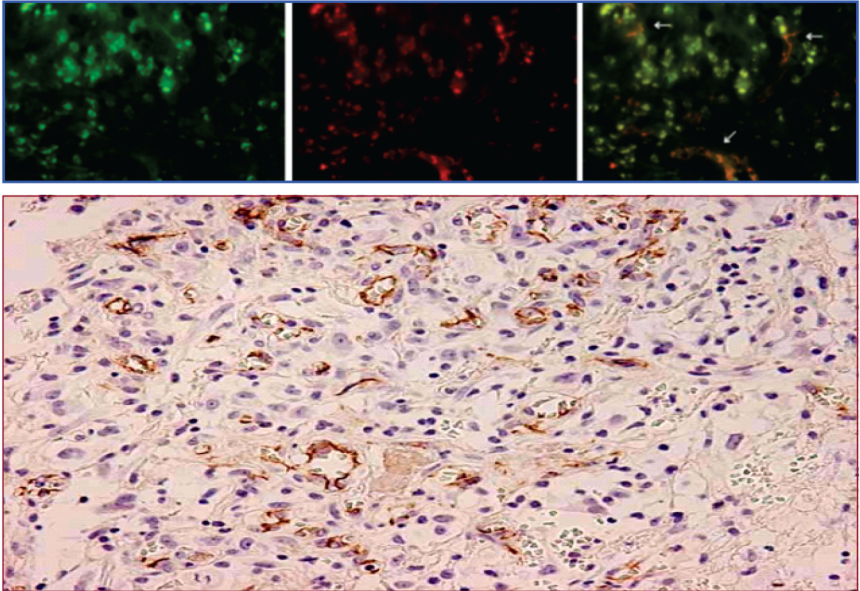


Rahmawati Minhajat



ANGIOGENESIS DAN PERANANNYA PADA KANKER

(Buku ini menampilkan beberapa hasil penelitian penulis mengenai angiogenesis pada kanker)

ANGIOGENESIS DAN PERANANNYA PADA KANKER

ANGIOGENESIS DAN PERANANNYA PADA KANKER

(Buku ini menampilkan beberapa hasil penelitian penulis
mengenai angiogenesis pada kanker)

Rahmawati Minhajat

Penerbit:



Bagian Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran

ANGIOGENESIS DAN PERANANNYA PADA KANKER

Penulis :

Rahmawati Minhajat

ISBN: 978-60261363-6-7

Desain sampul Layout :

Basuki Hariyanto

Penerbit:

Bagian Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Unhas

Alamat Penerbit:

Rumah Sakit Pendidikan Unhas Lt. 5
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 11 Makassar

Hak Cipta © Rahmawati Minhajat. *All rights reserved.* Hak cipta dilindungi undang-undang.

Cetakan I 2019

Dilarang memperbanyak isi buku ini, baik sebagian maupun seluruhnya dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penulis/penerbit.

KATA SAMBUTAN

Saya mengucapkan selamat kepada penulis atas diterbitkannya buku ini yang berjudul “Angiogenesis dan peranannya pada kanker”, 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.

Kita ketahui bahwa kejadian kanker terus meningkat sehingga berdampak pada peningkatan morbiditas dan mortalitas apabila tidak tertangani secara dini. 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 sehingga dapat berdampak pada proses edukasi, peningkatan minat meneliti dalam bidang terkait, deteksi dini pasien dan lebih jauh akan berdampak pada penurunan morbiditas dan mortalitas kanker.

Makassar, Agustus 2019.
Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS,

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

PENGANTAR PENULIS

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang dapat terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Proses angiogenesis fisiologis dimulai sejak dari dalam kandungan dan terus berlanjut sampai dewasa. Angiogenesis telah lama menarik perhatian karena perannya dalam kesehatan dan juga penyakit.

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. Secara umum, mekanisme terjadinya angiogenesis pada kanker sangat kompleks yang didasari oleh adanya pengaruh faktor proangiogenik. Implikasi klinis yang mungkin paling penting dari angiogenesis pada kanker adalah pengembangan terapi anti-angiogenesis yang saat ini sudah digunakan pada kasus kanker tertentu, yaitu sebagai terapi yang targetnya menghambat pembentukan vaskularisasi baru di disekitar tumor.

Tujuan utama penulisan dan penerbitan buku ini adalah untuk memberikan informasi yang lebih detail dan update mengenai angiogenesis secara umum dan secara khusus pada kanker kepada mahasiswa kedokteran, peneliti, dokter umum dan spesialis, serta

praktisi kesehatan lainnya. Buku ini juga dilengkapi dengan pembahasan beberapa hasil penelitian penulis yang terkait dengan angiogenesis kanker. Kami berharap buku ini akan bermanfaat bagi pembacanya

Makassar, Agustus 2019

Penulis,

Rahmawati Minhajat

DAFTAR ISI

KATA SAMBUTAN	v
PENGANTAR PENULIS.....	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH	5
BAB III ANGIOGENESIS PADA KONDISI FISILOGIS	11
BAB IV ANGIOGENESIS PADA KANKER	19
a. Mekanisme Angiogenesis Pada Tumor	20
b. Peranan VEGF Pada Angiogenesis Tumor	26
c. Peranan Endoglin (CD105) Pada Angiogenesis Tumor	29
BAB V PERANAN ANGIOGENESIS PADA PERTUMBUHAN TUMOR	33
BAB VI PERANAN ANGIOGENESIS PADA METASTASIS	37
BAB VII PERANAN ANGIOGENESIS SEBAGAI TARGET TERAPI KANKER	41

BAB VIII	
EVALUASI ANGIOGENESIS TUMOR DENGAN METODE MICROARRAY, IMUNOHISTOKIMIA DAN IMMUNOFLUORESCENCE	45
KEPUSTAKAAN	59

BAB I

PENDAHULUAN

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang dapat terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Proses angiogenesis fisiologis dimulai sejak dari dalam kandungan dan terus berlanjut sampai usia tua. Vaskular dibutuhkan pada semua jaringan untuk menjamin ketersediaan oksigen dan nutrisi. Oksigen memainkan peranan penting dalam regulasi vaskuler dimana faktor hemodinamik sangat penting untuk kelangsungan jaringan vaskular dan adaptasi struktur dinding pembuluh darah. Perubahan aktivitas metabolik menyebabkan perubahan angiogenesis dan perubahan kapilaritas yang proporsional.

Angiogenesis telah lama menarik perhatian karena perannya dalam kesehatan dan juga penyakit. 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. 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, dan mengusulkan bahwa penghambatan angiogenesis pada tumor dapat menjadi strategi untuk menghambat pertumbuhan kanker dan metastasis.

Angiogenesis pada kanker merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah setempat yang ada

disekitar tumor primer melalui mekanisme *sprouting*. 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. Secara umum, mekanisme terjadinya angiogenesis pada kanker sangat kompleks yang didasari oleh adanya pengaruh faktor proangiogenik yang dimulai dari proses proliferasi dan migrasi endotel, signal faktor pertumbuhan, remodeling matriks ekstraseluler serta interaksi sel stroma.

Lebih jauh lagi telah dibuktikan bahwa kepadatan angiogenesis pada kanker juga penting dalam memprediksi prognosis dan juga respon kanker terhadap kemoterapi atau radioterapi. Namun, implikasi klinis yang mungkin paling penting dari angiogenesis pada kanker adalah pengembangan terapi anti-angiogenesis, yaitu terapi yang targetnya menghambat pembentukan vaskularisasi baru di disekitar 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 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 angiogenesis pada kondisi patologis, misalnya pada kanker. Hasil penelitian kami dengan menggunakan metode imunohistokimia telah membuktikan bahwa ekspresi protein VEGF meningkat pada angiogenesis di daerah tumor, pada sel kanker dan sel-sel stroma sekitar kanker.

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

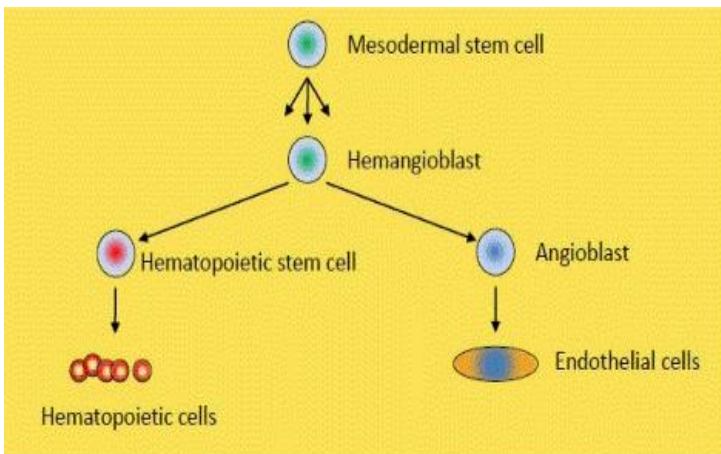
regulasi fungsi sel termasuk proliferasi, differensiasi dan migrasi. Dengan menggunakan metode imunohistokimia, penelitian kami juga telah membuktikan bahwa protein CD105 secara eksklusif diekspresikan pada sel endotel angiogenesis di daerah tumor yang dinilai melalui ekspresinya yang positif pada sel endotel. Sebaliknya protein CD105 hampir tidak diekspresikan pada sel endotel kapiler jaringan normal disekitar tumor.

Pada buku ini, pembahasan akan diawali dengan penjelasan mengenai mekanisme pembentukan pembuluh darah pada kondisi fisiologis yang meliputi vaskulogenesis dan angiogenesis, kemudian lebih jauh akan dibahas mengenai angiogenesis pada kanker serta evaluasi secara imunohistokimia melalui ekspresi protein VEGF, protein CD105 (Endoglin) dan beberapa marker angiogenik lainnya.

BAB II

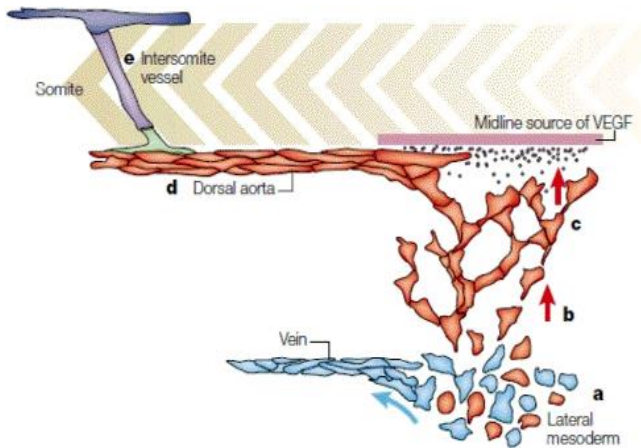
PEMBENTUKAN PEMBULUH DARAH

Sistem kardiovaskular adalah sistem organ yang pertama berkembang pada embrio. Permukaan luminal dari sistem sirkulasi yang kontak dengan darah adalah susunan sel epitel, yaitu selapis sel gepeng yang disebut endothelium dimana sel ini berasal dari mesoderm (Gambar 1). Hemangioblas adalah hasil diferensiasi dari sel punca mesodermal yang berubah menjadi sel punca hematopoietik dan angioblas. Angioblas adalah tipe sel yang mempunyai potensi untuk berdiferensiasi menjadi sel endotel namun belum memiliki semua penanda karakteristik sel endotel.



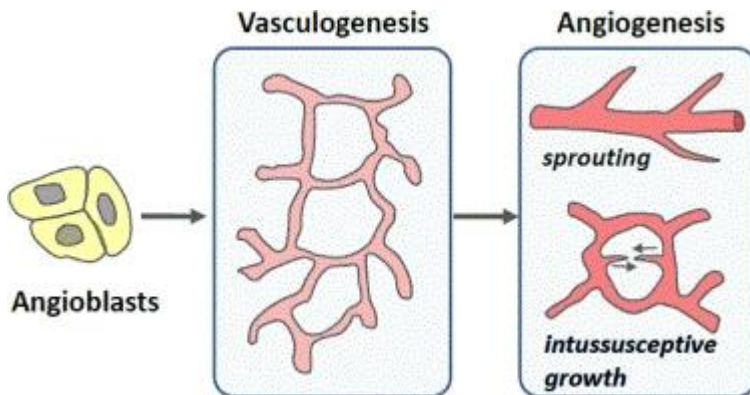
Gambar 1. Asal mula sel hematopoetik dan sel endotel. Sel punca mesoderm merupakan induk dari sel angioblas dan sel punca hematopoetik pada perkembangan embrional. Hemangioblas merupakan prekursor angioblas dan sel punca hematopoetik. Angioblas berdiferensiasi menjadi sel endotel. Sel punca hematopoetik akan berdiferensiasi menjadi semua tipe sel yang terdapat dalam sirkulasi darah. *Thomas H. Adair and Jean-Pierre Montani. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010*

Pembuluh darah pada orang dewasa berasal dari jaringan pembuluh darah yang awalnya terbentuk saat embrio melalui proses yang disebut sebagai vaskulogenesis. Vaskulogenesis adalah proses dimana pembuluh darah terbentuk secara *de novo* dari prekursor sel endotel yaitu angioblas. Selama proses vaskulogenesis, angioblas berproliferasi dan menyatu menjadi suatu jaringan pleksus kapilar primer. Pola sel endotel yang terbentuk melalui vaskulogenesis akan menjadi struktur dasar (*scaffold*) untuk proses angiogenesis dimasa akan datang. Setelah terbentuknya pleksus kapilar primer, akan terjadi remodeling melalui pertumbuhan dan percabangan. Proses vaskulogenesis ini terjadi pada jaringan ekstra dan intraembriolik embrio dan merupakan proses dinamis yang melibatkan interaksi berbagai sel termasuk matriks ekstraselular. Proses ini mencakup diferensiasi sel punca mesodermal menjadi angioblas dimana faktor pertumbuhan mempengaruhi migrasi angioblas untuk membentuk “*blood islands*” tempat dimana angioblas berubah menjadi sel endotel (Gambar 2).



Gambar 2. Vaskulogenesis pada embrio. (a) Angioblas yang berasal dari mesoderm lateral yang akan menjadi arteri (merah) atau vena (biru). Vena kardinal terbentuk dari sel prekursor (biru) yang tetap berada dalam posisi lateral. (b) Sel prekursor arteri bermigrasi ke arah *vascular endothelial growth factor tipe A* (VEGF-A) di garis tengah, tempat dimana VEGF disekresi oleh sel-sel yang berada di *midline*. (c) Angioblas arteri yang bermigrasi akan menyelaraskan posisinya membentuk pleksus. (d) Angioblas arteri menyatu membentuk aorta dorsal (e) Pembuluh darah intersegmental dirakit dari tiga tipe sel endotel dengan morfologi yang berbeda, pada gambar ditunjukkan sebagai warna biru, ungu, dan hijau. *Nature Publishing Group: Hogan (2002) [18]. Thomas H. Adair and Jean-Pierre Montani. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010*

Pembentukan pembuluh darah baru diawali oleh sel angioblas yang berdiferensiasi in situ menjadi sel-sel endotel yang dirangkai menjadi labirin vaskular primitif yang disebut vaskulogenesis. Jaringan primer ini matang melalui beberapa tipe pertumbuhan vaskular termasuk pembentukan vaskuler melalui proses *sprouting* dari sel endotel vaskuler setempat yang sudah ada, tipe ini dikenal sebagai tipe *sprouting angiogenesis* dan tipe lainnya adalah bentuk *Intussusceptive angiogenesis* yaitu proses dimana terjadi pelebaran lumen melalui interkalasi sel-sel endotel tambahan atau terjadi fusi pembuluh vaskuler yang sudah ada sebelumnya, percabangan dan pemisahan pembuluh darah (pembentukan pilar interkapiler, intususepsi). (Gambar 3)



Gambar 3. Gambaran skematis tiga tipe dasar pembentukan pembuluh darah. *Redrawn after Carmeliet and Collen (2000)*

TIPE ANGIOGENESIS

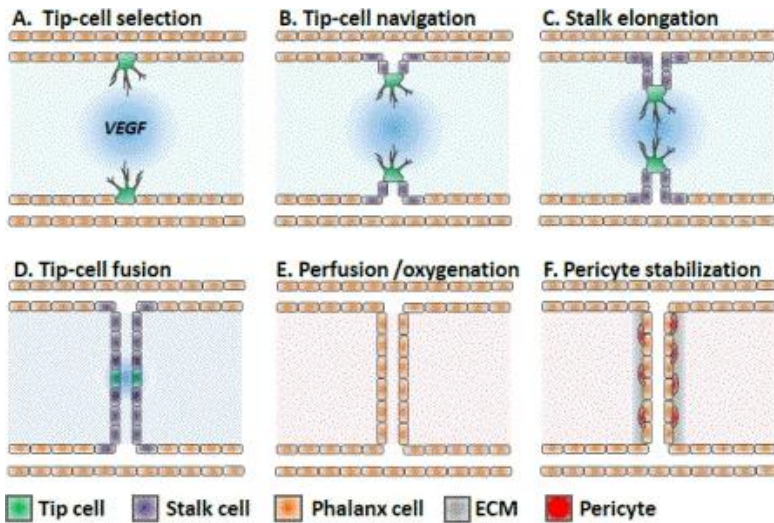
Ada dua tipe angiogenesis yaitu *sprouting angiogenesis* dan *intussusceptive angiogenesis (non-sprouting angiogenesis)* yang terjadi baik pada masa dalam kandungan maupun setelah lahir. *Sprouting angiogenesis* telah dipahami lebih baik karena telah ditemukan hampir 200 tahun yang lalu. *Intussusceptive angiogenesis* ditemukan oleh Burri sekitar dua dekade yang lalu. *Sprouting angiogenesis* ditandai oleh pertumbuhan sel endotel dari pembuluh darah setempat yang distimulasi oleh faktor pro-angiogenik seperti VEGF-A. Angiogenesis tipe ini dapat menambah pembuluh darah ke bagian jaringan yang sebelumnya tidak memiliki pembuluh darah.

Intussusceptive angiogenesis melibatkan pembentukan pembuluh darah melalui proses pemisahan dimana unsur jaringan interstisial menginvasi pembuluh darah yang ada, membentuk pilar jaringan transvaskuler yang meluas. Kedua jenis angiogenesis tersebut diperkirakan terjadi pada hampir semua jaringan dan organ tubuh.

Sprouting angiogenesis

Berikut ini adalah gambaran beberapa tahap proses pembentukan *Sprouting angiogenesis* (gambar 4):

- Diawali dengan dilepaskannya faktor pertumbuhan angiogenik yang akan mengaktifkan reseptor yang ada pada sel endotel, yaitu sel-sel yang melapisi dinding pembuluh yang ada.
- Selanjutnya sel-sel endotel yang teraktivasi ini mulai melepaskan enzim-enzim seperti protease. Protease ini dapat memecah protein dan sel dari membran basal. Kondisi tersebut menyebabkan terbukanya pembuluh darah yang ada yang memungkinkan lepasnya sel-sel endotel yang teraktivasi dari pembuluh darah induknya.
- Sekali sel-sel endotel tersebut terlepas, mereka akan memperbanyak diri disekitar matriks dan membentuk tunas yang solid. Kondisi tersebut membantu menghubungkan dengan pembuluh darah yang ada didekatnya.
- Selanjutnya tunas akan memanjang kearah sumber stimulasi angiogenik. Sel-sel endotel yang baru menggunakan molekul adhesi seperti integrin yang membantu mereka terikat satu sama lainnya untuk membentuk rantai. Tunas tersebut kemudian akan membentuk lingkaran yang akan membentuk pembuluh darah tubuler
- Pertumbuhan tunas vaskuler dapat terjadi dengan cepat dengan laju beberapa milimeter per hari.



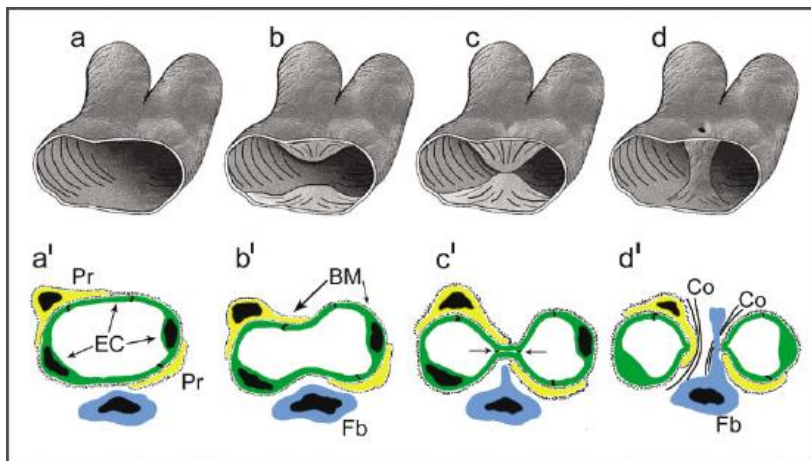
Gambar 4. *Sprouting Angiogenesis*. VEGF mengarahkan pertumbuhan kapiler ke jaringan yang perfusinya buruk. (A) Sel endotel yang terpapar VEGF-A dengan konsentrasi tertinggi akan menjadi sel paling ujung/pangkal (hijau). Jaringan hipoksia ditandai dengan daerah lingkaran biru. (B) Sel tunas akan mengawali pertumbuhan dengan memperbanyak jumlah filopodia. (C) Sel tunas yang bertumbuh akan memanjang melalui proliferasi sel endotel (ungu). (D) Kedua sel pangkal yang bertumbuh akan bergabung membentuk suatu lumen. (E) Darah yang mengalir melalui kapiler yang baru mengoksigenasi jaringan, sehingga mengurangi pelepasan VEGF-A. (F) Kapiler yang baru terbentuk distabilkan melalui perekrutan pericyte (merah), deposisi matriks ekstraselular (abu-abu), *shear stress* dan kekuatan mekanis lainnya yang terkait dengan aliran darah dan tekanan darah. *Redrawn after Carmeliet et al. (2009)*.

Intussusceptive angiogenesis atau splitting angiogenesis

Jenis angiogenesis ini pada dasarnya melibatkan pemisahan atau penguraian pembuluh darah yang lebih besar menjadi pembuluh darah yang lebih kecil. Pembuluh darah atau dinding kapiler memasuki lumen pembuluh darah yang ada untuk membaginya menjadi dua atau lebih pembuluh darah yang lebih kecil. Intususepsi memungkinkan peningkatan besar jumlah kapiler tanpa peningkatan jumlah sel endotel. Ini penting dalam perkembangan embrio. Proses angiogenesis intususepsi terjadi dalam beberapa fase yang meliputi (Gambar 5):

- Dinding kapiler saling mendekati dan kontak pada suatu titik.
- Kemudian pada tempat hubungan antar sel endotel (*endothelial cell junctions*) mengalami perubahan sehingga terbentuk dinding pembuluh darah yang *bilayer*.

- Dinding pembuluh darah yang *bilayer* ini kemudian mengalami perforasi oleh adanya faktor angiogenesis yang mengaktifkan endotel. Ini memungkinkan faktor pertumbuhan dan sel untuk menembus ke dalam lumen.
- Suatu titik awal intususepsi pembuluh darah terbentuk pada titik kontak antara dinding pembuluh darah satu dengan lainnya. Tempat ini diisi oleh pericytes dan myofibroblas.
- Sel-sel baru mulai membentuk serat kolagen di daerah titik awal pertembungan tersebut dan membantu menyediakan matriks ekstraseluler untuk pertumbuhan lumen pembuluh darah. Kemudian pada daerah awal intususepsi tersebut lumen pembuluh darah akan terbagi menjadi dua.



Gambar 5. Memperlihatkan gambar tiga dimensi (a-d) dan dua dimensi (a'-d') proses yang menghasilkan segmen vaskular baru melalui pertumbuhan intususepsi. a, b, a', b': Proses dimulai dengan penonjolan dinding kapiler yang berlawanan ke dalam lumen pembuluh darah. Setelah terjadi kontak interendotel (c,c'), terbentuk bilayer endotelium (EC) dan perforasi membran basalis (BM) pada bagian sentral dan pilar yang baru terbentuk meningkatkan ketebalan setelah diinvasi oleh fibroblas (Fb) dan pericytes (Pr), yang menghasilkan fibril kolagen (Co) (d,d'). *Kurz et al. (2003)*

Selama fase intususepsi, pertumbuhan kapiler terjadi melalui pembentukan pilar transkapiler. Selanjutnya pertumbuhan dan remodeling vaskular terjadi melalui intususepsi. Hal ini menghasilkan perluasan jaringan kapiler yang cepat dan pembentukan pohon vaskular dan adaptasi dinamis dan remodeling.

BAB III

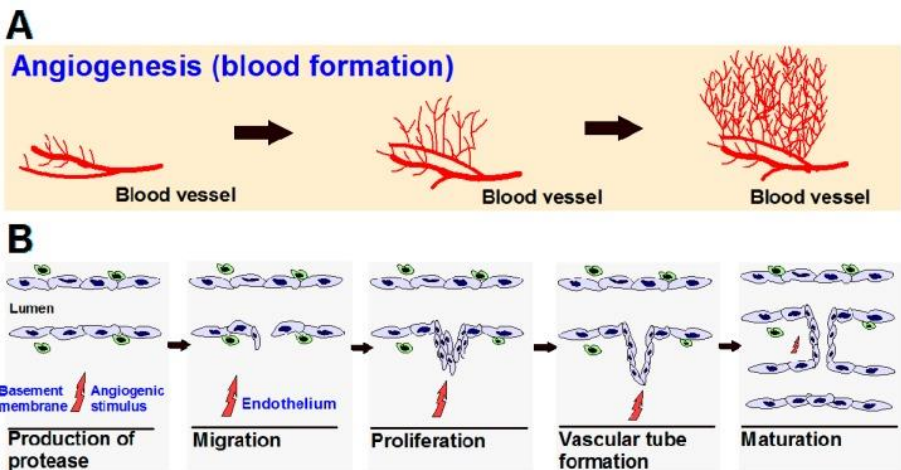
ANGIOGENESIS PADA KONDISI FISILOGIS

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya (*pre-existing*), selanjutnya terbentuk cabang-cabang pembuluh darah yang baru. Angiogenesis terjadi pada kondisi normal (fisiologis) dan juga pada kondisi patologis.

Proses angiogenesis pada kondisi fisiologis sangat penting selama perkembangan embrio. Pada orang dewasa, angiogenesis terlibat dalam pemeliharaan vaskular pada proses penyembuhan luka, iskemia dan pembentukan kolateral untuk memperbaiki perfusi organ, fungsi ovarium, serta proliferasi endometrium selama siklus reproduksi dan pembentukan plasenta. Kapiler tumbuh dan mengalami regresi pada jaringan sehat sesuai tuntutan fungsionalnya. Olahraga menstimulasi angiogenesis pada otot skelet dan jantung, sebaliknya kurang olahraga menyebabkan regresi kapiler. Kapiler tumbuh pada jaringan adiposa selama penambahan berat badan dan mengalami kemunduran selama penurunan berat badan. Jelas, angiogenesis terjadi sepanjang hidup akan tetapi berbeda dengan sel yang lain, kemampuan proliferasi sel endotel sangat terbatas. Stimulasi angiogenesis dapat berefek terapeutik pada penyakit jantung iskemik, penyakit arteri perifer, dan penyembuhan luka. Sebaliknya, mengurangi atau menghambat angiogenesis dapat berefek terapeutik pada kanker, kondisi oftalmik, rheumatoid arthritis, dan penyakit lainnya.

Pada kondisi fisiologis pembentukan pembuluh darah baru melalui proses normal dan kompleks yang dikendalikan oleh biomolekul tertentu yang diproduksi oleh tubuh. Sinyal kimia lokal atau endogen sistemik mengkordinasikan fungsi endotel dan sel otot polos dinding pembuluh darah untuk memperbaiki pembuluh darah yang rusak. Proses terjadinya angiogenesis merupakan proses yang kompleks yang dimulai dengan produksi protease, migrasi sel endotel dan proliferasi, pembentukan tabung vaskular, anastomosis tabung yang baru terbentuk, sintesis membran basalis dan penggabungan pericyte dan sel otot polos.

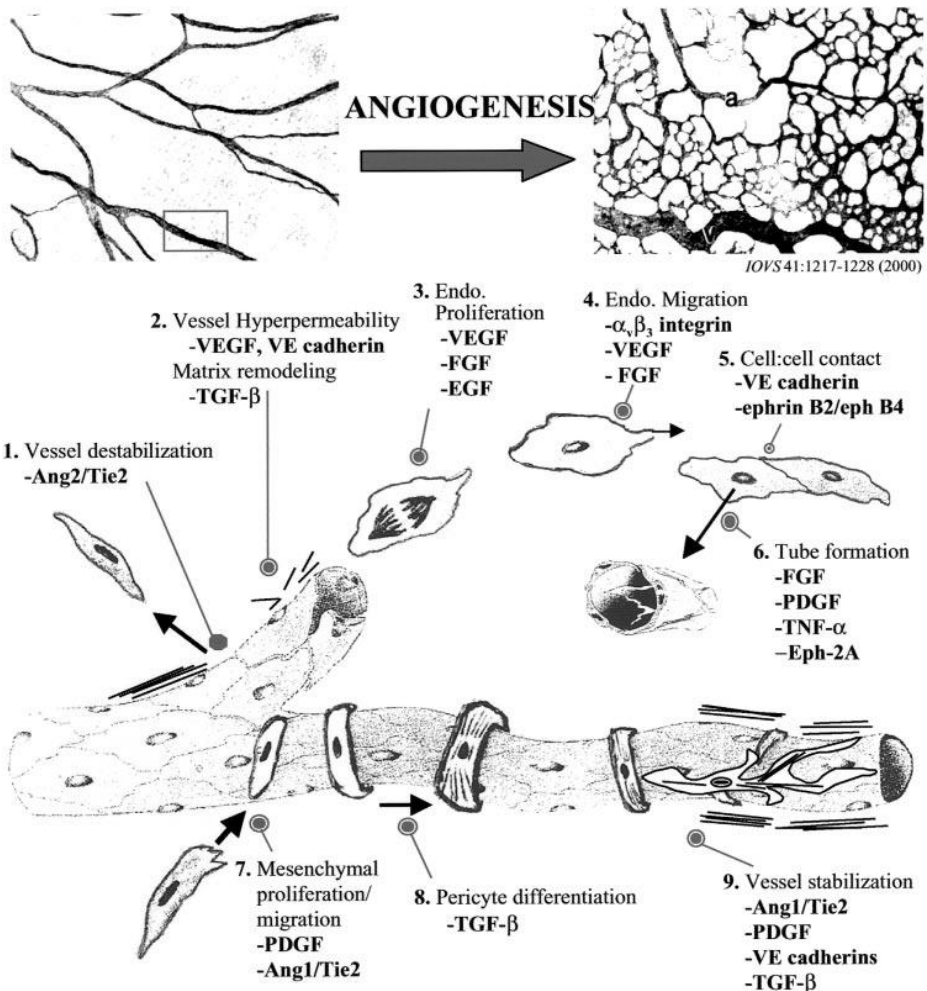
Setelah aktivasi sel endotel oleh rangsangan faktor angiogenik, enzim proteolitik diproduksi sehingga menyebabkan rusaknya matriks ekstraselular perivaskular dan membran basalis vaskuler. Selanjutnya sel endotel berproliferasi dan bermigrasi ke daerah perivaskular, membentuk “*primary sprouts*”. Dari daerah tersebut selanjutnya terjadi pembentukan lumen kapiler yang diikuti oleh sintesis membran basalis baru dan maturasi pembuluh darah untuk melengkapi struktur yang menyeruapi tabung dimana darah bisa mengalir (Gambar 6).



Gambar 6. (A) Angiogenesis pada proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sebelumnya sudah ada (*pre-existing vessels*); (B) Tahapan pada proses angiogenesis. Rajabi M. *Biomedicines*. 2017 Jun; 5(2): 34.

Proses angiogenesis pada kondisi fisiologis melibatkan berbagai proses independen, begitupun maturasi dan remodeling mikrovaskular yang baru terbentuk melalui kordinasi berbagai proses dalam mikrovaskular. Dalam keadaan normal, angiogenesis adalah suatu proses yang kompleks, karena membutuhkan induksi sel endotel yang tenang (tidak aktif berproliferasi) untuk membelah dan berproliferasi membentuk vaskular baru pada jaringan yang membutuhkan. Berbagai faktor yang berperan dari tahap awal angiogenesis sampai terbentuknya pembuluh darah baru dapat dilihat pada gambar berikutnya (gambar 7).

Angiogenesis normal tergantung pada kordinasi berbagai proses independen. Hilangnya pericyte dari endothelium dan distabilisasi pembuluh darah oleh angiopoetin-2 (Ang2) merubah sel endotel dari stabil menjadi kondisi fenotipe proliferasi. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VE chaderin dan TGF-beta menginduksi permeabilitas dan memungkinkan untuk ekstravasasi komponen protease dan matriks lokal dari aliran darah. Melalui induksi faktor pertumbuhan seperti VEGF, FGF dan EGF serta alfa dan beta integrin, sel endotel berproliferasi dan bermigrasi melalui remodeling matriks dan kemudian membentuk tabung dimana darah dapat mengalir. Sel mesenchymal berproliferasi dan migrasi sepanjang pembuluh darah baru dan berdiferensiasi menjadi pericyte matang, kemudian diikuti oleh formasi sel endotel matang, penguatan kontak antar sel endotel dan elaborasi matriks baru untuk menstabilkan pembuluh darah baru.



Gambar 7. Mekanisme angiogenesis pada kondisi fisiologis. TGF; transforming growth factor, FGF; fibroblast growth factor; EGF; epidermal growth factor, PDGF; platelet derived growth factor, TNF; tumor necrosis factor, a; arteriole, v; venule. [Adapted from Hughes et al (108a).] *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947–C970, 2002.

Pada kondisi normal, banyak faktor yang berpengaruh positif dan negatif terhadap angiogenesis; di antaranya adalah polipeptida, interaksi sel-sel dan matriks sel, serta efek hemodinamik. Faktor pertumbuhan (*growth factors*), molekul terikat membrane (*membrane-bound molecules*), dan kekuatan mekanis yang memediasi sinyal-sinyal ini dirangkum dalam Tabel

1. dan dibahas di bawah ini dalam hal kontribusinya pada mekanisme angiogenesis normal.

Molekul pro-angiogenik dipertahankan dalam keadaan tidak aktif dan akan mengalami upregulasi saat angiogenesis diperlukan untuk proses fisiologis, seperti pada kondisi reproduksi, embriogenesis, diferensiasi dan perbaikan atau penyembuhan jaringan. Dalam kondisi fisiologis, rangsangan eksternal termasuk hipoksia, hipoglikemia, dan mekanis stres dapat mengaktifkan proses angiogenesis. Hipoksia adalah suatu substansi pengaktif yang paling banyak diteliti, upregulasi *hypoxia-inducible factor* (HIF-1), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *endoplasmic reticulum kinases*, dan *soluble guanylate cyclases*, yang menyebabkan pembentukan vaskular selama embriogenesis.

Table 1. Faktor-faktor yang berperan pada angiogenesis normal

Factors	Biological Actions
Soluble mediators	
VEGF	Increases endothelial cell permeability Stimulates endothelial cell uPA/PAI-1 production Stimulates endothelial cell proliferation Inhibits endothelial cell apoptosis Enhances endothelial cell migration Stimulates in vivo angiogenesis
Ang1	Stimulates in vitro endothelial cell sprout formation Increases girth and stability of endothelium
Ang2	Antagonizes Ang1 signaling/destabilizes endothelium
aFGF bFGF	Stimulates endothelial cell proliferation Enhances endothelial cell migration Stimulates endothelial cell PA/collagenase production

	Stimulates endothelial cell tube formation
	Stimulates in vivo angiogenesis
PDGF	Stimulates DNA synthesis in endothelial cells
	Stimulates endothelial cells to form chords in vitro
	Stimulates proliferation of smooth muscle cells and pericytes
	Induces vWF, VEGF, and VEGFR-2 expression in cardiac endothelial cells
	Increases capillary wall stability
TGF- β	Supports anchorage-independent growth of fibroblasts
	Inhibits proliferation and migration of endothelial cells
	Stimulates/inhibits formation of endothelial cell tubes in vitro
	Produces net antiproteolytic activity via modulation of uPA/PAI-1 expression levels
	Inhibits production of other proteases/stimulates production of protease inhibitors
	Stimulates VSMA production by pericytes
	Chemotactic for monocytes and fibroblasts
	Stimulates in vivo angiogenesis in presence of inflammatory response
	Increases vessel wall stability
TNF- α	Stimulates angiogenesis in vivo
	Stimulates formation of endothelial cell tubes in vitro
	Inhibits endothelial cell proliferation
EGF, TGF- α	Stimulate endothelial cell proliferation
	Stimulate angiogenesis in vivo

G-CSF, GM-CSF	Stimulate endothelial cell proliferation and migration
Angiogenin	Stimulates angiogenesis in vivo Supports endothelial cell binding and spreading
Angiotropin	Stimulates random capillary endothelial cell migration Stimulate endothelial cell tube formation Stimulates in vivo angiogenesis
Tissue factor	Contributes to development of yolk sac vasculature
Factor V	Contributes to development of yolk sac vasculature
Prostaglandin	Stimulates in vivo angiogenesis
Nicotinamide	Stimulates in vivo angiogenesis
Monobutyryn	Stimulates in vivo angiogenesis Stimulates endothelial cell migration in vitro

Membrane-bound proteins

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin	Highly expressed on activated endothelial cells Mediates endothelial cell attachment, spreading, and migration Present on angiogenic capillary sprouts Required for bFGF-stimulated angiogenesis in vivo Localizes MMP-2 to capillary sprouts Suppresses endothelial cell apoptosis
$\alpha_v\beta_5$ -Integrin	Required for VEGF-stimulated angiogenesis in vivo
$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	Required for non-VEGF growth factor-stimulated angiogenesis in vivo
VE-cadherin	May mediate permeability of endothelium

	Required for in vivo angiogenesis
	Prevents endothelial cell apoptosis
Eph-4B/Ephrin-B2	Colocalize at venous/arterial interfaces of developing embryo
	Required for angiogenesis of head and yolk sac and for myocardial trabeculation
Ephrin-A1	Required for in vivo angiogenesis induced by TNF- α
	Chemotactic for endothelial cells in vitro
Eph-2A	Required for endothelial cell tube formation in vitro
Biomechanical forces	
Blood flow/shear stress	Increases endothelial stress fiber formation (if laminar)
	Promotes endothelial cell division (if turbulent)
	Stimulates transcription of bFGF and TGF- β genes

Am J Physiol Cell Physiol 282: C947–C970, 2002.

BAB IV

ANGIOGENESIS PADA KANKER

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh terjadinya pertumbuhan sel yang tidak normal, dimana proliferasi sel terjadi secara cepat dan tanpa kendali. Karsinogenesis atau onkogenesis adalah proses di mana sel-sel normal bertransformasi menjadi sel kanker. Hal ini ditandai 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. Dalam keadaan normal, pengaturan keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis terkontrol dengan ketat, hal tersebut untuk memastikan integritas organ dan jaringan. Pembelahan sel adalah proses fisiologis yang terjadi pada hampir semua jaringan dan dalam berbagai kondisi. Mutasi yang mengarah pada kanker akan mengganggu pengaturan keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis, hal ini menghasilkan pembelahan sel yang tidak terkontrol dan terjadi evolusi pada sel-sel tersebut oleh adanya seleksi alami dalam tubuh. Proliferasi sel yang tidak terkontrol dan sangat cepat adalah kondisi yang terjadi pada kanker. Kanker dapat menyerang organ lain, menyebar ke lokasi yang jauh (metastasis) dan mengancam jiwa.

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 menghindari 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.

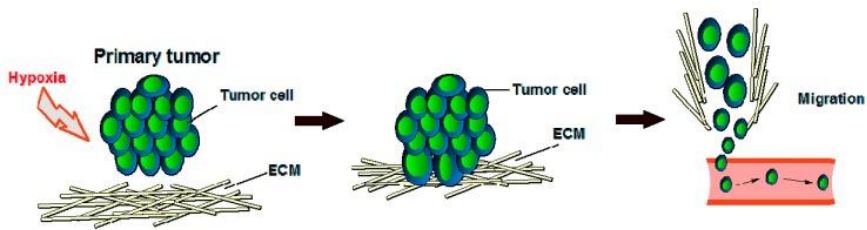
a. MEKANISME ANGIOGENESIS PADA TUMOR

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 mm^2 tanpa adanya angiogenesis.

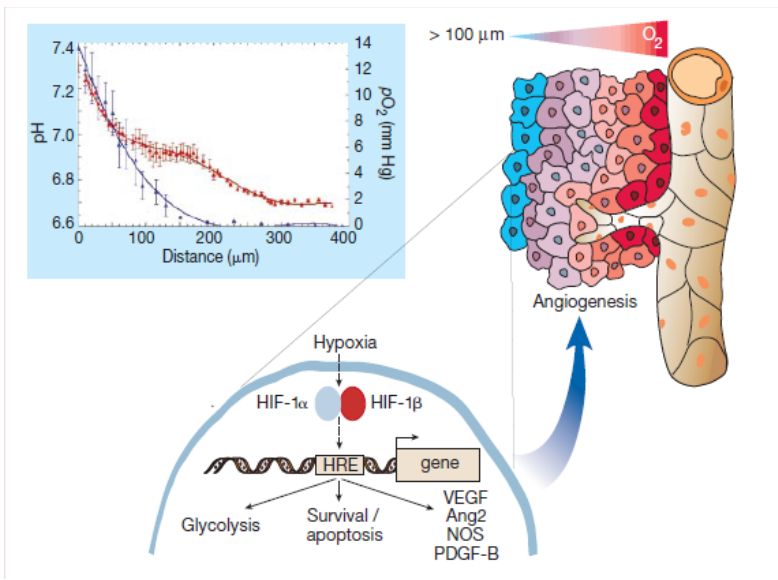


Gambar 8. Tumor development under hypoxic conditions. ECM = extracellular matrix. *Biomedicine*,2017,5,34.

Angiogenesis patologis yang terjadi pada kanker ditandai oleh 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, dan 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 (sel tumor yang telah kekurangan oksigen) 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. (Gambar 9)

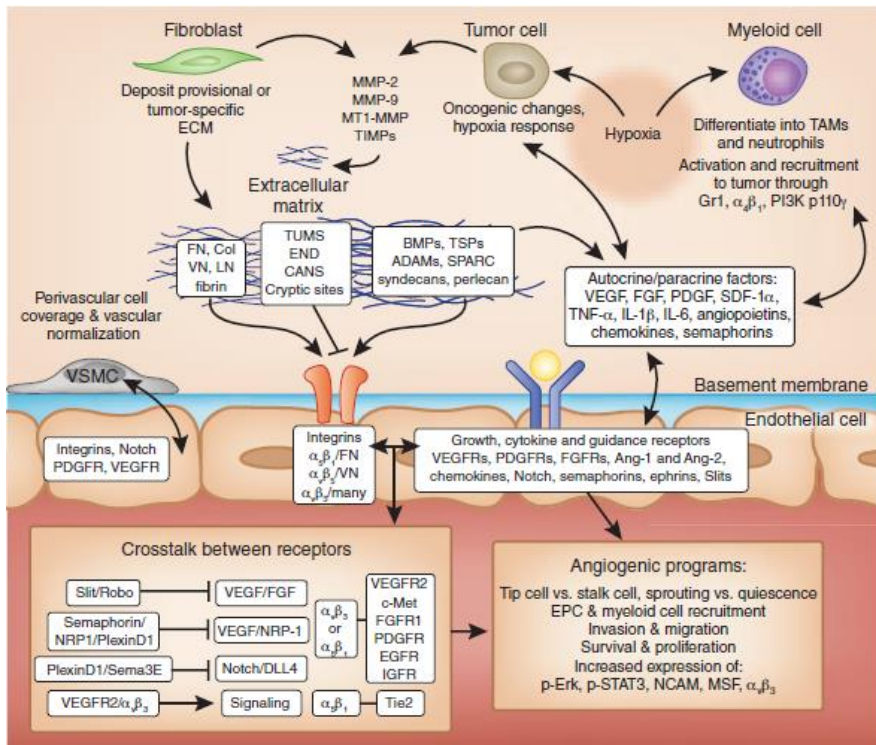


Gambar 9. Role of hypoxia in tumour angiogenesis. Because of the irregular pattern and organization of the tumour vasculature, some cells in tumours are located more than 100 mm (the diffusion limit for oxygen) away from blood vessels and become hypoxic (red-to-blue gradient indicates progressive hypoxia). 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). *Nature*, vol407.

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.

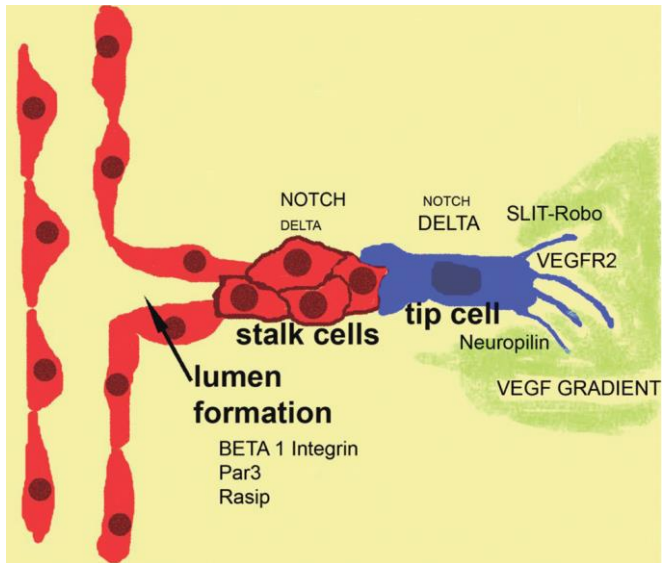
Setiap sel dalam lingkungan mikro tumor dipengaruhi oleh sel yang ada disekitarnya, serta oleh komponen stromal tumor. Secara alami transformasi onkogenik atau responnya terhadap hipoksia, tumor sel melepaskan berbagai faktor yang mulai mengubah lingkungannya. Faktor-faktor ini menyebabkan remodeling 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. (Gambar 10)



Gambar 10. Mediators of endothelial activation and the tumor angiogenic response. FN, fibronectin; Col, collagen; VN, vitronectin; LN, laminin; TUMS, tumstatin; END, endostatin; CANS, canstatin. *Nature Med*,11,2011.

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*). (Gambar 11)



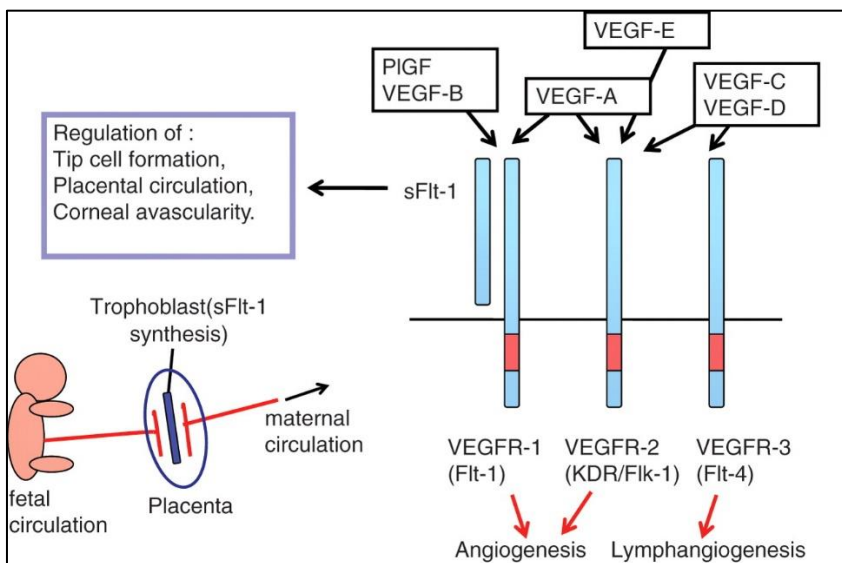
Gambar 11. *Signaling pathways in angiogenesis. Genes & Cancer, vol 2,12 (2011)*

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.

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 growt 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 embryogenesis 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 12. Sistem VEGF dan VEGFR. VEGF-A dan reseptornya memainkan peranan utama vaskulogenesis dan angiogenesis.

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*)] and

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.

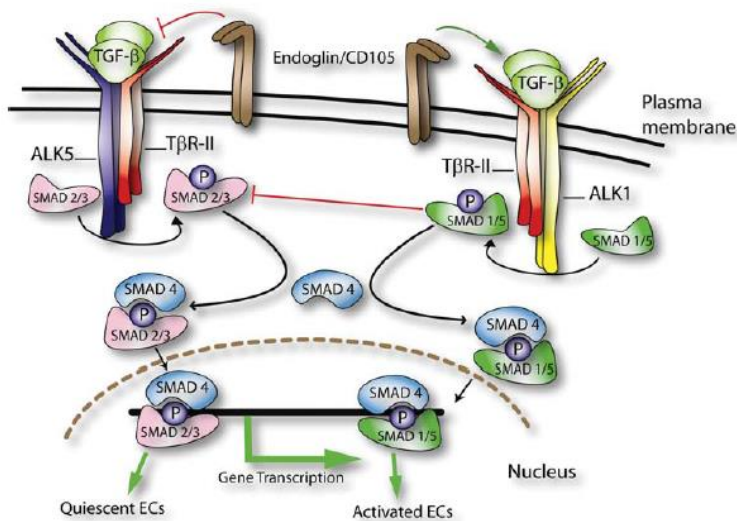
Reseptor VEGF adalah tipikal reseptor tyrosin kinase (TKRs) yang mempunyai domain ekstraseluler untuk ikatan ligan, domain transmembran, dan domain sitoplasma, termasuk domain tyrosin kinase. VEGF-A mengikat dan mengaktifkan VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR / Flk-1). VEGFR-1 memiliki afinitas yang tinggi 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 (*hypoxiainducible 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, 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 prominent 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.

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-β1 dan 3 dan memodulasi signal TGF-β melalui interaksinya dengan TGF-β reseptor I dan/atau II. CD105 merupakan koreseptor penunjang tipe III (TGF-βRIII) untuk TGF-βRII, activin like kinase-1 (ALK-1) dan ALK-5 yang berinteraksi dengan TGF-β family. TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, activin, terikat pada CD105 melalui ikatannya dengan reseptor TGF-βII.



Gambar.13. A schematic hypothetical role of endoglin/CD105 in TGF-b/ALK-1 and TGF-b/ALK-5 signalling pathways in endothelial cells.

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. CD105 mengikat TGF- β melalui ikatannya dengan TGF- β R2. 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.

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 inflamatori, sel stroma pada jaringan neoplasma maupun sel endotel pembuluh limfe.

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. Antibody CD105 terikat terutama pada sel endotel yang aktif, yang terlibat pada angiogenesis tumor, akan tetapi ekspresi CD105 lemah atau negatif pada endotel vaskuler jaringan normal.

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' dan juga dengan kelangsungan hidup dimana pasien dengan *microvessel density* (MVD) yang tinggi, median lebih dari 3.10×250 , memperlihatkan prognosis yang buruk. Peningkatan serum endoglin dihubungkan dengan metastasis pada pasien dengan solid tumor termasuk kanker kolorektal (KKR). Pada pasien KKR, terdapat perbedaan level antara pasien tanpa metastasis dan pasien dengan metastasisi secara statistik.

Dilaporkan bahwa peningkatan serum endoglin dihubungkan dengan peningkatan metastasis pada pasien dengan solid tumor termasuk KKR dan kanker payudara. 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 V

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 prekanker. 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". Folkman mengusulkan bahwa 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 dipertusi ke dalam lumen pembuluh darah baru.

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, vaskular 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 yang disebut 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 tumor angiogenesis 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. Pada suatu penelitian dilaporkan bahwa, sel tumor bersama dengan fibroblast yang 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 VI

PERANAN ANGIOGENESIS PADA METASTASIS

Kanker primer jarang menyebabkan kematian pasien (kecuali kanker paru-paru 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 (terlampir pada bab terakhir buku ini) 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 (stadium IV).

BAB VII

PERANAN ANGIOGENESIS SEBAGAI TARGET TERAPI KANKER

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kepadatan angiogenesis tumor 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 mungkin diperlukan.

Secara umum, inhibitor angiogenesis tumor dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok inhibitor utama, yaitu: (i) inhibitor langsung yang menargetkan sel-sel endotelial yang ada pada pembuluh darah yang sedang tumbuh, dan (ii) 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.

Tabel 2. Obat antiangiogenesis yang telah direkomendasikan oleh FDA US. Antiangiogenesis ini dikombinasikan dengan obat anti kanker kemoterapi konvensional

Generic Name	FDA-Approved Indication
Bevacizumab	Colorectal, non-small-cell lung, and glioblastoma multiforme
Thalidomide	Myeloma
Lenalidomide	Myeloma (myelodysplastic syndrome (MDS))
Sorafenib	Renal cell and hepatocellular carcinoma
Sunitinib	Renal cell and gastrointestinal carcinoma
Temsirolimus	Renal cell carcinoma
Axitinib	Renal cell carcinoma
Pazopanib	Renal cell carcinoma, kidney cancer, and advanced soft tissue sarcoma
Cabozantinib	Thyroid cancer
Everolimus	Kidney cancer, advanced breast cancer, pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs), and subependymal giant cell astrocytoma
Ramucirumab	Stomach cancer and gastroesophageal junction adenocarcinoma
Regorafenib	Colorectal cancer and gastrointestinal stromal tumor
Vandetanib	Thyroid cancer
Ziv-aflibercept	Colorectal cancer

Lupo G. *Front Pharmacol.* 2017. 6;7:519

Pada fase 3 uji klinik VEGF sebagai antiangiogenesis kanker memperlihatkan perbedaan signifikan respon tumor terhadap pengobatan: tumor dapat merespons terapi anti-angiogenik atau dapat memberikan respons parsial atau bahkan tidak sama sekali. Klasifikasi tumor yang sensitif, sensitive parsil dan tidak sensitive dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Respon tumor terhadap terapi antiangiogenesis

Tumor	Anti-angiogenic therapy			Reference
	Sensitive	Partially sensitive	Insensitive	
Breast cancer		✓		Fakhrehajani and Toi, 2014; Earl et al., 2015
Clear cell renal carcinoma	✓			Hutson et al., 2014; Rini et al., 2014
Colorectal cancer		✓	✓	Bennouna et al., 2013; Grothey et al., 2013
Gastroesophageal cancer		✓		Fuchs et al., 2014; Wilke et al., 2014
Glioma		✓		Gilbert et al., 2014
Hepatocellular carcinoma	✓			Bruix et al., 2015; Cainap et al., 2015
Lung cancer		✓		Garon et al., 2014; Liang et al., 2014
Neuroendocrine and thyroid cancer	✓			Brose et al., 2014
Ovarian and cervical cancer	✓			Pujade-Lauraine et al., 2014; Tewari et al., 2014
Pancreatic cancer			✓	Kindler et al., 2010
Prostate cancer			✓	Michaelson et al., 2014

Lupo G. *Front Pharmacol.* 2017. 6;7:519

Telah dilaporkan bahwa inhibitor angiogenesis mungkin berpotensi mengganggu proses normal tubuh seperti penyembuhan luka, tekanan darah, fungsi ginjal, perkembangan janin, reproduksi, dan peningkatan risiko pembekuan di arteri yang akan mengakibatkan stroke atau serangan jantung. Sebagai contoh, hipertensi adalah salah satu efek samping yang paling sering diamati dari penghambatan sistemik pensinyalan VEGF, yang juga merupakan salah satu efek samping yang paling mudah dikelola dengan penggunaan obat anti-hipertensi standar. Pengobatan kanker dengan menghambat pensinyalan VEGF dapat menyebabkan disfungsi endotel dengan penurunan kadar VEGF, yang pada akhirnya akan mengakibatkan hipertensi. Pada kondisi normal, VEGF diketahui melepaskan vasodilator nitrat oksida (NO) pada dinding vaskuler dengan meningkatkan regulasi nitrat oksida sintase endotel (eNOS) dan prostasiklin (PGI₂), yang

menghasilkan vasodilatasi, melalui aktivasi mitogen-activated protein kinase (MAPK) dan jalur hilir phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)]. Oleh karena itu, dengan penghambatan VEGF, produksi NO akan berkurang, yang akan meningkatkan vasokonstriksi, meningkatkan resistensi perifer dan akhirnya meningkatkan tekanan darah.

BAB VIII

EVALUASI ANGIOGENESIS TUMOR DENGAN METODE MICROARRAY, IMUNOHISTOKIMIA DAN IMMUNOFLUORESCENCE

Pada bab ini penulis akan menampilkan beberapa hasil penelitiannya mengenai angiogenesis pada kanker yang sudah terpublikasi internasional.

PENELITIAN 1

Penelitian ini dipublikasikan pada jurnal *Virchows Archiv*, February 2006, Volume 448, Issue 2, pp 127–134. Publisher SpringerLink dengan judul: *Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers*.

Dengan teknik microarray dan menggunakan beberapa antibody marker endotel (Tabel 1), ekspresi dari berbagai marker endotel tersebut dievaluasi dan dibandingkan dengan menggunakan metode imunohistokimia. Subyek penelitian adalah jaringan kanker kolorektal dari pasien kanker kolorektal yang sudah ditegakkan diagnosisnya berdasarkan pemeriksaan histopatologi. Tempat penelitian di Laboratorium Department of Pathology and Biodifence Saga University Japan.

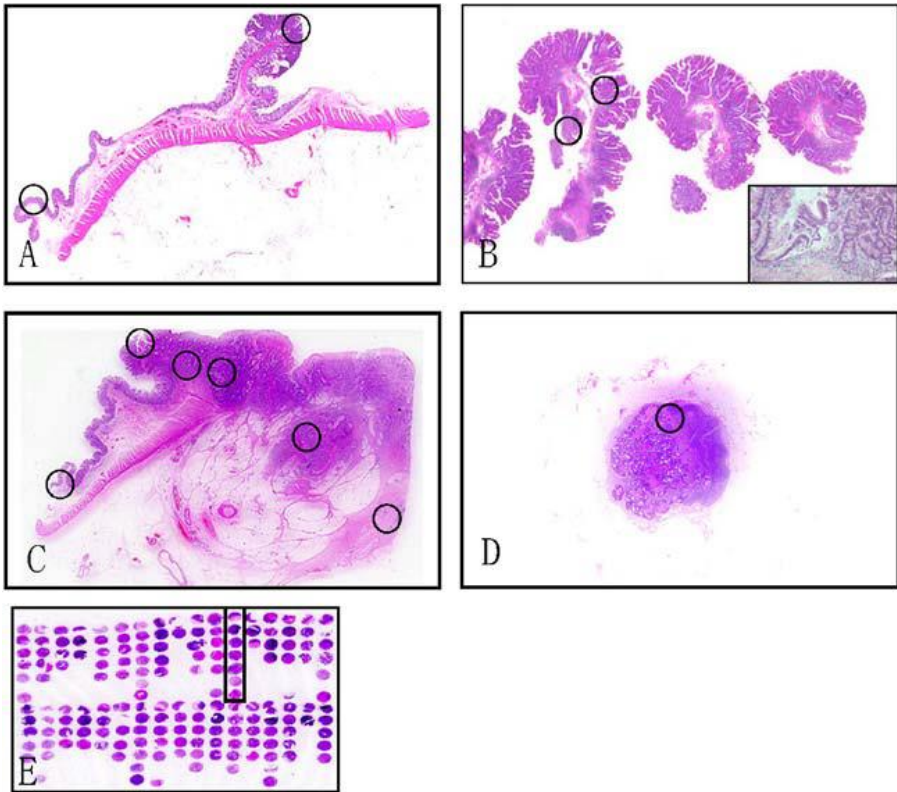
Pada penelitian ini, penulis menggunakan beberapa Antibody sebagai marker untuk mengevaluasi ekspresinya pada sel endotel angiogenesis tumor. Antibody yang digunakan sebagaimana tertulis pada tabel 1.

Tabel 1. Antibody

Antibody	Clone	Pretreatment	Dilution	Company
CD31	Mono	Proteinase K	×20	Dako
CD105	Mono	MW—EDTA	×50	Novocastra
CD44	Mono	AC—EDTA	×50	MBL
VEGF	Mono	AC—EDTA	×100	Santa Cruz
Flt-1	Poly	AC—EDTA	×200	Santa Cruz
Flk-1	Poly	AC—EDTA	×200	Santa Cruz
TGF-β1	Poly	AC—EDTA	×100	Santa Cruz
TGF-βRII	Poly	AC—EDTA	×200	Santa Cruz

Antigen retrieval method for immunohistochemistry For double immunostaining, see “[Materials and methods](#)” MW Microwave, AC citrate buffer. *Minhajet R, Virchows Arch, 2005*

Dengan menggunakan metode *tissue microarray* paraffin blok spesimen kanker kolorektal, diambil setiap lapisan dinding kolon dari specimen kanker kolorektal masing-masing lapisan mukosa, submukosa, lapisan muskularis, lapisan serosa dan jaringan limfonodus metastasis (gambar1). Kemudian masing-masing dievaluasi dengan pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi protein VEGF, CD105, CD44, CD31, Flt-1, Flk-1, TGF-beta I dan TGF-beta reseptor II pada angiogenesis kanker. Lebih jauh lagi dilakukan pemeriksaan *immunofluorescence*



Gambar 1. Sources of punctured cores. Cores were punched out from the normal mucosa and neoplastic layer of adenoma at the mucosal level (a and b), carcinoma in adenoma (b), and normal mucosa, as well as in the mucosa, submucosa, muscular propria, subserosa, and serosa levels (c) of cancer tissues, and in lymph node metastasis (d). The box shows all layers from one advanced cancer in a representative tissue microarray (e). Inset: A transition area of adenoma (left half) and cancer (right half) in the right circle of b. *Minhajet R, Virchows Arch, 2005*

Pada table 2. di bawah ini memperlihatkan lokasi ekspresi marker antibody pada sel endotel vaskuler dan/ atau pada sel tumor. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa hanya marker antibody CD31, CD105 dan VEGF yang positif terekspresi pada sel endotel vaskuler, marker lainnya tidak tampak ekspresinya pada sel endotel tetapi positif pada sel kanker.

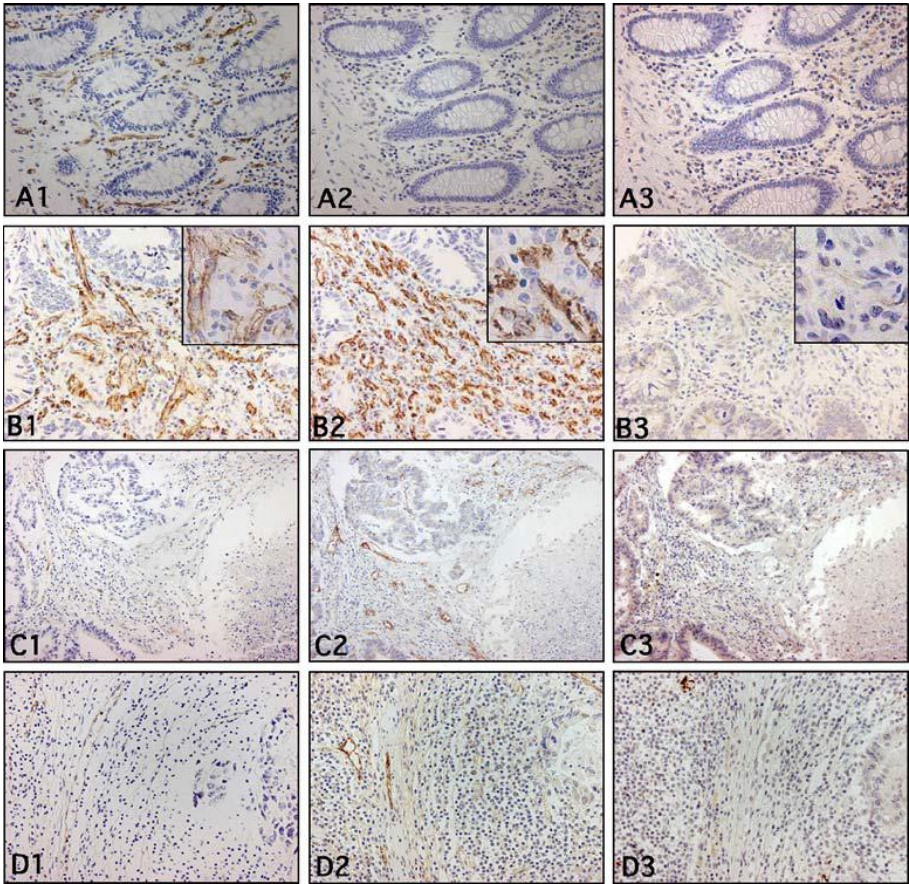
Table 2. Immunohistochemical results

Markers	Vascular endothelial cells	Tumor cells
CD31	+ ^a	-
CD105	+ ^a	+ (cc)
CD44	-	+ (cm)
VEGF	+	+ (cc)
Flt-1	-	+ (cc, cm)
Flk-1	-	+ (cc, cn)
TGF- β 1	-	+ (cc)
TGF- β RII	-	+ (cc, cn)

(cc) cell cytoplasm, (cm) cell membrane, (cn) cell nucleus. (a) CD31 is mostly positive in preexisting larger blood vessels, whereas CD105 is positive in newly formed small blood vessels

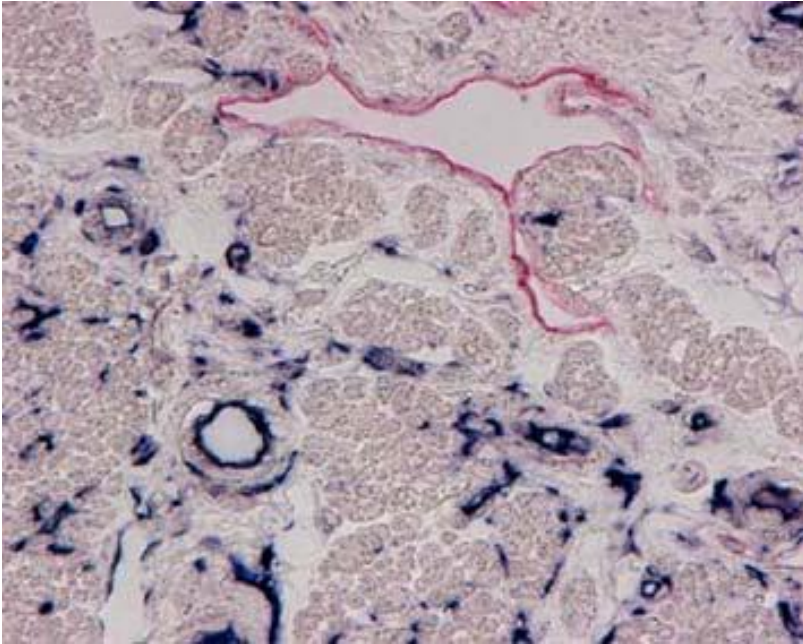
Pada gambar 2 di bawah ini memperlihatkan perbandingan ekspresi CD31, CD105 dan VEGF pada jaringan kanker kolorektal yang diambil dari lapisan mukosa yang normal, lesi kanker pada lapisan mukosa, serosa dan metastasis limfonodus. (lihat keterangan di bawah gambar 2).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa CD31 secara intens terekspresi pada sel endotel vaskuler dengan diameter yang lebih besar pada daerah mukosa normal tetapi tidak pada daerah tumor, sebaliknya CD105 dan VEGF tidak terekspresi pada sel endotel vaskuler di daerah mukosa normal. Lebih jauh lagi, hasil penelitian ini membuktikan bahwa CD105 secara intens terekspresi pada sel endotel vaskuler dengan diameter yang lebih kecil di daerah kanker, hal ini menunjukkan CD105 secara eksklusif terekspresi pada angiogenesis tumor dibandingkan marker antibody lainnya.



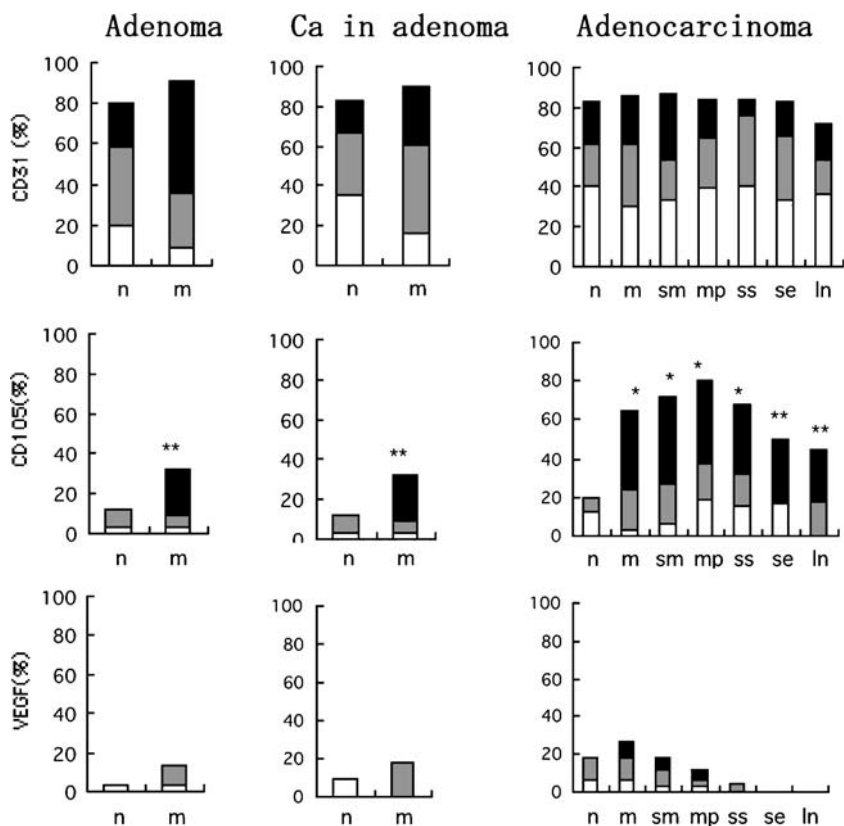
Gambar 2. Expression of CD31 (a1–d1), CD105 (a2–d2), and VEGF (a3–d3). Immunohistochemistry. Original magnification, $\times 200$. Normal mucosa (a1–a3), neoplastic lesion at mucosal level (b1–b3), subserosal level (c1–c3), and lymph node metastasis (d1–d3) from 1.5-mm tissue cores of the same specimen. Intense vascular expression of CD31 (a1); absent expression of CD105 (a2) and VEGF (a3) in normal mucosa. Intense expression of CD31 (b1) in large blood vessels and CD105 (b2) in smaller blood vessels from serial sections. Cancer tissues expressed VEGF but not the blood vessels (b3). In subserosal layer and lymph node metastasis, only CD105 is expressed (c2 and d2). Inset: Original magnification $\times 400$

Selanjutnya untuk membuktikan eksklusifitas ekspresi CD105 pada angiogenesis tumor, kami melakukan pemeriksaan *double staining* dengan marker pembuluh limfe D2-40. Hasil penelitian ini (gambar 3) membuktikan bahwa CD105 tidak terekspresi pada pembuluh limfe.



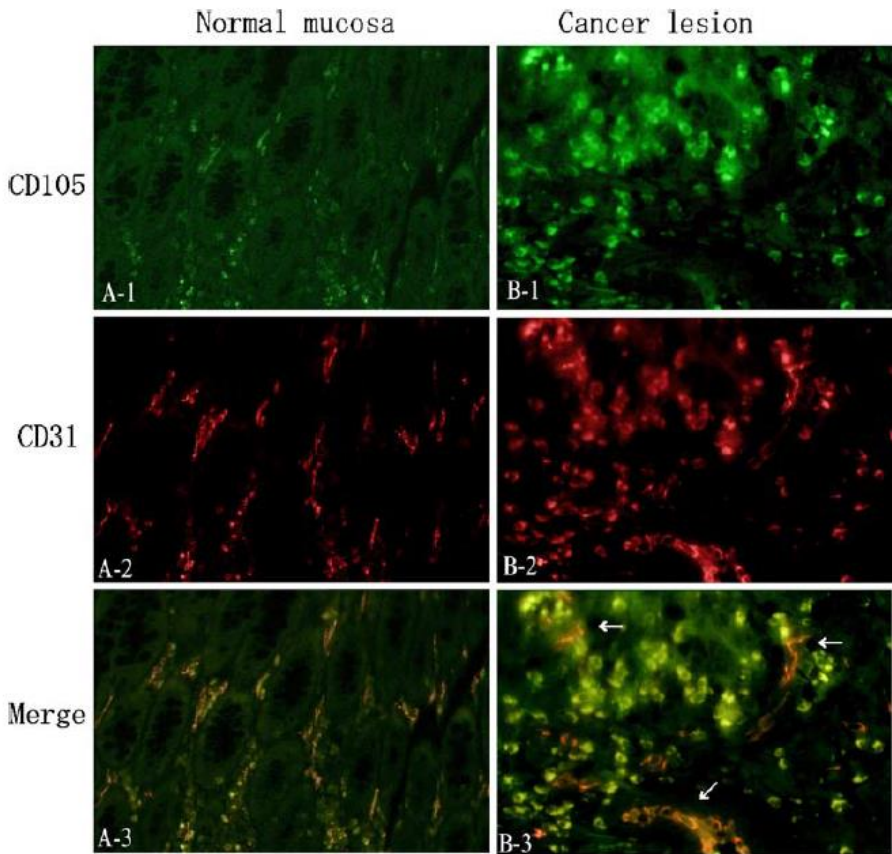
Gambar 3. Double immunostaining of CD105 (blue purple) and D2-40 (red). No apparent double labeling of CD105 and D2-40 in the vessels. Original magnification, $\times 200$

Pada gambar 4. Di bawah ini memperlihatkan ekspresi CD31, CD105 dan VEGF. Sel endotel vaskuler mengekspresikan CD31, CD105 dan VEGF pada semua level jaringan colon adenoma, carcinoma in adenoma, dan adenocarcinoma.



Gambar 4. Expression of CD31, CD105, and VEGF. Vascular endothelial cells express CD31, CD105, and VEGF throughout all tissue levels of colon adenoma, carcinoma in adenoma, and adenocarcinoma. Only CD105 significantly differs between the normal mucosa and adenoma or cancer (middle three boxes). CD31 (upper boxes) and VEGF (lower boxes) are not different between them. n Normal mucosa adjacent to the tumors at the level of tumor/cancer cells, m mucosal layers, sm submucosa, mp muscular propria, ss subserosa, se serosa. Significantly different: * $p < 0.001$ and ** $p < 0.05$. Grade of immunoreaction: (rectangle) weak, (dotted rectangle) moderate, and (filled rectangle) intense

Metode double immunostaining juga dilakukan pada penelitian ini untuk mengevaluasi adanya angiogenesis pada kanker dengan membandingkan ekspresi CD31 dan CD105 pada mukosa normal dan mukosa yang mengandung sel-sel kanker. CD105 sangat jarang diekspresikan pada endotel vaskuler yang ada pada mukosa normal tetapi sangat intens terekspresi pada endotel pembuluh darah kecil dan kapiler angiogenesis pada daerah kanker. CD31 secara umum diekspresikan pada endotel vaskuler yang lebih besar.



Gambar 5. Double immunofluorescence of CD105 and CD31. Normal mucosa (upper layer) and cancer lesion (lower layer). CD105 is rarely expressed in the normal mucosa (a1) and is intensely expressed in angiogenetic small blood vessels and capillaries (b1). An intense vascular expression of CD31 is universally noted in all large and small blood vessels and capillaries (a2 and b2). Their characteristics are demonstrated in the merged images (a3 and b3,arrows). Original magnification, $\times 200$

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa *de novo* pembuluh darah pada kanker colon secara spesifik mengekspresikan CD105. Temuan ini dapat dijadikan dasar untuk pengembangan novel antiangiogenik terapi kanker.

PENELITIAN 2:

Penelitian ini dipublikasikan pada jurnal *Pathology International* 2006; 56: 717–723. dengan judul: *Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers*. Publisher: Wiley-Blackwell.

Subyek penelitian adalah jaringan kanker dari berbagai organ yang sudah ditegakkan diagnosisnya berdasarkan pemeriksaan histopatologi. Tempat penelitian di Laboratorium Department of Pathology and Biodifence Saga University Japan. Pada table 1 di bawah ini memperlihatkan sampel tumor yang digunakan pada penelitian ini.

Table 1 Summary of tumor samples

Organ	Primary tumor	<i>n</i>	Metastatic tumor	<i>n</i>
Brain	Glioblastoma	9	Metastatic brain tumor	8
Lung	Adenocarcinoma	26	Lung carcinoma (5)	
	Well (10)		Renal cell carcinoma (2)	
	Moderate (10)		Breast carcinoma (1)	
	Poor (6)			
	Squamous cell carcinoma	12		
	Well (3)			
	Moderate (4)			
	Poor (5)			
Breast	Invasive ductal carcinoma	30		
	Papillotubular (10)			
	Solid-tubular (10)			
	Schirrus (10)			
Stomach	Adenocarcinoma	30		
	Well (10)			
	Moderate (10)			
	Poor (10)			
Colon	Adenocarcinoma	31		
	Well (16)			
	Moderate (15)			
Liver	Hepatocellular carcinoma	20	Metastatic liver cancer	12
	Well (10)		Colon carcinoma (12)	
	Moderate (10)			
Kidney	Renal cell carcinoma	10		

R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723

Adapun antibody yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2 di bawah ini:

Table 2 Antibodies used

Antibody to	Clone	Pretreatment	Dilution	Company
CD31	JC70A	Proteinase K	20 X	Dako, Glostrup, Denmark
CD105	4G11	MV-EDTA	50 X	Novocastra, Newcastle, UK
CD44	MH114	AC-EDTA	50 X	MBL, Birmingham, UK
VEGF	C-1	AC-EDTA	100 X	Santa Cruz, CA, USA
Flt1	Poly	AC-EDTA	200 X	Santa Cruz, CA, USA
Flk1	Poly	AC-EDTA	200 X	Santa Cruz, CA, USA
TGF- β 1	Poly	AC-EDTA	100 X	Santa Cruz, CA, USA
TGF- β RII	Poly	AC-EDTA	200 X	Santa Cruz, CA, USA

Antigen retrieval method for immunohistochemistry: AC, citrate buffer; MW, microwave. R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

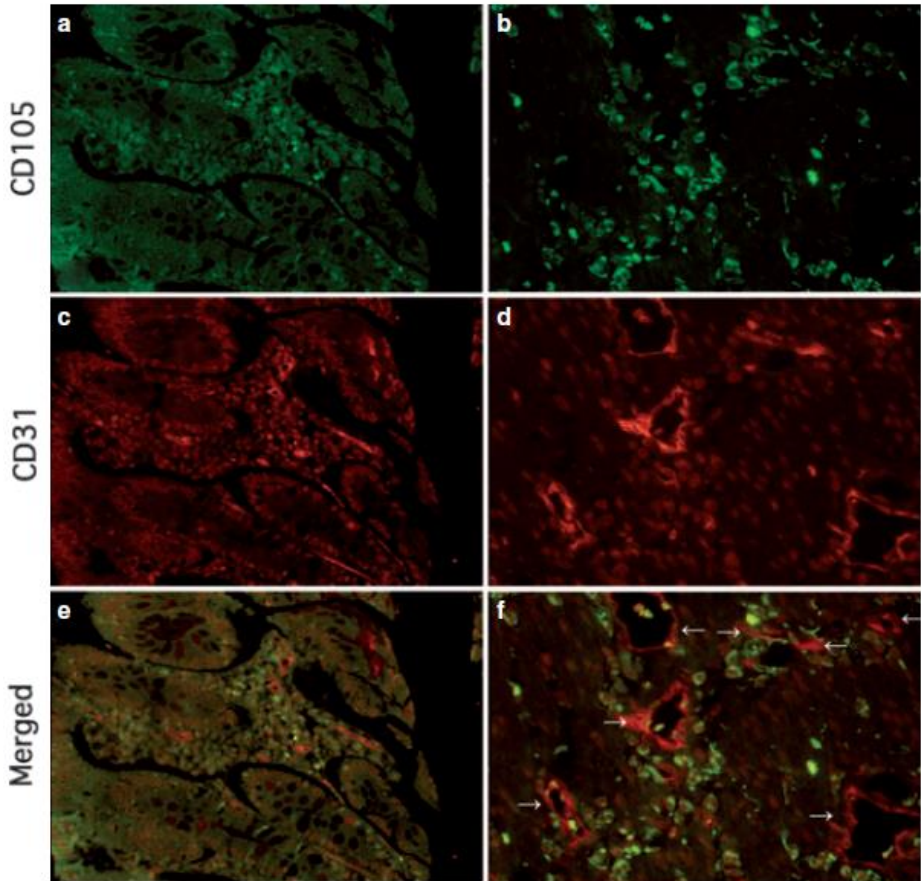
Pada tabel 3 di bawah ini memperlihatkan hasil pemeriksaan imunohistokimia CD105 semua jenis kanker yang digunakan pada penelitian ini, dan tampak perbedaan ekspresi CD105 pada *non-cancerous areas* dan *cancerous areas*.

Table 3 Expression of CD105 in non-endothelial cells

Samples (n)	Non-cancerous areas	%	Cancerous areas	%
Brain				
GBM (9)	Neuron cell	22	Glioblastoma cell	55
MBT (8)	Neuron cell	38	Cancer cell	75
Lung (38)	No expression	0	Cancer cell	46
Breast (30)	Ductal epithelial cell	10	Cancer cell	90
Stomach (30)	Mucosal epithelial cell	27	Cancer cell	60
Colon (31)	Mucosal epithelial cell	6	Cancer cell	90
Liver				
HCC (20)	Hepatocyte	35	Cancer cell	55
MLC (12)	Hepatocyte	42	Cancer cell	50
Kidney (10)	Tubular epithelial cell	70	No expression	0

GBM, glioblastoma; HCC, hepatocellular carcinoma; MBT, metastatic brain tumor; MLC, metastatic liver cancer. R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

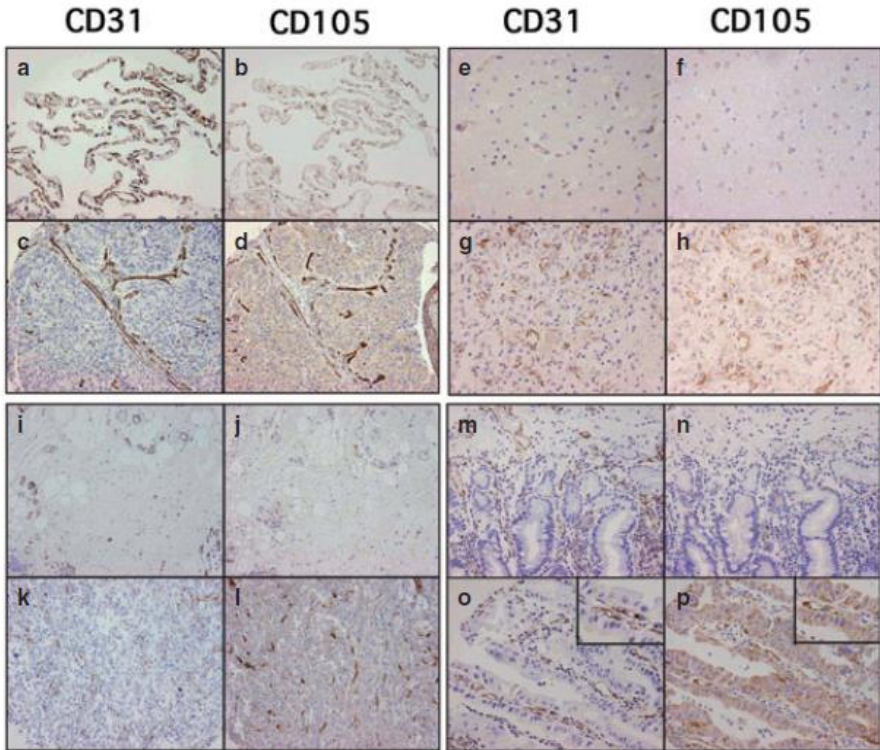
Dengan menggunakan metode *Double-immunofluorescence staining* CD105 dan CD31, penelitian ini mengevaluasi ekspresi CD105 dan CD31 pada mukosa normal dan yang mengandung lesi kanker colorectal. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 1 dan keterangan gambar.



Gambar 1. Double-immunofluorescence staining of CD105 and CD31. (a,c,e) Normal mucosa and (b,d,f) colon cancer lesion. (a) CD105 is rarely expressed in normal mucosa, and (b) intensely expressed in angiogenic small blood vessels and capillaries (green). (c,d) Intense vascular expression of CD31 is universally noted in all mature blood vessels and capillaries (red). Their different characteristics are demonstrated in the merged images. (e,f) Large mature vessels remain red (arrows) and small newly formed vessels are stained light green. Original magnification, X200. R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

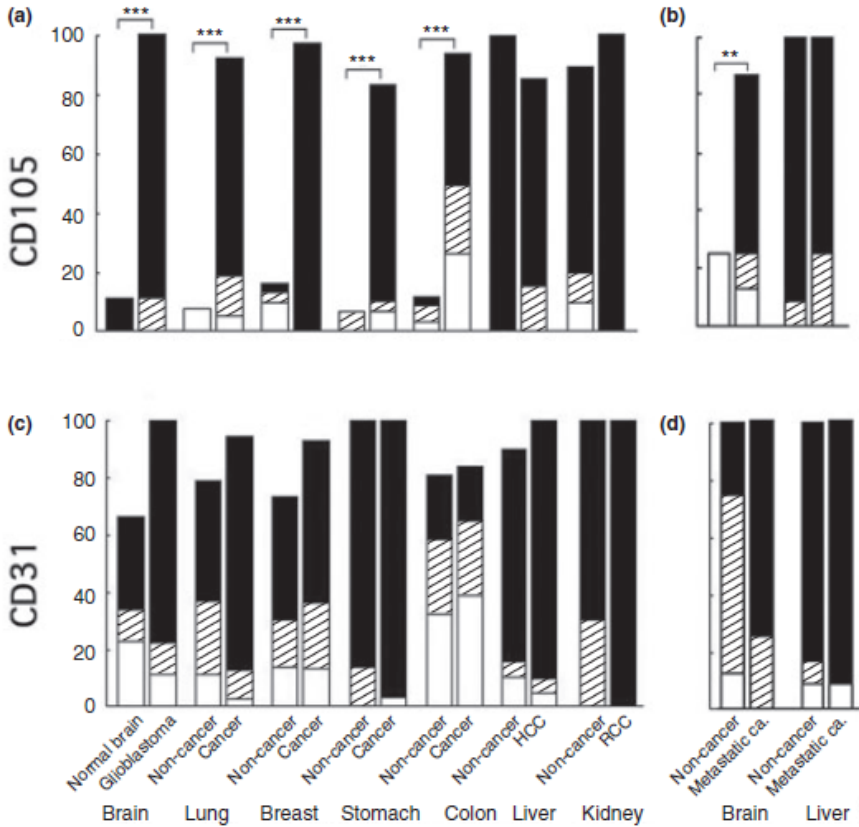
Pada gambar 2 di bawah ini memperlihatkan hasil penelitian dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia menilai ekspresi CD105 dan

CD31 pada berbagai jenis kanker. Penilaian dilakukan pada *adjacent non-cancerous areas* dan *cancerous areas*



Gambar 2. Expression of CD31 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. R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

Pada gambar 3 di bawah ini, memperlihatkan ekspresi CD105 dan CD31 pada *adjacent non-cancerous areas* dan *primary cancer*, serta *metastatic cancerous areas*. Ekspresi CD105 berbeda signifikan antara *adjacent non-cancerous* dan *cancerous areas* pada tumor brain, lung, breast, stomach, colon, dan metastatic brain tumors.



gambar 3 Expression of CD105 and CD31 in (a,c) adjacent non-cancerous areas and primary cancer, and (b,d) metastatic cancerous areas. CD105 expression differs significantly between (a) adjacent non-cancerous and cancerous areas in brain, lung, breast, stomach, colon, and (b) metastatic brain tumors. However, CD31 is equally expressed in vascular endothelial cells in both cancerous and non-cancerous areas from various organs, and no or only a slight difference is found among them. HCC, hepatocellular carcinoma; RCC, renal cell carcinoma. Grade of immunoreaction: (—) weak, () moderate, () intense. Student's *t*-test: significantly different at ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$. R. Minhajat *et al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

Pada tabel 4 di bawah ini memperlihatkan ekspresi semua marker yang digunakan pada penelitian ini pada setiap jenis kanker yang berbeda.

Table 4 Expression of markers in endothelial cells from cancerous and adjacent non-cancerous areas

Samples		CD31 (%)	CD105 (%)	CD44 (%)	VEGF (%)	Flt1 (%)	Fik1 (%)	TGF-β1 (%)	TGF-βRII (%)
Brain	GBM (n = 9)	N-ca	6 (67)	1 (11)	–	–	–	–	–
		Ca	9 (100)	9 (100)	–	–	–	–	–
	MBT (n = 8)	N-ca	6 (75)	1 (13)	–	–	–	–	–
		Ca	8 (100)	8 (100)	–	–	–	–	–
Lung	AC (n = 26)	N-ca	15 (58)	1 (4)	–	–	1 (4)	–	–
		Ca	23 (89)	20 (77)	–	3 (12)	–	2 (8)	–
	SCC (n = 12)	N-ca	8 (62)	–	–	–	–	2 (17)	–
		Ca	12 (92)	11 (85)	–	–	–	–	–
Breast	Papillotubular (n = 10)	N-ca	7 (70)	1 (10)	–	–	1 (10)	–	–
		Ca	7 (70)	10 (100)	–	1 (10)	1 (10)	3 (30)	–
	Solid-tubular (n = 10)	N-ca	7 (70)	2 (20)	–	–	–	1 (10)	–
		Ca	9 (90)	10 (100)	–	–	1 (10)	–	–
	Schirrous (n = 10)	N-ca	3 (30)	–	–	–	–	1 (10)	–
		Ca	4 (40)	8 (80)	–	1 (10)	2 (20)	3 (30)	–
Stomach	AC (n = 30)	N-ca	30 (100)	3 (10)	–	5 (17)	–	5 (17)	–
		Ca	30 (100)	22 (73)	–	4 (13)	–	6 (20)	–
Colon	AC (n = 31)	N-ca	27 (87)	6 (19)	–	4 (13)	–	–	–
		Ca	28 (90)	29 (94)	–	5 (16)	–	–	–
Liver	HCC (n = 20)	N-ca	17 (85)	20 (100)	19 (95)	–	–	1 (5)	–
		Ca	19 (95)	16 (80)	9 (45)	–	–	4 (20)	–
	MLC (n = 12)	N-ca	12 (100)	11 (92)	9 (75)	–	–	1 (8)	–
		Ca	11 (92)	11 (92)	–	–	–	2 (17)	–
Kidney	RCC (n = 10)	N-ca	10 (100)	9 (90)	–	–	–	–	–
		Ca	10 (100)	10 (100)	–	–	–	–	–

AC, adenocarcinoma; Ca, cancerous area; GBM, glioblastoma; HCC, hepatocellular carcinoma; MBT, metastatic brain tumors; MLC, metastatic liver cancer; N-ca, adjacent non-cancerous area; SCC, squamous cell carcinoma; RCC, renal cell carcinoma; –, no expression. R. Minhajat *at al*, *Pathology International* 2006; 56: 717–723.

Karena hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa CD105 secara spesifik dan eksklusif terekspresi hanya pada pembuluh darah baru (angiogenesis) pada kanker otak, paru, mamma, gaster dan colon, maka hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa CD105 dapat menjadi target strategi anti-angiogenesis untuk terapi kanker.

KEPUSTAKAAN

1. Arjaans, M. *et al.*, 2016. *VEGF Pathways Targeting Agents, Vessel Normalization and Tumor Drug Uptake : from Bench to Bedside.* *Oncotarget*, 7(16) : 21247 - 58.
2. Bielenberg, DR., and Zetter BR., 2015. *The Contribution of Angiogenesis to The Process of Metastasis.* *Cancer J*, 21 (4):267-73.
3. Burri PH., Hlushchuk R., and Djonov V., 2004. *Intussusceptive Angiogenesis : Its Emergence, Its Characteristic and Its Significance.* *Dev Dyn*, 231(3): 474-88.
4. Carmeliet, P., 2005. *VEGF as A Key Mediator of Angiogenesis in Cancer.* *Oncology*, 69(3): 4-10. DOI : 10.1159/000088478. PMID: 16301830.
5. Carmeliet, P., and Jain RK., 2011. *Principles and Mechanisms of Vessel Normalization for Cancer and Other Angiogenic Disease.* *Nat Rev Drug Discov*, 10(6): 412-27.
6. Carmeliet, P., and Collen D., 2000. *Transgenic Mouse Models in Angiogenesis and Cardiovascular Disease.* *J Pathol*, 190(3): 387-405.
7. Carmeliet, P., 2000. *Mechanisms of Angioegensis and Arteriogenesis.* *Nat Med.*, 6(4): 389-95.
8. De Palma M., Biziato D., and Petrova TV., 2017. *Microenvironmental Regulation of Tumor Angioegensis.* *Nat Rev Cancer*, 17(8):457-474.
9. De Spiegelaere W. *et al.*, 2012. *Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant form of Angiogenesis.* *J Vasc Res*, 49(5): 390-404.
10. Djonov, V., Baum O., and Burri PH., 2003. *Vascular Remodelling by Intussusceptive Angiogenesis*, 314 (1): 107-17.
11. Folkman, J., 2002. *Role of Angioegensis in Tumor Growth and Metastasis.* *Semin Oncol.*, 29(16): 15-8.
12. Folkman, J., 1990. *What is The Evidence That Tumor Are Angiogenesis Dependent ?* *J Natl Cancer Inst*, 82: 4-6.
13. Fonsatti, E., Altomonte M., and Maio M., 2003. *Endoglin (CD105) : A Target for Anti- Angiogenetic Cancer Therapy.* *Curr Drug Targets*, 4. (4): 291-6.

14. Hicklin, DJ., Ellis LM., 2005. *Role of The Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis*. *J Clin Oncol.*, 23(5) : 1011 - 27.
15. Hoff, PM and Machado KK., 2012. *Role of Angiogenesis in The Pathogenesis of Cancer*. *Cancer Treat Rev*, 38(7): 825-33.
16. Lupo G, Caporarello, N. and Olivieri M, 2017. *Anti-angiogenesis Therapy in Cancer: Downsides and New Pivots for Precision Medicine*. *Front Pharmacol.* 6;7:519.
17. Makanya, AN., Hlushchuk R., and Djonov VG., 2009. *Intussusceptive Angiogenesis and Its Role in Vascular Morphogenesis, Patterning, and Remodelling*. *Angiogenesis*, 12 (2): 113-23.
18. Minhaj, R. Tokunaga, O and Daisuke, M. 2006. *Endoglin (CD105) Expression in Angiogenesis of Colon Cancer : Analysis using Tissue Microassays and Comparison with Other Endothelial Markers*. *Virchows Arch*, 448(2): 127-34.
19. Minhaj, R. Tokunaga, O and Daisuke, M. 2006. *Organ Specific Endoglin (CD105) Expression in The Angiogenesis of Human Cancers*. *Pathol Int*, 56 (12): 717-23.
20. Minhaj, R. R. Tokunaga, O and Daisuke, M. 2009. *Anti-CD105 Inhibits Primary Cancer Growth and Secondary Hematogenous Metastasis in A Xenograft Model*. *Vascular Disease Prevention*, 6(6): 91-96.
21. Nishida, N., Yano H., Nishida T., Kamura T., and Kojiro M ., 2006. *Angiogenesis in Cancer*. *Vasc Health Risk Manag*, 2(3): 213-9.
22. Nassiri, F. 2011. *Endoglin (CD105) : A Review of Its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy*. *Anticancer Res*, 31.(6): 2283-90.
23. Papetti, M., and Herman IM., 2002. *Mechanisms of Normal and Tumor Derived Angiogenesis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282 (5): C947-70.
24. Rajabi, M., and Mousa SA., 2017. *The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment*. *Biomedicines*, 5(2). pii: E34.
25. Rapisarda, A and Melillo G., 2012. *Role of The VEGF/VEGFR Axis in Cancer Biology and Therapy*. *Adv Cancer Res*, 114. 237 - 67.

26. Safiyah, Ziyad and M. Luisa Iruela-Arispe, 2011. *Molecular Mechanisms of Tumor Angioegenesis*. *Genes and Cancer*, 2(12): 1085-1096.
27. Seaman, S., Stevens J., Yang MY., Logsdon D, Graff-Cherry C., and St Croix B., 2007. *Genes That Distinguish Physiological and Pathological Angiogenesis*. *Cancer Cell*, 11(6): 539-54.
28. Weis, SM., and Cheresch DA., 2011. *Tumor Angiogenesis : Molecular Pathways and Therapeutic Targets*. *Nat Med*, 17 (11): 1359-70.

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.

Penerbit:
Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK-UNHAS

Alamat:
Rumah Sakit Pendidikan Unhas Lantai 5
Jl. Perintis Kemerdekaan Km.11
Makassar

