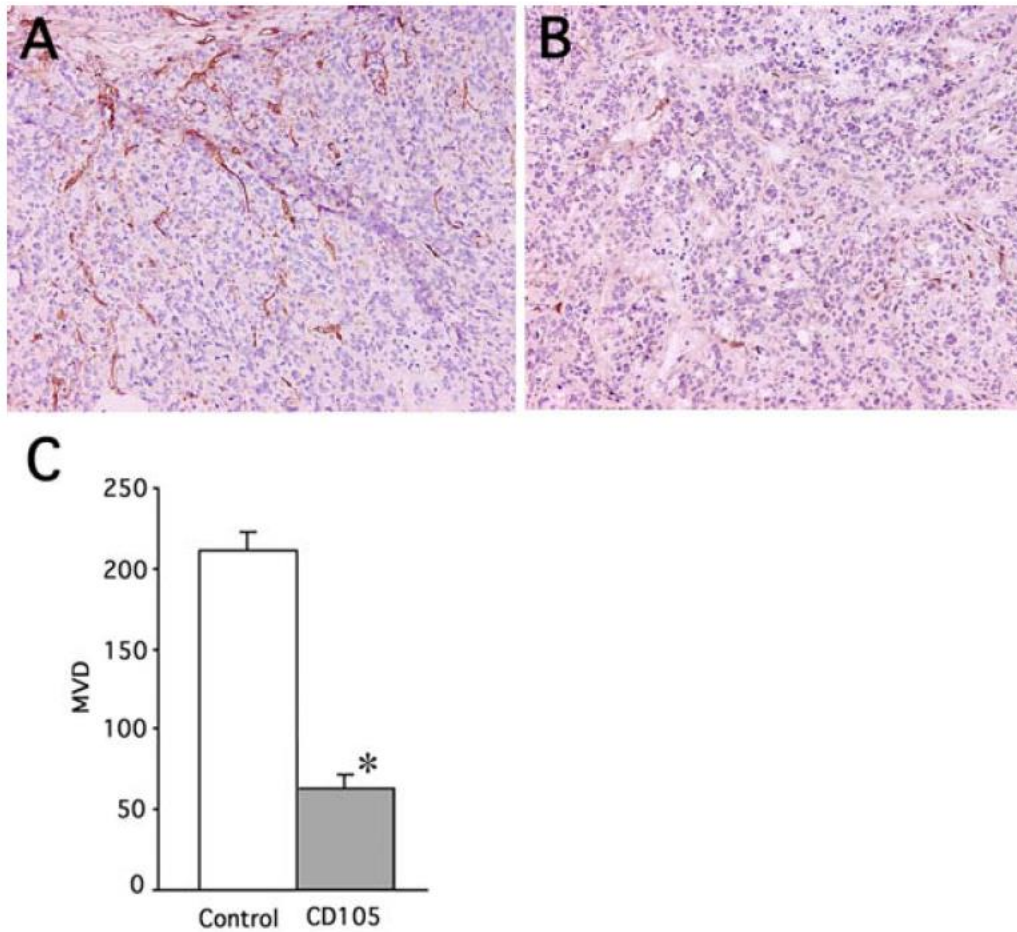


Fig. (3). An immunohistological study of CD105 expression and MVD in the subcutaneous cancer lesion. **A)** The vascular network is well developed and CD105 is strongly expressed in the control. $\times 100$ **B)** The vascular network is often interrupted and the remaining fragmented vasculature is barely positive. Note the degenerative or necrotic cancer tissue. $\times 100$. **C)** Comparison of MVD. MVD is much less in the anti-CD105 group. * $P < 0.01$. (Minhajati R et al, *Vascular Disease Prevention*, 2009)

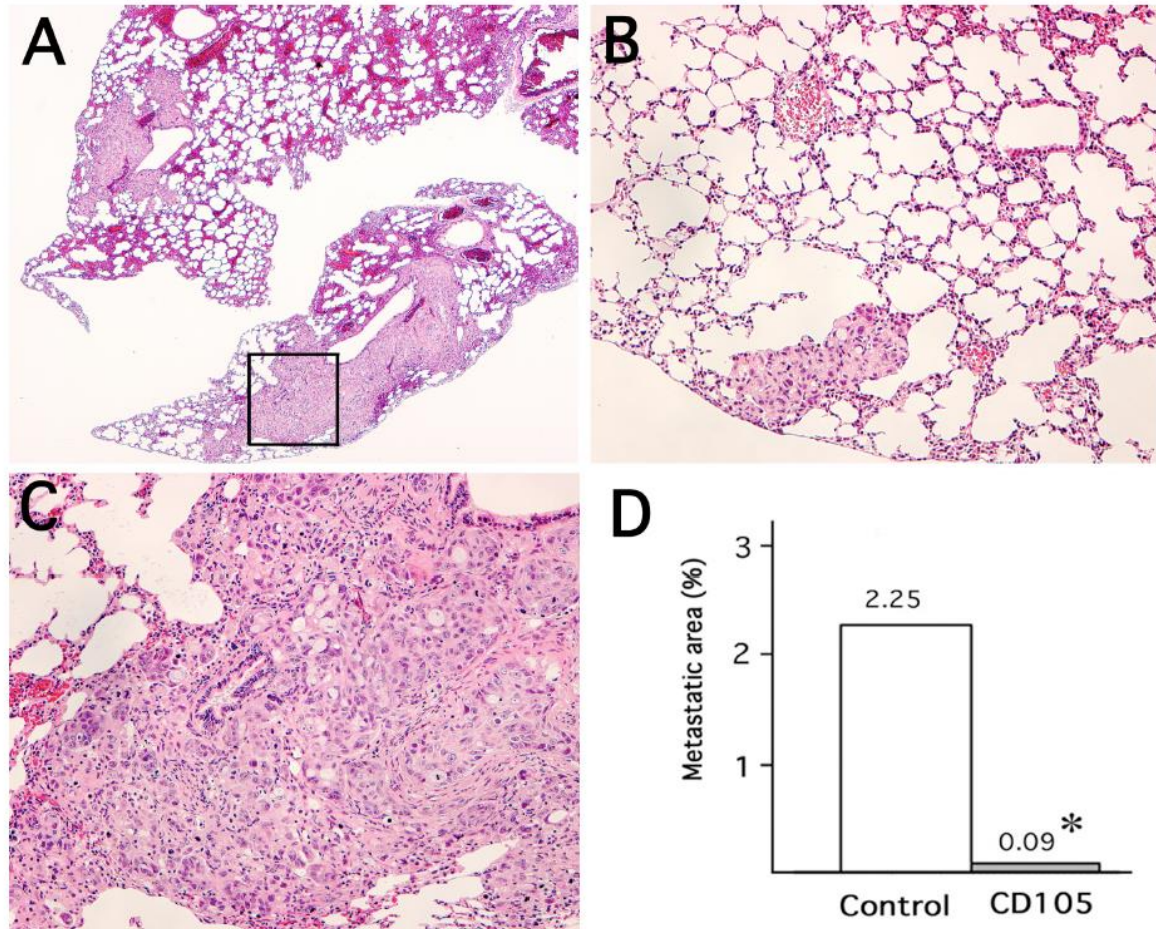


Fig. (4). A comparison of hematogenous metastasis to lung. **A)** Many foci of metastatic lung cancer are seen in the control group. *x40*. **B)** On the other hand, the number of cancer metastases is much smaller and the size is also smaller. *x100*. **C)** Higher magnification of A. Most of the cancer lesion is large. *x200*. **D)** A comparison of the cancer metastasis. The number of cancer foci is much less in the anti-CD105 group. * $P < 0.01$. (Minhajati *et al*, *Vascular Disease Prevention*, 2009)

Target CD105, sebagai terapi anti-angiogenesis pada kanker juga telah diteliti secara ekstensif dalam serangkaian pemberian anti-CD105 mAb yang dikombinasikan dengan radiolabel, immunotoxinconjugate, atau rejimen kemoterapi konvensional. Menariknya, dari semua model hewan coba, semuanya memperlihatkan adanya efek anti-tumor dan aktivitas anti-metastasis dan membuktikan kemampuan anti-CD105 mAb untuk menghambat angiogenesis tumor.

Pada model eksperimental kami ini, terapi antibodi anti-CD105 dilakukan pada xenograft kanker kolon pada *SCID mouse*. Pertumbuhan kanker berhenti dan menyusut drastis karena nekrosis di bagian tengah tumor setelah pemberian Antibodi anti-CD105 setiap 2 hari.

Selain itu, terapi antibodi anti-CD105 tersebut yang diberikan melalui vena pada ekor tikus dapat mencegah penyebaran kanker di paru-paru. Terapi antibodi tersebut juga mencegah metastasis sekunder tumor primer subcutaneus. Penggunaan antibodi anti-CD105 untuk terapi anti-angiogenik memiliki keuntungan besar dalam menargetkan angiogenesis tumor. Jika antibodi anti-CD105 dikombinasikan dengan antikanker kemoterapi dapat menjadi strategi untuk kanker di masa depan.

Sebagai kesimpulan dari penelitian ini adalah temuan penelitian menunjukkan bahwa CD105 secara khusus diekspresikan pada sel endotel vaskular pada model xenograft kanker kolon, dan antibodi anti-CD-105 menghambat pertumbuhan tumor dan metastasis hematogen melalui penghambatan angiogenesis tumor. Endoglin (CD105) dapat menjadi target yang bermanfaat dan antibodi anti-CD105 adalah kandidat untuk terapi antiangiogenik kanker kolorektal.

1. Adair TH, Montani JP. Angiogenesis. 2010;San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
2. Arjaans, M. *et al.*, 2016. *VEGF Pathways Targeting Agents, Vessel Normalization and Tumor Drug Uptake : from Bench to Bedside*. *Oncotarget*, 7(16) : 21247 - 58.
3. [Arnold M](#), [Sierra MS](#), [Bray F](#). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. [Gut](#). 2016. pii: gutjnl-2015-310912.
4. August DA, Ottow RT, Sugarbaker PH. Clinical perspective of human colorectal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1984;3(4):303-24. Bielenberg DR, Zetter BR. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J*. 2015.
5. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009 Oct;19(5):329-37.
6. Ben K. Seon, Akinao Haba, Endoglin-Targeted Cancer Therapy. *Curr Drug Deliv*. 2011 Jan; 8(1): 135–143. 52
7. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
8. Bielenberg, DR., and Zetter BR., 2015. *The Contribution of Angiogenesis to The Process of Metastasis*. *Cancer J*, 21 (4):267-73.
9. Bray F, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
10. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
11. Ciombor KK, Goldberg RM. Update on Anti-angiogenesis Therapy in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2015;11:378–87
12. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS*. 2006;(96):321-49.
13. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003;16(4):376-88.
14. Cutsem EV, A. Cervantes A, Adam R. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 27:1386–1422
15. De Palma M., Biziato D., and Petrova TV., 2017. *Microenvironmental Regulation of Tumor Angiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 17(8):457-474.
16. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels LA et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2019; 394: 1467–80
17. Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61:759-170.
18. Florescu-Țenea RM, Kamal AM, Mitruț P, et al. Colorectal Cancer: An Update on Treatment Options and Future Perspectives. *Curr Health Sci J*. 2019. ;45(2):134-141
19. Fokman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent?. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82: 4-6.
20. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med*. 1971; 285: 1182-6.
21. Guyot F, Faivre J, Manfredi S, et al. Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005;16:756-61.
22. Gustavsson B, [Carlsson G](#), [Machover D](#), et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015. ;14(1):1-10.

23. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ . Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. Br J Cancer. 2005 Aug 22;93(4):399-405.
24. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
25. Kanat O, Ertas H. Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. World J Clin Oncol. 2019;24; 10(2): 52-61.
26. Lavery IC, Kostner FL, Pelley RJ, et al. Treatment of colon and rectal cancer. Surg Clin North Am. 2000;80(2):535-69.
27. Lee SR, Michael SG, Daniela EM, et al. Endoglin for Targeted Cancer Treatment. Curr Oncol Rep. 2014; 16:365
28. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci . 2017;18(1):197.
29. Minhajat R, Daisuke M, Tokunaga O, et al. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. Virchows Arch. 2006;448(2):127-34.
30. Minhajat R, Daisuke M, Tokunaga O, et al. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. Pathol Int. 2006;56(12): 717-23.
31. Minhajat R, Kai K, Tokunaga O, et al. Anti-CD105 Inhibits Primary Cancer Growth and Secondary Hematogenous Metastasis in a Xenograft Model. Vascular Disease Prevention. 2009;6:91-96.
32. Minhajat R, Benyamin AF, Bakri S. Profiles of Endoglin and Vascular Endothelial Growth Factor Based on Staging and Histological Grading of Colorectal Cancer, and Its Relationship with Bevacizumab Therapy. *Accepted in Journal of Colproctology, 2020.*
33. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guideline Colon Cancer. 2020.
34. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, et al. NCCN Guidelines Insights: Colorectal Cancer Screening, Version 1.2018. J Natl Compr Canc Netw. 2018;16(8):939-49.
35. Rajabi M, Shaker A. Mousa SAThe Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. Biomedicines. 2017 Jun; 5(2): 34.
36. Renehan AG, Egger M, Saunders MP, et al. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. BMJ. 2002;6:324(7341):813.
37. Seeber A, Gunsilius E, Gastl G, et al. Anti-Angiogenics: Their Value in Colorectal Cancer Therapy. Oncol Res Treat. 2018;41(4):188-193.
38. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer.2003;3:721–732.
39. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin.2019. 69,7
40. Stephenson J. A, Goddard JC, Al-Ta'an O. Tumour Angiogenesis: A Growth Area From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. J Cancer Res. 2013; ID 895019
41. Sudoyo AW, Hernowo W, Krisnuhoni E, et al. Colorectal cancer among young native Indonesians: A clinicopathological and molecular assessment on microsatellite instability. Med J Indones. 2010;19:245-51.
42. Tejpar S, Van Cutsem E. Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2002;16(2):171-85.
43. Ward J.P. Oxygen sensors in context. Biochim. Biophys. Acta.2008;1777:1–14.
44. Weis SM, Cheresh DA. Tumor Angiogenesis : Molecular Pathways and Therapeutic Targets. Nat Med. 2011;17(11): 1359-70.
45. Weitz J, Koch M, Debus J, et al. Colorectal cancer. Lancet. 2005;365(9454):153-65.

46. WHO. Colorectal cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Globocan 2012.
47. Xie YH, Chen YX, Fang JY. et al. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 20;5(1):22.
48. Paauwe M, Heijkants RC, Hawinkels LJ. Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene.* 2016 Aug 4;35(31):4069-79.

ANTI-ANGIOGENESIS SEBAGAI TARGET TERAPI KANKER KOLOREKTAL



Dr. Rahmawati Minhajat. PhD, SpPD, KHOM, FINASIM.

Menyelesaikan pendidikan dokter (1995), Spesialis Penyakit Dalam (2012) serta Konsultan Hematologi dan Onkologi Medik (2017) di Universitas Hasanuddin Makassar. Penulis menyelesaikan pendidikan tingkat Doktoral (S3) di Department of Pathology and Biodefense, Medical Faculty Saga University

Japan tahun 2007 dengan fokus riset dan publikasi mengenai kanker, dimana beberapa diantaranya mengenai angiogenesis pada kanker. Saat ini penulis menjalankan tugas sebagai tenaga pengajar pada jenjang pendidikan S1, S2/Spesialis dan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Selain itu, penulis juga menjalankan tugas pelayanan sebagai Dokter Spesialis Penyakit Dalam dan sebagai Konsultan Hematologi Onkologi Medik di Rumah Sakit Universitas Hasanuddin dan beberapa tempat lainnya.