

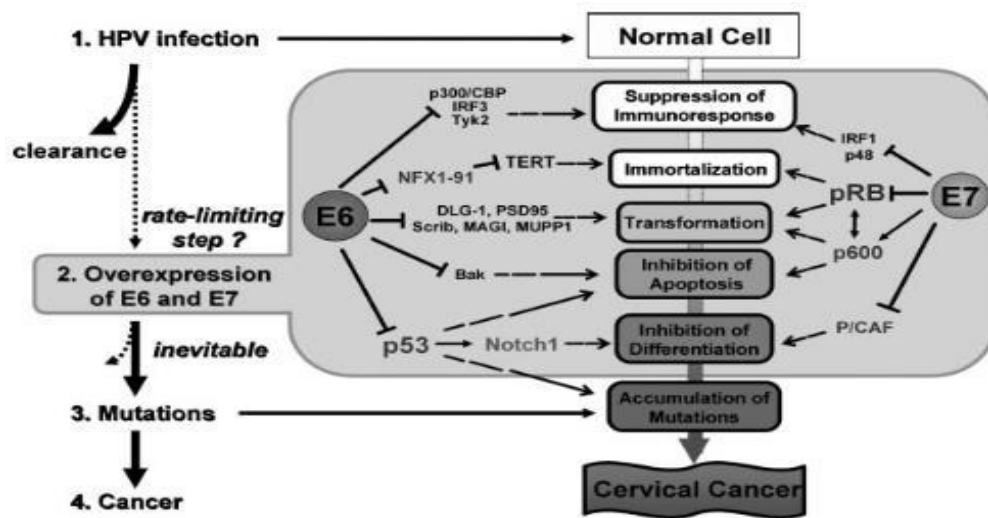
## BAB 2

### TINJAUAN KEPUSTAKAAN

#### 2.1 Kanker Serviks Uteri

Kanker serviks uteri adalah penyakit keganasan primer pada serviks uterus. Kanker serviks uteri disebabkan oleh Virus HPV. Proses karsinogenesis kanker serviks terjadi dalam rentang waktu 3 s/d 17 tahun, dan melalui fase prakanker. Infeksi HPV tipe risiko tinggi dapat menyebabkan displasi skuamosa berat atau karsinoma in situ tanpa melalui tahapan displasia ringan. Dalam suatu penelitian, displasia berat terjadi dalam waktu rata-rata 26 bulan setelah infeksi HPV terdeteksi. Displasia ringan akan menjadi displasia berat dalam waktu 2 tahun pada sekitar 15% kasus, dan sekitar sepertiga kasus displasia berat akan menjadi karsinoma invasif dalam masa 10 tahun bila tidak diterapi (Berek dan Hacker, 2015).

Pada manusia dan hewan proses pembelahan sel sebagian besar diatur oleh dua jenis protein, yaitu Retinoblastoma (Rb) dan p53 yang berfungsi sebagai supresor tumor endogen yang menghambat proliferasi. Akibat adanya pengikatan protein sel p53 oleh E6 dan protein sel pRB oleh E7 adalah inaktivasi kedua protein supresor tumor sehingga menyebabkan terjadinya transformasi maligna. Bila hal ini berlanjut dan tidak terkontrol, terjadi pembelahan sel secara berlebihan dan penumpukan, kerusakan kromosom, delesi dan berbagai mutasi lainnya, akhirnya terjadi proses invasif dan keganasan serviks.



**Gambar 2.1.** Karsinogenesis oleh HPV pada kanker serviks (Yugawa dan Kiyono, 2009)

### 2.1.1 Epidemiologi

Kanker serviks uteri adalah kanker penyebab morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada wanita. Secara global menduduki urutan ketujuh (4,7%), di Asia Tenggara menempati urutan kelima (7,5%), sedangkan di Indonesia merupakan keganasan nomor satu (17,8%) pada wanita (Azis, 2004).

Jenis histologi karsinoma sel skuamosa (KSS) meliputi 75-80% kasus, sedangkan adenokarsinoma dan adenoskuamosa antara 10-15% kasus. Angka kejadian pada usia 50 tahun keatas dua kali lebih tinggi (13,9/100.000) dibanding usia dibawahnya (6,7/100.000) dan kelompok umur tertinggi adalah usia diatara 45-49 tahun. Namun yang penting pada negara negara sedang berkembang, seperti halnya di Indonesia adalah sebagian besar kasus (62-82%) datang pada stadium lanjut (Berek dan Hacker, 2015 ; Azis, 2004).

### 2.1.2. Riwayat alamiah kanker serviks uteri

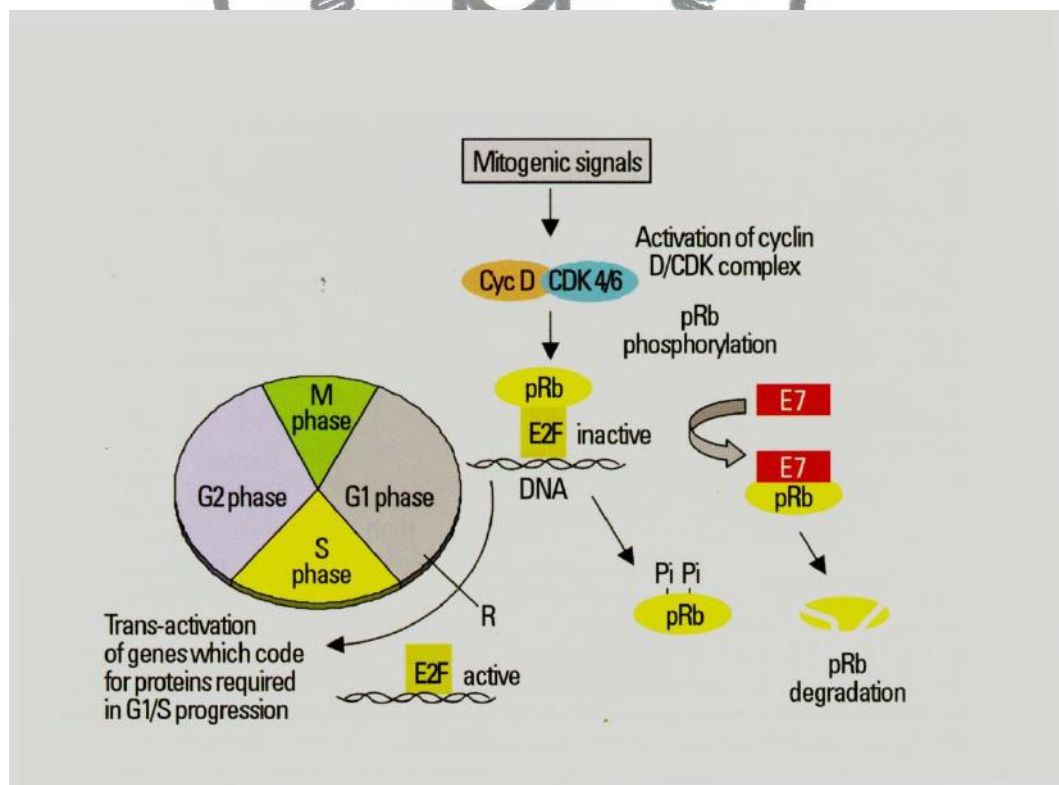
Penyebab kanker serviks adalah Human Papillomavirus (HPV). Virus HPV merupakan parasit obligat intraseluler, termasuk golongan virus DNA yang mempunyai untaian ganda berupa gulungan genom melingkar dengan 8000 Da. DNA HPV positif ditemukan sebanyak 96% dari penderita kanker serviks di Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo terutama tipe HPV 16 dan 18 (Azis, 2004).

Virus HPV termasuk *double stranded DNA virus* (dsDNA), famili Papova virus, mempunyai genome sirkuler dengan ukuran 7-8 base pairs (bp), dan genomnya tersebut dibungkus oleh kapsid berbentuk icosahedral (Motoyama *et al.*, 2004).

Pada manusia dan hewan proses pembelahan sel sebagian besar diatur oleh dua jenis protein: Retinoblastoma (Rb) dan p53 dengan fungsi sebagai supresor tumor endogen yang menghambat proliferasi. Pengikatan protein sel p53 oleh E6 dan protein sel pRB oleh E7 yang mengakibatkan inaktivasi kedua protein supresor tumor merupakan langkah utama dalam terjadinya transformasi maligna. Bila hal ini terjadi, sintesis pada DNA pejamu akan berlanjut dan tidak terkontrol, terjadi pembelahan sel secara berlebihan dan penumpukan, kerusakan kromosom, delesi dan berbagai mutasi lainnya. Pada akhirnya terjadi proses invasif dan keganasan serviks.

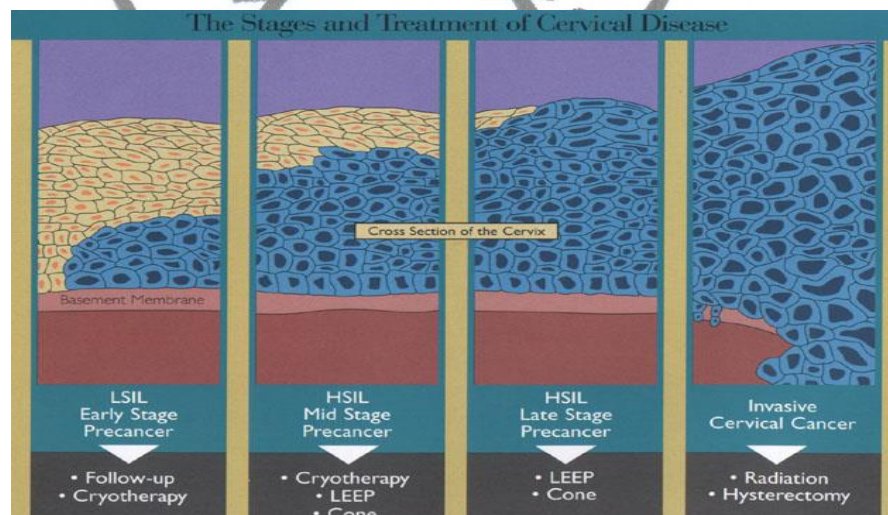
**Tabel 2.1** . Fungsi protein produk gen HPV (Motoyama *et al.*, 2004)

Protein	Fungsi
E1	mengontrol replikasi DNA virus/mempertahankan episomal
E2	mengontrol replikasi/transkripsi/transformasi
E5	transformasi melalui reseptor permukaan ( <i>epidermal growth factor, platelet-derive growth factor, p123</i> )
E6	immortalisasi/berikatan dengan p53, trans-activate/ kontrol transkripsi
E7	immortalisasi/berikatan dengan Rb1, p107, p130, cyclin AICDK2/ kontrol transkripsi
L4	mengikat cytokeratin
L1	protein struktur/ <i>major viral coat protein</i>
L2	protein struktur/ <i>minor viral coat protein</i>

**Gambar 2.2.** Inaktifasi gen supresor tumor oleh protein E6 dan E7 HPV (Motoyama *et al.*, 2004)

Risiko waktu hidup (*life time risk*) infeksi HPV genitalia berkisar sekitar 80%, tetapi sangat sedikit dari wanita ini yang akan menderita kanker serviks. Dalam masa 12 bulan setelah ditemukannya infeksi, 70% wanita tidak terinfeksi lagi dan sebelum 24 bulan hanya 9% saja yang masih terinfeksi.

Infeksi HPV tipe risiko tinggi dapat mengakibatkan displasi skuamosa berat atau karsinoma *in situ* tanpa melalui tahapan displasia ringan. Dalam suatu penelitian, displasia berat terjadi dalam waktu median 26 bulan setelah infeksi HPV terdeteksi. Hanya sekitar 15% displasia ringan akan menjadi displasia berat dalam waktu 2 tahun, tetapi sekitar sepertiga displasia berat akan menjadi karsinoma invasif dalam masa 10 tahun bila tidak diterapi (Berek dan Hacker, 2015).



**Gambar 2.3.** Patologi dari berbagai stadium serta terapi kanker Serviks uteri (Berek dan Hacker, 2015)



**Tabel 2.2.** Angka regresi dan progresi dari lesi pra kanker ( Berek dan Hacker, 2015)

Sitologi	% Regresi ke normal (Confident interval)	% Progres ke high-grade SIL (Confident interval)	% Kanker invasif (Confident interval)
ASCUS	68,19 (57,51–78,86)	7,13 ( 0,8 –13,5 )	0,25 (0,0–2,25)
Low grade SIL	47,39 (35,92–58,86)	20,81 ( 6,08 –35,55 )	0,15 (0,0–0,71)
High-grade SIL	35,03 (16,57–53,49)	23,37 (12,82–32,92 )	1,44 (0,0–3,95)

150 jenis HPV yang berbeda telah diidentifikasi. Sekitar 40 jenis ditularkan melalui kontak seksual. Jenis HPV diklasifikasikan ke dalam risiko tinggi atau risiko rendah, berdasarkan potensi onkogenik, atau kecenderungan untuk menginduksi kanker.

Jenis HPV berisiko rendah dapat menyebabkan kutil anogenital. Dua jenis, 6 dan 11, bertanggung jawab atas lebih dari 90 persen kasus. Jenis HPV berisiko tinggi menyebabkan sejumlah kanker pada manusia, termasuk kanker serviks, anus, vulva, vagina, dan penis. Selain itu, HPV tipe 16 telah dikaitkan dengan kanker *oropharyngeal*. Seperti ditunjukkan dalam Gambar 2.1, sebagian besar kanker serviks yang berkembang di seluruh dunia berkaitan dengan HPV tipe 16 atau 18. Di AS, HPV telah terdeteksi pada lebih dari 90 persen dari kanker serviks; dari jumlah tersebut, 51 persen terkait dengan HPV 16 dan 16 persen dengan HPV 18. Jenis risiko tinggi yang paling umum di Amerika Utara adalah 16, 18, 31, dan 45.

### 2.1.3. Patobiologi

Infeksi primer dari HPV terjadi pada sel lapisan basal dan parabasal. Setelah terjadi penetrasi dari virus maka partikel virus aktivasi sintesis DNA. Zona peralihan pada kanker serviks merupakan tempat utama dari infeksi HPV. Setelah terjadi infeksi HPV virus akan menuju ke sel basal dari epitel serviks dan mengadakan pembentukan di sitoplasma sel basal serta mengekspresikan protein virus E1, E2, E4, E5, E6, E7. Sel basal yang terinfeksi ini berdiferensiasi dan melakukan migrasi ke permukaan dan mulai mengekspresikan protein L1 dan L2. Pada sel-sel epitel yang terinfeksi HPV tersebut, virus akan terintegrasi pada kromosom penjamu dan mengekspresikan protein E6 dan E7 yang akan mengikat protein p53 dan pRb.

Pada HPV yang menyebabkan keganasan, protein yang berperan banyak adalah E6 dan E7. Mekanisme utama protein E6 dan E7 dari HPV dalam proses perkembangan kanker serviks adalah melalui interaksi dengan protein p53 dan protein retinoblastoma (pRb). Protein E6 mengikat p 53 yang merupakan suatu gen supresor tumor sehingga sel kehilangan kemampuan untuk mengadakan apoptosis. Sementara itu, E7 berikatan dengan Rb yang juga merupakan suatu gen supresor tumor sehingga sel kehilangan sistem kontrol untuk proses proliferasi sel itu sendiri. Protein E6 dan E7 pada HPV jenis yang resiko tinggi mempunyai daya ikat yang lebih besar terhadap p53 dan protein Rb, jika dibandingkan dengan HPV yang tergolong resiko rendah.

HPV 16 E5, E6 dan E7 Onkoprotein mengatur ekspresi *cyclooxygenase-2* (COX-2) yang terkait dengan karsinogenesis serviks. (A) HPV16, E6 dan E7 Onkoprotein merangsang produksi *amphiregulin* yang mengaktifkan EGFR → Ras → MAPK signaling. Pada fosforilasi c-Jun, menuju transduksi  $\beta$ -like protein *1-related* protein (TBLR1)-*dependen*, degradasi dari reseptor nuklir *corepressor* (NCoR) / kompleks *histone deacetylase 3* (HDAC3) dan pengaktifan elemen koaktivator siklik AMP-responif yang mengikat protein (CBP) / p300 dan *terfosforilasi c-Juni / c-Fos heterodimer* dengan promotor COX-2. Pertukaran korepressor / koaktivator ini dipicu oleh HPV Onko-protein menyebabkan peningkatan transkripsi COX-2; (B) HPV 16 E5 onkoprotein juga menyebabkan peningkatan EGFR terfosforilasi kemudian meningkatkan transkripsi gen COX-2 dan sekresi VEGF, yang meningkatkan karsinogenesis serviks (Berek dan Hacker, 2015).

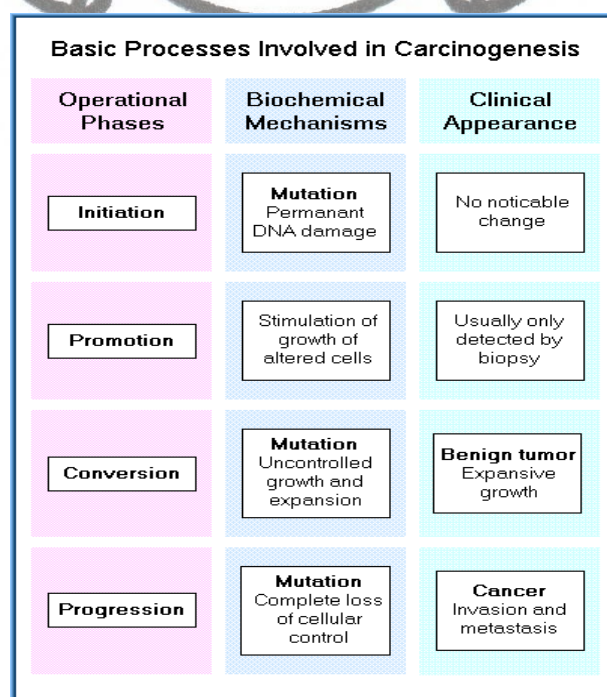
Protein E1 berperan dalam proses inisiasi dan elongasi dari pembentukan DNA, sedangkan E2 berperan dalam regulasi positif dan negatif dari ekspresi gen melalui interaksi dengan early promoter. Protein E6 dan E7 berperan dalam proliferasi melalui mekanisme yang mengganggu sistem kontrol siklus sel target dan HPV ditularkan melalui kontak anogenital kulit ke kulit, bukan melalui cairan tubuh seperti kebanyakan infeksi yang ditularkan secara seksual. Meskipun HPV dapat ditularkan melalui kontak kelamin tanpa hubungan seksual, risiko jauh lebih rendah, dan rute utama penularan adalah melalui hubungan seksual. HPV ini juga dapat ditularkan melalui kontak oral-genital.



## Karsinogenesis

Sel yang terpapar dengan agen karsinogenik seperti bahan kimia, virus atau radiasi, maka akan terjadi perubahan fenotip yang bervariasi dan akhirnya menimbulkan tanda kanker. Transformasi menjadi kanker tersebut tidak terjadi sekaligus, bersifat selektif, proliferasi meningkat, berlebihan dan diluar kendali dan akhirnya terjadi transformasi kanker penuh.

Karsinogenesis merupakan suatu proses dengan banyak tahap sehingga menimbulkan berbagai ciri keganasan seperti daya invasi, pertumbuhan berlebihan, penyimpangan dari system imun. Proses bertahap ini sering disebut dengan *progresi tumor*. Pada tingkat genetik progresi dihasilkan dari akumulasi peristiwa genetik.

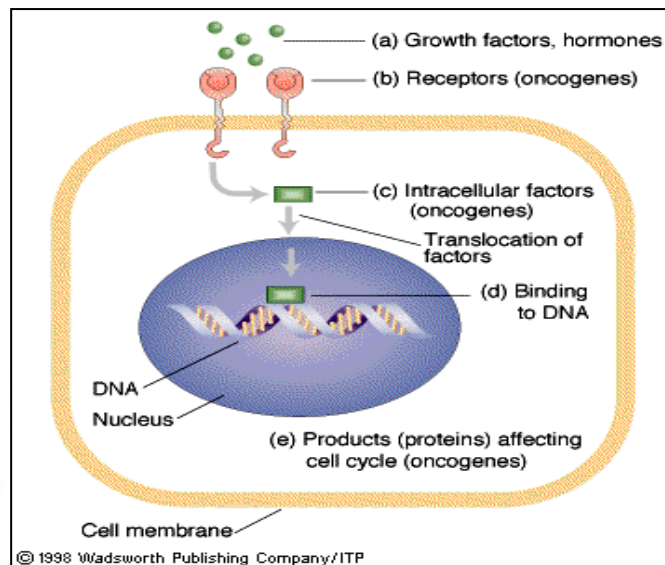


**Gambar 2.4** Proses Utama pada Karsinogenesis (Berek dan Hacker, 2015)

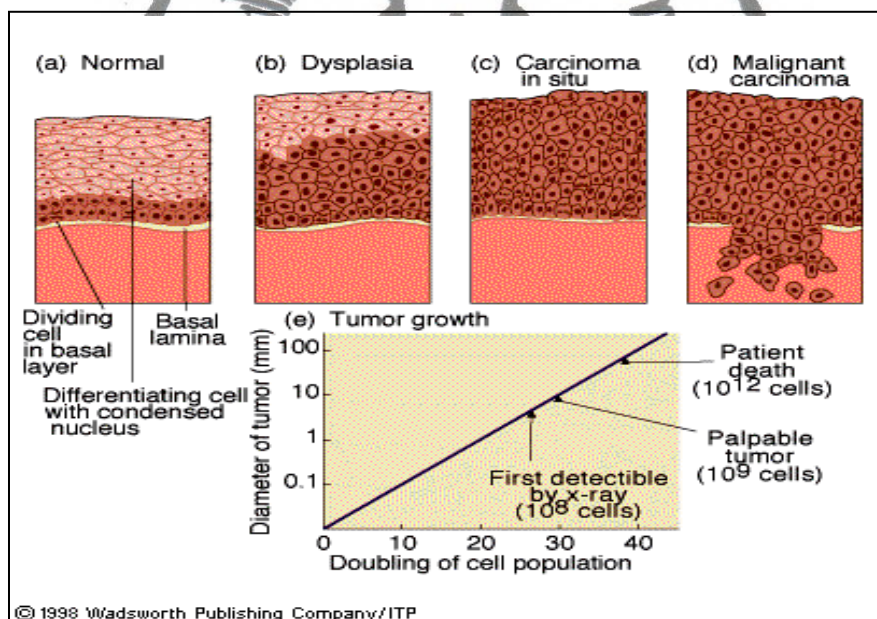
Mekanisme karsinogenesis dapat terjadi baik secara biokimia maupun molekuler, yang mana masing-masing berbeda tiap karsinogen, hal ini tergantung pada struktur dan sumber karsinogen masing-masing. Karsinogen pada dasarnya akan menimbulkan lesi pada untai DNA yang mengandung berbagai jenis gen. Berbagai jenis onkogen dan gen supresor (*Tumor Suppressor Gene* = TSG) yang berperan sebagai regulator siklus sel atau pertumbuhan dan diferensiasi sel pada umumnya merupakan sasaran lesi onkogenik.

Salah satu jenis gen yang sering mengalami delesi atau mutasi adalah tumor supresor gen p53. p53 menghasilkan produk yang berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang berperan pada pengaturan siklus sel pada cek point tertentu. Sebagian besar mutasi gen p53 terletak antara *codon* 120 dan 290 pada *exon* 4-9, bagian ini disebut *hot spot* mutasi p53. Dalam perannya sebagai aktivator transkripsi, protein p53 akan mengikat DNA secara spesifik sesuai sekuennya. Mutasi pada p53 menyebabkan sekuen spesifik hilang, sehingga p53 tidak berfungsi. Ada 3 jenis mutasi utama pada p53 yang diketahui, yang menarik adalah bahwa jenis mutasi ini berkorelasi dengan jenis kanker yang ditimbulkan.

Mutasi yang pertama adalah transisi dari *guanin* (G) ke *adenin* (A) atau dari *cytosin* (C) ke *thymin* (T), perubahan ini terutama terletak pada sekuen di nukleotida CpG. Mutasi lain adalah transverse *guanine* ke *thymin*, mutasi ini disebabkan faktor eksternal yang memodifikasi residu G dari DNA. Sedangkan mutasi ketiga adalah karakteristik untuk lesi akibat produk penyinaran seperti yang dijumpai pada kanker kulit.



**Gambar 2.5** Skema Peran Onkogen dalam sel (Berek dan Hacker, 2015)



**Gambar 2.6** Tahapan perkembangan kanker (Berek dan Hacker, 2015)

Pada pertumbuhan sel kanker didapatkan beberapa kelainan pada jalur transduksi-sinyal, baik pada sistem pensinyalan ekstraseluler, reseptor faktor pertumbuhan, pensinyalan sitoplasmik, maupun kelainan pensinyalan pada transkripsi nukleus.

### 1. Kelainan pensinyalan ekstraseluler

Kelainan sinyal ekstraseluler secara beruntun akan menyebabkan kelainan mekanisme transduksi sinyal intraseluler. Pada sarkoma kaposi (terkait dengan AIDS) yang merupakan suatu tumor pada pembuluh darah, akan menyebabkan terjadinya perangsangan pada VEGF, yang berakibat ekspresi VEGF meningkat dan merangsang pertumbuhan pembuluh darah (angiogenesis). Adanya ekspresi berlebih dari VEGF dan angiogenesis ini, akan menyebabkan neovaskularisasi pada sel tumor sehingga bertumbuh.

### 2. Kelainan reseptor faktor pertumbuhan

Faktor pertumbuhan adalah *chemical messenger* yang akan mempengaruhi komunikasi antar sel, kelainan pada reseptor GF ini juga akan merubah pola perkembangan sel. *Oncogene* yang terkait dengan keganasan : glioblastoma, karsinoma payudara, dan karsinoma buli-buli pada manusia mempunyai kesamaan dengan EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), sehingga reseptor ini dapat dikode pertumbuhannya oleh *Oncogene* tersebut.

### 3. Kelainan pensinyalan sitoplasmik

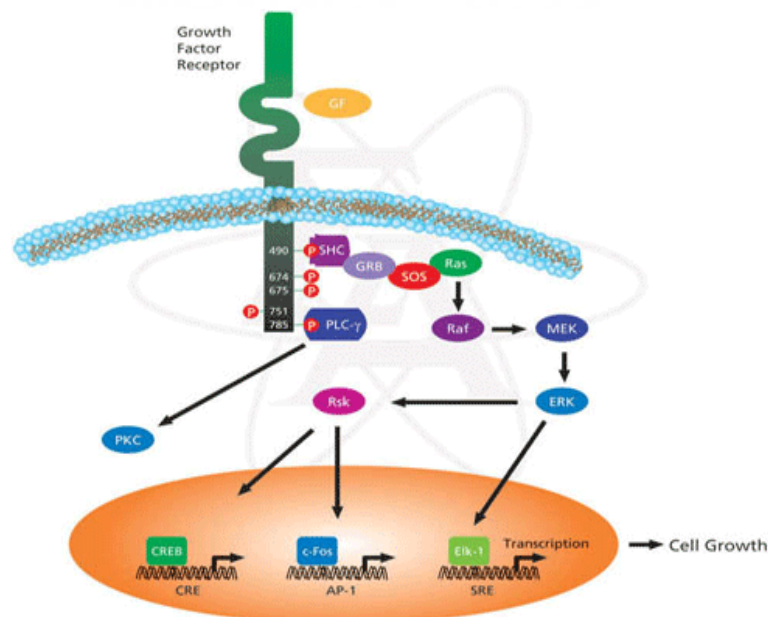
Kelainan pada transduksi pensinyalan sitoplasmik ini ditandai oleh overekspresi onkogen ras yang menyebabkan pembelahan sel meningkat.

### 4. Kelainan faktor transkripsi nukleus

Sasaran akhir transduksi sinyal adalah faktor transkripsi. Ekspresi gen dikontrol oleh faktor-faktor transkripsi yang diatur oleh stimuli ekstraseluler, baik oleh faktor pertumbuhan maupun oleh sitokin.

Apabila aktivitas tersebut menjadi tidak teratur yang disebabkan oleh amplifikasi atau mutasi gen, maka pertumbuhan sel atau diferensiasi sel akan menjadi terganggu, yang akhirnya dapat mengakibatkan transformasi malignan. Baik jalur stimulator maupun inhibitor kedua-duanya mengatur siklus sel, biasanya dengan mempengaruhi transkripsi. Kanker dapat terjadi akibat aberasi pada jalur-jalur tersebut.

- Jalur stimulator yang khas ini dipicu oleh faktor pertumbuhan (a) yang mengikatkan diri pada reseptor kinase-tirosin (b) Sinyal direlai protein G (c) yang disebut *Ras*. (seperti semua protein G, *Ras* ini aktif ketika GTP terikat dengannya) *Ras* (d) meneruskan sinyal kesederetan protein kinase. Kinase yang terakhir mengaktifkan faktor transkripsi (e) yang mengaktifkan gen-gen untuk satu atau lebih protein yang menstimulasi siklus sel. Jika mutasi membuat *Ras* atau komponen lain dari jalur itu aktif secara abnormal akan terjadi pembelahan sel yang berlebihan dan kanker.



**Gambar 2.7** Regulasi faktor Transkripsi (Berek dan Hacker, 2015)



- Jalur inhibitor ini mengarah pada penekanan pembelahan sel. Pada keadaan ini, mutasi yang menyebabkan defisiensi pada komponen jalur manapun dapat menyebabkan kanker. Protein p53 adalah contoh jalur inhibitor. Sinyal yang membuat p53 bekerja biasanya apabila terdapat kerusakan DNA. Kerusakan pada DNA yang tidak terdeteksi akan menyebabkan sel berproliferasi tanpa terkoordinasi dan berkembang menjadi kanker.

#### 2.1.4 Stadium

Stadium kanker serviks didasarkan atas pemeriksaan klinik, oleh karena itu pemeriksaan harus cermat kalau perlu dilakukan dalam narkose. Stadium klinik tidak berubah bila kemudian ada penemuan baru. Penyebaran ke korpus tidak mempengaruhi stadium. Penemuan pasca bedah dicatat tetapi tidak merubah stadium yang ditetapkan prabedah.

Klasifikasi menurut FIGO:

**Tabel 2.3.** Pembagian stadium kanker seviks berdasarkan FIGO 2015

Stadium	Keterangan
Stadium I	: Karsinoma hanya terbatas pada serviks ( perluasan ke korpus uteri harus dikesampingkan )
Stadium IA	: Karsinoma invasif yang hanya dapat didiagnosis dengan menggunakan mikroskop (semua lesi yang besar dengan invasi yang superfisial merupakan kanker stadium IB) Invasi stromal dengan kedalaman maksimal 5,0 mm dan perluasan horisontal

, $\leq 7,0$  mm. Kedalaman invasi harus tidak melebihi 5,0 mm dari basal epitel jaringan asal- superfisial atau glanduler. Keterlibatan *vascular space - venous* atau limfatik tidak merubah stadium

- IA1 : Kedalaman invasi stromal  $\leq 3,0$  mm, perluasan horisontal tidak melebihi 7,0 mm
- IA2 : Kedalaman invasi stromal  $> 3,0$  dan  $\leq 5,0$  mm, perluasan horisontal tidak melebihi 7,0 mm.
- Stadium IB : Lesi-lesi yang tampak secara klinik terbatas pada serviks atau kanker preklinik yang lebih besar daripada stadium IA
- IB 1 : Lesi  $\leq 4$  cm
- IB2 : Lesi  $> 4$  cm
- Stadium II : Karsinoma meluas diluar uterus, tetapi belum sampai dinding pelvis atau belum sampai sepertiga distal vagina;
- Stadium IIA : Melibatkan lebih dari  $2/3$  vagina bagian atas, tidak ada perluasan kedalam parametrium
- IIA1 : Lesi  $\leq 4$ cm,
- IIA2 : Lesi  $> 4$  cm
- Stadium IIB : Jelas ada perluasan ke parametrium tetapi tidak pada dinding pelvis

Stadium III : Karsinoma telah meluas sampai dinding pelvis; pada pemeriksaan rektal tidak terdapat ruangan bebas karsinoma antara tumor dan dinding pelvis; tumor tumbuh sampai sepertiga bagian bawah vagina. Adanya hidronefrosis atau ginjal yang tidak berfungsi masuk dalam stadium ini, kecuali disebabkan karena kelainan lain.

Stadium IIIA : Tidak ada perluasan sampai dinding pelvis, tetapi pertumbuhan tumor sampai sepertiga bagian bawah vagina

Stadium IIIB : Penyebaran sampai dinding pelvis atau hidronefrosis atau ginjal yang tidak berfungsi

Stadium IV : Karsinoma telah meluas sampai diluar pelvis minor atau secara klinik telah tumbuh kedalam mukosa kandung kencing atau rektum (terbukti dari hasil biopsi)

Stadium IVA : Pertumbuhan tumor ke dalam organ-organ sekelilingnya (organ pelvis )

Stadium IVB : Penyebaran ke organ-organ jauh

---

( FIGO, 2015)

### **2.1.5 Tatalaksana kanker serviks uteri**

Tatalaksana pengobatan kanker serviks uteri dapat dilakukan dengan berbagai modalitas terapi. Ada tiga modalitas utama terapi kanker serviks, yaitu operasi, radioterapi dan kemoterapi. Saat ini sedang berkembang terapi yang

relatif baru untuk meningkatkan keberhasilan terapi, yaitu *Targeted Therapy* dan *Immunotherapy*.

Terapi kanker serviks uteri berdasar stadiumnya adalah sebagai berikut :

### Stadium

IA1 Histerektomi ekstrapasial. Bila fertilitas masih diperlukan dilakukan konisasi dilanjutkan pengamatan lanjut.

IA2 Operasi

1. Histerektomi radikal atau modifikasi (tipe 2) dan limfadenektomi pelvis
2. Histerektomi ekstrapasial dan limfadenektomi pelvis bila tidak ada invasi limfo-vaskular
3. Konisasi luas atau trakhektomi radikal dengan limfadenektomi laparoskopis, kalau fertilitas masih dibutuhkan.
4. Radioterapi: radiasi luar dan brakiterapi (dosis di titik A 75-80 Gy)

IBI/IIA  $\leq$  4 cm Hindari gabungan operasi dengan radiasi untuk mengurangi morbiditas operasi

1. Histerektomi radikal dan limfadenektomi pelvis,  $\pm$  sampel kgb para-aorta
2. Pada usia muda, ovarium dapat dikonservasi
3. Terapi adjuvan kemoradiasi pasca bedah (dengan cisplatin  $\pm$  5-FU) bila ada faktor risiko kgb (+), parametrium (+), tepi sayatan (+)
4. Radioterapi: radiasi luar dan brakiterapi (dosis di titik A 80-85 Gy)

IB2/IIA > 4 cm

#### Kemoradiasi

Radiasi luar dan brakiterapi serta pemberian cisplatin 40 mg/m<sup>2</sup>/minggu selama radiasi luar. Kalau kgb iliaka kominis atau para-aorta (+) lapangan radiasi diperluas.

#### Operasi

Histerektomi radikal dan limfadenektomi pelvis

Kemoterapi Neoadjuvandiikuti histerektomi radikal dan limfadenektomi pelvis

IIB, III, IVA

#### Kemoradiasi

Radiasi luar dan brakiterapi serta pemberian cisplatin 40 mg/m<sup>2</sup>/minggu selama radiasi luar. Jika kgb iliaka kominis atau para-aorta (+) lapangan radiasi diperluas

#### Eksenterasi

Dapat dipertimbangkan pada IVA bila tidak meluas sampai dinding panggul, terutama bila ada fistel rektovaginal dan vesikovaginal

IVB atau residif

Residif lokal sesudah operasi

1. Radiasi + kemoterapi (cisplatin ± 5-FU). 50 Gy bila lesi mikroskopik dan 64-66 Gy pada tumor yang besar
2. Eksenterasi kalau proses tidak sampai dinding panggul (Berek dan Hacker, 2015)



## Pengobatan adjuvan

Hal penting lain yang harus dipertimbangkan adalah mengevaluasi hasil operasi, secara komprehensif, karena pengobatan tambahan / adjuvan didasarkan pada berbagai faktor. Pilihan terapi adjuvan yang bisa diberikan adalah kemoradiasi, kemoterapi atau hanya radiasi. Faktor prognosis yang digunakan saat ini meliputi faktor kliniko-patologik yaitu umur, stadium, besar lesi, jenis histologi, derajat diferensiasi, *deep cervical stromal invasion*, invasi limfo-vaskuler, metastase kelenjar getah bening. Sedangkan faktor biomolekuler yang banyak diteliti adalah molekul adesi sel E-kaderin dan katenin, Enzim protease MMP, kaptensin D Heparanase. Petanda biomolekuler Indeks DNA, Gen supresor p53 dan berbagai proto-onkogen misalnya *epidermal growth factor receptor* (EGFR).

### 2.1.6. Kemoterapi

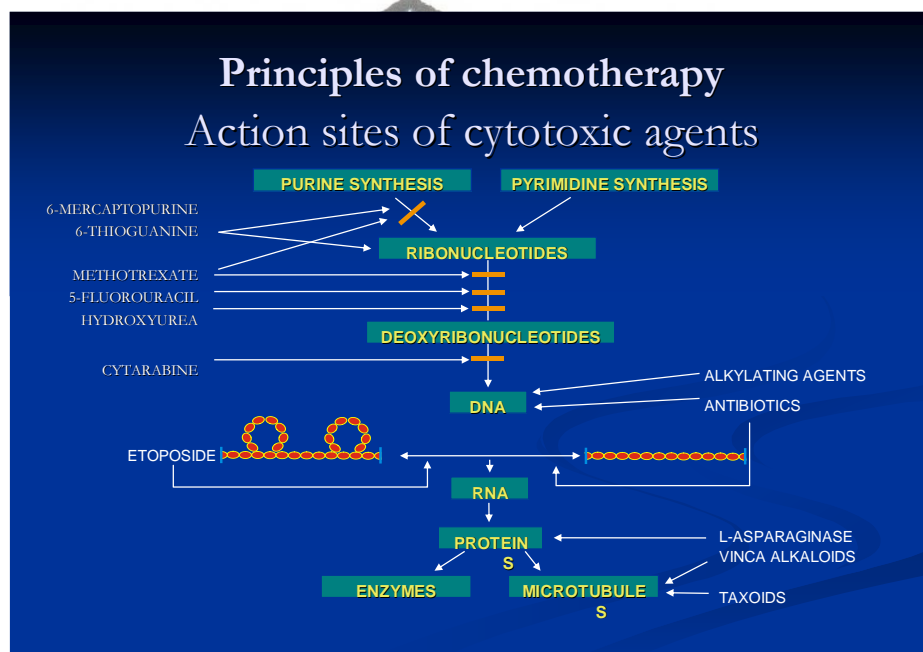
Kemoterapi pada pasien kanker serviks dapat diberikan sebagai adjuvan terapi, artinya diberikan setelah operasi histerektomi radikal atau sebelum radioterapi. Seperti halnya pada kanker ovarium, saat ini telah ada protokol untuk kemoterapi neoajuvan pada kanker serviks. Kemoterapi neoajuvan artinya kemoterapi yang diberikan sebelum terapi utama, misalnya radioterapi atau operasi histerektomi radikal. Pemberian kemoterapi neoajuvan, salah satu tujuannya adalah mengecilkan/menyusutkan besar lesi di serviks ataupun invasi di dinding vagina, sehingga meningkatkan radikalitas operasi (Modarres *et al.*, 2005 ; Chang *et al.*, 2000).

Efek pembunuhan sel suatu sitostatika dapat dibedakan dalam fase spesifik dan fase non-spesifik. Efek spesifik ditentukan oleh sifat kimia obat dan sifat khas biokimiawi sel tumor. Biodistribusi yang menguntungkan kecepatan penyerapan oleh sel, tingkat pengubahan intraseluler ke metabolit (aktivasi) dan adanya proses yang sensitif meningkatkan secara positif efek pembunuhan sel. Sebaliknya penyerapan yang menurun, pengeluaran yang meningkat atau kenaikan pemecahan intraseluler menghambat efek mematikan sel. Efek netto proses-proses ini, kebanyakan menghasilkan kerusakan DNA, adalah resultante dari pengaruh peningkatan atau penghambatan. Kemoterapi yang dapat diberikan sebagai neoadjuvan adalah *platinum base chemoteraphy* diantaranya : 5 Fluoro Uracil-Cisplatin, PVB ( Cisplatinum Vincristin Bleomycin ) atau Paclitaxel Carboplatin.

Meskipun ada banyak perbedaan dalam struktur dan mekanisme kedua pada akhirnya kebanyakan sitostatika menimbulkan gangguan genom di DNA dalam bentuk *adduct*, *cross-links* dan pematahan rantai tunggal atau ganda. Di sini dimulai fase non-spesifik efek sitostatik, yang tidak lagi bergantung kepada sifat-sifat biokimia spesifik obat yang dipakai atau sel sasaran. Yang menentukan efek dalam fase ini adalah kemampuan sel untuk mengenal kerusakan DNA dan memperbaikinya dan waktu yang diperlukan untuk reparasi, artinya berpengaruh pada kecepatan pertumbuhan tumor.

Efek sitotoksik ini merupakan hasil interaksi dengan makromolekul (DNA, RNA dan protein) dan umumnya efek tersebut terjadi dalam tiga bentuk, yaitu :

- Rusaknya asam inti dengan proses alkilasi (ikatan kovalen dari rantai karbon ke DNA), interkalasi (insersi suatu senyawa diantara basa nukleotida), atau menghasilkan *a single-strand breakage*.
- Inhibisi enzim yang spesifik.
- Fragmentasi dari struktur spindle mikrotubuler (The Cochrane, 2005)



**Gambar 2.8.** Mekanisma kerja obat obat sitostatika ( Berek dan Hacker , 2015)

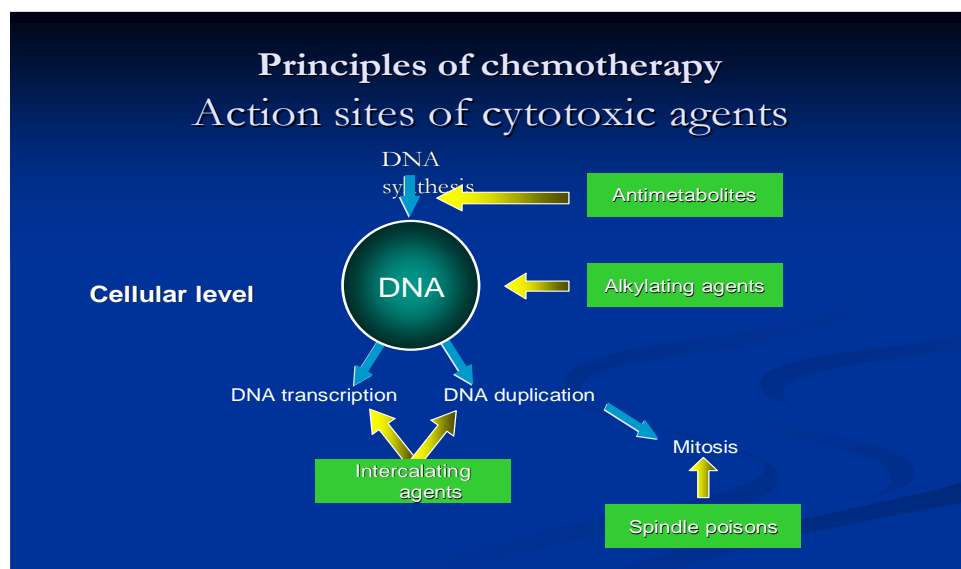
### ***Carboplatin***

Carboplatin (Paraplatin<sup>R</sup>, CBDCA) mirip dengan kompleks platinum dengan peningkatan indeks terapi dan profil anti kanker yang sama.

Mekanisme kerja : Cara kerja Carboplatin mirip dengan Cisplatin. Perbedaan yang mendasar hanya cara kerjanya yang lebih lambat. Hampir 75% Carboplatin dieksresi dalam bentuk utuh diurin. Obat ini memiliki resistensi silang dengan Cisplatin dan resistensinya lebih kecil dari pada Cisplatin.

Eliminasi : Carboplatin dieksresi di urin dan harus disesuaikan dosisnya pada gangguan fungsi ginjal. Waktu paruh Carboplatin 2,5-3 jam.

Dosis dan Jadwal pemberian : Carboplatin secara umum diberikan tiap 3-4 minggu. Penurunan trombosit terendah yang berhubungan dengan Carboplatin memerlukan pemberian dalam interval yang lebih lama. Dosis aman Carboplatin membutuhkan penilaian filtrasi glomerulus yang akurat, baik dengan kedokteran nuklir maupun penilaian berdasarkan kadar serum kreatinin atau volume urin 24 jam. Dosis Carboplatin kemudian dihitung berdasarkan rumus Calvert ( $\text{dosis} = \text{AUC} \times [\text{GFR} + 25]$ ), dimana AUC secara klinis diperoleh dari target area dibawah kurva (area *under curve*). AUC 4-7 dianjurkan, tergantung adanya pemberian obat lain. Sedangkan laju filtri glomerulus diperkirakan dengan nilai bersihan kreatinin (creatinine clearance) dan persamaan Jellife atau Crockcroft. Protokol Perkumpulan Onkologi Ginekologi (GOG) umumnya menggunakan rumus  $\text{GFR} = 0,9 \times (98 - 0,8 \times [\text{umur} - 20]) / \text{kadar kreatinin serum}$ .



**Gambar 2.9.** “Lokasi “ bekerja obat Sitostatika ( Berek dan Hacker. 2015)

## Paclitaxel

Merupakan obat sitotoksik yang relatif baru. Paclitaxel dikembangkan pada tahun 80-an berasal dari ekstrak tumbuhan yang mempunyai aktivitas anti tumor dan mempunyai jumlah yang sedikit dari spesies *Taxus*. Paclitaxel dan docetaxel mempunyai mekanisme kerja primer mengikat mikrotubul dan menghambat depolimerasi dari mikrotubul ke dalam ikatan dimer tubulin. Efek ini berlawanan dengan "vinca alkaloid" yang mencegah perakitan mikrotubul. Melalui perubahan dimer tubulin yang normal mengganggu keseimbangan sejumlah proses di dalam sel menjadi terganggu, termasuk proses mitosis, konsentrasi rendah dari paclitaxel (50 nmol/L) efektif untuk meningkatkan polimerasi tubulin dan studi preklinik menunjukkan efek biologik sesuai dengan konsentrasi obat.

Perbedaan dengan docetaxel adalah ikatan tubulin lebih tinggi afinitasnya. Paclitaxel pada percobaan awal mempunyai reaksi hipersensitifitas yang tinggi dengan menurunkan frekuensi dan beratnya reaksi maka pemberian infus diperpanjang menjadi 24 jam dan penderita secara rutin diberikan premedikasi kortokosteroid dan antagonis H1 dan H2. Aktivitas anti tumor dapat diberikan pada karsinoma ovarium dan payudara. Dikombinasikan dengan platinum dan anthracycliner memberikan hasil yang baik. Pemberian kombinasi ini juga perlu diperhatikan pemberian cisplatin pertama memberikan efek neutropenia. Pemberian paclitaxel menyebabkan alopesia namun memberikan efek mual dan muntah yang ringan. Pada penelitian ini dosis yang digunakan adalah 175 mg/m persegi.



### **Mekanisme peluruhan dan penyusutan tumor.**

*Fractional kill hypothesis*, Apoptosis, dan *Early Tumor Shrinkage* (ETS)

Proses inisiasi dan perkembangan kanker yang disebut karsinogenesis terjadi secara bertahap, demikian juga proses regresi atau penyembuhan kanker. Misalnya adalah proses menyusut atau luruhnya kanker padat (solid tumor) setelah pemberian kemoterapi atau radioterapi, yang juga terjadi secara bertahap. Pada pemberian kemoterapi, mati atau berkurangnya jumlah sel kanker dikenal istilah *Fractional kill hypothesis* / *log kill hypothesis*. (Berek dan Hacker 2015)

Pada pemberian kemoterapi, akan mengakibatkan matinya sel kanker secara fraksional, misalnya 80 % dari populasi awal dan hal ini tidak tergantung pada jumlah absolut populasi sel awal. Pada pemberian kemoterapi selanjutnya, juga akan terbunuh sejumlah sel secara fraksional seperti diatas. Hal inilah salah satu alasan pemberian kemoterapi diberikan secara serial. Dengan demikian mudah dipahami bahwa peluruhan serta penyusutan besar tumor pada proses kemoterapi, memerlukan waktu atau tidak dapat segera dinilai. Efek biologik jaringan pasca radioterapi, yang dalam beberapa hal juga terjadi pasca kemoterapi, akan terjadi kematian sel secara fraksinasi dan dapat melalui tahapan sebagai berikut yaitu *Repair*, *Repopulation*, *Redistribution* dan *Reoxygenation*. Rangkaian proses diatas akan menentukan seberapa besar respon terapi yang terjadi.

*Apoptosis* merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram, berperan penting agar pengaturan homeostasis dalam suatu jaringan dan organ tetap konstan. Istilah apoptosis pertama kali diperkenalkan oleh Kerr, Wyllie dan Currie pada tahun 1972 sebagai mekanisme molekuler yang mengatur kematian sel secara khusus (Apoptosis diambil dari bahasa Yunani yang berarti “gugur”).

Sel yang sudah tidak berfungsi lagi akan dieliminasi dan mengalami proliferasi fisiologis yang kemudian menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu sehingga memelihara fungsi jaringan menjadi normal. Sel akan mengalami apoptosis jika mendapat informasi berupa rangsangan fisiologis dan dapat pula berupa rangsangan patologis yang prosesnya dikontrol oleh oleh gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel, diantaranya gen p53, Rb, dan golongan Bcl2. Dereglasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi secara tidak terkontrol seperti yang dijumpai pada kanker.

Secara mikroskopik apoptosis dapat dilihat dengan terjadinya sitoplasma yang mengerut, nukleus yang piknotik, fragmentasi sitoplasma dan nukleus. Fragmen-fragmen sel tersebut mengandung organel yang tetap berfungsi, yang selanjutnya badan apoptosis tersebut akan di fagositosis oleh sel-sel fagosit. Perubahan molekuler apoptosis diawali oleh fragmentasi DNA. Apoptosis berbeda dengan nekrosis, dimana terjadi pembengkakan sel dan hancurnya membran sel lalu isi sel akan dilepas ke jaringan atau bagian antar sel. Pada nekrosis, isi tersebut akan bersifat toksik terhadap sel lain disekitarnya, hal inilah yang memicu terjadinya proses inflamasi.

Apoptosis tergantung pada aktivasi gen dan sintesis protein baru, dan diperkirakan bahwa proses ini diatur oleh sejumlah gen. Pada manusia termasuk bcl-2 yang menghambat apoptosis dan karena itu akan memperpanjang daya hidup sel. P53 dalam keadaan normal akan merangsang apoptosis. Ciri-ciri morfologi apoptosis meliputi :

- a. Penyusutan sel.
- b. Kondensasi dan fragmentasi kromatin.
- c. Pembentukan gelembung sitoplasma dan badan apoptotik.
- d. Fagositosis badan apoptotik oleh sel sehat didekatnya atau oleh makrofag.
- e. Tidak ada tanda peradangan.

Kematian sel kanker pasca pemberian radioterapi atau kemoterapi diantaranya adalah melalui proses apoptosis. Kematian sel melalui proses apoptosis berarti tidak terjadi secara langsung misalnya efek fisik dari radioterapi atau kemoterapi, tapi lebih pada kerusakan genetik yang tidak dapat diperbaiki melalui mekanisme biologis sel normal. Dan hal ini masih berjalan beberapa saat sampai minggu pasca pemberian radioterapi atau kemoterapi. Penilaian respon terapi pada kanker dengan metode *Response evaluation criteria in solid tumours* (RECIST), hanya menilai penyusutan lesi secara fisik, tapi tidak dapat menilai aktifitas sel kanker pada proses pengobatan, kematian sel ataupun kemungkinan sel yang berhasil diperbaiki / repair secara genetik dan terjadi repopulasi.

*Response evaluation criteria in solid tumours* (RECIST) digunakan untuk mengevaluasi dan mengelompokan tingkat respon suatu kanker terhadap terapi anti kanker yang telah diberikan, namun tidak bias mengukur/menilai tingkat seluler dan biomolekuler. Alternatif lain untuk menilai serta memprediksi respon terapi selama atau saat dalam pengobatan, dapat digunakan kriteria *Early Tumor Shrinkage* (ETS). ETS didefinisikan penurunan volume tumor 20 % dari ukuran / volume awal pada jangka waktu yang telah

ditentukan, biasanya 6-7 minggu. RECIST maupun ETS menggunakan dasar penurunan ukuran lesi tumor sebagai dasar penilaian respon terapi, tentunya tidak dapat digunakan pada “*non solid tumor*”. ( Heinemman et al. 2015 )

### 2.1.7 Metastasis dan faktor prognosis kanker serviks uteri

Metastasis pada kanker serviks terjadi melalui berbagai cara, meliputi :

1. Invasi : penyebaran secara langsung pada stroma serviks, korpus uteri parametrium dan vagina
2. Hematogen : melalui aliran darah
3. Limfogen : melalui aliran limfe
4. Implantasi peritoneal (Miller A. B, 2004)

Metastasis pada KGB merupakan hal yang penting karena dapat digunakan sebagai faktor prognostik. Kelenjar getah bening yang berfungsi sebagai drainase pada pasien kanker serviks adalah obturator, pada bifurkasio iliaka, iliaka eksterna dan iliaka komunis. Takeda *et al.*, dalam penelitiannya mengelompokan prognosis pasien menjadi :

1. Risiko rendah : pasien dengan tumor terbatas pada serviks dan tidak ada invasi limfo-vaskuler.
2. Risiko sedang : pasien dengan tumor terbatas pada serviks, dengan invasi limfo-vaskuler, jenis sel skuamosa atau adenoskuamosa, metastase kelenjar getah bening pelvik dan invasi parametrium.
3. Risiko tinggi : pasien dengan metastase KGB pelvik, iliaka komunis dan para-aorta, invasi parametrium, jenis sel adenokarsinoma.

Angka ketahanan hidup 5 tahun masing masing kelompok risiko adalah berturut-turut  $100 \pm 0$  (mean  $\pm$  SE)%,  $85.5 \pm 3.9\%$ , dan  $25.1 \pm 9.7\%$ . Pengelompokan risiko tersebut ditujukan pada pemilihan pemberian terapi adjuvan yang akan diberikan. Namun belum didapatkan kesepakatan tentang hal tersebut ( Berek dan Hacker J.S, 2014).

#### 2.1.7.1 Faktor kliniko-patologik

Kombinasi faktor klinis dan hasil pemeriksaan patologi anatomi dari jaringan operasi yang disebut sebagaifaktor kliniko-patologik saat ini yang akan digunakan sebagai faktor prognosis pada pasien kanker serviks uteri.

##### Stadium

Angka ketahanan hidup 5 tahun adalah 95% pada kedua stadium 1a1 dan 1a2. Currie, pada penelitian skala besar menetapkan angka survival masing masing 86,3%,75%,58,9% dan 34,1% pada stadium I, Ila,I Ib dan stadium lain.Penelitian di Memorial Sloan-Kattering Cacncer Center pada 431 pasien stadium 1b atau Ila, didapatkan 71 pasien metastase pada KGB (Singh dan Arif, 2004).

##### Ukuran lesi

Ukuran lesi merupakan prediktor pada metastase KGB, invasi limfo-vaskuler serta survival. *Survival rate* masing masing 90%,60%,40% pada ukuran lesi <2cm, >2cm dan >4cm. Cut-of point besar lesi adalah 4 cm, namun analisa multivariat menunjukkan tidak ada perbedaan *odd ratio* pada ukuran 3,1-4 cm dengan 4,1-5 cm ( Singh dan Arif, 2004; Martinez A *et al.*, 2010).



### **Invasi-limfovaskuler**

Pada pasien stadium Ib, angka kejadian invasi limfo-vaskuler masing masing 30%, 69% dan 76% pada ukuran tumor <2cm, 2,1 – 4 cm dan > 4 cm, dan rata rata adalah 53%. Invasi limfo-vaskuler sampai saat ini masih merupakan kontroversi dan menjadi perdebatan. Beberapa analisis mendapatkan tidak didapatkan korelasi bermakna terhadap survival. Laporan lain mendapatkan angka survival 5 tahun sebesar 90% bila tidak ada invasi limfovaskuler, sementara bila ada invasi sebesar 50-70%. Angka risiko kekambuhan meningkat sesuai dengan tingkat invasi limfo-vaskuler. Sebuah penelitian mendapatkan angka rekurensi pada 2 tahun pertama pada invasi-limfovaskuler yang tinggi (45%), sedang (33%), ringan (15%) dan negatif (7%) (Pierangelo M *et al.*, 2005)

### **Metastasis kelenjar getah bening**

Metastase pada kelenjar getah bening selain berfungsi sebagai faktor prognosis /faktor prediktor bebas terhadap survival, juga sering digunakan sebagai acuan untuk mengevaluasi faktor prognosis lain, misalnya besar lesi, invasi limfovaskuler, juga beberapa faktor biomolekuler misalnya MMP dan VEGF. Pasien tanpa metastase pada KGB mempunyai angka ketahanan hidup 5 tahun sebesar 85-90%, sedangkan pasien dengan metastase KGB bervariasi antara 20-74% ( Martinez *et al.*, 2010).

### **Jenis histologi**

Jenis histologi adenokarsinoma meliputi kurang lebih 15 – 25 % dari keseluruhan keganasan pada serviks uteri. Kasus adenokarsinoma cenderung

meningkat pada wanita usia muda. Analisis multivariat menyimpulkan, secara keseluruhan survival pasien dengan adenokarsinoma lebih buruk yaitu 59 % dibanding 73 % pada pasien dengan skuamosa (Berek dan Hacker J.S 2014).

#### 2.1.7.2. Petanda biomolekuler

Petanda biomolekuler sampai saat ini belum banyak digunakan sebagai faktor prognosis yang digunakan sehari-hari dalam tatalaksana pasien, namun penelitian dalam bidang ini berlangsung intensif. Petanda biomolekuler tersebut diantaranya enzim protease (Matrixs metaloproteinase/MMP, kaptensin D, Heparanase), molekul adhesi sel (E-kadherin,katenin), indeks DNA dan tumor supresor gen p53.

VEGF adalah suatu *growth factor* yang penting dalam regulasi angiogenesis fisiologis dan angiogenesis patologis. Sedangkan VEGF-C juga berperan pada proses limphangiogenesis.

*Vascular endothelial growth factor-C* (VEGF-C) berperan dalam proses limphangiogenesis, proses pembentukan saluran limfatik baru. VEGF-C dapat bekerja baik pada pembuluh darah maupun pembuluh limfe melalui aktivasi pada reseptor VEGF R2. Sinyal tansduksi VEGF-C/VEGF R3 diketahui berperan penting pada proses limfangiogenesis dan metastase pada *sentinel node* (Su *et al.*, 2007).

Van Trappen *et al.*, meneliti pola koekspresi gen pada kanker serviks uteri dan menyimpulkan bahwa VEGF-C sebagai faktor limphangiogenesis meningkat 130 kali pada jaringan kanker serviks uteri dibanding serviks normal, dan kadar VEGF-C mRNA yang tinggi pada kelompok pasien dengan metastasis kelenjar getah bening.

Wen-Fang Cheng *et al.*, melakukan pengukuran kadar protein VEGF *intratumoral* pada jaringan hasil biopsi pasien kanker serviks uteri dan mendapatkan bahwa tumor yang overekspresi VEGF adalah : lebih besar ( $3.35 \pm 1.17$  lawan  $2.13 \pm 1.28$  cm,  $p < .001$ ) insiden invasi stroma dalam lebih tinggi (20 of 57 lawan 6 of 47,  $P = .009$ ), invasi limfo-vaskuler (15 of 33 lawan 11 of 71,  $p = .011$ ), invasi parametrium (15 of 32 lawan 11 of 72,  $p = .002$ ), dan metastase kelenjar getah bening (10 of 20 lawan 16 of 84,  $p = .004$ )

Angka risiko kekambuhan meningkat sesuai dengan tingkat invasi limfo-vaskuler. Sebuah penelitian mendapatkan angka rekurensi pada 2 tahun pertama pada invasi-limfovaskuler yang tinggi (45%), sedang (33%), ringan (15%) dan negatif (7%).

Peran VEGF sebagai tumor marker, yang dapat digunakan untuk prediksi metastase KGB serta prediksi respon terapi telah diteliti pada berbagai keganasan, diantaranya karsinoma kolorektal, karsinoma hepatoseluler, endometrium dan ovarium. Tanir HM, menyimpulkan dalam penelitiannya, bahwa serum VEGF merupakan petanda tumor yang potensial, dengan relevansi yang bagus untuk menentukan asal dari massa di adneksa.

Analisis multivariat pada kanker kolorektal didapatkan kadar serum VEGF yang tinggi ( $>533$  pg/ml) merupakan prediktor bebas penurunan survival (HR=1.65,  $p=0.015$ ), sementara konsentrasi dalam plasma tidak dapat digunakan sebagai prediktor ( $>112$  pg ml<sup>-1</sup>) (HR=1.27,  $P=0.23$ ) (Werther *et al.*, 2002).

Khusus pada kanker serviks stadium awal, Kodama *et al.*, melakukan pemeriksaan ekspresi mRNA VEGF, dan menyimpulkan bahwa VEGF berperan merangsang angiogenesis pada kasus invasi awal. Mathur *et al.*, meneliti peran serum VEGF-C sebagai biomarker pada kanker serviks uteri stadium lanjut, dan menyimpulkan bahwa kadar serum VEGF-C dapat untuk deteksi dini kemungkinan adanya metastasis.

Petanda biomolekuler dimasa yang akan datang akan mempunyai peran yang lebih besar. Beberapa penelitian dan pengobatan yang menargetkan pada inhibisi EGFR dan VEGFR telah dan sedang berjalan. Pada kanker serviks uteri strategi terbaik untuk pencegahan dan pengobatannya adalah pemahaman biologi dari HPV (Mathur *et al.*, 2005 ; Mitsuhashi *et al.*, 2005).

## 2.2 Vascular Endothelial Growth Factor ( VEGF )

*Vascular endothelial growth factor* (VEGF) adalah glikoprotein proangiogenik yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, survival pada sel endotel serta meningkatkan permeabilitas kapiler.

Sel kita memerlukan oksigen, yang digunakan sebagai energi menjalankan proses proses molekuler. Oksigen tersebut dikirimkan melalui darah, dan sebagian besar sel sel kita berada dalam rentang 10 milimeter dari pembuluh kapiler. Sel sel tumor juga tanpa pengecualian. Bila massa sel sel tumor telah lebih besar dari 1 milimeter, hal tersebut menyebabkan sel kekurangan oksigen dan energi kecuali dibentuk pembuluh darah baru. *Vascular endothelial growth factor* atau VEGF

adalah sinyal kunci yang digunakan oleh sel yang kekurangan oksigen (*oxygen-hungry cells*) untuk memicu pertumbuhan pembuluh darah (Frumovitz *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Biologi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF )**

Perkembangan pembuluh darah adalah kebutuhan utama dalam perkembangan dan diferensiasi organ selama embriogenesis, demikian juga pada penyembuhan luka serta fungsi reproduksi pada manusia dewasa. Angiogenesis juga terlibat dalam patogenesis berbagai penyakit seperti retinopati proliferatif, arthritis rheumatoid, termasuk pertumbuhan tumor. (Ferrara *et al.*,1997; Lymbousaki *et al.*,1999)

#### **2.2.1.1 Sintesis dan Aktivitas Biologis VEGF**

##### **2.2.1.1.1 Sintesis VEGF**

Sintesa VEGF dipicu oleh berbagai faktor. Faktor perangsang utama adalah hipoksia jaringan / sel, sedangkan faktor lainnya adalah berbagai sitokin (PDGF, EGF,IGF dll), Cox-2 serta berbagai onkogen.

Hipoksia akan menyebabkan ekspresi HIF-1 $\alpha$ , suatu faktor transkripsi, dan akan masuk dalam inti sel. Selanjutnya terjadi ikatan dengan *hipoksia respon element* (HRE) dan terjadi transkripsi gen VEGF. Kemudian terjadi sintesa m-RNA VEGF, terjadi translasi dan diproduksi protein VEGF dan berakhir dengan disekresikanya VEGF.



Dilain pihak, dengan keadaan normal atau tidak adanya hipoksia maka akan terjadi supresi transkripsi gen VEGF dan degradasi m-RNA serta protein yang diproduksinya.

#### 2.2.1.1.2. Aktifitas Biologis VEGF

VEGF menstimulasi migrasi dan proliferasi sel endotel pada arteri, vena dan kapiler dan merangsang angiogenesis baik *in vitro* ataupun *in vivo*. Demikian juga, VEGF merangsang migrasi dari monosit dan makrofag yang mempunyai reseptor VEGFR-1 di permukaannya. VEGF juga bersifat *pro-survival factor* yang merangsang ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan A1 pada sel endotel manusia. VEGF juga menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler (Ferrara *et al.*, 1997)

Kerja VEGF dimediasi melalui pengikatan kepada dua reseptor tirosin kinase yaitu VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR; bentuk murin-nya dikenal sebagai Flk-1). Reseptor-reseptor tersebut diaktivasi oleh VEGF dengan mencetuskan fosforilasi berbagai protein yang aktif dalam kaskade transduksi sinyal. Anggota lain dari keluarga VEGF menunjukkan spesifisitas pengikatan reseptor yang berbeda, dimana VEGF-B dan *Placental Growth Factor* (PlGF) hanya mengikat dan mengaktivasi VEGFR-1. VEGF-C dan VEGF-D mengikat reseptor ketiga, VEGFR-3 (Flt-4) dan melakukan mediasi limfangiogenesis dan memperlihatkan beberapa aktivitas terhadap VEGFR-2. VEGFR-1 dan 2 ditemukan pada permukaan sel-sel endotelial, dimana mereka mengikat VEGF dengan afinitas tinggi. Walau VEGFR-1 berafinitas lebih tinggi, VEGFR-1 dipercaya bekerja sebagai reseptor umpan, mempengaruhi modulasi availabilitas

VEGF terhadap VEGFR-2, reseptor utama sinyal VEGF. Kerja modulator lebih lanjut diperluas dengan adanya bentuk larut air dari VEGFR-1, yang mengikat VEGF dan dapat menghambat mitogenesis yang diinduksi VEGF, sebagaimana neuropilin, reseptor untuk kolapsin/semaforin. Neuropilin-2 terikat pada VEGFR-1, sedangkan neuropilin-1 terikat pada VEGF-165 dan meningkatkan afinitas terhadap VEGFR-2. ( Goel H.L.2013)

#### 2.2.1.2 Metode pemeriksaan VEGF

Pemeriksaan terhadap VEGF dapat dilakukan dengan berbagai metode, dan hal ini kadang menimbulkan kesulitan untuk mengevaluasi / membandingkan hasil dari berbagai pemeriksaan tersebut. Macam pemeriksaan yang dilakukan adalah :

- RT-PCR dan *in-situ hybridisation* untuk evaluasi ekspresi m-RNA VEGF
- Intra-tumoral protein
- Imunhistokimia
- Western Blotting dan
- ELISA

Pemeriksaan kadar VEGF pada plasma dan serum penderita mempunyai keuntungan karena lebih mudah dilakukan, namun harus diperhatikan bahwa kadar VEGF dalam sirkulasi dipengaruhi oleh VEGF yang disekresikan oleh platelet dan leukosit akibat proses normal pembekuan. Masalah ini diatasi dengan pengambilan sampel darah dan segera dilakukan sentrifugasi untuk pemisahan serum penderita.

Cheng WF, mendapatkan nilai tengah ( median ) protein VEGF intra-tumoral pada pasien kanker serviks adalah 180 pg/mg, sedangkan pada jaringan normal 0 pg/mg. Besar lesi > 4 cm dibanding < 4 cm ( 1030 dibanding 118 ). Invasi limfo-vaskuler dibanding tidak ( 568 dibanding 118 ) dan pasien dengan metastase KGB dibanding tanpa metastase KGB ( 795,5 dibanding 121 pg/mg).

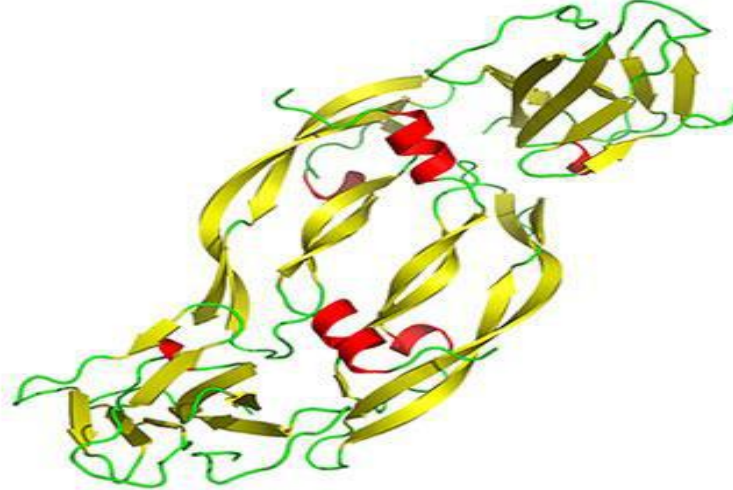
Sedangkan overekspresi VEGF didapatkan dari pemeriksaan imunohistokimia sebesar 10/20 ( 50%) pada kasus dengan metastase KGB, sedangkan tanpa metastase KGB sebesar 16/84 dengan  $P=0,002$ ). Pemeriksaan yang dilakukan dengan RT-PCR untuk menilai m-RNA, menyimpulkan VEGF-C *upregulated* 130 kali pada pasien kanker serviks dibanding pada serviks normal.

Sensitivitas pemeriksaan VEGF-C yang diartikan sebagai perbedaan konsentrasi yang dapat dideteksi pada pengenceran bertingkat adalah 12,8 pg/ml. Kadar VEGF-C adalah antara 54 - 647 pg/ml dan kadar rata ratanya adalah 170 pg/ml. Tidak didapatkan interferensi dengan protein lain dalam serum yang dapat mempengaruhi spesifisitas pemeriksaan VEGF-C (Matshumara *et al.*, 2003 ; Mitshuhashi *et al.*, 2005)

#### **2.2.1.2.1 Struktur VEGF dan Reseptor VEGF**

VEGF pertama kali dideskripsikan sebagai protein yang mampu merangsang permeabilitas vaskuler dan proliferasi sel endotel dan diidentifikasi sebagai perangsang utama angiogenesis dan vaskulogenesis. VEGF adalah sebuah basa, 34-46-kDa *homodimeric*, heparin-binding glycoprotein dan gen VEGF berada di kromosom 6p12. VEGF, yang juga disebut VEGF-A atau *vascular*

*permeability factor* (VPF), termasuk kedalam keluarga *supergene VEGF-platelet-derived growth factor* (PDGF). Anggota keluarga yang lain adalah VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-E. Semua menunjukkan derajat yang bervariasi homolog dengan VEGF. *Splicing* alternatif gen VEGF menghasilkan lima asam amino isoform 121,125, 165, 189 dan 206 serta varian-varian lain yang lebih jarang. VEGF-165, adalah bentuk dominan dan sebagian terkait dan disekresi oleh matriks (Ferrara *et al.*, 1997).



**Gambar 2.10.** Molekul VEGF (Ferrara *et al.*, 1997)

VEGF-189 dan VEGF-206 merupakan dasar, dengan afinitas tinggi terhadap heparin dan tetap terkucil dalam matriks ekstra-selular, terikat pada proteoglikan-proteoglikan heparan sulfat. VEGF-121 bersifat asam, tidak mengikat heparin dan disekresikan. Bentuk matriks sekuester mungkin dilepaskan oleh kerja enzimatik, baik melalui kerja heparinase atau melalui celah plasmin untuk melepaskan suatu fragmen yang bersifat difusif (VEGF-110).

Kerja VEGF-165 terkait dengan aktivasi kaskade proteinase, termasuk yang mengarah kepada pembentukan plasmin, sehingga pelepasan isoform VEGF yang terikat matriks menimbulkan mekanisme amplifikasi.

#### 2.2.1.2.2. Regulasi Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF diatur oleh berbagai hormon, faktor pertumbuhan dan sitokin. Ekspresi mRNA VEGF meningkat pada kultur sel yang dirangsang dengan Interleukin-6 (IL-6), PDGF, EGF, TGF, prostaglandin E2, thyroid stimulating hormone (TSH) dan luteotrophic hormone. Sebagai tambahan, *nitric oxide* dan produk-produk onkogen v-Has-ras/v-raf juga merangsang ekspresi VEGF.

Hipoksia merupakan rangsangan terkuat ekspresi VEGF baik pada in vitro maupun in vivo. *VEGF gene promoters*, mempunyai elemen *cis-acting enhancer* yang akan berikatan dengan *hypoxia inducible factor* (HIF), suatu faktor transkripsi. Dengan ikatan pada reseptor VEGF dan terjadi transauto-posporilisasi dan aktivasi kaskade sinyal transduksi meliputi jalur Src, PLC-g, MAPK, STAT3 dan STAT5 (Lee *et al.*, 2008 ; Schoppman *et al.*, 2006).

Ekspresi gen VEGF diregulasi oleh suatu stimulasi pejamu, termasuk estrogen, *nitric oxide* (NO) dan berbagai variasi *growth factor*, diantaranya *fibroblast growth factor-4*, PDGF, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), *keratinocyte growth factor*, *interleukin* (IL)-6, IL-1 $\beta$  dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (Ferrara *et al.*, 1997).



Konsisten dengan perannya pada angiogenesis tumor, ekspresi VEGF diregulasi oleh kejadian-kejadian genetik yang biasa terjadi pada transformasi maligna, seperti hilangnya gen-gen supresor tumor (misalnya p53) dan aktivasi onkogen seperti *ras*, *v-src* dan *HER-2*. Selebihnya ekspresi VEGF secara khusus lebih sensitif terhadap tekanan oksigen dan sangat terpengaruh oleh hipoksia yang menjadi karakter hampir semua tumor.

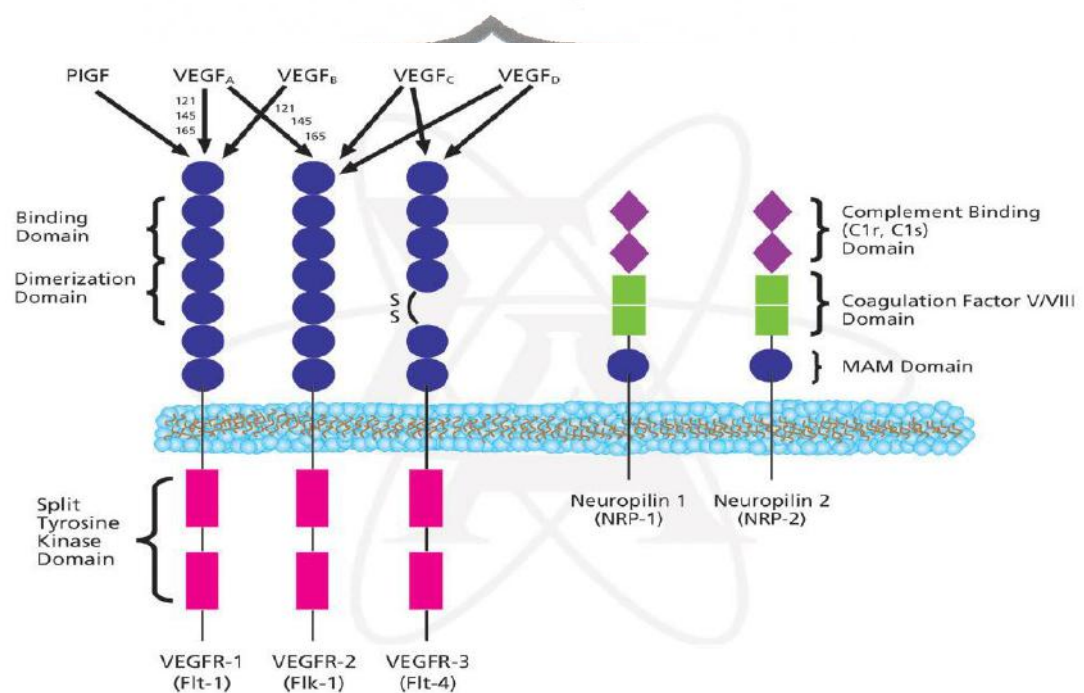
Dengan VEGF, hipoksia juga menimbulkan regulasi VEGFR-1 dan VEGFR-2 pada sel-sel endotelial. Peningkatan ekspresi gen-gen VEGFR juga diinduksi oleh pengikatan kepada VEGF itu sendiri, sehingga menimbulkan amplifikasi sinyal VEGF. TGF- $\beta$ , yang juga menimbulkan peningkatan VEGF, telah ditemukan menurunkan regulasi kadar VEGFR mRNA pada sel-sel endotelial, sedangkan TNF- $\alpha$  dilaporkan mempunyai efek positif dan negatif terhadap ekspresi VEGFR-2. (Pappeti *et al.*, 2002; Stefensen *et al.*, 2010)

#### 2.2.1.2.3. Reseptor VEGF

Sinyal kunci yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel, juga regenerasi dan remodeling jaringan dewasa, dilakukan melalui reseptor transmembran, dimana sebagian besar adalah *reseptor tyrosin kinase*. Reseptor VEGF, VEGFR adalah suatu reseptor kelompok tirosin kinase.

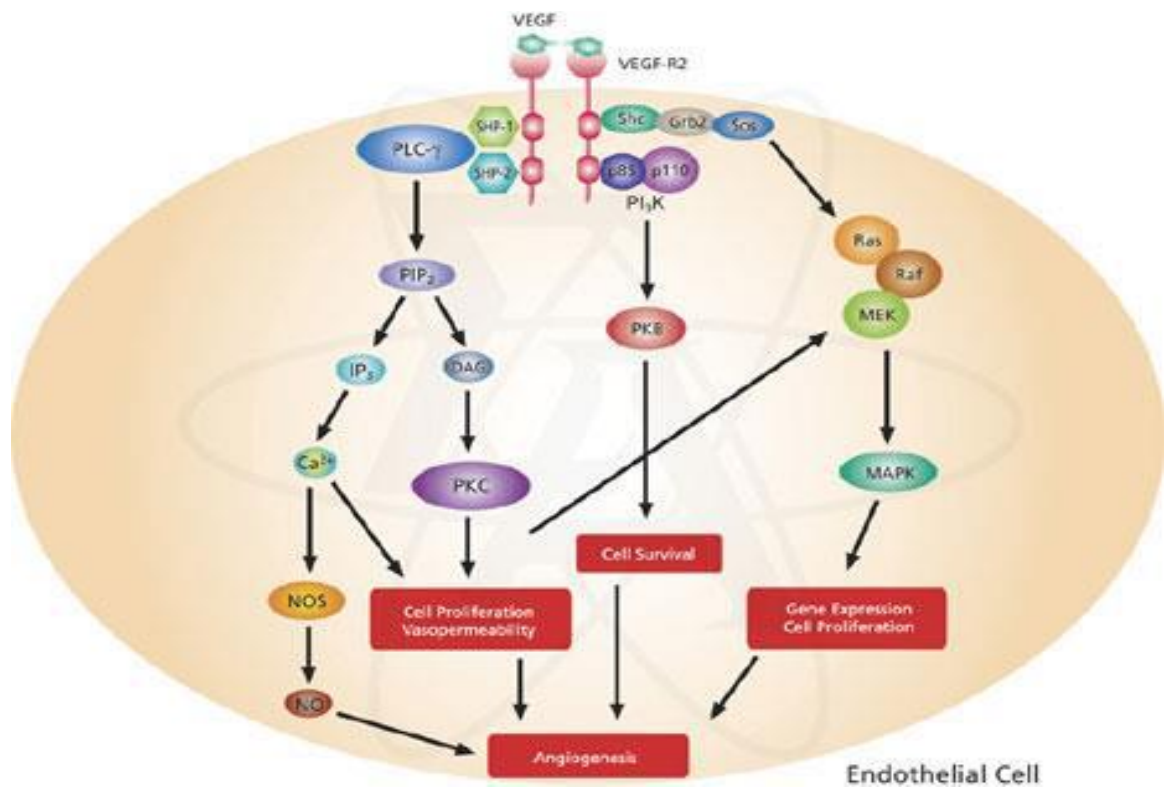
*Ligands* VEGF menghantarkan efek angiogenik melalui ikatan yang spesifik dengan VEGF reseptor (VEGFR). Ikatan tersebut mengakibatkan perubahan konformasional pada reseptor berupa dimerisasi dan berlanjut dengan sinyal transduksi melalui domain tirosin kinase. Ada 3 reseptor primer dan 2 buah

ko-reseptor yang akan mengikat VEGF dan keluarganya, yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 dan ko-reseptor Neuropilin-1 dan Neuropilin-2. Neuropilin tidak mempunyai domain/area intraseluler dan diduga meningkatkan afinitas VEGF pada reseptor primer. Beberapa variasi afinitas ligan pada reseptor dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



**Gambar 2.11.** Reseptor transmembran vascular epithelial growth factor (VEGF) dan *ligands* meliputi : VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4), neuropilin-1, dan neuropilin-2 (Ferrara *et al.*, 1997).

Ekspresi reseptor VEGF pada sel endotel berbeda diantara 3 jenis reseptor VEGFR-1, VEGFR-2 dan VEGFR-3. VEGFR-2 diekspresikan hampir pada semua sel endotel, sedangkan VEGFR-1 dan VEGFR-3 hanya diekspresikan pada pembuluh darah tertentu.

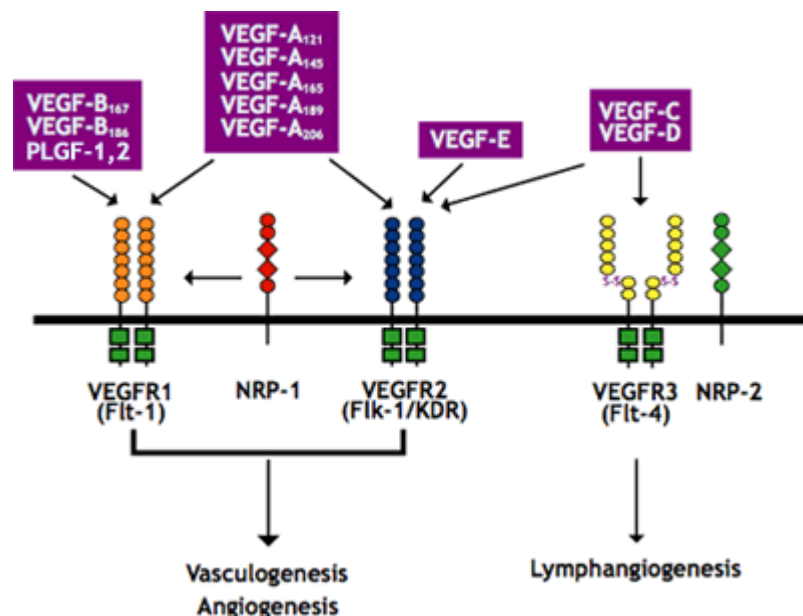


**Gambar 2.12.** Sinyal transduksi dari ikatan VEGF pada reseptor VEGFR-2 (Ferrara *et al.*, 1997).

- VEGFR-1 : adalah glikoprotein transmembran berukuran 180 kDa, dan dapat terdeteksi ekspresinya pada hampir semua sel endotel. VEGFR-1 berperan sebagai reseptor dari VEGF, PLGF dan VEGF-B. VEGFR-1 adalah sinyal kunci untuk angiogenesis, terutama pada fase embriogenesis, tapi tidak banyak berperan pada angiogenesis patologis, misalnya pada pertumbuhan tumor.
- VEGFR-2 : VEGFR-2 sebelumnya dinamakan KDR (*kinase insert-domain containing receptor*) flk-1 (*fetal liver kinase-1*), disandi oleh gen yang berlokasi pada *region 4q11-q13*, sebuah protein berukuran 230 kDa. Selama masa embrio, ekspresi mRNA VEGFR-2 terdistribusi pada kapiler, pembuluh darah dan endokardium. VEGFR-2 meningkat ekspresinya dengan rangsangan

hipoksia, dan berperan utama pada regulasi permeabilitas vaskuler. VEGFR-2 menghantarkan sinyal efek angiogenik meliputi :

1. Permeabilitas vaskuler mikro
  2. Proliferasi sel endotel
  3. Invasi
  4. Migrasi
  5. *Survival*
- VEGFR-3 : Protein VEGFR-3 (FLT4) mengikat VEGF-C dan VEGF-D. VEGFR-3 merangsang limfangiogenesis dan hanya ditemukan pada sel endotel aliran limfe dewasa. Didapatkan peran VEGFR-3 dalam menjaga integritas vaskuler dengan memodulasi aktifitas VEGFR-2.
  - Neuropilin : NRP-1 dan NP-2 adalah suatu glikoprotein transmembran, terekspresi pada sel endotel pembuluh darah ataupun pembuluh darah pada tumor. Ikatan pada VEGF akan menyebabkan peningkatan migrasi sel endotel. NRP-1 dan NRP-2 keduanya adalah suatu protein reseptor transmembran yang berhubungan dengan regulasi proses angiogenesis. Reseptor neuropilin akan mengikat beberapa isoform dari VEGF meliputi : VEGF, VEGF-E, PlGF-2 dan VEGF-B. Penelitian terakhir mendapatkan bahwa reseptor NRP-2 juga berikatan dengan VEGF-C dan diekspresikan bersamaan dengan VEGFR-3 dan berperan dalam perkembangan saluran limfe.



**Gambar 2.13.** Variasi ikatan VEGF dan reseptornya serta manifestasi klinisnya (Ferrara N *et al.*, 1997).

### 2.2.1.3 Peran VEGF dalam Angiogenesis Patologis

VEGF adalah suatu faktor pertumbuhan yang berperan dalam regulasi vaskulogenesis, angiogenesis fisiologis dan angiogenesis patologis.

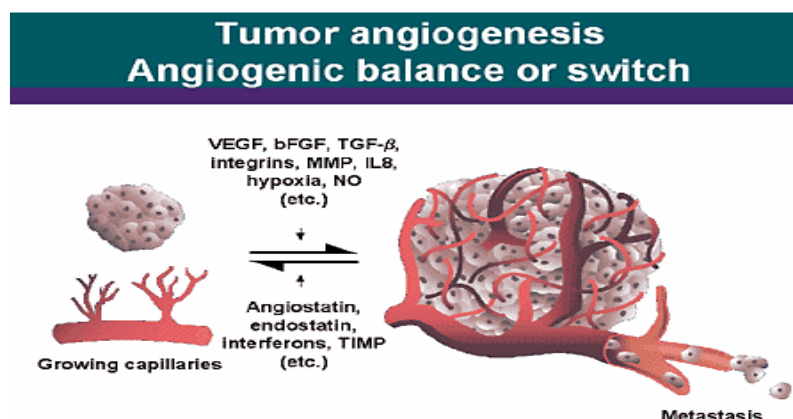
#### 2.2.1.3.1 Vaskulogenesis dan Angiogenesis

Langkah pertama dalam rangkaian proses sistem pembuluh darah masa embrio adalah rangsangan pada ventro-lateral mesoderm oleh anggota dari *fibroblast growth factor* (FGF) dan keluarga *transforming growth factor*-beta (TGF). Vaskulogenesis bermula dengan diferensiasi dari hemangioblast dari dari mesoderm dan pembentukan aglomerat sel atau pulau pulau darah yang saling berhubungan. Proses vaskulogenesis tahap kedua dimana sel endotel menginvasi, melebur, dan membentuk pleksus kapiler primitif. VEGFR-1 sejak awal berperan dalam perkembangan hemangioblas.



Vaskularisasi terjadi setelah terjadi tonjolan sel endotel, diikuti migrasi, proliferasi dan remodeling membentuk pembuluh kapiler dari pleksus kapiler primitif. Proses ini dinamakan angiogenesis yang akhirnya membentuk *pohon pembuluh darah*, arteri dan vena. Angiogenesis dibedakan dengan vaskulogenesis pada tingkat seluler. Mekanisme molekuler yang mengendalikan kedua proses tersebut bisa tumpang tindih. Tidak seperti vaskulogenesis, angiogenesis juga terjadi pada masa dewasa, misalnya pada sistem reproduksi dewasa, penyembuhan luka, reparasi jaringan dan berbagai kondisi patologis.

Pertumbuhan dari suatu pembuluh darah dibagi menjadi dua, yaitu vaskulogenesis dan angiogenesis. Vaskulogenesis adalah pertumbuhan pembuluh darah baru yang prekursornya berasal dari angioblast, sedangkan angiogenesis merupakan pertumbuhan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah sebelumnya atau dengan kata lain merupakan perluasan dari pembuluh darah sebelumnya. Proses vaskulogenesis terbatas pada saat embriogenesis sedangkan proses angiogenesis dapat terjadi pada saat perkembangan.



**Gambar 2.14.** *Angiogenic switch* keseimbangan antara pro dan antiangiogenesis (Su *et al.*, 2007)

VEGF adalah suatu *growth factor* yang penting dalam regulasi angiogenesis fisiologis dan angiogenesis patologis. VEGF juga memainkan berbagai peran, mulai dari suatu peran *pivotal* dalam vaskulogenesis embriogenik sampai kepada peran dalam delesi satu alel yang dapat mengakibatkan kematian mudugah. Sebagaimana telah diterangkan diatas, angiogenesis adalah suatu proses *multistep* dan VEGF bekerja pada beberapa tingkatan proses, yaitu:

- VEGF adalah suatu mitogen yang poten bagi sel-sel vaskular endotelial namun dengan beberapa pengecualian, VEGF tidak bersifat mitogenik bagi sel-sel tipe lain.
- VEGF bertindak sebagai mediator sekresi dan aktivasi enzim-enzim dalam proses degradasi matriks ekstra-seluler. VEGF bekerja pada sel-sel endotelial, menginduksi ekspresi aktivator dan inhibitor plasminogen, ekspresi reseptor urokinase dan ekspresi *matrix metalloproteinases* kolagenase interstisial dan gelatinase A, juga pada saat yang bersamaan menurunkan kadar inhibitor jaringan *metalloproteinases 1* dan 2.
- VEGF bertindak sebagai suatu *survival factor* bagi sel-sel endotelial melalui inhibisi proses apoptosis. Kerja ini dimediasikan melalui induksi ekspresi protein-protein anti-apoptotik Bcl-2 dan Bcl-A1, regulasi *phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*, meningkatkan *fosforilasi adhesi fokal kinase* dan stimulasi produksi sel-sel endotelial NO dan prostaglandin-12.
- VEGF adalah faktor penting dalam mobilisasi prekursor-prekursor sel-sel endotelial sumsum tulang dalam proses promosi vaskularisasi.

- VEGF juga mempunyai peran penting dalam modulasi migrasi sel-sel endotelial kepada lokasi angiogenesis.

Kerja VEGF lainnya termasuk meningkatkan permeabilitas vaskular, inhibisi diferensiasi sel-sel dendritik, regulasi transport heksosa ke dalam sel-sel endotelial, induksi faktor-faktor jaringan dan induksi migrasi monosit.

Sehubungan dengan jumlah VEGF yang diproduksi oleh tumor, terjadi suatu rangkaian umpan balik positif, yaitu promosi angiogenesis yang diinduksi oleh VEGF mempercepat pertumbuhan tumor akan menimbulkan peningkatan sekresi VEGF. Tipe amplifikasi ini dapat terus berlanjut melalui *upregulation* yang dimediasi oleh VEGF pada proses ekspresi reseptor-reseptor VEGF dalam sel-sel endotelial. Angiogenesis tumor juga mengikutsertakan sel-sel prekursor endotelial dari sumsum tulang dalam suatu proses yang tergantung pada VEGF dan dapat diabolakan sepenuhnya bila sinyal-sinyal melalui VEGFR-1 dan VEGFR-2 diinhibisi (Yakuan *et al.*, 2010).

#### 2.2.1.3.2 Limphangiogenesis

Jaringan limfatik berfungsi menjaga mikrosirkulasi jaringan, dengan mengalirkan cairan dari ruang interstisial yang kemudian disaring pada kelenjar getah bening dan dikembalikan ke sirkulasi sistemik melalui duktus torasikus dan anastomosis *limphaticovenous*. Fungsi lain yang penting adalah dalam sistem imun, proses radang dan metastase tumor.

Limphangiogenesis mempunyai beberapa kesamaan dengan proses angiogenesis. Perbedaan utama adalah bahwa saluran limfatik berkembang jauh

setelah arteri dan vena terbentuk. Sel endotel saluran limfatik kelihatannya hanya tumbuh dari lapisan endotel vena. Jalur transduksi sinyal VEGF-C / VEGFR-3 diketahui berperan utama pada limphangiogenesis. VEGF-C / VEGFR-3 meningkatkan ketahanan hidup/survival, proliferasi dan migrasi sel endotel saluran limfe serta merangsang kaskade sinyal PKC, MAP kinase, PI3K dan Akt.

Ada beberapa teori yang menjelaskan limphangiogenesis, pertama bahwa saluran limfatik tumbuh / berkembang dari vena sentral pada area tertentu dari tubuh. Teori lain disebut *centripetal theory*, saluran limfatik berkembang dari lymphangioblasts yang berada pada ruang mesenkimal tertutup. Teori ketiga adalah kombinasi dari keduanya, dan mendukung pendapat saluran limfatik berkembang dari *venousmesenchymal*, yaitu dari vena kecil dan agregat mesenkim (Yakuan *et al.*, 2010 ; Mastsumara *et al.*, 2003).

#### 2.2.1.3.3 Tumor Angiogenesis

Pertumbuhan tumor dimulai dengan fase massa kecil avaskuler, dan memerlukan asupan aliran darah yang memungkinkan pertumbuhan hingga beberapa milimeter. Tumor memerlukan oksigen dan nutrisi untuk berkembang. Rangsangan terjadinya angiogenesis terjadi melalui molekul angiogenik yang dikeluarkan oleh tumor ataupun sel semang / host. Aktivasi proliferasi sel endotel dapat dilakukan dengan :

- Meningkatkan aktifator
- Mengurangi inhibitor / penghambat

Teori tentang pertumbuhan avaskuler dan metastasis belum semuanya dipahami dari semua aspeknya. Pertumbuhan avaskuler terjadi misalnya pada tumor yang berasal dari epitel dan terpisah dari sistem pembuluh darah dibawahnya. Namun demikian tumor yang tumbuh atau metastasis pada jaringan yang ada vaskularisasinya, makavaskularisasi tumor akan bergabung dengan vaskularisasi tersebut.

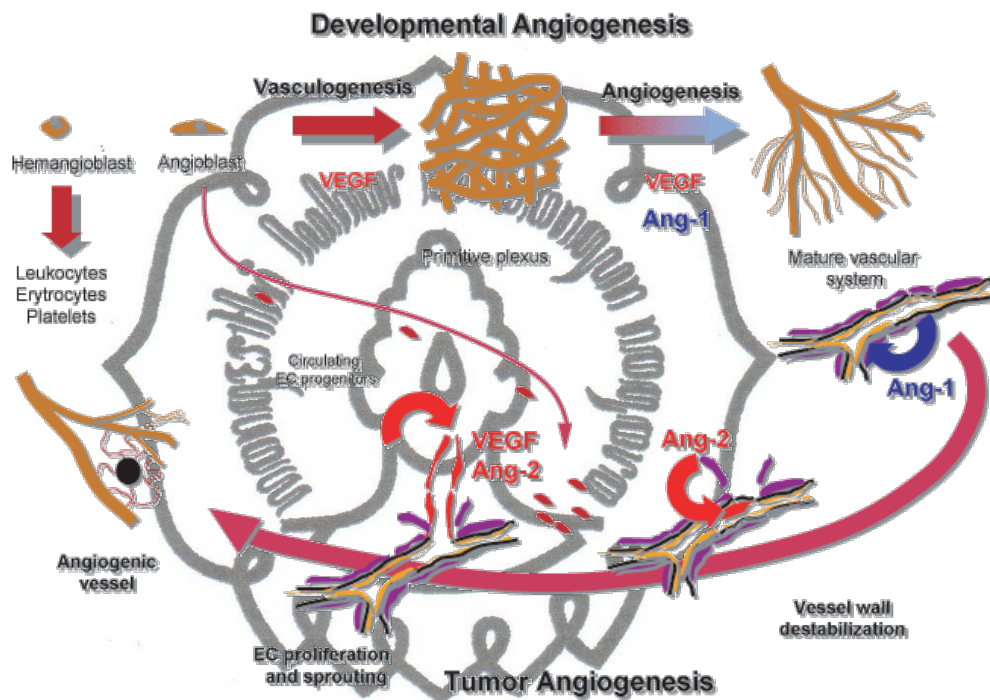
Antiangiogenesis Ang-2 dan pro angiogenesis VEGF adalah regulator utama dalam keseimbangan antara regresi dan pertumbuhan jaringan vaskuler. Tumor mempunyai morfologi yang kompleks, terdiri dari jaringan vaskuler regional, infiltrasi pada host dan komponen jaringan ikat / penunjang. Struktur pembuluh darah tumor secara anatomi bersifat heterogen, dan relatif prematur. Dilapisi sel endotel sederhana dan lebih sedikit pericytes dibanding pembuluh darah jaringan normal. Pembuluh darah tumor permeabilitasnya lebih tinggi dan lebih mudah terjadinya kebocoran makromolekul.

Tumor mengeluarkan kolagenase dan heparanase yang mendegradasi matriks ekstraseluler yang berakibat keluarnya simpanan faktor faktor angiogenesis. Sel sel tumor pada saat bersamaan juga mampu mengeluarkan faktor angiogenesis seperti VEGF.

VEGF adalah regulator utama pada angiogenesis abnormal. Dalam hal ini, ekspresi VEGF berpotensi dalam responya terhadap rangsangan akibat hipoksia ataupun oleh oknogen melalui sitokin.



Angiogenesis terus berlanjut seiring dengan perkembangan tubuh disertai tumbuhnya kapiler-kapiler baru yang muncul atau membelah dari pembuluh darah yang sudah ada, diikuti dengan *remodelling* yang sejalan dengan pertumbuhan organisme hingga sampai kepada bentuk akhirnya.



**Gambar 2.15.** Perbedaan angiogenesis normal dan angiogenesis pada perkembangan tumor (Ferrara *et al.*, 1997).

Pada manusia dewasa, angiogenesis fisiologis berlanjut pada tingkat yang sudah sangat berkurang dan secara primer diasosiasikan dengan rumatan vaskular seperti pada proses penyembuhan luka dan siklus haid.

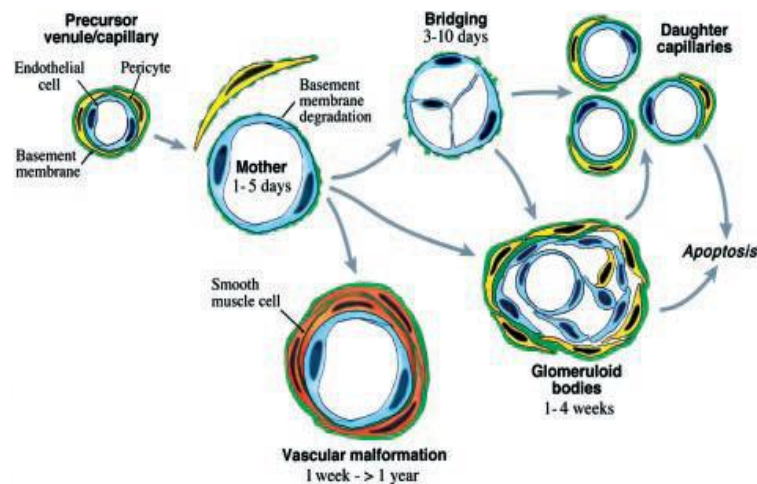
Angiogenesis sangat diperlukan untuk pertumbuhan hampir semua tumor primer dan metastasis lanjutannya. Tumor dapat mengabsorpsi nutrisi dan oksigen dengan cara difusi sederhana sampai tumor berukuran 1-2 mm, dimana pertumbuhan selanjutnya memerlukan elaborasi pasokan vaskular. Diduga proses

elaborasi ini mengikutsertakan jaringan vaskular sekitarnya untuk mulai memunculkan tunas kapiler-kapiler pembuluh darah baru yang akan tumbuh dan selanjutnya menginfiltrasi massa tumor. Sebagai tambahan, baik angiogenesis fisiologis maupun angiogenesis tumor berkaitan dengan perekrutan sel-sel prekursor endotelial dari sumsum tulang untuk menimbulkan neovaskulasisasi.

Ketika induksi pembuluh darah baru diperhitungkan sebagai pola utama dari angiogenesis tumor, data terbaru mengindikasikan bahwa beberapa jenis tumor mungkin dapat tumbuh dengan memilih pembuluh darah-pembuluh darah yang sudah ada. Vaskulatur 'terpilih' tersebut lalu beregresi, sehingga tumor juga ikut beregresi namun proses regresi ini akhirnya berbalik karena adanya angiogenesis yang terinduksi oleh hipoksia pada tepi tumor

Angiogenesis fisiologis dan angiogenesis tumor diregulasi oleh *a host of growth factor* pada *microenvironment*, salah satunya adalah VEGF yang sangat spesifik bagi sel-sel endotelial, lalu *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) dan *Matrix Metalloproteinases* (MMPs).

Faktor-faktor pengaktivasi dapat diproduksi baik oleh tumor-tumor itu sendiri, oleh jaringan sekitarnya dan dengan menginfiltrasikan makrofag-makrofag dan fibroblas-fibroblas. Mayoritas komponen-komponen pengaktivasi bekerja melalui reseptor-reseptor permukaan sel endotelial sebagai *ligand*, yang pada akhirnya mensekresikan faktor-faktor angiogenik tambahan.



**Gambar 2.16.** Proses neovaskularisasi pada sel endotel pada pertumbuhan tumor. (Mastsumara *et al.*, 2003)

Sebagai tambahan, hipoksia, hipoglikemia dan stress mekanik dapat menjadi stimuli. Pada kasus *matrix metalloproteinases*, stimulasi diduga merefleksikan proteolisis konstituen-konstituen membrana basalis seperti *heparan-sulfate proteoglycans* yang mengakibatkan terjadinya pelepasan *sequestered growth factor*

Tumor dapat tidak aktif selama bertahun-tahun sebelum berubah menjadi fenotip angiogenik. Perubahan yang dikenal sebagai *angiogenic swicth* ini, dipercaya terjadi akibat suatu alterasi keseimbangan antara faktor inhibitor dan pemicu.

Banyak tipe yang sama dari perubahan genetik yang mendasari transformasi ke status maligna, seperti aktivasi onkogen dan hilangnya gen-gen supressor tumor, juga mampu menginduksi *angiogenic swicth*. Segera setelah diinisiasi, angiogenesis tumor tidak hanya menumbuhkan tumor primer, namun

pembuluh darah sekitarnya juga membentuk jalur penyebaran metastatik sel-sel kanker individual. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa ketika suatu sel telah bertransformasi, angiogenesis dapat dinisiasi pada suatu massa tumor yang hanya berisi 100-300 sel. Serupa dengan tumor metastatik yang berasal dari sel-sel yang bertransformasi telah mengalami banyak perubahan genetik yang mendasari *angiogenic switch*, berpotensi tumbuh dengan cepat sejak dari stadium paling awal.

#### 2.2.1.3.4 Tumor Limphangiogenesis

Peran saluran limfatik pada tumorigenesis relatif kurang mendapat perhatian, kecuali relevansi klinisnya yang berkaitan dengan limphangiogenesis. Pembuluh darah mikro dalam tumor menyerupai saluran limfatik, diduga karena gabungan tidak memnetu dari saluran embrionik pada tumor yang sedang tumbuh.

VEGF-C dapat bekerja baik pada pembuluh darah ataupun saluran limfe, bekerja dengan meningkatkan permeabilitas pembuluh, migrasi dan proliferasi sel endotel lewat aktivasi VEGFR-2. Jalur transduksi sinyal VEGF-C / VEGFR-3 diketahui berperan utama pada limphangiogenesis. VEGF-C / VEGFR-3 meningkatkan ketahanan hidup/survival, proliferasi dan migrasi sel endotel saluran limfe serta merangsang kaskade sinyal PKC, MAP kinase, PI3K dan Akt. Peningkatan kadar VEGF-C telah dibuktikan berkaitan dengan beberapa kanker pada manusia dan ekspresinya dapat digunakan sebagai prediktor metastase pada KGB.

### 2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C)

VEGF-C disekresi dalam bentuk *disulphide bonded homodimer*, 31 and 21 kDa polypeptides. VEGF-C mempunyai 2 bentuk yaitu dengan berat molekul 31 kDa, merupakan bentuk terbanyak, yang mengaktivasi VEGFR3 dan dengan berat molekul 21 kDa yang berafinitas kepada VEGFR2 dan 3.

VEGF-C diekspresikan secara kuat pada jaringan yang kaya saluran limfatik, misalnya di mesenterium, ginjal, ovarium dan plasenta. VEGF-C sedikit diekspresikan pada otak, liver dan thymus. Hipoksia, onkoprotein Ras, dan p53 mutant merupakan perangsang kuat terhadap ekspresi mRNA VEGF, namun diketahui tidak meningkatkan ekspresi mRNA VEGF-C.

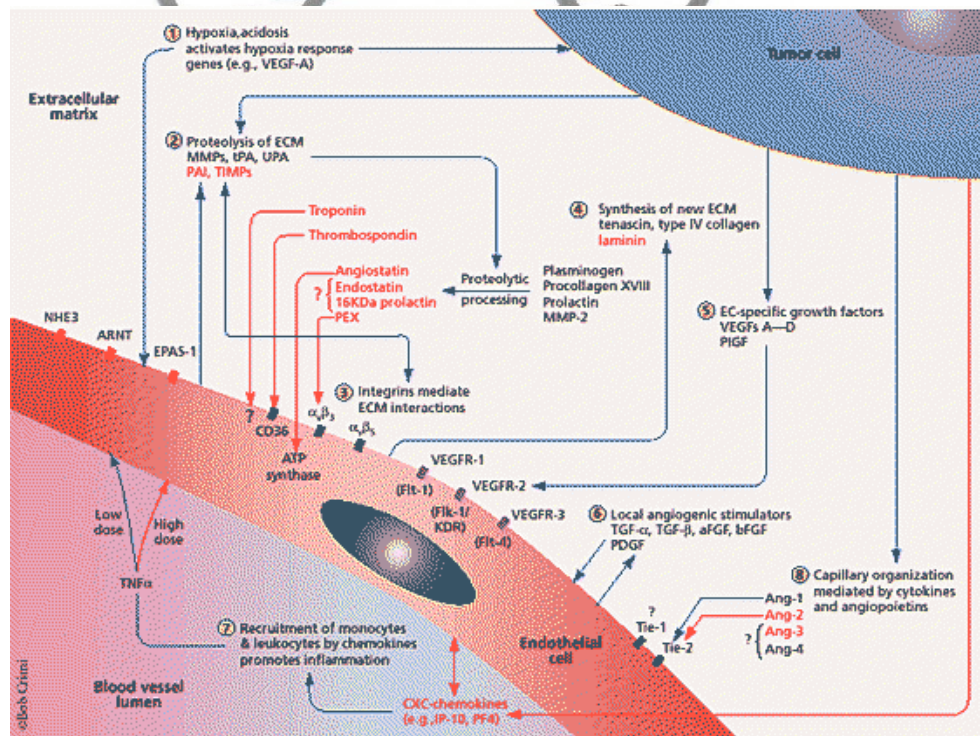
VEGF-C meningkatkan permeabilitas vaskuler, demikian juga migrasi dan proliferasi sel endotel. Penelitian terbaru mendapatkan bahwa VEGF-C mempunyai efek mitogenik dan kemotatik berdasar kadarnya, terhadap sel endotel. VEGF-C juga merangsang pengeluaran *nitric oxide* dari sel endotel yang mengakibatkan permeabilitas kapiler dan angiogenesis. VEGF-C mempunyai kemampuan merangsang pemanjangan dan perubahan bentuk *spindle-like cell shape* pada sel endotel.

Mitsuhashi *et al.*, (2005), melaporkan hubungan kadar serum VEGF-C penderita kanker serviks uteri, dimana kadar serum VEGF-C berkaitan secara signifikan dengan stadium berdasar FIGO, terutama pada jenis sel skuamosa, serta tidak berhubungan dengan adanya metastase KGB. Tidak dilakukan evaluasi kaitan antara kadar VEGF-C dengan invasi limfo-vaskuler. Mitsuhashi



menyimpulkan kadar VEGF-C serum merupakan *biomolecular marker* potensial untuk untuk kanker serviks uteri jenis sel skuamosa.

Hashimoto *et al.*(2003), dalam penelitiannya menyimpulkan adanya keterlibatan VEGF-C mRNA yang diperiksa dengan *reverse transcription-polymerase chain reaction* dalam metastasis pada pasien dengan kanker serviks uteri. Ekspresi VEGF-C mRNA secara signifikan lebih tinggi pada pasien kanker serviks stadium IB-IIB yang dilakukan radikal histerektomi dan limphadenektomi : metastasis kelenjar getah bening pelvik, *deep stromal invasion* dan invasi limfo-vaskuler ( $p=0,006$ ,  $p=0,016$  dan  $p=0,036$ ). Analisis multivariat menyimpulkan bahwa ekspresi VEGF-C mRNA dapat berperan sebagai faktor prognostik independen pada pasien kanker serviks uteri.



**Gambar 2.17.** Interaksi sel tumor dan sel endotel ( Mastsumara *et al.*, 2003).

### 2.3 Metastasis dan Invasi Limfo-vaskuler

Pertumbuhan tumor, invasi limfo-vaskuler dan metastasis adalah hal yang tidak terpisahkan dalam pembahasan faktor faktor yang berperan dalam perkembangan kanker, serta prognosinya pada pasien. Penelaahan ketiga masalah tersebut difokuskan kaitanya dengan angiogenesis, liphangogenesis serta fator-faktor yang mempengaruhinya.

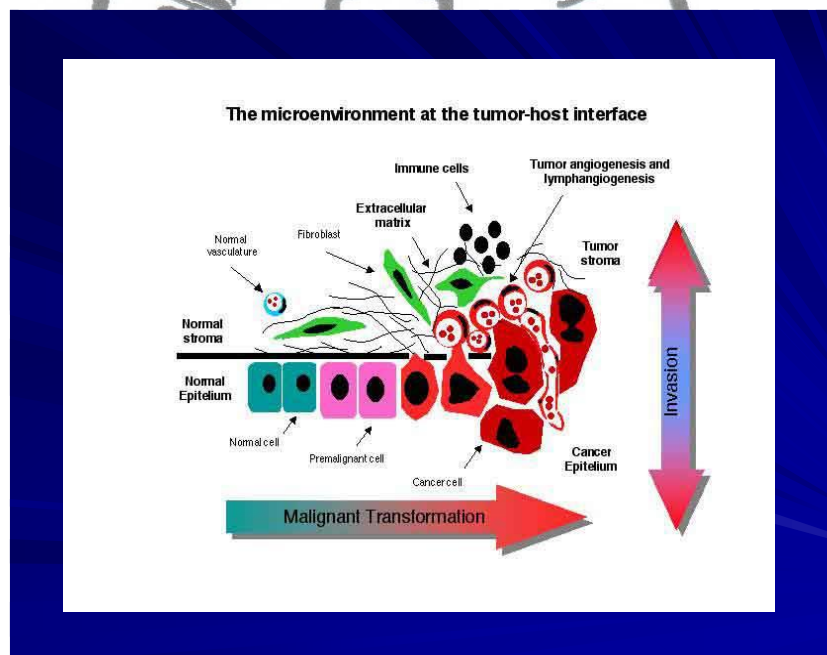
Tumorigenesis adalah proses bertahap, dimana setiap tahapnya mencerminkan perubahan genetik yang mendorong terjadinya transformasi. Sel sel tumor, yang tentunya telah mengalami mutasi , mempunyai kemampuan untuk merangsang keluaranya faktor pro-angiogenik VEGF dalam jumlah berlebih atau menghambat aksi dari antiangiogenesis. Dengan adanya supali oksigen dan nutrisi, tumor mempunyai kemampuan untuk tumbuh membesar, demikian juga kemampuan untuk metastasis.

Angiogenesis adalah faktor penting dalam pertumbuhan dan penyebaran metastatik tumor ganas. Dari berbagai *growth factors* yang meregulasi angiogenesis fisiologis dan patologis, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dipercaya sebagai growth faktor yang terpenting. Terdapat bukti bahwa over-ekspresi VEGF berkorelasi dengan prognosis buruk pada beberapa jenis tumor.

Tumor yang mengekspresikan VEGF secara khusus menarik sebagai target terapi antikanker karena aktivitas angiogenesis terjadi pada endotel dibandingkan dengan zat-zat yang secara langsung menuju sel-sel tumor. Angiogenesis sangat diperlukan untuk pertumbuhan tumor dan hal ini disebabkan oleh ikatan *Vascular*

*Endothelial Growth Factor (VEGF)* pada satu dari dua reseptor VEGF yaitu *F1t-1* dan *KDR*.

Neovaskularisasi diperlukan untuk kecepatan pertumbuhan tumor. Tumor dapat mengaktifkan *angiogenicswitch* dengan merubah keseimbangan antara perangsang dan penghambat angiogenesis. Fungsi lain adalah dengan pengendalian enzim protease, yang akan mempengaruhi kemampuan sel untuk merusak matriks ekstraseluler. Hipoksia jaringan tetap menjadi rangsangan angiogenesis yang fundamental, termasuk pada sel tumor (Brem, 1999 ; Satoshi *et al.*, 2010).



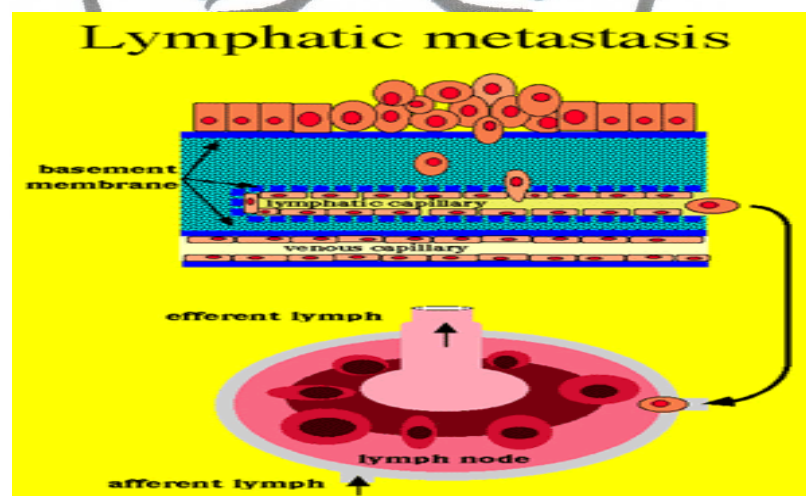
**Gambar 2.18.** Interaksi sel tumor dan host dalam transformasi sel dan proses invasi (Marchiole, 2005).

### 2.3.1 Peran angiogenesis dan limphangiogenesis pada perkembangan kanker

Kanker adalah penyakit yang melibatkan perubahan dimanis tingkat gen. Mutasi menghasilkan onkogen yang memberikan kemampuan dominan, dilain pihak gen supresor tumor diinaktifasi dan kehilangan fungsi.

Kemampuan menyebar sel kanker memungkinkan sel kanker tersebut lepas dari tumor primer dan membentuk koloni baru dimana nutrisi dan ruang tidak memberikan hambatan. Penyebaran sel kanker meliputi mekanisme invasi jaringan, penyebaran limfatik, penyebaran hematogen atau perlekatan / penyebaran langsung melalui lumen tubuh ataupun permukaan organ/tubuh.

Pola umum metastase tumor adalah bahwa KGB regional sebagai tempat yang pertama, namun adanya sel kanker di KGB tidak dapat selalu diartikan bahwa sel kanker tersebut metastase melalui saluran limfatik. Sel kanker intra-limfatik dapat secara langsung berada di sistem vaskuler melalui komunikasi veno-limfatik. Peningkatan jumlah sel di sistem vaskuler akan meningkatkan peluang terjadinya metastase KGB.



**Gambar 2.19.** Gambaran skematik proses metastase limfogen (Marchiole *et al*, 2005)

Angiogenesis dan metastase merupakan bagian penting dari perkembangan kanker karena sangat berperan dalam diseminasi sel sel ganas. Perbedaan cara metastase menentukan prognosa dan hasil akhir dari suatu kanker. Tiga komponen invasi adalah Adhesi, Proteolisis dan Migrasi. Salah satu



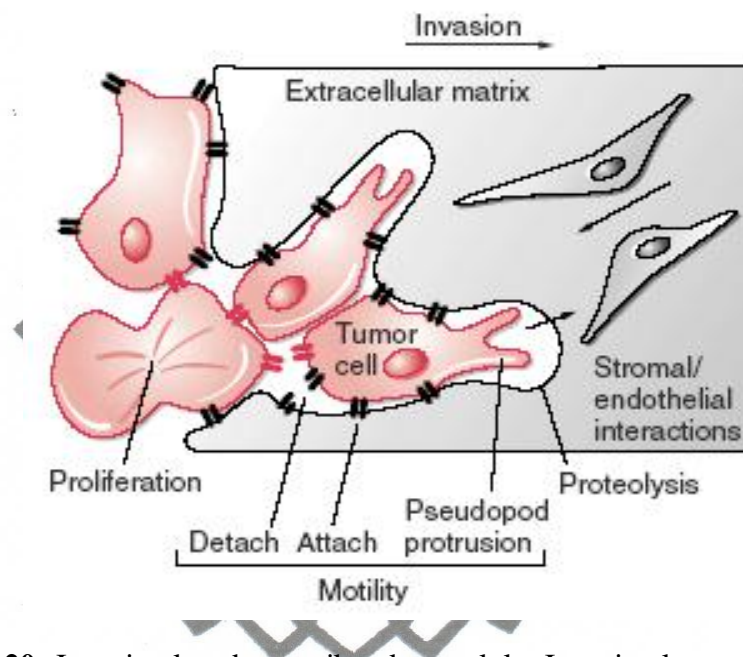
faktor penting selama proses invasi adalah adhesi. Adhesi memerlukan peran integrin dan cadherin yang merupakan suatu “*cell adhesion molecule*”. Sedangkan integrin merupakan suatu heterodimer yang terdiri dari ikatan kovalen alfa dan beta. Walau dikenal sebagai molekul adhesi antar sel, integrin saat ini dikenal berperan dalam proses regulasi apoptosis, ekspresi gen, proliferasi sel, invasi metastasis dan angiogenesis. Jadi integrin adalah suatu molekul yang berperan dalam degradasi membran basal yang merupakan tahap awal angiogenesis, dengan adanya degradasi membran basal, sel endotel dapat bermigrasi yang selanjutnya membentuk tunas pembuluh darah baru

**Tabel 2.4.** Kaskade Metastasis

Peristiwa Kaskade Metastasis	Mekanisme
1. Tahap inisiasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efek karsinogenik</li> <li>• Aktivasi onkogen</li> </ul>
2. Promosi dan progresi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kariotipik</li> <li>• Genetik</li> <li>• Gen amplifikasi</li> </ul>
3. Proliferasi tidak terkontrol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autocrine growth factor</li> </ul>
4. Angiogenesis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multipel growth factor</li> </ul>
5. Invasi lokal, pembuluh darah atau getah bening	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum chemoattractant</li> <li>• Enzim yang bersifat degradasi</li> </ul>
6. Peredaran sel kanker, penyumbatan dan ekstrasvasi :	
a) Adesi pada endotelium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interaksi dengan trombosit, fibrin dan faktor pertumbuhan</li> </ul>
b) Retraksi endotelium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trombosit, tumor cell factor</li> </ul>
c) Adesi pada membran basalis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor lancini</li> <li>• Receptor trombospondin</li> </ul>
d) Pelebaran membrana basalis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensim protease</li> <li>• Kemotaksis</li> </ul>
e) Locomotion	
7. Pembentukan koloni baru di tempat lain	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reseptor untuk lokal faktor pertumbuhan</li> <li>• Angiogenesis</li> </ul>
8. Menghindari daya tahan tubuh dan pengobatan resistensi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resisten terhadap makrofag, natural killer cell dan amplifikasi gen</li> </ul>



Urokinase plasminogen aktivator adalah enzim protease yang mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin yang terbentuk ini akan mendegradasi beberapa komponen extracellular matrix (ECM) seperti fibrin, fibronectin, laminin. Plasmin juga mengaktivasi beberapa MMP ( *matrix metallo proteinase* ) seperti MMP-1, MMP-2, dan MMP-9.

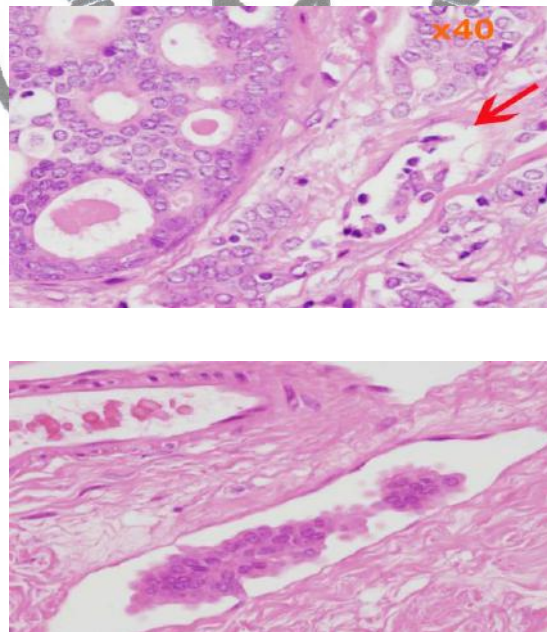


**Gambar 2.20.** Invasi sel pada matriks ekstraseluler. Invasi sel ganas terdiri dari motilitas sel, adhesi dan proteolisis. Pada proses invasi, sel berbentuk pseudopodia yang memanjang karena polimerisasi dari aktin (sitoskeleton) dengan bantuan kalsium. Degradasi matriks ekstraseluler dilakukan dengan cara proteolisis (Brem, 1999 ).

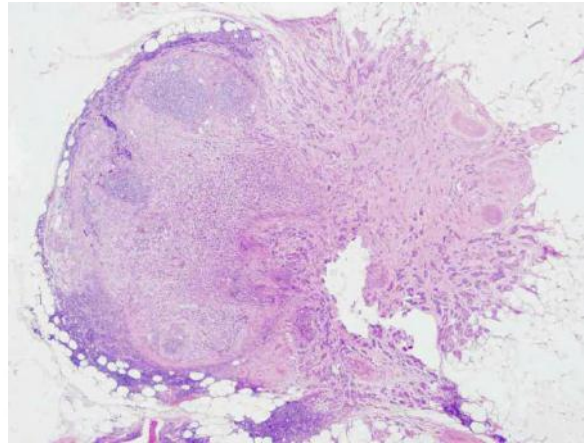
### 2.3.2 Invasi Limfovaskuler

Invasi limfo-vaskuler diketahui sebagai salah satu faktor prognosis buruk untuk berbagai jenis tumor. Pada penelitian yang dilakukan pada pasien kanker serviks uteri, invasi-limfovaskuler merupakan faktor prognosis independen terhadap faktor prognosis lainnya. Invasi limfo-vaskuler atau *lymphatic vascular space invasion* (LVSI) adalah adanya emboli sel kanker pada lumen pembuluh darah ataupun saluran limfatik, berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi.

Beberapa penelitian mengelompokkan invasi limfo-vaskuler secara bertingkat, seperti misalnya negatif, ringan, sedang dan tinggi. Angka risiko kekambuhan meningkat sesuai dengan tingkat limfo-vaskuler. Sebuah penelitian mendapatkan angka rekurensi pada 2 tahun pertama pada invasi-limfovaskuler yang tinggi (45%), sedang (33%), ringan (15%) dan negatif (7%). Densitas invasi limfo-vaskuler dinilai dari jumlah adanya sel kanker pada ruang kapiler / saluran limfe, pada slide yang terjelek / tertinggi invasi limfo-vaskulernya. Namun penelitian lain menyimpulkan bahwa evaluasi densitas atau tingkat invasi limfo-vaskuler tidak mempunyai nilai secara klinis, melainkan hanya nilai positif ada invasi limfo-vaskuler atau tidak.



**Gambar 2.21.** Invasi Limfo-vaskuler. Lihat gambaran sel sel kanker dalam ruang yang dilapisi selapis sel endotel (Hirakawa *et al.*, 2010).



**Gambar 2.22.** Metastase kelenjar getah bening (Hirakawa *et al.*, 2010)

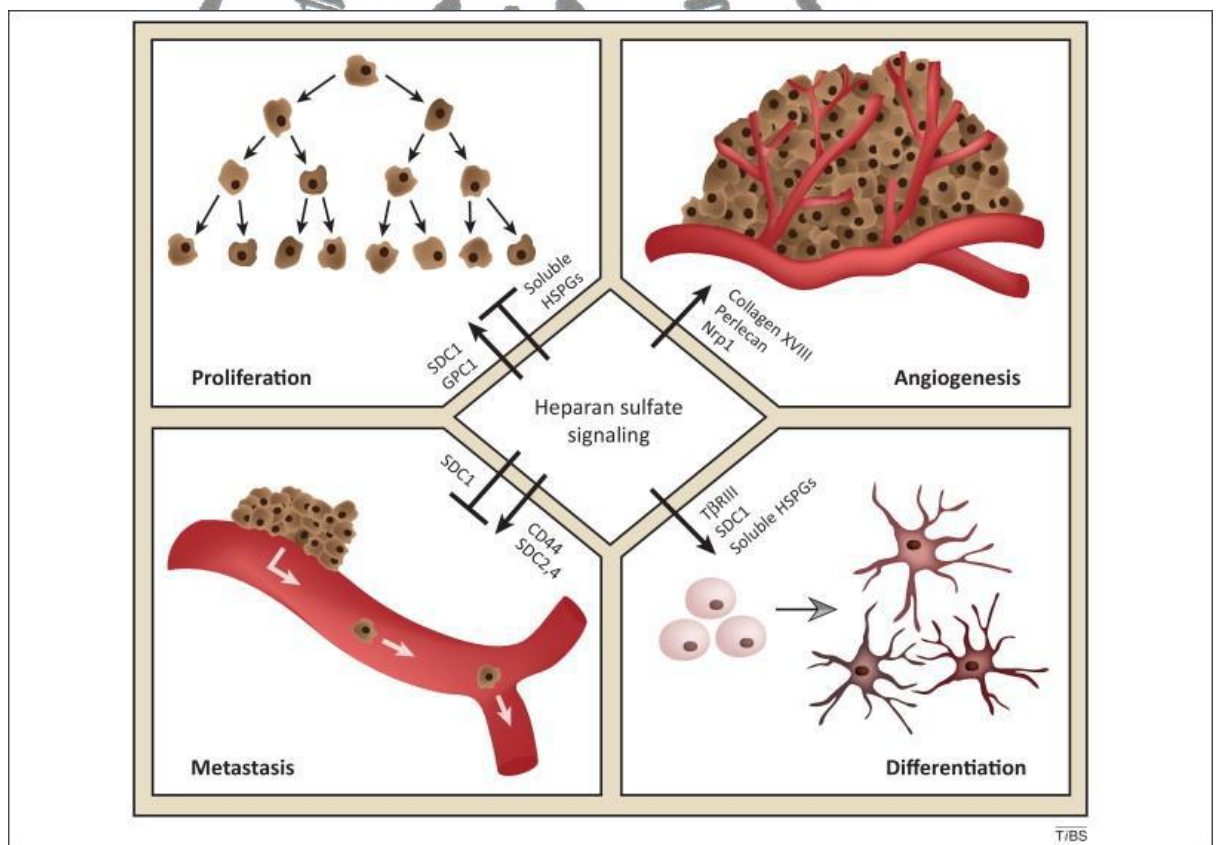
Metastase kanker pada organ organ dalam tubuh ditentukan oleh banyak hal. Hipotesis *seed and soil* mengatakan sel tumor akan tumbuh bila mendapatkan keadaan *fertile environment compatible*. Sebuah organ mungkin saja gagal mengembangkan metastase, hal ini bukan karena kegagalan diseminasi sel kedaerah tersebut, namun karena ketidakmampuan organ tersebut menyediakan lingkungan yang favourable untuk pertumbuhan.

Hirakawa S *et al.*, (2007), melakukan penelitian pada 71 pasien stadium IB-IIA yang dilakukan histerektomi radikal dan limphadenektomi, melaporkan bahwa adanya invasi limfo-vaskuler meningkatkan risiko rekurensi, namun derajat densitas dari invasi limfo-vaskuler tidak berpengaruh terhadap rekurensi. Perkembangan jaringan limfatik pada sentinel lymphnodes, yang berakibat terjadinya metastasis jauh juga dirangsang oleh VEGF-C.

## 2.4 Heparanase

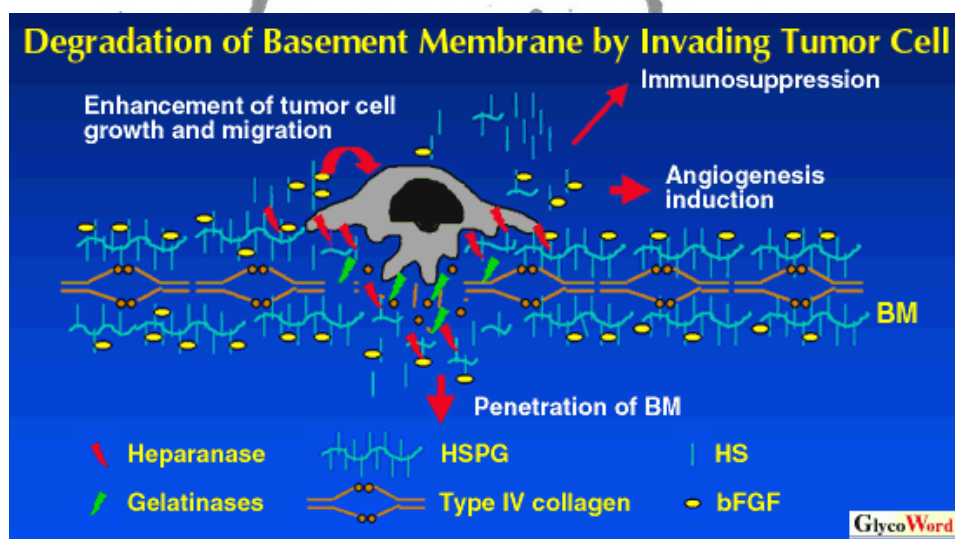
Heparanase adalah endo- $\beta$ -D-glucuronidase yang mengkatalisa proses hidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glycosidic antara D-glucuronate dan D-glucosamine dalam heparan sulfat.

Heparan sulfat dan heparan sulfat proteoglycans (HSPGs) didapatkan pada matriks ekstraseluler dan membran basal dan permukaan sel. Ekspresi dan sekresi heparanase berkaitan dengan degradasi matriks ekstraseluler dan metastasis serta meningkatkan angiogenesis.



**Gambar 2.23.** Peranan Heparanase dalam perkembangan kanker (Davidsson *et al.*, 2007)

Ekspresi heparanase dilaporkan sebagai faktor prognosis dan rendahnya survival pada kanker lambung, pancreas, colon, tropoblas, endometrium, ovarium dan kanker serviks. Heparanase dapat dievaluasi dengan imunohistokimia dan RT-PCR untuk menilai ekspresi *m-RNA Heparanase*. Ekspresi heparanase diharapkan dapat menjadi faktor prognosis baru, termasuk peluang penggunaan penghambat heparanase sebagai terapi sehingga dapat meningkatkan pelayanan pada penderita.



**Gambar 2.24.** Degradasi basal membran oleh sel kanker (Davidsson *et al.*, 2007)

Perkembangan tumor, neovaskularisasi dan metastasis tergantung pada kemampuan sel kanker untuk menginvasi jaringan yang meliputi degradasi matriks ekstraseluler dan struktur membran basal. Heparanase adalah endo- $\beta$ -D-glucuronidase yang mengkatalisa proses hidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glycosidic antara D-glucuronate dan D-glucosamine dalam heparan sulfat. Heparan sulfat dan *heparan sulfat proteoglycans* (HSPGs) didapatkan pada matriks ekstraseluler dan membran basal dan permukaan sel. Ekspresi dan sekresi heparanase berkaitan dengan degradasi matriks ekstraseluler dan metastasis serta meningkatkan angiogenesis (Davidsson *et al.*, 2007; Murdoch *et al.*, 1992).



Ekspresi heparanase dilaporkan sebagai faktor prognosis dan rendahnya survival pada kanker lambung, pancreas, colon, tropoblas, endometrium, ovarium, kandung kemih dan kanker serviks. Heparanase dapat dievaluasi dengan imunohistokimia dan RT-PCR untuk menilai ekspresi *m-RNA Heparanase*. Ekspresi heparanase diharapkan dapat menjadi faktor prognosis baru, termasuk peluang penggunaan penghambat heparanase sebagai terapi sehingga dapat meningkatkan pelayanan pada penderita (Sinyho *et al.*, 2003 ; De Zong W *et al.*, 2010).

Heparanase merupakan endo- $\beta$ -D-glukuronidase yang mampu membelah rantai samping heparan sulfat yang berkontribusi terhadap pemecahan matriks ekstraselular. Sel mamalia mengekspresikan enzim heparanase fungsional tunggal yaitu heparanase-1. Heparanase-2 merupakan homolog heparanase, namun tidak mampu melakukan aktivitas pemecahan heparin sulfat.

Gen heparanase terletak pada kromosom 4q21.3. Heparanase pertama kali diekspresikan sebagai pra-proheparanase, dengan sinyal terminal-n dihapus pada translokasi ke endoplasmaretikulum, menghasilkan proheparanase 65-kDa; kemudian berpindah ke apparatus Golgi untuk di enkapsulasi dan di sekresikan. Pro heparanase berinteraksi dengan komponen ekstraselular sebelum diinternalisasi dan dimobilisasi sampai lisosom. Disini pro hepaaranase mengalamiproteolitik posttranslasi dan pembelahan untuk menjadi heparanase aktif. Bentuk aktif heparanase terdiri dari heterodimer yang terdiri dari Subunit 8- dan 50-kDa yang nonkovalen (Rivara *et al.*, 2016).

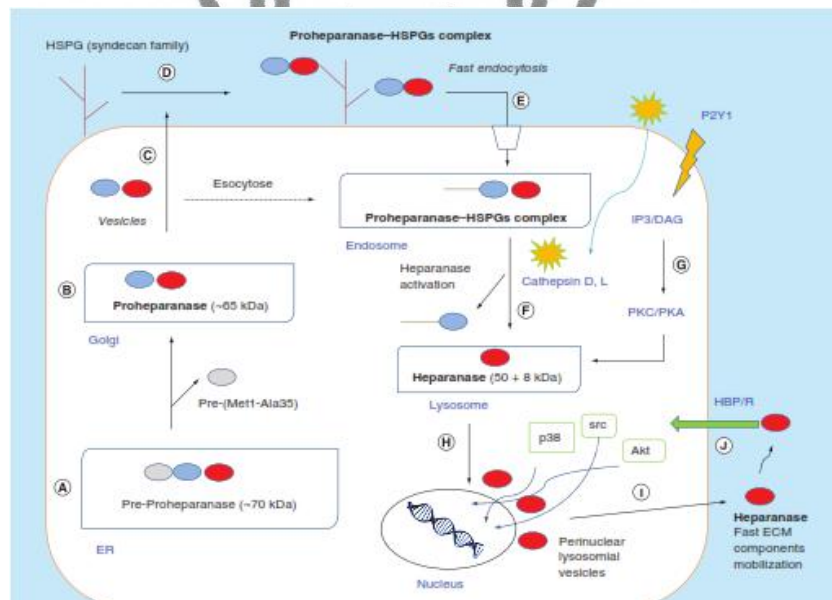
Pada keadaan normal, ekspresi heparanase terbatas terutama untuk trombosit, leukosit yang aktif, dan plasenta, dengan sedikit atau tanpa ekspresi dalam jaringan ikat atau epitel normal. Heparanase paling aktif dalam kondisi asam (pH 5-6), selama peradangan atau dalam lingkungan mikro tumor (Heyman dan Yang, 2016).

Peran langsung Heparanase dikeganasan di konfirmasikan saat penghambatan heparanase di sel kanker menghasilkan penurunan yang signifikan dalam fenotipe invasif sel. Aktivitas enzimatis utama dari Heparanase adalah pembelahan Heparan sulfat dari *Heparan Sulfat Proteoglycans*, melepaskan *growth factor* dan sitokin yang kemudian dapat menyebarkan jalur sinyal seluler yang memfasilitasi remodelling matriks ekstraselular, terutama membran basal kapiler subendotel. Langkah ini penting pada migrasi endotel selama angiogenesis. Heparanase diinduksi fragmen Heparin sulfat mempertahankan aktivitas biologis dan bisa meningkatkan aktivitas *growth factor*. Tumor dengan kadar heparanase tinggi memiliki *microvesel density* yang jauh lebih tinggi daripada tumor dengan ekspresi heparanase rendah dan penghambatan heparanase mengakibatkan penurunan *microvesel density* (Heyman dan Yang, 2016).

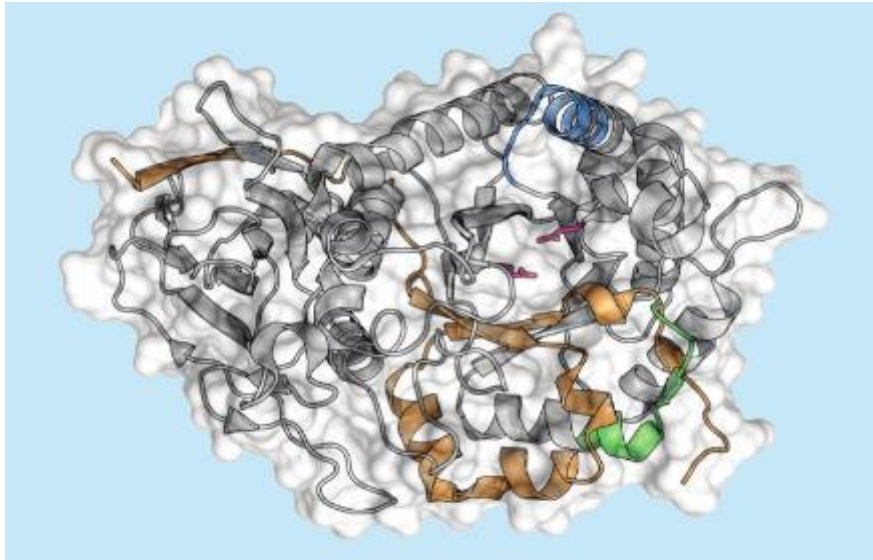
Baru-baru ini, heparanase ditemukan memiliki peran penting dalam memodulasi *autophagy* pada sel tumor. Heparanase lisosomal bersatu dengan *autophagosom*, berkontribusi pada kontrol seluler *autophagy*. Sel tumor dengan ekspresi heparanase tinggi ditemukan memiliki peningkatan kadar *autophagy*, yang mendorong pertumbuhan tumor dan resistensi terhadap kemoterapi. Secara mekanis, induksi *autophagy* oleh heparanase terjadi melalui target dari rapamycin

jalur 1 kompleks (MTORC1). Pewarnaan dengan jelas menunjukkan bahwa heparanase *co-localizes* dengan LC3II. LC3-II adalah penanda *autophagy* yang mudah digunakan dan banyak digunakan karena terbentuk dan tetap berhubungan dengan *autophagosome* bahkan setelah fusi dengan lisosom. Bahkan, LC3-II adalah satu-satunya protein yang dikenal yang secara khusus berhubungan dengan *autophagosome* (Shteingauz *et al.*, 2015).

Karena heparanase berimplikasi pada banyak tahap perkembangan tumor, ini adalah target terapeutik yang ideal. Selain itu, karena hanya ada satu heparanase yang fungsional, tidak ada enzim lain yang bisa bertindak menggantikannya. Terakhir, karena heparanase biasanya tidak diekspresikan pada sebagian besar jaringan normal, efek samping sekunder akibat penghambatan dapat minimal (Heyman dan Yang, 2016).



**Gambar 2.25.** Biosintesis Heparanase (Rivara *et al.*, 2016).



**Gambar 2.26.** Struktur Heparanase (Rivara *et al.*, 2016).

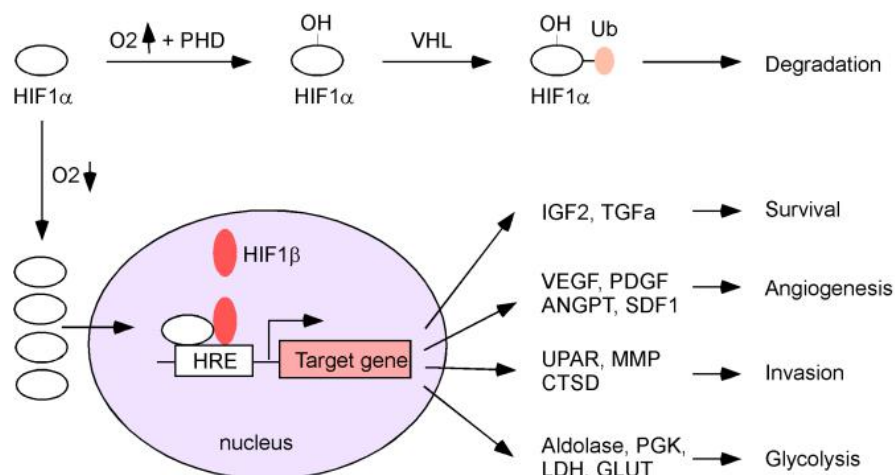
Penelitian oleh Zeng *et al.*, 2013 menyebutkan tingkat positif heparanase adalah 63,3% (38/60) pada pasien kanker serviks dengan imunohistokimia, dan secara signifikan berkorelasi dengan ukuran tumor dan stadium klinis ( $P < 0,05$ ) (Zeng *et al.*, 2013).

Ekspresi gen heparanase dinilai dengan q RT-PCR dalam 28 serviks normal, 26 intraepitelial neoplastik, dan 48 sampel jaringan kanker serviks. Ekspresi m-RNA Heparanase berbeda diantara 3 kelompok dan lebih rendah pada serviks normal dibandingkan dengan serviks intraepitel neoplastik dan kanker serviks invasif ( $p = 0,048$ ). Pada kasus kanker serviks invasif, ada korelasi langsung antara ekspresi heparanase dan ukuran tumor ( $p = 0,002$ ). Dalam kasus kanker serviks yang di terapi dengan histerektomi radikal dan limfadenektomi pelvis, ekspresi mRNA heparanase secara signifikan lebih tinggi pada tumor dengan metastasis limfe ( $p = 0,044$ ) dan pada kasus dengan ukuran tumor besar ( $p = 0,005$ ) (Varchalama *et al.*, 2008).

Penelitian oleh Hu *et al.*, 2016 menyebutkan tingkat ekspresi Heparanase pada limfonodi pasien kanker serviks stadium IIA jelas lebih tinggi daripada stadium IA-IB. Selain itu, tingkat ekspresi heparanase lebih tinggi pada tumor yang berdiferensiasi sedang dan rendah dibandingkan dengan tumor yang berdiferensiasi baik. Pasien dengan metastasis limfe positif kadar heparanase lebih tinggi daripada kasus yang tidak terdapat metastasis. Semua perbedaan ini signifikan secara statistik ( $P < 0,05$ ) (Hu *et al.*, 2017).

## 2.5 Hypoxia Inducible Factor -1alpha ( HIF-1 $\alpha$ )

*Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$*  adalah sebuah faktor transkripsi yang mempunyai peran kunci dalam perkembangan kanker melalui regulasi angiogenesis, *cell survival* dan resistensi obat. HIF - 1 $\alpha$  juga terlibat dalam fungsi biologis dalam kondisi normal dan berperan dalam limfangiogenesis tumor dengan meregulasi rangsangan terbentuknya VEGF - C .

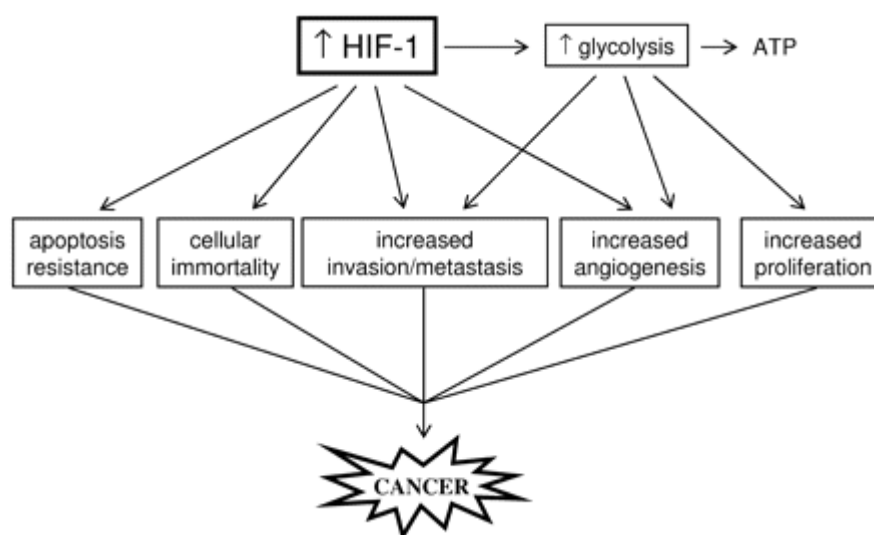


**Gambar 2.27.** Sinyal transduksi HIF-1 alpha dalam perkembangan kanker (Schoppmann, 2006).



Sebastian F *et al.*, melaporkan, pada kanker payudara *Lymphatic microvessel density* ( LMVD ) , LVI , ekspresi HIF - 1 $\alpha$  dan VEGF - C dievaluasi dengan imunohistokimia di 119 kasus kanker payudara invasif dan didapatkan positif kelenjar getah bening.

Ada hubungan yang signifikan antara HIF - 1 $\alpha$  dan VEGF - C (  $p = 0,026$  ,  $r = 0,204$  , koefisien Spearman korelasi ) . Selanjutnya hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF - 1 $\alpha$  dan jumlah peritumoral lymphangiogenesis LMVD (  $p = 0,014$  , *Mann - Whitney test* ) . LMVD berkorelasi secara signifikan dengan LVI (  $p < 0,001$  , uji *Mann - Whitney* ) . HIF - 1 $\alpha$  merupakan faktor prognostik independen untuk kelangsungan hidup pada analisa uni dan multivariat (  $p = 0,027$  ,  $0,029$  ,  $0,025$  , masing-masing, Cox regresi ). Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa HIF - 1 $\alpha$  dapat menjadi biomarker yang menjanjikan dan sebagai target terapi terhadap perkembangan tumor dan metastasis .



**Gambar 2.28.** Skema peran kunci HIF-1 pada karsinogenesis (Lopez-Lazaro, 2006).

Pada kanker payudara, didapatkan ekspresi yang berkorelasi bermakna antara HIF1-  $\alpha$  dan VEGF-C. ( $p = 0,026$ ,  $r 0,204$ , *Spearman's coefficient of correlation*). HIF1-  $\alpha$  merupakan *independent prognostic factor* untuk angka ketahanan hidup pada analisa uni dan multivariate ( $p = 0.027$ ,  $0.029$ ,  $0.025$ , respectively, Cox regression). Dari analisa data menunjukkan bahwa HIF1-  $\alpha$  punya peran penting pada regulasi kemampuan tumor untuk membentuk saluran limfatik baru, sehingga bisa dijadikan target terapi untuk melawan progresi tumor dan metastasis ( Schoppmann *et al.*, 2006 ; Debbi *et al.*, 2007 ).

Sel yang hipoksia, merangsang sekresi HIF1-  $\alpha$ , selanjutnya HIF1-  $\alpha$  merangsang ekspresi berbagai gen yang penting dalam perkembangan kanker meliputi : vascular endothelial cell growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2, *glucose transporters* and *glycolytic enzymes*, proteases (MMP2 and urokinase plasminogen activator) and growth factors (endothelin-1).

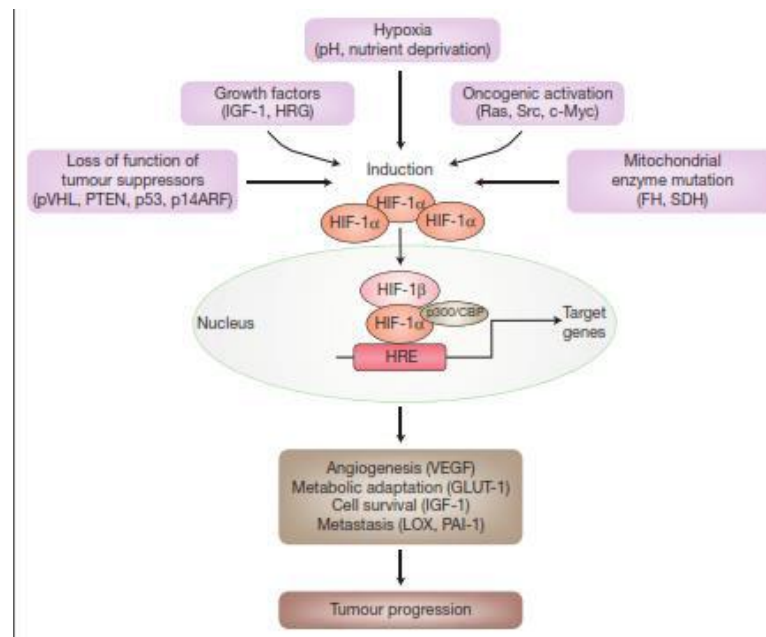
Prognosis pasien kanker payudara dengan ekspresi tinggi HIF1-  $\alpha$  adalah rendah, dengan angka *survival* 73%, sementara dengan ekspresi rendah punya angka *survival* 93%. Data tersebut menunjukkan bahwa HIF1-  $\alpha$  diperlukan pada fase inisiasi perkembangan kanker serta berperan penting pada perkembangan serta kemampuan metastasis. HIF1-  $\alpha$  mempunyai peran kunci pada perkembangan kanker serta target utama untuk kemoprevensi (Giovanni, 2006).

HIF adalah kompleks transkripsi yang aktif terhadap perubahan kadar oksigen seluler dan menengahi ekspresi banyak gen. Target gen HIF adalah mengkode protein yang terlibat dalam regulasi berbagai aspek biologi tumor, termasuk transport oksigen, metabolisme besi, glikolisis, transport glukosa,

kelangsungan hidup sel dan proliferasi, angiogenesis, invasi dan metastasis. HIF termasuk dalam famili protein *basic helix-helix-loop-helix* (bHLH). Prototipe famili tersebut adalah HIF-1. HIF-1 terdiri dari dua subunit: subunit HIF-1 $\alpha$  dan subunit HIF-1 $\beta$ .

Sintesis Protein HIF-1 $\alpha$  diatur oleh mekanisme oksigen-independen yang melibatkan faktor pertumbuhan dan dimediasi aktivasi phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Dalam kondisi hipoksia, hidroksilasi *prolyl* dalam domain ODD dihambat dan interaksi HIF-1 $\alpha$  dengan pVHL dicegah. Akibatnya, degradasi HIF-1 $\alpha$  diblokir dan akibatnya kadar protein HIF-1 $\alpha$  meningkat. HIF-1 merekrut koaktivator transkripsi seperti p300 / CBP (p300 / CREB binding protein) dan mengikat *hypoxia-response element* (HRE) dalam daerah promotor gen target HIF-1 $\alpha$ , yang kemudian memediasi aktivitas transkripsi. Sel yang hipoksia, merangsang sekresi HIF1 $\alpha$ , selanjutnya HIF1- $\alpha$  merangsang ekspresi berbagai gen yang penting dalam perkembangan kanker meliputi : *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF), *cyclooxygenase-2*, *glucose transporters and glycolytic enzymes*, *proteases* (MMP2 and *urokinase plasminogen activator*) and *growth factors* (endothelin-1).

Selain hipoksia, mutasi di beberapa gen yang terlibat dalam mekanisme penginderaan oksigen juga telah terbukti berkontribusi dalam peningkatan ekspresi HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  dan HIF-2 $\alpha$ ) dan aktivasi jalur HIF di sel tumor. Sel tumor dengan aktivasi konstitutif dari Jalur Ras-MAPK, Src atau PI3K-AKT (PKB) - mTOR meningkatkan Ekspresi protein HIF-1 $\alpha$ . Hilangnya fungsi protein penekan tumor seperti PTEN (yang menyebabkan aktivasi konstitutif AKT) dan p53 juga dapat mengakibatkan meningkatkan aktivitas HIF-1.



**Gambar 2.29.** Overekspresi berlebihan HIF-1 $\alpha$  dan aktivasi jalur HIF pada kanker disebabkan kombinasi perubahan lingkungan mikro (Poon *et al.*, 2009).

HIF-1 $\alpha$  memiliki peran ganda dalam karsinogenesis awal. Di satu sisi, HIF-1 $\alpha$  mendukung angiogenesis tumor dan kelangsungan hidup sel saat menengahi sebuah respon adaptif, sementara di sisi lain, sebagai tanggapan terhadap stres sel, HIF-1 $\alpha$  bekerja sama dengan proses apoptosis (melalui induksi gen apoptosis atau *crosstalk* ke p53) untuk menengahi kematian sel tumor. Fungsi HIF dalam perkembangan tumor juga tergantung pada tipe sel dan konteks seluler serta tahap karsinogenesis (Poon *et al.*, 2009).

Pada kanker serviks, beberapa penelitian menyimpulkan tidak ada hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  dengan stadium FIGO, tingkat histologis, ukuran tumor dan keterlibatan limfatik. Sementara beberapa penelitian menunjukkan bahwa pasien dengan ekspresi HIF-1 $\alpha$  yang kuat memiliki waktu ketahanan hidup yang secara signifikan lebih pendek, interval bebas penyakit dan

hanya respon parsial untuk radioterapi (Dellas *et al.*, 2008). Prognosis 30 pasien dengan HIF-1 $\alpha$  tinggi pada kanker serviks kurang baik (73% kelangsungan hidup), sedangkan tingkat kelangsungan hidup 24 bulan dari 30 pasien lainnya dengan HIF-1 $\alpha$  rendah adalah 93% (Fujimoto *et al.*, 2006).

Kondisi hipoksia meningkatkan resistansi radiasi dan bergantung pada HIF-1 $\alpha$  dengan menaikkan ekspresi VEGF dan menghambat ekspresi p53. Peningkatan tumor hipoksia melindungi sel dari proses apoptosis yang disebabkan oleh radiasi di mana HIF-1 $\alpha$  mungkin memainkan peran penting (Birner *et al.*, 2000).

Prognosis pasien kanker payudara dengan ekspresi tinggi HIF1-  $\alpha$  adalah rendah, dengan angka survival 73%, sementara dengan ekspresi rendah punya angka survival 93%. Data tersebut menunjukkan bahwa HIF1- $\alpha$  diperlukan pada fase inisiasi perkembangan kanker serta berperan penting pada perkembangan serta kemampuan metastasis. HIF1-  $\alpha$  mempunyai peran kunci pada perkembangan kanker serta target utama untuk kemoprevensi (Melillo, 2006).

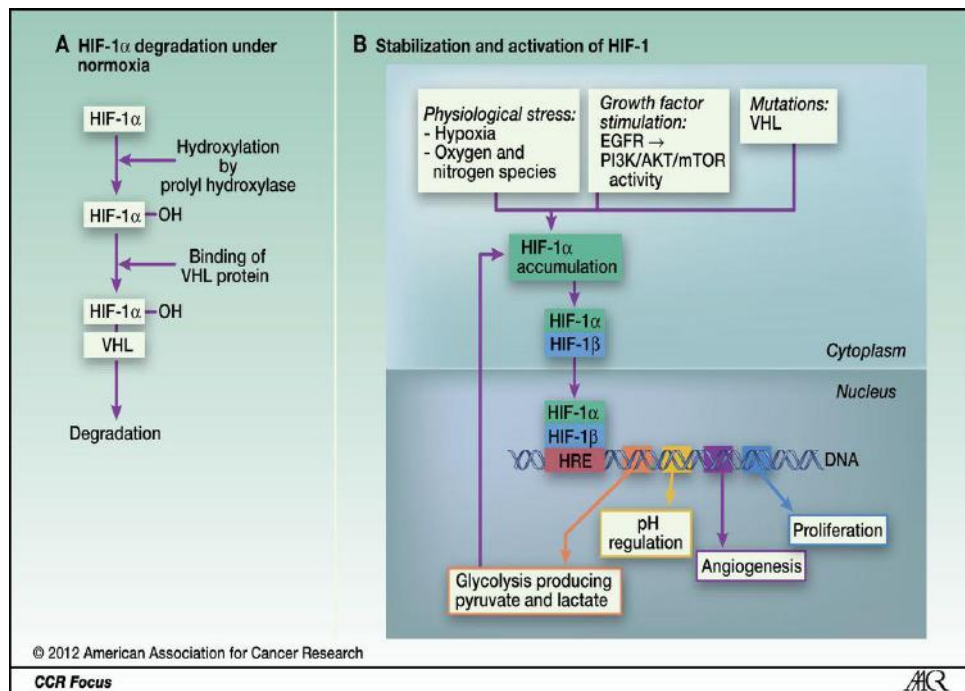
*Microenvironment* dari sel kanker merupakan pengatur utama dalam membentuk progresi dari keganasan, dan pada beberapa kasus faktor genetik dan epigenetik penting dalam mempengaruhi perkembangan kanker. *Microenvironment* kanker ditandai dengan pH yang rendah, penurunan nutrisi, dan hipoksia. Sel kanker mampu survive pada kondisi *microenvironment* yang buruk. Hipoksia adalah penyebab tumor memperoleh karakteristik menjadi agresif dan berpotensi meningkatkan metastasis, penurunan sensitivitas obat, penurunan apoptosis terkait p53 dan peningkatan instabilitas genetik dan laju mutasi (Babar



*et al.*, 2011). Hipoksia menyebabkan karakteristik yang secara independent dan secara signifikan berkorelasi dengan penurunan survival pada pasien kanker. Salah satu efektor utama dari hipoksia adalah faktor transkripsi HIF-1 $\alpha$  yang bertanggung jawab untuk meregulasi *survival* dan angiogenesis dari jalur selular.

Regulasi HIF-1 $\alpha$  dalam mengendalikan hipoksia ternyata dapat diinduksi oleh mikro-RNA (Babar *et al.*, 2011). Mikro-RNA adalah molekul RNA kecil dengan panjang 19-24 nukleotida dan tidak berfungsi mengkode protein. Mikro-RNA mengatur ekspresi gen pada tingkat posttranskripsi, dengan cara menyebabkan degradasi mRNA target atau dengan menekan translasi target gen, dapat pula menurunkan regulasi mRNA target. Semakin banyak bukti bahwa satu mikro-RNA tertentu sering mengatur beberapa gen target dan satu gen dapat dipengaruhi oleh berbagai mikroRNA. Mikro-RNA sekarang dianggap sebagai salah satu regulator gen penting untuk perkembangan dan proses karsinogenesis. Hasil penelitian terakhir menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara hipoksia, kanker, dan mikro-RNA. Sejumlah mikro-RNA pada kondisi hipoksia membuat sel kanker mengalami peningkatan kemampuan adaptasi dan bertahan (Ioannou *et al.*, 2015).

Prognosis pasien kanker payudara dengan ekspresi tinggi HIF-1 $\alpha$  adalah rendah, dengan angka survival 73%, sementara dengan ekspresi rendah punya angka survival 93%. Data tersebut menunjukkan bahwa HIF-1 $\alpha$  diperlukan pada fase inisiasi perkembangan kanker serta berperan penting pada perkembangan serta kemampuan metastasis. HIF-1 $\alpha$  mempunyai peran kunci pada perkembangan kanker serta target utama untuk kemoprevensi.



**Gambar 2.30.** Skema representasi dari jalur HIF-1 alpha (Poon *et al.*, 2009).

Di bawah kondisi *normoxic*, HIF-1 $\alpha$  cepat terdegradasi karena hidroksilasi HIF-1 $\alpha$  oleh *prolyl hidroksilase* dan selanjutnya mengikat protein von Hippel-Lindau. Stres fisiologis (hipoksia dan spesies oksigen dan nitrogen reaktif), mutasi pada protein von Hippel-Lindau dan PI3K / AKT / kegiatan mTOR berkontribusi pada stabilisasi dan akumulasi HIF-1 $\alpha$ . Setelah stabilisasi HIF-1 $\alpha$ , ia mengikat HIF-1 $\beta$ . Kompleks HIF-1 $\alpha$  ini mengikat ke elemen responif hipoksia (HRE) dari DNA, sehingga memulai transkripsi gen target. Hal ini menyebabkan metabolisme tumor glikolitik di antara sesamanya. produk akhir glikolitik piruvat dan laktat menginduksi akumulasi HIF-1 $\alpha$ , yang pada gilirannya meningkatkan aktivitas HIF-1 (Maeda *et al.*, 2012).

Sel tumor tidak hanya menghasilkan faktor angiogenik, tetapi juga menginduksi molekul antiangiogenesis. Hipoksia sel tumor akan membebaskan *Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) yang akan mengendalikan transkripsi VEGF. HIF-1 $\alpha$  telah dianggap sebagai penanda endogen hipoksia. Tingginya nilai HIF- 1 $\alpha$  memiliki arti yang sangat penting terhadap prognosis kanker serviks. Selain itu HIF- 1 $\alpha$  juga terlihat pada lesi prakanker serviks, endometrium, payudara, dan prostat.

Pada keadaan normal pergantian dan pembaruan sel terjadi sesuai dengan kebutuhan melalui proliferasi sel dan apoptosis di bawah pengaruh proto-onkogen dan gen supresor tumor. Bila terjadi gangguan oleh bahan karsinogen yang menyebabkan proto-onkogen berubah menjadi onkogen, maka akan terjadi proliferasi sel abnormal yang tidak diimbangi dengan terjadinya apoptosis sel. Proliferasi yang tidak terkendali menyebabkan ukuran suatu neoplasma atau tumor mencapai ukuran yang lebih besar, sehingga diperlukan pembentukan neovaskularisasi guna mendukung nutrisi jaringan tumor baru, yaitu dengan menstimulasi sekresi polipeptida seperti IGF (*Insulin like Growth Factor*), PDGF, *Granulosit Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) dan IL-1.

## 2.6. Pencitraan dan penilaian respon terapi

### 2.6.1. Pencitraan

Penilaian terhadap perubahan tumor merupakan hal penting dari evaluasi klinis terapi kanker baik penyusutan tumor maupun progresivitas. *Radiographic Imaging* dengan *Helical Computer Tomography* (CT) atau MRI adalah teknik

yang dipakai untuk memonitoring respon tumor. Metode pemeriksaan lain yang dapat digunakan adalah ultrasonografi (USG), bisa dengan diameter lesi atau dengan USG 3 dimesi dengan mengukur volume lesi di serviks. Teknik yang dipakai untuk mengukur respon yang pertama kali harus dipakai untuk pengukuran selanjutnya. Tabel dibawah ini menunjukkan hasil pemeriksaan pelvis bimanual yang dapat dipakai untuk memonitor penyakit regional pada pasien tumor ginekologi (Yang *et al*, 2006).

Perubahan jumlah sel tumor dalam hal ini untuk evaluasi respon kemoterapi lebih baik dinilai dengan perubahan volume tumor daripada perubahan pengukuran linier. Volumetri memungkinkan deteksi perubahan kecil dalam ukuran tumor sebagai respon terhadap terapidan dapat memprediksi hasil tanggapan lebih baik dan lebih awal daripada pengukuran linear (Yaghmai *et al.*, 2011).

Angiogenesis sangat penting untuk pertumbuhan tumor dan berkorelasi dengan proses metastasis tumor. Vaskularisasi tumor pada kanker servik dapat dinilai dengan USG doppler transvaginal. Alcazar *et al.*, (1999) menilai vaskularitas tumor dengan USG doppler transvaginal, dan menemukan bahwa vaskularisasi yang lebih rendah memiliki respon yang lebih besar terhadap kemoterapi (Mangla dan Singla, 2015).

Vaskularisasi tumor dapat dinilai dengan mengukur *Resistency Index (RI)* dan *Pulsality Index (PI)* arteri uterina atau percabangannya yang memvaskularisasi servik. Nilai RI dan PI yang lebih tinggi menunjukkan vaskularisasi yang lebih rendah dan ditemukan pada kasus kanker servik yang

*complete response* terhadap kemoterapi. *Complete response* diartikan sebagai tidak ditemukan sisa tumor setelah pemberian kemoterapi.

Vaskularisasi dapat juga dinilai menggunakan USG tiga dimensi doppler, yaitu dengan mengukur indeks vaskular, termasuk *vascularization index* (VI), *Flow Index* (FI) dan *Vascularization Flow Index* (VFI). Regresi logistik univariat menunjukkan FI sebagai prediktor respon klinis yang paling signifikan terhadap kemoterapi neoadjuvan. Nilai FI menunjukkan densitas eritrosit dalam jaringan, sedangkan eritrosit merupakan sel darah merah yang berperan penting dalam transport oksigen. Sel kanker merupakan sel-sel yang hipoksia dimana FI akan menunjukkan nilai yang rendah. Nilai FI yang lebih rendah mewakili densitas eritrosit yang lebih rendah dan mungkin merupakan konsentrasi oksigen yang lebih rendah, merupakan prediktor penting yang berkaitan dengan non respon terhadap kemoterapi pada pasien dengan kanker serviks stadium lanjut. Nilai cut-off FI terbaik adalah 37,3, dengan sensitivitas 73,2% dan spesifisitas 64,7% (Qin *et al.*, 2012).

Beberapa penelitian menemukan bahwa vaskularisasi tumor jauh lebih signifikan dibandingkan status kelenjar getah bening dalam menentukan kelangsungan hidup pasien kanker serviks 18. Pasien dengan kelenjar getah bening positif dan vaskularitas tumor yang rendah memiliki prognosis yang lebih baik daripada mereka yang memiliki kelenjar getah bening negatif dan vaskularitas tumor yang tinggi. Oleh karena itu, vaskularisasi tumor memiliki peran penting dalam menentukan prognosis pasien (Mangla dan Singla, 2015).



Evaluasi respon kemoterapi dapat juga dilakukan dengan menggunakan USG transabdominal, yaitu dengan mengukur diameter tumor (panjang kraniocaudal, diameter melintang dan antero-posterior), ekogenisitas, dan perluasan tumor (Testa *et al*, 2009).

CT scan dapat juga digunakan untuk mengevaluasi respon kemoterapi selain ultrasonografi pada pasien kanker servik. Tumor primer bersifat heterogen dan *hypoattenuating* relatif terhadap stroma normal pada pencitraan dengan bahan kontras. Tidak tampak nya bidang lemak periureteral dan massa jaringan lunak adalah tanda ekstensi parametrium. Batas antara tumor dengan otot panggul yang kurang dari 3 mm dan adanya pembekuan pembuluh darah adalah tanda invasi dinding sisi panggul. Penyebaran limfatik dapat terlihat sebagai rantai nodus iliaka eksternal dan internal serta rute *presacral* ke nodus paraaortik. Metastasis jauh terlihat dengan penyakit primer atau rekuren dan dapat melibatkan hati, paru-paru, dan tulang. CT memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi tumor berulang dan dapat digunakan untuk memonitor pasien. Keakuratan CT adalah antara 65% dan 80% untuk mendeteksi keterlibatan metastasis (Pannu *et al.*, 2001).

Penggunaan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) telah disarankan untuk mengevaluasi klinis pasca kemoterapi, dengan menilai keterlibatan parametrium, kandung kemih, serta rektum. Ketepatan MRI dalam menilai keterlibatan parametrium, kandung kemih dan rektum adalah sebanyak 75% kasus. Sonografi B-mode transvaginal tidak digunakan dalam stadium klinis karena ketepatannya yang rendah dalam menentukan invasi parametrium, kandung kemih dan rectum (Ghi *et al.*, 2007). Perkembangan terbaru kombinasi CT scan dan MRI dan

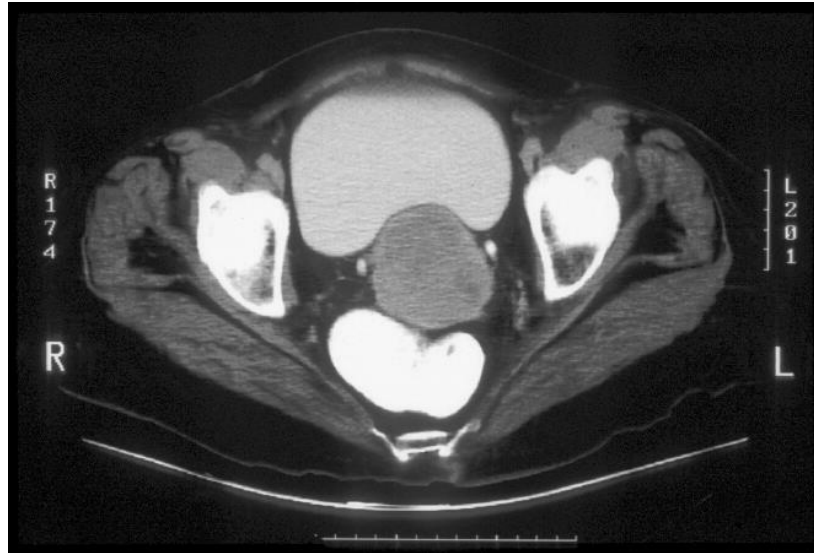
analisis *software* telah dilakukan untuk mengukur volume tumor (Yaghmai *et al.*, 2011).

Sensitivitas MRI adalah 90% dalam mendeteksi rekurensi penyakit ginekologis, telah terbukti sebanding dengan tomografi emisi positron fluorodeoxyglucose (FDG-PET). MRI juga terbukti memiliki nilai dalam pemantauan respon radioterapi, terutama pada deteksi dini penyakit rekuren. Peran MRI semakin dikembangkan dalam perencanaan radioterapi. Keakuratan MRI dalam pengukuran volume tumor sangat baik sehingga ideal untuk mengarahkan radioterapi ke organ yang terkena dampak dan mengurangi cedera radiasi pada usus kecil dan besar serta kandung kemih. Deteksi nodus yang lebih besar dari 1 cm pada sumbu pendek penting untuk prognosis dan juga untuk merencanakan bidang perawatan radioterapi (Reznek dan Sahdev, 2005).

Pencitraan MR telah terbukti lebih unggul dari CT scan dalam mengidentifikasi stroma dan parametrium. Sedangkan keuntungan CT scan adalah waktu akuisisi yang cepat, pencitraan selama peningkatan puncak vaskular (arterial atau vena), kurangnya artefak gerakan usus, dan kontraindikasi yang lebih sedikit daripada pencitraan MR (Pannu *et al.*, 2001).

Selama beberapa tahun terakhir, banyak bukti telah terakumulasi untuk mengembangkan peran MRI dalam pengelolaan pasien kanker serviks. Akibatnya, saat ini MRI memiliki peran yang baik dalam menentukan stadium tumor primer, mengevaluasi respon terhadap pengobatan, mendeteksi komplikasi dan kekambuhan, serta dalam merencanakan radioterapi. Dengan demikian, hal ini

telah memainkan peran penting MRI dalam pengembangan operasi *fertility-sparing* pada wanita muda dengan kanker serviks (Reznek dan Sahdev, 2005).



**Gambar 2.31.** CT Scan pada kanker serviks stadium IB. Batas lesi rata dan intak. (Yang *et al.*, 2006)

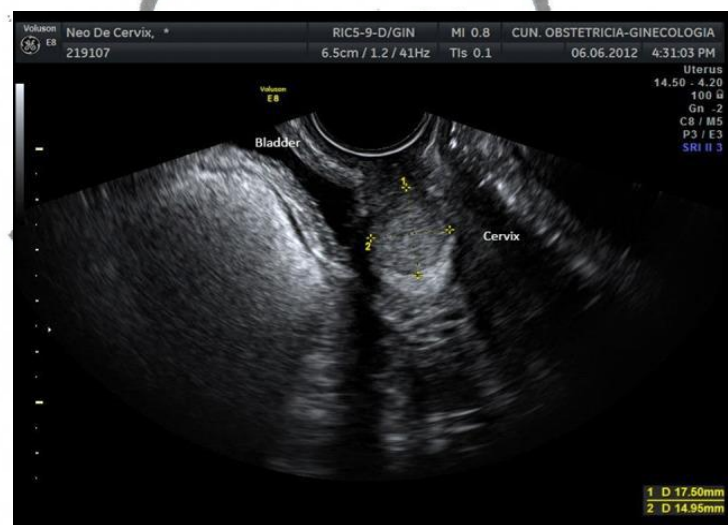
Akurasi MRI untuk evaluasi respon pengobatan kanker serviks adalah 75%, dengan keterbatasan terutama dalam menilai respon pada invasi parametrium (Ghi *et al.*, 2007). Ultrasonografi transvaginal B-Mode tidak digunakan untuk penentuan stadium pada kanker serviks stadium lanjut, karena kesulitan pada invasi parametrium, kandung kencing dan rektum. Ultrasonografi dapat digunakan menilai besar atau diameter lesi apada stadium awal, dimana belum ada invasi parametrium (Ghi *et al.*, 2007). Pemeriksaan USG tidak digunakan untuk lesi yang lebih dalam dikarenakan *operator dependent* serta tidak dapat dilakukan penilaian ulang, serta diperlukan keahlian dan tahapan belajar/ *learning curve* yang cukup. Cara ukur untuk lesi serviks dengan Ultrasonografi, meliputi :

Diameter anteroposterior : potongan coronal

Diameter latero-lateral : potongan transversal

Diameter Proksimal-distal : potongan sagital

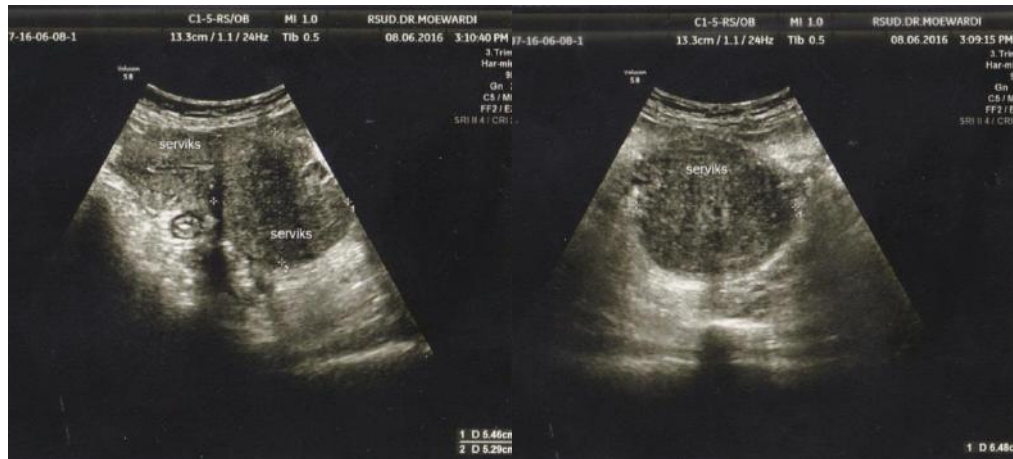
Dengan pengukuran lesi secara 3 dimensi, maka akan didapatkan nilai volume. Volume merupakan nilai penting dalam menilai perkembangan kanker, karena volume tumor, mencerminkan jumlah sel.



**Gambar 2.32.** Potongan longitudinal Ultrasonografi Transvaginal (Alcazar *et al.*, 2014)



**Gambar 2.33.** Ultrasonografi transvaginal menunjukkan lesi serviks yang besar/*bulky lesion* (Alcazar *et al.*, 2014).



**Gambar 2.34.** Ultrasonografi Transabdominal menunjukkan posisi uterus dalam potongan sagital dan transversal. Tampak pengukuran diameter lesi serviks pada dimensi antero-posterior, cranial-kaudal dan latero-lateral/coronal

Kriteria evaluasi respon tumor penting untuk menentukan terapi dan memilih regimen. Standar yang dipakai adalah yang dikembangkan oleh WHO. Pada tahun 2000 beberapa organisasi antara lain *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*, *National Cancer Institute of Canada (NCIC)*, *National Cancer Institute of United States (NCI)* mempublikasi *Respon Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST)*.

## 2.6.2 Evaluasi Respon terapi

### 2.6.2.1 Respon Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST)

Kriteria evaluasi respon tumor penting untuk menentukan terapi dan memilih regimen kemoterapi. Standar yang dipakai adalah yang dikembangkan oleh WHO. Pada tahun 2000 beberapa organisasi antara lain *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*, *National Cancer*

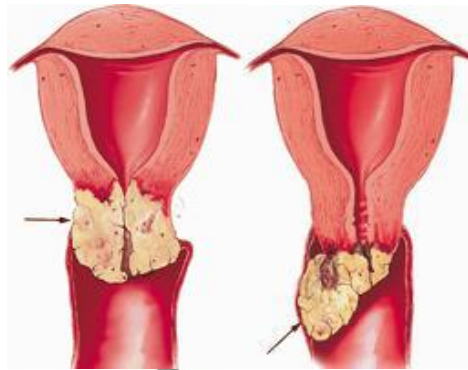


*Institute of Canada (NCIC), National Cancer Institute of United States (NCI)* mempublikasi *Respon Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST)*.

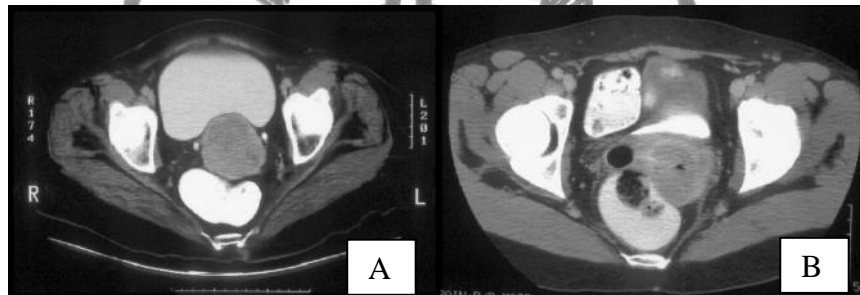
Metode penilaian respon tumor menggunakan teknik dan metode dengan melaporkan *baseline lesi*/ besar lesi awal dan selama *follow up*. Pemeriksaan pencitraan harus dilakukan disamping pemeriksaan klinis. Lesi klinis yang dapat diukur adalah lesi superfisial dengan ukuran  $\geq 10$  mm, Rontgen thorak bisa digunakan untuk batas lesi yang tegas. CT Scan merupakan modalitas imaging yang lebih terpilih. Penilaian evaluasi respon tumor melibatkan respon target lesi, respon non target lesi dan munculnya lesi baru.

Metode RECIST telah mengalami revisi. Dalam RECIST 1.1 dimana yang dimaksud lesi yang dapat diukur / *measurable lesions* minimal 1 lesi dengan ukuran minimal 10 mm dengan spiral CT Scan atau 20 mm dengan konvensional CT Scan. Lesi yang tidak dapat diukur / *non measurable lesions* yang dimaksud adalah lesi lain dengan ukuran  $< 20$  mm / 10 mm, meliputi : lesi tulang, leptomeningeal disease, ascites, efusi pleura/pericardial, lesi kistik. Non target lesi merupakan lesi sebagai bagian dari penyakit namun tidak termasuk dalam target lesi (efusi pleura, 5 mm nodul paru) dimana tidak diperlukan pengukuran.

Pemeriksaan lain untuk menilai respon tumor setelah dilakukan terapi adalah F-DG PET dan PET CT. Pada pasien Kanker Esofagus, sensitivitas CT, Ultrasonografi endoskopik dan F-DG PET berturut turut adalah pada kisaran 33%-55%, 50%-100% dan 71%-100%. Sedangkan spesifisitasnya adalah 50%-71%, 36%-100% dan 55%-100% ( Simona dan Ell, 2009).



**Gambar 2.35.** Gambar skematik kanker serviks uteri dengan lesi terbatas pada serviks (A) dan lesi yang telah invasi parametrium (B) ( Pannut *et.al.*, 2001).



**Gambar 2.36.** Gambar CT Scan pada pasien kanker serviks Stadium IB (A) dan Stadium IIB (Pannu *et al.*, 2001).

Sedangkan akurasi MRI untuk evaluasi respon tumor pasca pengobatan adalah 78% (Manfredi *et al.*, 1998). Subak L *et al.*, melaporkan akurasi MRI dalam menilai invasi stroma adalah 88 %, sedangkan untuk menilai kedalaman invasi stroma adalah 78%. CT sulit digunakan untuk menilai ukuran tumor dan kedalaman invasi, karena tidak dapat membedakan jaringan tumor dengan jaringan sehat sekitarnya. MRI lebih unggul akurasinya dalam menilai invasi stroma, yaitu 94 berbanding 76%,  $p < 0,005$ . CT dilaporkan dapat digunakan untuk penentuan stadium serta evaluasi invasi stroma dengan pemeriksaan menggunakan kontras. Demikian juga untuk evaluasi pembesaran kelenjar getah bening (KGB) ( Pannu *et al.*, 2001).

**Tabel 2.5.** Overall Disease Response Categories (Eisnhauer *et al.*, 2009)

Complete response (CR) <sup>a</sup>	Disappearance of all <i>target</i> <sup>c</sup> and <i>nontarget</i> lesions and normalization of tumor marker levels (if appropriate)
Partial response (PR)	Disappearance of all <i>target</i> lesions without progression of <i>nontarget</i> lesions, without appearance of new lesions, and persistence of abnormal tumor marker levels -Or-At least a 30% decrease in the sum LD of <i>target</i> lesions (taking as reference the baseline sum LD) without progression of <i>nontarget</i> lesions or appearance of new lesions. <i>Note:</i> In the case where the only <i>target</i> lesion is a solitary pelvic mass measured by physical exam (not radiographically measurable), a 50% decrease in the LD is required.
Progressive disease (PD)	At least a 20% increase in the sum LD of <i>target</i> lesions, taking as reference the smallest sum LD recorded since the start of treatment, or the appearance of one or more new lesions, or progression of any <i>nontarget</i> lesion. <i>Note:</i> In the case where the only <i>target</i> lesion is a solitary pelvic mass measured by physical exam (not radiographically measurable), a 50% increase in the LD is required.
Stable disease (SD) <sup>b</sup>	Neither sufficient shrinkage of <i>target</i> lesions to qualify for PR nor sufficient increase to qualify for PD, taking as reference the smallest sum LD since the start of treatment. No appearance of new lesions ( <i>target</i> or <i>nontarget</i> ).

Respon target lesi dinyatakan sebagai *Complete Response* (CR) jika semua target lesi menghilang; Partial Response (PR) jika  $\geq 30\%$  penurunan dari baseline; Progresif Disease (PD) jika  $\geq 20\%$  peningkatan dari baseline; Stable Disease (SD) jika tidak masuk dalam kategori PD maupun PR. Respon non target lesi dinyatakan sebagai Complete Response (CR) jika semua non target lesi menghilang, tumor marker kembali ke level normal; Progresif Disease (PD) jika terjadi pembesaran non target lesi. Stable Disease (SD) jika non target lesi menetap  $\geq 1$  serta peningkatan tumor marker.

Jeh *et al* pada tahun 2013, melakukan penelitian pada 79 pasien dengan kanker payudara yang diberikan neoadjuvan kemoterapi, empat puluh sembilan pasien diklasifikasikan sebagai berespon / *responders* yaitu pasien dengan respon komplit dan respon partial, dan 34 pasien tidak berespon / non-responders, yaitu pasien dengan *stable disease* dan progresif ;35 dari 45(77,8%) kasus sesuai

dengan patologi, berdasar RECIST1.0. Dalam memprediksi respon patologis, sensitivitas, spesifisitas, keakuratan, PPV dan NPV dari kriteria RECIST 1.0 masing masing 77,8%, 58,8%, 69,6%, 71,4% dan 66,7%. Lima puluh dua pasien diklasifikasikan sebagai responders berdasarkan kriteria 1.1; 39 dari 45 kasus sesuai dengan patologi (86,7%). Dalam memprediksi patologi respon, sensitivitas, spesifisitas, akurasi, PPV dan NPV dari kriteria RECIST 1.1 adalah 86,7%, 61,8%, 75,9%, 75,0% dan 77,8%. Kriteria RECIST 1.1 menunjukkan persentase yang lebih tinggi dalam sensitivitas, spesifisitas, akurasi, PPV dan NPV dibandingkan dengan Kriteria 1.0, namun tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara dua metode.

AUC untuk RECIST 1.0 adalah 0,809 dan 0,853 untuk RECIST 1.1. Sensitivitas, spesifisitas dan keakuratan RECIST 1.0 masing masing 75,6%, 73,5% dan 74,7% ketika cutoff 34,7% digunakan. Sensitivitas, spesifisitas dan akurasi RECIST 1.1 adalah 84,4%, 73,5% dan 79,7%, masing, bila nilai *cut off* 34,4% digunakan. Meskipun nilai *cut off* RECIST 1.1 mendekati 30% sebagai kriteria penelitian ini, tidak terdapat signifikansi secara statistik. CI 95% adalah 0,714-0,905 untuk RECIST 1.0 dan 0,768 - 0,938 untuk RECIST 1.1. Tidak ada perbedaan secara statistik dalam AUC antara RECIST 1.0 dan RECIST 1.1 (Jeh *et al*, 2013). Dalam penelitian ini, menggunakan kedua penilaian, yaitu besar lesi dan kelenjar getah bening, tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik dalam diagnostik kinerja antara RECIST 1.0 dan RECIST 1.1. Sejak kriteria RECIST telah banyak digunakan dan semakin menggantikan kriteria WHO, kriteria RECIST telah dikritik mengenai sejumlah masalah, termasuk jumlah total lesi untuk dinilai, penilaian kelenjar getah bening, kegunaan teknik pencitraan



baru (FDG-PET atau MRI) dan penggunaan RECIST dalam uji coba obat-obatan target terapi dan non-sitotoksik.

Penelitian oleh Marinovich *et al*, 2015, respon ultrasonografi setelah dua siklus dinilai oleh Kriteria WHO, diaplikasikan pada tumor primer di dua dimensi (WHO-2D : 50% pengurangan diameter terpanjang dan diameter tegak lurus setelah dua siklus dibandingkan dengan sebelum terapi). Analisis tambahan menggunakan kriteria RECIST 1.1 (Pengurangan 30% diameter terpanjang dari tumor primer), dan kriteria WHO pada tumor primer di satu dimensi (WHO-1D: pengurangan 50% diameter terpanjang). Semua kriteria diterapkan pada pengukuran tumor primer saja, metastase limfonodi tidak dipertimbangkan.

Marinovich *et al*, 2015 melakukan penelitian pada 832 pasien kanker payudara, dengan hasil pada seluruh kriteria ultrasonografi, DOR (*Diagnostic Odds Ratio*) menurun secara signifikan karena definisi *Complete Respon* menjadi kurang ketat. DOR tertinggi diamati untuk prediksi tumor T0, N0. Untuk kriteria WHO-2D DOR sebagai berikut 4.07 (T0, N0), 3.75 (T0/is, N0), 3.14 (T0/is, N1/2) dan 2.65 (T0/is/1a, N1/2). Dalam definisi *Complete Respon*, sensitifitas dan spesifisitas dibandingkan untuk WHO-2D dan RECIST, dengan sensitifitas ultrasonografi yang sedang sampai tinggi dengan spesifisitas yang rendah. Sebaliknya, WHO-1D menunjukkan sensitivitas rendah dengan spesifisitas yang tinggi (sensitivitas 581.7%, spesifisitas 547.6% vs. 42.3% and 80.4%). Tidak ada bukti adanya perbedaan dalam DOR untuk kriteria respon ultrasonografi dalam definisi *Complete Respon*.

Kriteria RECIST menyediakan kerangka kerja standar untuk pembacaan dan penafsiran efektifitas terapi, namun tidak cocok untuk evaluasi organ tertentu



(hati, tulang) dan beberapa jenis terapi. Selain itu, batas yang dipilih (-30% untuk respon dan 20% untuk progresif) dipilih tanpa ada validasi, hal itu merefleksikan luaran pasien (misalnya kelangsungan hidup secara keseluruhan). Ambang batas (respon atau progresif) untuk memprediksi perbedaan dalam ketahanan hidup pada pasien yang diterapi mungkin berbeda untuk jenis terapi dan jenis kankernya. Misalnya, terapi target seperti anti-VEGF atau anti-EGFR sering menyebabkan perubahan ukuran yang sangat kecil saja, sedangkan angka ketahanan hidup secara signifikan memanjang. Begitu juga kriteria ini sama sekali tidak sesuai untuk menilai respon terapi berdasarkan imaging (radiofrekuensi ablasi, kemoembolisasi dll). yang sering meninggalkan bekas luka yang sama besar atau lebih besar dari lesi awal.

Fournier *et al*, melakukan analisis statistik untuk menentukan ambang batas untuk evaluasi ukuran yang mencerminkan manfaat target terapi dalam hal *Progression Free Survival* (PFS) pada pasien yang diobati dengan terapi anti-angiogenik untuk kanker ginjal metastatik. Terdapat penurunan sedikitnya 10% dari diameter terpanjang, yang dijadikan ambang terbaik antara respon dan tidak respon terapi. Nilai penurunan 10% ambang respon itu dikonfirmasi dalam dua penelitian populasi independen pada pasien dengan karsinoma sel ginjal metastatik, dan juga pada kanker urothelial metastatik. Ambang batas ini juga tetap terlihat ketika di aplikasikan pada kanker lain yang diterapi dengan target terapi. Namun, Kedua penilaian ini memiliki parameter yang berbeda, diantaranya yaitu penilaian selama uji klinis memerlukan standardisasi untuk membandingkan efek obat yang berbeda, yang mana penilaian selama praktik

klinis rutin harus mencermati manfaat klinis selanjutnya untuk pasien. Selain itu kriteria ini harus diaplikasikan secara ketat selama percobaan klinis.

Perkembangan radiologi bukanlah satu-satunya faktor yang mempengaruhi keputusan terapi, sebagai faktor lain seperti klinis dan respon biologis atau perkembangan, toksisitas, dan juga ada tidaknya pilihan pengobatan lainnya harus juga diperhatikan. Kesimpulan dari prosedur pencitraan sebaiknya tidak ditempatkan untuk membuat keputusan terapi tertentu. Ini bisa jadi sulit untuk menjelaskan kepada pasien bahwa pengobatan tertentu harus dilakukan selanjutnya atau dihentikan jika kesimpulan dari pencitraan menyarankan sebaliknya. Contohnya adalah Lesi pada tulang, yang merupakan salah satu yang paling sulit untuk metastase tulang secara tradisional dievaluasi dengan pemindaian tulang, tapi pemeriksaan ini tidak terlalu peka untuk perubahan. Evaluasi metastase pada tulang rumit karena dapat berupa beberapa bentuk litik, sklerotik, atau campuran dengan kemungkinan transisi dari bentuk pertama ke bentuk kedua selama terapi. (Fournier *et al*, 2015)

#### 2.6.2.2. Staging TNM

Penelitian meta analisis oleh Ye *et al*, 2015, Sebanyak 28 penelitian, dengan 2283 pasien karsinoma kolorektal menunjukkan tingkat deteksi tumor pre-operatif oleh PET-CT adalah 95,35%, lebih tinggi dibandingkan dengan CT ( $p < 0,05$ ). Sensitivitas dan spesifisitas staging “T” pre-operatif oleh PET-CT / PET adalah 0,73 (CI 95%: 0,65-0,81) dan 0,99(95% CI: 0,98-0,99), dimana AUC dan Q masing-masing 0,96 dan 0,91. Sensitivitas dan spesifisitas staging “N” pre-operatif oleh PET-CT / PET adalah 0,62 dan 0,70, dimana AUC dan Q masing-

masing 0,76 dan 0,70. Sedangkan untuk staging “M” sensitivitas dan spesifitas PET-CT / PET adalah 0,91 (95% CI: 0,80-0,96) dan 0,95 (95% CI: 0,91-0,98), dimana AUC dan Q masing-masing 0,96 dan 0,91. Sehingga dapat disimpulkan F-FDG PET-CT / PET punya kinerja yang baik pada tingkat pendeteksian tumor pre-operatif staging “T” dan “M” pada pasien kanker kolorektal primer. Namun, nilai diagnostik pre-operatif F-FDG PET-CT / PET pada staging “N” tidak ideal.

Sedangkan pada penelitian meta analisis oleh Seevaratnam *et al*, 2011 pada pasien kanker gaster, staging “T” pre-operatif dengan menggunakan MRI akurasi lebih baik dibandingkan dengan CT dan abdominal ultrasonografi. Untuk staging “N” pre-operatif PET memiliki sensitivitas paling rendah, namun spesifitas paling tinggi dibandingkan dengan modalitas lainnya. Untuk staging “M” pre-operatif, tidak ada perbedaan bermakna antara seluruh modalitas pencitraan.

#### **2.6.2.3. Tumor Marker SCC-Ag (*Squamous Cell Carcinoma Antigen*)**

Penelitian oleh Minar dan Weinberger, 2011 menyimpulkan SCC-Ag tidak dapat digunakan untuk diagnosis kanker serviks sel skuamosa dengan peningkatan kadarnya terjadi sejalan hanya dengan peningkatan volume tumor. Kadar SCC-Ag yang negatif tidak menyingkirkan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening regional, spesifitas pada penelitian ini adalah 92%. Peningkatan SCC-Ag di atas batas atas normal dikaitkan dengan peningkatan risiko metastasis limfe, sensitivitas untuk keterlibatan kelenjar getah bening meningkat secara signifikan pada peningkatan kadar SCC-Ag dua kali lipat atau lebih di atas batas atas normal (hampir 70 % dari sampel). Akibatnya, perlu untuk menentukan status kelenjar

getah bening regional segera setelah staging awal kanker serviks. Risiko metastasis kelenjar limfe regional kemudian dikaitkan dengan volume tumor yang besar. Kebanyakan kekambuhan tampak dalam 2 tahun pertama setelah terapi utama, kadar SCC-Ag positif ditemukan pada kira-kira 80% kejadian.

Penelitian oleh Li *et al*, 2015, kadar SCC-Ag meningkat ( $> 3,5$  ng / mL) pada 43,8% pasien sebelum kemoterapi neoadjuvan, dan 13,0% pasien setelah kemoterapi neoadjuvan. kadar SCC-Ag sebelum dan sesudah terapi berkorelasi dengan respon terhadap kemoterapi neoadjuvan ( $p = 0,010$ , dan  $p < 0,001$ ), infiltrasi stroma ( $p = 0,041$ , dan  $p = 0,006$ ), dan status kelenjar getah bening ( $p < 0,001$ , dan  $p < 0,001$ ). Dalam analisis multivariat, peningkatan kadar SCC-Ag sebelum terapi menunjukkan sebagai faktor risiko independen metastase ke kelenjar getah bening ( $p < 0,001$ ). Pasien dengan kadar SCC-Ag sebelum dan sesudah terapi  $< 3,5$  ng / mL menunjukkan *3 years disease free survival (DFS)* dan *3 years overall survival (OS)* lebih baik dibandingkan dengan pasien dengan kadar SCC-Ag sebelum dan sesudah terapi  $> 3,5$  ng / mL ( $p < 0,001$ , dan  $p < 0,001$ ). Analisis multivariat menunjukkan bahwa kadar SCC-Ag setelah terapi adalah prediktor OS yang kuat ( $P = 0,001$ ) dan juga prediktor DFS yang kuat ( $P = 0,012$ ). Dengan kesimpulan dari penelitian ini yaitu peningkatan kadar SCC-Ag sebelum terapi ( $> 3,5$  ng / mL) menunjukkan respon yang buruk terhadap kemoterapi neoadjuvan dan risiko lebih tinggi untuk metastase ke kelenjar getah bening. Peningkatan kadar SCC-Ag setelah terapi berkorelasi dengan DFS dan OS yang buruk.

Penelitian oleh Markovina *et al*, 2017 menyimpulkan bahwa SCC-Ag adalah biomarker serum yang sudah ditetapkan sebagai untuk prognosis buruk

pada kanker serviks. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi SCC-Ag umumnya menetap selama terapi kemoradiasi pada tumor dari pasien yang mengalami kekambuhan, dan SCC-Ag juga memediasi respon sel tumor terhadap radiasi in vitro. Studi lebih lanjut terus berlanjut untuk mengamati mekanisme molekuler dari fenotipe ini, dan bisa mengarah pada perkembangan terapi baru untuk meningkatkan efektivitas kemoradiasi pada kanker serviks.

Penelitian oleh Hu *et al*, 2015, dengan hasil sensitivitas, spesifisitas, akurasi, *Positive Predictive Value (PPV)* dan *Negative Predictive Value (NPV)* dari PET / CT untuk deteksi kekambuhan tumor atau keganasan adalah 100% (86/86), 80,8% (21/26), 95,5% (107/112), 94,5% (86/91) dan 100% (21/21). Dari 112 pasien yang termasuk dalam penelitian ini, kekambuhan terdeteksi oleh PET / CT pada 62 dari 64 pasien dengan kadar SCC-Ag yang tinggi, dibandingkan dengan 24 dari 48 pasien dengan kadar SCC-Ag negatif. *Positive Predictive Value (PPV)* dan *Negative Predictive Value (NPV)*, sensitivitas dan akurasi SCC-Ag untuk mendeteksi kekambuhan tumor masing-masing 96,9% (62/64), 50% (24/48), 72,1% (62/86) dan 76,8% (86/112). Terdapat hasil lima positif palsu dari PET / CT, semuanya berhubungan dengan kadar SCC-Ag yang negatif. PPV dari penemuan positif pada PET / CT yang terkait dengan peningkatan SCC-Ag untuk mendeteksi kekambuhan tumor adalah 100% (62/62). NPV dari tidak ada temuan pada PET / CT yang terkait dengan kadar SCC-Ag negatif adalah 100% (19/19). Dengan kesimpulan Evaluasi kadar SCC-Ag serum dan pencitraan PET / CT dapat menjadi teknik yang saling melengkapi pada kasus kanker serviks jenis skuamosa yang mengalami kekambuhan. Positif PET / CT dengan peningkatan SCC-Ag bisa memprediksi kekambuhan.



Penelitian oleh Oh *et al*, 2016, menyebutkan peningkatan serum SCC-Ag ( $\geq 2,5$  ng / mL) diamati pada 62,3% pasien dengan kekambuhan tumor. Indikator pertama kekambuhan adalah serum SCC-Ag serum abnormal pada 21 pasien (39,6%), yang mana 10 di antaranya asimtomatik pada pasien yang mendapatkan *salvage therapy*.

Prevalensi peningkatan kadar SCC meningkat sesuai dengan stadium penyakit. Pada stadium I hanya sebesar 30-40% saja yang meningkat, pada stadium II 60-70% sedangkan stadium III-IV 80-90%. Pasien dengan stadium IB yang kadar SCC rendah lebih baik survivalnya dibandingkan dengan pasien yang mengalami peningkatan kadar SCC, 96% versus 70%. *Squamous Cell Carcinoma Antigen 1/2* (SCCA 1/2), keluarga protease inhibitor (*the serpin family of endogenous serine protease inhibitors*) ekspresinya berhubungan dengan derajat diferensiasi tumor. Ekspresi pada derajat diferensiasi buruk ditemukan 22% dan derajat diferensiasi yang baik ditemukan 81,3%. Metastasis ke kelenjar getah bening ditemukan 40% N1/N2 dan 63,2% N0/Nx karsinoma sel skuamosa serviks. Karena kelebihan SCC bukan pada sensitivitasnya tetapi pada spesifitasnya, sehingga kenaikan kadar SCC yang abnormal dengan penemuan lesi residif secara klinik terdapat keterlambatan 6-7,8 bulan. Umumnya pengobatan kuratif kasus residif tidak lagi dimungkinkan bila kadar SCC sudah meningkat. Sehingga peningkatan kadar SCC tidak memberi manfaat terhadap terapi penderita. (Andrijono, 2012).