

Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* Berhubungan Positif dengan Kedalaman Invasi pada Adenokarsinoma Kolorektal

IB Caka Gunantara, IGA Sri Mahendra Dewi, I Gusti Alit Artha
*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana
Denpasar*

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma kolorektal adalah salah satu keganasan yang kejadiannya cukup sering, yang terjadi di seluruh dunia dan merupakan masalah kesehatan serius di Indonesia. Kedalaman invasi merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan faktor prognosis adenokarsinoma kolorektal. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan faktor pro-angiogenik dominan yang berperan dalam angiogenesis untuk pertumbuhan tumor, invasi, dan metastasis tumor pada adenokarsinoma kolorektal. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis hubungan antara ekspresi VEGF dan kedalaman invasi pada adenokarsinoma kolorektal.

Metode

Penelitian ini menggunakan metode analitik potong lintang, menggunakan 50 sampel adenokarsinoma kolorektal dari operasi kolonektomi yang diambil dari arsip blok parafin di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar sejak tanggal 1 Januari 2012 sampai 30 Juni 2016. Dilakukan diagnosis ulang kedalaman invasi, kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia VEGF.

Hasil

Ekspresi VEGF ditemukan pada 45 kasus dan 5 kasus dengan ekspresi VEGF negatif. Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan korelasi positif sedang antara ekspresi VEGF dengan kedalaman invasi ($r=0,491$; $r^2(rsq)=0,24$; $p=0,000$ ($p<0,05$)).

Kesimpulan

Ekspresi VEGF dan kedalaman invasi menunjukkan hubungan positif pada adenokarsinoma kolorektal.

Kata kunci: adenokarsinoma, kedalaman invasi, kolorektal, VEGF.

ABSTRACT

Background

Colorectal carcinoma is the most frequent malignancy in the world and is a serious health problem in Indonesia. The depth of invasion is one of the important factors in determining the prognosis of colorectal adenocarcinoma. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the predominant angiogenic factor which contributes to angiogenesis and promote growth, invasion and metastasis in colorectal adenocarcinoma. The purpose of this study was to analyze the relationship between the expression of VEGF and the depth of invasion on colorectal adenocarcinoma.

Methods

This analytic cross-sectional study was performed on 50 samples of colorectal adenocarcinoma, taken from the paraffin blocks archives, from Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, University of Udayana/Sanglah General Hospital Denpasar from January 1st, 2012 until June 30th, 2016. Rediagnosis of the depth of invasion was performed followed by VEGF immunohistochemical staining.

Results

VEGF expression was found in 45 cases while 5 cases were found with negative VEGF expression. Spearman correlation test analysis showed moderate correlation between the expression VEGF and the depth of invasion ($r=0.491$; $r^2(rsq)=0,24$; $p=0.000$ ($p,0.05$))

Conclusion

Expression of VEGF and the depth of invasion showed positive correlation on colorectal adenocarcinoma.

Key words: adenocarcinoma, colorectal, depth of invasion, VEGF.

PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal adalah salah satu keganasan yang kejadiannya cukup sering, terutama pada negara-negara industri seperti di Eropa, Australia, New Zealand, Amerika Utara, dan Jepang. Karsinoma kolorektal merupakan keganasan tersering ketiga di seluruh dunia, dengan insiden sebesar 12% dari semua kasus keganasan, dengan kasus baru sebanyak 8,5% per tahun.^{1,2} Di Indonesia tahun 2011, karsinoma kolorektal adalah keganasan ketiga yang paling sering menurut lokasi tumor dan merupakan keganasan primer terbanyak pertama pada laki-laki serta terbanyak ketiga pada perempuan.⁵ Insiden berdasarkan jenis kelamin adalah relatif lebih tinggi pada laki-laki, yang dikaitkan dengan pola makan dan gaya hidup. Keganasan ini jarang terjadi sebelum usia 40 tahun, kecuali pada individu dengan predisposisi genetik atau predisposisi penyakit inflamasi kronis.³⁻⁵

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang telah ada, merupakan proses penting untuk kelangsungan pertumbuhan tumor, invasi tumor, dan metastasis. Angiogenesis merupakan suatu proses kompleks yang melibatkan matriks ekstraselular dan sel endotelial, serta dipengaruhi oleh faktor-faktor angiogenik (faktor pro-angiogenik dan faktor anti-angiogenik). Angiogenesis diperlukan untuk suplai oksigen, nutrisi, faktor pertumbuhan dan hormon, enzim proteolitik serta penyebaran sel-sel tumor ke tempat jauh.⁶⁻⁸ *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan faktor pro-angiogenik dominan, yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel endotel, yang mendasari pertumbuhan dan invasi tumor serta berhubungan dengan metastasis dan prognosis buruk pada karsinoma kolorektal.^{1,2,4,9,10}

Eksresi VEGF dihubungkan dengan progresivitas tumor dan prognosis buruk berbagai macam tumor termasuk karsinoma kolorektal.^{8,11} Eksresi VEGF mulai meningkat pada adenoma kolon dan secara signifikan terjadi peningkatan lebih lanjut pada perkembangan karsinoma kolorektal. Selain itu ekspresi VEGF dan jumlah pembuluh darah memberikan hasil yang serupa pada adenoma dan karsinoma kolorektal non metastatik, dan secara signifikan meningkat pada karsinoma kolorektal yang bermetastatik.^{12,13}

Beberapa penelitian menunjukkan hubungan yang signifikan antara VEGF dan kelangsungan hidup 10 tahun, sehingga memberikan informasi prognostik dan informasi sebagai target terapi yang berharga pada karsinoma kolorektal.¹⁴⁻¹⁸ Eksresi VEGF dan *Hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 α) secara signifikan terkait dengan derajat diferensiasi tumor, metastasis, kelenjar getah bening dan metastasis hati, serta berhubungan bermakna dengan kelangsungan hidup pasien. Pemberian anti VEGF (bevacizumab) yang menghambat VEGF (target terapi) memberikan hasil yang baik pada karsinoma kolorektal.¹⁹⁻²¹ Pada penelitian yang lain, didapatkan korelasi yang baik antara derajat diferensiasi dan overekspresi VEGF, namun tidak dijumpai adanya korelasi bermakna antara stadium tumor dan overekspresi VEGF.²²

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis hubungan ekspresi VEGF dan kedalaman invasi pada adenokarsinoma kolorektal.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan *cross sectional study*. Populasi penelitian ini ialah semua blok parafin dari bahan operasi penderita adenokarsinoma kolorektal yang diperiksa secara histopatologi di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar sejak 1 Januari 2012 sampai 30 Juni 2016 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi ialah sediaan berasal dari bahan operasi reseksi kolorektal dengan diagnosis histopatologi adenokarsinoma dan masih mengandung jaringan yang cukup untuk dilakukan pembedahan ulang, sedangkan kriteria eksklusi sampel ialah blok parafin yang rusak. Sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 50 sampel yang dipilih dengan cara *proportional random sampling*.

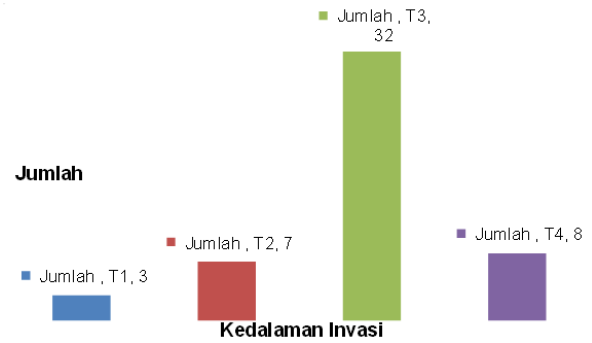
Dilakukan evaluasi ulang pada sediaan H-E oleh peneliti utama dan dua ahli patologi secara *blind independent* menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21, untuk melihat arsitektur kelenjar dan kedalaman invasi tumor. Kedalaman invasi tumor dikategorikan menjadi T1 (tumor melewati muskularis mukosa infiltrasi ke submukosa), T2 (tumor infiltrasi ke muskularis propria), T3 (tumor infiltrasi menembus muskularis propria ke sub serosa atau ke

peritoneum atau jaringan perirektal), dan T4 (tumor menginfiltrasi organ atau struktur atau peritoneum visceral). Kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan antibodi primer *monoclonal mouse* VEGF, Biologend, yang telah diencerkan (pengenceran 1:100) selama 30 menit pada suhu kamar atau semalam pada suhu 4°C. Dilanjutkan dengan antibodi sekunder streptavidin-biotin peroksidase dan kromogen diaminobenzidine (DAB). Kontrol positif disertakan untuk setiap pewarnaan antibodi, sedangkan kontrol negatif disertakan untuk setiap kasus. Jaringan kelenjar getah bening digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif diambil dari jaringan mukosa kolon normal. Sel yang mengekspresikan VEGF akan tampak berwarna coklat pada sitoplasma sel tumor. Sediaan diamati secara semikuantitatif untuk menilai persentase sel yang terpulas positif VEGF dan intensitas pewarnaan VEGF pada sel tumor. Berdasarkan persentase sel yang terpulas positif tersebut dibagi menjadi skor 0-3 yaitu: 0 (<10% sel terpulas), 1 (11-20% sel terpulas), 2 (21-50% sel terpulas), dan 3 (>50% sel terpulas). Berdasarkan intensitas warna coklat pada sel ganas yang terpulas, dikategorikan menjadi: 0 (negatif), 1 (lemah), 2 (sedang) dan 3 (kuat). Penilaian ekspresi VEGF dibuat berdasarkan perkalian skor persentase sel tumor yang terpulas positif dengan skor intensitas pewarnaannya sehingga didapatkan hasil perkalian 0-9. Ekspresi VEGF dikategorikan menjadi: negatif (0)=skor 0, positif ringan (+1)=skor 1-2, positif sedang (+2)=skor 3-4 dan positif kuat (+3)=skor 5-9.^{22,23}

Data pengamatan penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan deskriptif. Analisa statistik terhadap data penelitian dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 16,0 *for windows*. Dilakukan uji korelasi Spearman untuk menilai korelasi ekspresi VEGF dan kedalaman invasi adenokarsinoma kolorektal.

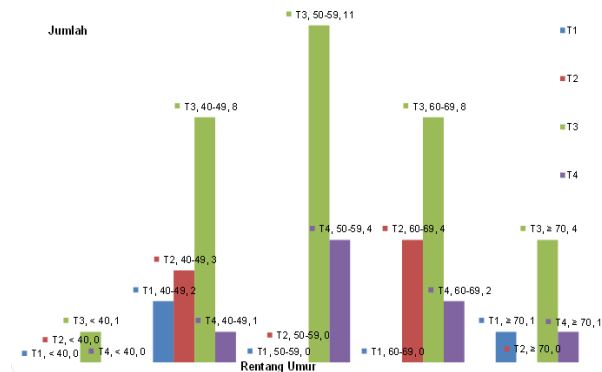
HASIL

Distribusi sampel berdasarkan kedalaman invasi tumor. Pada penelitian ini didapatkan 3 kasus dengan kedalaman invasi T1, 7 kasus dengan kedalaman invasi T2, 32 kasus dengan kedalaman invasi T3 dan 8 kasus dengan kedalaman invasi T4. (Gambar 1).



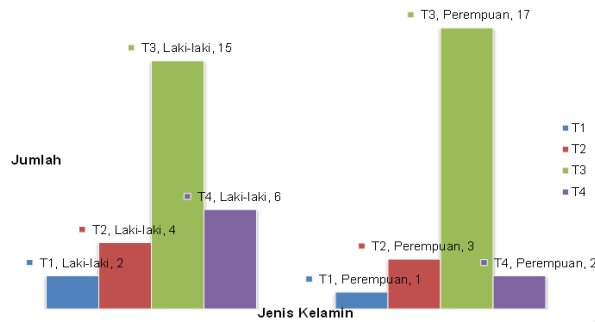
Gambar 1. Distribusi sampel berdasarkan kedalaman invasi.

Rentang umur penderita pada penelitian ini cukup bervariasi yaitu sejak umur 34 sampai 83 tahun, dengan rerata umur adalah 56,20±10,8 tahun. Jumlah sampel terbanyak yaitu pada kelompok umur 50-59 tahun. Pada setiap kelompok umur, tumor dengan kedalaman invasi T3 menunjukkan proporsi yang paling tinggi. Distribusi sampel berdasarkan kelompok umur dan kedalaman invasi disajikan pada Gambar 2.



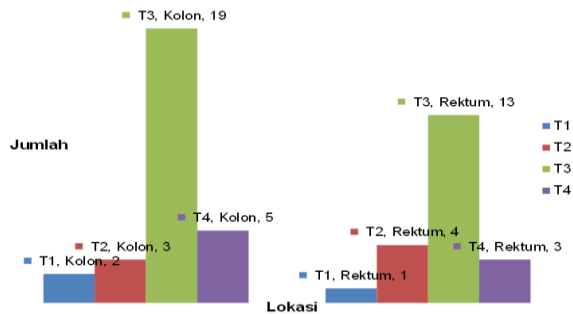
Gambar 2. Distribusi sampel berdasarkan kelompok umur dan kedalaman invasi.

Distribusi sampel berdasarkan jenis kelamin, menunjukkan jumlah sampel laki-laki sebanyak 27 kasus (54%) dan sampel dengan jenis kelamin perempuan sebanyak 23 kasus (46%). Baik pada kelompok laki-laki dan perempuan, tumor dengan kedalaman invasi T3 menunjukkan proporsi yang paling tinggi. Distribusi kasus berdasarkan jenis kelamin dan kedalaman invasi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Distribusi sampel berdasarkan jenis kelamin dan kedalaman invasi.

Berdasarkan lokasi tumor, tumor yang berlokasi pada kolon yaitu sebanyak 29 kasus (58%) sedangkan pada rektum sebanyak 21 kasus (42%). Baik pada kolon maupun rektum, tumor dengan kedalaman invasi T3 menunjukkan proporsi yang paling tinggi. Distribusi kasus berdasarkan lokasi tumor dan kedalaman invasi disajikan pada Gambar 4.



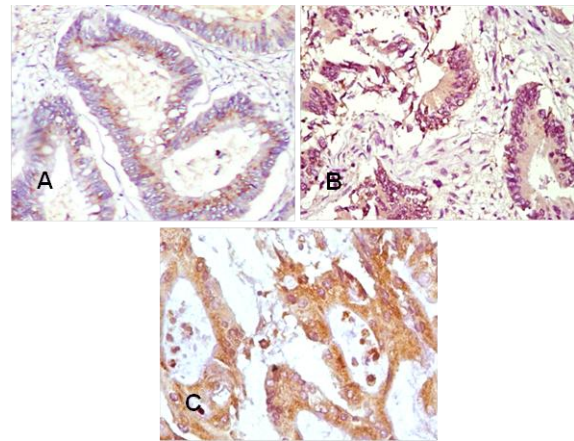
Gambar 4. Distribusi sampel berdasarkan lokasi tumor dan kedalaman invasi.

Pada Tabel 1 tampak skor ekspresi VEGF pada masing-masing kedalaman invasi. Analisis korelasi dengan uji Spearman didapatkan korelasi positif sedang dengan $r=0,491$, koefisien determinasi $r^2(rsq)=0,24$ menunjukkan hubungan kuat dengan $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini berarti bahwa ekspresi VEGF berhubungan positif terhadap kedalaman invasi.

Tabel 1. Distribusi kasus berdasarkan kedalaman invasi dan ekspresi VEGF.

VEGF	Kedalaman invasi			
	T1	T2	T3	T4
0	2	2	1	0
+1	1	2	11	1
+2	0	3	9	2
+3	0	0	11	5
Total	3	7	32	8

$r=0,491$; $r^2=0,24$; $p=0,000$



Gambar 5. Imunohistokimia VEGF pada kasus adenokarsinoma kolorektal. A. Intensitas pulasan lemah; B. Intensitas pulasan sedang; C. Intensitas pulasan kuat (pembesaran 400 x).

DISKUSI

Pedoman klinis yang digunakan sebagai dasar menentukan prognosis adalah stadium karsinoma kolorektal. Sistem stadium yang dipakai adalah klasifikasi AJCC yang menggunakan sistem TNM.^{1,2,4} Pada penelitian ini, sampel merupakan penderita adenokarsinoma kolorektal dengan kedalaman invasi T1, T2, T3 dan T4. Sebagian besar sampel menunjukkan kedalaman invasi T3, yaitu sel tumor infiltrasi menembus muskularis propia ke sub serosa atau ke peritoneum atau jaringan perirektal sebanyak 32 kasus (64%).

Insiden karsinoma kolorektal meningkat sesuai dengan peningkatan umur. Jarang terjadi dibawah umur 40 tahun, kecuali pada penderita dengan faktor predisposisi genetik dan atau faktor predisposisi penyakit lainnya seperti *chronic inflammatory bowel disease*.¹ Pada penelitian sebelumnya dilaporkan umur rata-rata sampel penelitian adalah 58 tahun.^{19,22} Pada penelitian ini, rentang umur sampel cukup bervariasi yaitu berkisar antara umur 34 sampai 83 tahun dengan rerata umur $56,20 \pm 10,8$, menunjukkan rata-rata yang hampir sama dengan penderita karsinoma kolorektal pada penelitian lain yaitu pada dekade keenam.^{19,22}

Insiden karsinoma kolorektal berdasarkan jenis kelamin adalah relatif lebih tinggi pada laki-laki, hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan pola makan dan gaya hidup antara laki-laki dan perempuan, seperti minum alkohol dan merokok.¹ Pada penelitian ini jumlah sampel

lebih banyak pada laki-laki dibandingkan perempuan.

Karsinoma kolorektal terjadi lebih banyak pada kolon sigmoid dan rektum, akan tetapi pada penelitian beberapa tahun terakhir terjadi perubahan lokasi dengan meningkatnya proporsi karsinoma pada bagian yang lebih proksimal seiring dengan peningkatan umur.^{1,2,4} Pada penelitian ini proporsi kasus lebih banyak terletak di kolon.

Eksresi VEGF oleh sel tumor mempengaruhi prognosis dan respon terapi secara klinis, namun demikian pemeriksaan VEGF tidak rutin dilakukan.¹⁰ Banyak penelitian lain yang menilai korelasi antara ekspresi VEGF dengan berbagai faktor prognostik termasuk derajat diferensiasi tumor, kedalaman invasi tumor, dan metastasis.

Pada penelitian lain didapatkan 70% dari pasien karsinoma kolorektal dengan stadium IV memiliki ekspresi VEGF positif secara signifikan meningkat jika dibandingkan dengan stadium II dan III. Demikian pula, level VEGF serum terbukti berkorelasi dengan stadium penyakit pada karsinoma kolorektal. Level VEGF serum lebih tinggi pada pasien dengan metastasis dibandingkan dengan pasien tanpa metastasis.¹⁴ Penelitian terdahulu melaporkan ekspresi HIF-1 dan VEGF secara signifikan terkait dengan stadium tumor, metastasis kelenjar getah bening dan metastasis hati. Ekspresi HIF-1 dan VEGF juga berhubungan bermakna dengan kelangsungan hidup secara keseluruhan dan bermakna sebagai target terapi anti VEGF. Ekspresi HIF-1 berkorelasi positif dengan ekspresi VEGF pada pasien karsinoma kolorektal.¹⁹ Penelitian sebelumnya menunjukkan hasil ekspresi VEGF berkorelasi positif dengan derajat diferensiasi karsinoma kolorektal, namun ekspresi VEGF tidak berkorelasi dengan stadium tumor.²² Pemeriksaan imunohistokimia EGFR dan VEGF pada karsinoma kolorektal primer menunjukkan hasil yang berbeda dengan ekspresi EGFR dan VEGF pada limfatik dan metastasis hati, di mana tingkat ekspresi EGFR dan VEGF pada jaringan metastatik lebih tinggi daripada karsinoma kolorektal primer serta memberikan hasil yang baik terhadap pemberian anti VEGF berupa *bevacizumab*.¹⁶

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa semakin dalam kedalaman invasi tumor semakin meningkat ekspresi VEGF (33,33% positif pada

kedalaman invasi T1; 71,42% positif pada kedalaman invasi T2; 96,88% positif pada kedalaman invasi T3 dan 100% pada kedalaman invasi T4). Hasil uji Spearman menunjukkan korelasi positif sedang antara ekspresi VEGF dengan kedalaman invasi, dengan koefisien korelasi $r=0,491$, koefisien determinasi $r^2(rsq)=0,24$ menunjukkan hubungan kuat, nilai $p=0,000$ ($p<0,05$).

Hal ini memperkuat teori mengenai peranan VEGF sebagai faktor angiogenik dominan pada adenokarsinoma kolorektal, yang mendasari pertumbuhan dan invasi tumor, serta berhubungan dengan metastasis dan sebagai target terapi. Adanya ekspresi VEGF pada adenokarsinoma kolorektal dapat dipakai pertimbangan bagi klinisi untuk memberikan *bevacizumab* (anti VEGF) suatu rekombinan antibodi monoklonal yang mengikat dan menetralkan VEGF-A, sehingga dapat mencegah terjadinya metastasis dan prognosis lebih buruk bagi pasien adenokarsinoma kolorektal. Tentunya diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menilai manfaat dan resiko pemberian anti VEGF pada pasien adenokarsinoma kolorektal.

KESIMPULAN

Eksresi VEGF dan kedalaman invasi menunjukkan hubungan positif pada adenokarsinoma kolorektal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P. Tumor of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen A, editors. World Health Organization: Classification of Tumours, pathology and genetics of tumours of the digestive system. Third ed. Lyon: IARC Press; 2010; 104-19.
2. Juan Rosai MD, Gastrointestinal Tract, in Juan Rosai MD, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, New York. 2011; 731-816
3. Santosa, Suharti C. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Sebagai Sasaran Terapi Kanker Kolorektal. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2009; 36: 5-12.
4. Mitchell RN, Kumar V, Abbas K, *et al*. Neoplasia. In: Mitchell RN, Kumar V, Abbas K, Fausto N, eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005; 1225-6.
5. Kanker di Indonesia Tahun 2011 Data Histopatologik, Yayasan Kanker Indonesia,

- Badan Registrasi Kanker, Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia, Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI. 2011.
6. Piulats J, Mitjans F. Angiogenesis switch pathways. In: Bronchud MH, Foote MA, Giaccone G, Olopade O, Workman P. eds. *Principles of Molecular Oncology*. New Jersey: Humana Press. 2008; 239-51.
 7. Schulz WA. Invasion and metastasis. In: *Molecular Biology of Human Cancer*. Dordrecht: Springer. 2007; 193-217.
 8. Farhat. Vascular endothelial growth factor pada karsinoma nasofaring. *Majalah Kedokteran Nusantara*. 2009; 42: 59-65.
 9. Hardjolukito ESR, Cornain S, Hernowo B. Angiogenesis in Basic Science of Oncology-Ilmu Onkologi Dasar, Edisi I, FKUI, Jakarta; 2010.
 10. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A crucial Target for Anti- and ProAngiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011; 2: 1097-105.
 11. Kawamura H, Li X, Welsh M, Welsh LC. VEGF signal transduction in angiogenesis, in WD Figg, Folkman J (ed.), *Angiogenesis: an integrative approach from science to medicine*. Spinger. 2008; 205-13.
 12. Kekec Y, Paydas S, Zorludemir S, Parsak CK, Sakman G, Seydaoglu G. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor-A expression in colorectal cancer. *J Cancer Mol*. 2006; 4: 161-7.
 13. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013; 153: 13-9.
 14. Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, *et al*. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res*. 2008; 28: 3865-70.
 15. Martins SF, Reis RM, Rodrigues AM, Baltazar F, Filho AL. Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World J Clin Oncol*. 2011; 6: 272-80.
 16. Jin K, Lan H, Cao F, Han N, Xu Z, Li G, *et al*. Differential response to EGFR- and VEGF-targeted therapies in patient-derived tumor tissue xenograft models of colon carcinoma and related metastases. *Int J Oncol*. 2012; 41: 583-8.
 17. Saif MW. Anti-VEGF agents in metastatic colorectal cancer (mCRC): Are they all alike? *Cancer Manag Res*. 2013; 5: 103-15.
 18. Weng W, Feng J, Qin H, Ma Y. Molecular therapy of colorectal cancer: Progress and future directions. *Int J Cancer*. 2015; 136: 493-502.
 19. Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou H. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications, *BMC Cancer*. 2009; 9: 432-41.
 20. Wu Y, Jin M, Xu H, Shimin Z, He S, Wang L, *et al*. Clinicopathologic Significance of HIF-1 α , CXCR4, and VEGF Expression in Colon Cancer. *Hindawi Pub Corp Clin Deve Immunol*. 2010; 1-11. Article ID 537531.
 21. Weickhardt AJ, Williams DS, Lee CK, Chionh F, Simes J, Murone C, *et al*. Vascular endothelial growth factor D expression is a potential biomarker of bevacizumab benefit in colorectal cancer. *British J Cancer*. 2015; 113: 37-45.
 22. Hashim AF, Al-Janabi AA, Mahdi LH, Al-Toriahi KM, Yasseen AA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor expression correlates with histologic grade and stage of colorectal cancer. *Libyan J Med*. 2010; 8: 1-4.
 23. Guntersah T, Harijadi, Irianiwati. TAMs, VEGF, dan MVD pada karsinoma duktal invasif payudara serta hubungannya dengan derajat histologik, ukuran tumor, status kelenjar getah bening dan ketahanan hidup. *Majalah Patologi Indonesia*. 2010; 19: 33-7.
 24. Comsa S, Cimpean AN, Ceausu R, Suciuc C, Raica M., Correlation between vascular endothelial growth factor expression, microvascular density in tumor tissues and TNM staging in breast cancer. *Arch Biol Sci, Belgrade*. 2012; 64: 409-17.