

Analisis polimorfisme gen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) pada endometriosis

N. ABDULLAH

Departemen Obstetri dan Ginekologi
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin/
RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo
Makassar

Tujuan: Melihat hubungan antara polimorfisme gen VEGF dengan kejadian endometriosis pada pasien yang dilakukan operasi laparoskopik.

Tempat: RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar.

Bahan dan cara kerja: Polimorfisme nukleotida tunggal pada gen VEGF -460 pada daerah promoter dan +405 pada daerah 5' -*untranslated* diuji hubungan pada penelitian potong lintang terhadap 50 perempuan dengan endometriosis dan 28 perempuan tanpa endometriosis. Setelah ekstraksi genom DNA, dilakukan pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) dan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) untuk analisis genotip polimorfisme VEGF. Penelitian ini dilakukan di Makassar-Indonesia sejak Januari 2007 sampai dengan Oktober 2007.

Hasil: Distribusi genotip polimorfisme -460T>C pada perempuan dengan endometriosis berbeda bermakna dibandingkan dengan perempuan tanpa endometriosis ($p < 0,05$). Walaupun demikian distribusi genotip polimorfisme +405C>G pada perempuan dengan endometriosis berbeda tidak bermakna dibandingkan dengan perempuan tanpa endometriosis ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Data ini menunjukkan bahwa polimorfisme nukleotida tunggal pada gen VEGF -460T>C pada daerah *promoter* gen VEGF bisa berhubungan dengan kejadian endometriosis pada populasi di Makassar-Indonesia.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2009; 33-2: 108-17]

Kata kunci: endometriosis, polimorfisme, VEGF

Objective: To know whether VEGF gen polymorphism is associated with susceptibility to the occurrence of endometriosis in the patients who underwent laparoscopic operation.

Setting: Dr. Wahidin Sudirohusodo General Hospital, Makassar.

Material and methods: The single nucleotide polymorphisms -460T>C in the promoter region and +405 C>G in the 5' -*untranslated* region of the VEGF gene were tested to find if there was an association between cross sectional study of 50 women with endometriosis and 28 women with no evidence of disease. Following extraction of genomic DNA, genotyping of the 460T>C and +405 C>G polymorphism of the VEGF gene was performed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The study was conducted in Makassar-Indonesia from January 2007 to October 2007.

Results: The distribution of genotypes of -460T>C polymorphism in women with endometriosis is significantly different from those without endometriosis ($p < 0,05$). However, the distribution of genotypes of +405C>G polymorphism in women with endometriosis is not significantly different from those without endometriosis ($p > 0,05$).

Conclusion: These data suggest that the single nucleotide polymorphisms of -460T>C in the promoter region of VEGF gene may associated with the incidence of endometriosis in the Makassar Indonesian population.

[Indones J Obstet Gynecol 2009; 33-2: 108-17]

Keywords: endometriosis, polymorphism, VEGF

PENDAHULUAN

Endometriosis merupakan kelainan ginekologi dan masalah endokrinologi reproduksi yang banyak ditemukan, namun sampai saat ini etiologi dan patogenesisnya belum diketahui dengan pasti. Endometriosis dijumpai pada sekitar 3-10 persen populasi perempuan usia reproduksi. Evers (1996) mendapatkan angka kejadian endometriosis pada 60-80 persen perempuan dengan dismenore, 30-50 persen perempuan dengan keluhan nyeri perut, dan 30-40 perempuan dengan infertilitas¹. Angka ke-

jadiannya yang cukup tinggi ini menempatkan endometriosis menjadi salah satu masalah reproduksi yang utama saat ini. Sementara di lain pihak endometriosis mulai dari patofisiologi, kelainan dan dampak klinik yang ditimbulkannya, serta penatalaksanaannya masih belum seperti yang diharapkan.

Pengembangan penelitian dasar untuk mengungkap hal-hal tersebut di atas pada dasarnya baru mampu menjelaskan sampai tingkat penentuan faktor-faktor yang berpengaruh dalam perkembangan proses penyakit. Akhir-akhir ini penyertaan penelitian di bidang endometriosis yang melibatkan

unsur cairan peritoneum dan proses angiogenesis agaknya banyak membuka cakrawala baru tentang patogenesis endometriosis, di mana keterlibatan faktor autokrin dan parakrin diduga memainkan peranan yang besar². Banyak hipotesis telah dikemukakan tentang patogenesis terjadinya endometriosis, tetapi hipotesis Sampson tentang menstruasi *retrograde* yang menyebabkan tertanamnya jaringan endometriotik di luar kavum uteri yang banyak diterima, dengan segala perdebatannya. Menstruasi *retrograde* adalah refluks perdarahan menstruasi melalui tuba Fallopi kemudian tertanam di luar kavum uteri terutama di rongga peritoneum. Walaupun menstruasi *retrograde* dilaporkan terjadi pada 70-90 persen perempuan, namun diagnosis endometriosis hanya terjadi pada sekitar 10 persen³. Hal ini menimbulkan pertanyaan kenapa hanya sebagian kecil perempuan menderita endometriosis. Diduga ada faktor lain yang terlibat dalam perkembangan penyakit ini sehingga bisa menyebabkan sel-sel endometriotik yang tumpah ke rongga pelvik berproliferasi dan berkembang menjadi endometriosis.

Endometriosis digolongkan ke dalam kelompok penyakit angiogenik dan proses angiogenesis pada jaringan endometrium yang berlebihan diduga sebagai mekanisme penting dalam patogenesis endometriosis. Penelitian kedokteran berbasis bukti menunjukkan bahwa endometrium perempuan penderita endometriosis mempunyai peningkatan kapasitas berproliferasi, berimplantasi, dan bertumbuh dalam rongga peritoneum⁴. Beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan yang berasal dari makrofag seperti IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), TGF β (*Transforming Growth Factor beta*) dan VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) diduga berperan dalam perkembangan endometriosis melalui peningkatan neovaskularisasi sel-sel endometrium yang melekat pada peritoneum⁵. Penelitian juga membuktikan adanya peningkatan angiogenesis pada peritoneum di mana endometriosis berimplantasi

dan peningkatan aktivitas angiogenik pada cairan peritoneum perempuan endometriosis. McLaren melaporkan peningkatan kadar VEGF pada cairan peritoneum perempuan endometriosis dibanding kontrol^{6,7}. Seperti pada tumor ganas, VEGF dihubungkan dengan beratnya derajat invasi dan potensi metastase, VEGF diduga berhubungan dengan perkembangan pembuluh darah yang penting untuk pertumbuhan dan pemeliharaan jaringan endometrium di luar kavum uteri. Lebih lanjut dilaporkan peningkatan kadar VEGF cairan peritoneum dan ekspresi VEGF pada jaringan endometriosis paralel dengan beratnya tingkat penyakit⁸.

Pengetahuan mengenai mekanisme molekular angiogenesis dalam terjadinya endometriosis sangat diperlukan dalam memahami patogenesis penyakit ini sehingga dapat dilakukan perbaikan penatalaksanaan pada pasien. Perkembangan pembuluh darah baru melibatkan interaksi dan koordinasi berbagai gen, dan salah satunya adalah famili gen VEGF⁹. Ada beberapa famili VEGF yang telah ditemukan seperti VEGF A, B, C, D, dan E, tetapi VEGF A dianggap banyak berperan^{10,11}. VEGF A bekerja melalui ikatan reseptor VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) dan VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) untuk menginduksi diferensiasi, proliferasi, dan migrasi sel endotel. Gen VEGF berlokasi pada kromosom 6p213, dan ekspresinya dilaporkan diatur oleh estrogen, hipoksia, faktor pertumbuhan seperti EGF *epidermal growth factor*, dan sitokin seperti IL-1 dan IL-6^{10,11,12}. Beberapa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) telah diidentifikasi pada gen VEGF terutama polimorfisme +405C>G pada 5 *untranslated region*, -460T>C pada *promoter region*, dan +936T>C pada 3 *untranslated region* yang dilaporkan berhubungan dengan produksi protein VEGF^{13,14}. Gen VEGF pada manusia terletak pada kromosom 6p12, terdiri dari 8 ekson yang diantarai 7 intron. Rentang area penyandi kurang lebih 14 kb (Gambar 1).



Gambar 1. Organisasi genomik dan variasi polimorfisme pada gen VEGF

Telah dilaporkan adanya hubungan polimorfisme gen VEGF dengan retinopati diabetik¹⁵, dengan kanker payudara, dengan kanker paru-paru¹⁷, dan dengan kanker prostat¹⁸. VEGF diduga memainkan peranan dalam perkembangan dan progresivitas endometriosis berdasarkan alasan: 1) VEGF terekspresi pada epitel uterus dan sel stroma manusia yang diregulasi oleh estrogen, 2) VEGF berlokasi pada epitel dan implan endometriotik, terutama pada lesi merah yang aktif, 3) VEGF meningkat pada serum dan cairan peritoneum penderita endometriosis¹⁹. Ada kemungkinan peningkatan kadar dan ekspresi VEGF pada endometriosis diakibatkan oleh adanya polimorfisme gen VEGF. Hisch dkk (2004), melaporkan adanya hubungan antara polimorfisme -460T>C dan endometriosis¹³, sedangkan Bhanoori dkk (2005) melaporkan hubungan polimorfisme +405C>G dan endometriosis¹⁹. Lebih lanjut, analisis *haplotipe* berisi polimorfisme gen +405C>G dan -460T>C menunjukkan peningkatan aktivitas promoter gen VEGF secara bermakna¹⁴.

Walaupun teori Sampson tentang transplantasi jaringan endometrium ke rongga peritoneum melalui menstruasi *retrograde* yang banyak diterima dalam hubungannya dengan perkembangan endometriosis, mekanisme seluler dan molekuler yang mendasari penyakit ini belum sepenuhnya terungkap. Banyak ahli meyakini dan sepakat bahwa patogenesis endometriosis merupakan multi faktorial yang melibatkan faktor lingkungan, imunologi, endokrin, dan proses genetik. Akhir-akhir ini di luar negeri banyak dilakukan penelitian endometriosis di tingkat seluler, molekuler dan genetik. Penemuan di luar negeri tentang adanya polimorfisme genetik VEGF dalam hubungannya dengan kadar VEGF pada endometriosis mengundang banyak pertanyaan untuk segera dijawab.

Penelitian yang mencari hubungan antara polimorfisme gen VEGF dan kejadian endometriosis belum pernah dilakukan di Indonesia. Analisis lebih lanjut tentang hubungan polimorfisme gen VEGF dalam hubungannya dengan peningkatan kadar protein VEGF pada endometriosis perlu dilakukan agar patogenesis tentang terjadinya endometriosis dapat diketahui.

Pemahaman mengenai patogenesis endometriosis sangat berguna untuk diagnosis dan strategi penanganan penyakit ini. Beberapa penelitian mengusulkan VEGF sebagai target untuk diagnosis dan bahkan terapeutik pada endometriosis^{20,21,22}.

BAHAN DAN CARA KERJA

Metode penelitian yang digunakan adalah survei analitik dengan menggunakan studi potong lintang. Populasi sampel adalah semua penderita yang dilakukan laparoscopi dengan berbagai indikasi operasi yang memenuhi syarat. Cara pengambilan sampel secara *purposive*, yaitu semua anggota populasi di tempat penelitian yang memenuhi syarat inklusi diambil sebagai sampel sampai jumlah sampel terpenuhi. Waktu penelitian dilaksanakan sejak bulan Januari 2007 sampai dengan jumlah sampel terpenuhi.

Subjek yang diteliti adalah perempuan yang bersedia mengikuti seluruh pemeriksaan sesuai petunjuk dan menandatangani persetujuan setelah mendapat penjelasan yang lengkap tentang prosedur dan untung rugi tindakan laparoscopi (*informed consent*). Sudah ada konfirmasi diagnosis melalui anamnesis, pemeriksaan fisis, USG, dan laparoscopi. Tidak dibatasi umur antara pascamenarke dan premenopause, serta tidak dalam pengobatan endometriosis untuk supresi ovarium dalam 6 bulan terakhir seperti pengobatan hormonal keluarga berencana, aromatase inhibitor, dan analog GnRH.

Dikeluarkan dari penelitian bila data tidak lengkap dan tidak mengikuti seluruh prosedur. Pada pemeriksaan laparoscopi didapatkan penyakit infeksi panggul berat dan tanda-tanda keganasan.

Tempat penelitian di Rumah Sakit pendidikan di Makassar propinsi Sulawesi Selatan yang terdiri dari RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan RS swasta lainnya. Penyaringan dan amplifikasi DNA untuk pemeriksaan polimorfisme VEGF -460T>C dan +405C>G dengan PCR di Pusat Kegiatan Penelitian UNHAS Makassar. Sekuensing nukleotida DNA untuk mengetahui letak polimorfisme dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Eijkman Jakarta.

Definisi operasional pada penelitian ini adalah: Sampel darah adalah darah vena cubiti penderita endometriosis maupun kontrol yang ditampung dalam *vacutainer* dengan antikoagulan. Endometriosis adalah jaringan endometrium yang ditemukan di luar kavum yang dibuktikan melalui visualisasi langsung dengan laparoscopi. Diagnosis endometriosis ditegakkan berdasarkan anamnesis, gambaran klinik, USG, kemudian dikonfirmasi dengan visualisasi langsung saat pemeriksaan laparoscopi dan laparotomi eksplorasi; Pemeriksaan laparoscopi adalah pemeriksaan rongga abdomen dengan bantuan teleskop untuk konfirmasi diagnostik maupun terapeutik operatif. Klasifikasi endometriosis berdasarkan ASRM yang ditentukan saat laparoscopi, di mana disebut stadium I (minimal) jika total nilai ASRM = 1-5, Stadium II (ringan) jika total nilai ASRM = 6-15, Stadium III (sedang) jika total nilai

ASRM = 15-40, Stadium IV (berat) jika total nilai ASRM >40. Endometriosis ringan adalah stadium I/II dan endometriosis berat adalah stadium III/IV; Kontrol adalah penderita perempuan yang bukan didiagnosis sebagai endometriosis, keganasan, dan penyakit infeksi panggul dan bersedia ikut dalam penelitian, serta telah dikonfirmasi dengan anamnesis, fisis, USG, dan laparoskopi. Ekstraksi DNA adalah Ekstraksi DNA VEGF sebelum dilakukan amplifikasi dengan menggunakan metode Chelex; PCR (*Polymerase Chain Reaction*) VEGF adalah suatu teknik untuk mengamplifikasi DNA VEGF dengan menggunakan primer yang sesuai; Polimorfisme gen VEGF adalah alel polimorfisme gen VEGF yang paling frekuensi pada -460T>C dan +405C>G; Polimorfisme gen VEGF -460T>C dianggap positif jika gen yang mengkode asam amino pada urutan -460 T berubah menjadi C yang dilihat pada *electrophoregram*. Disebut heterosigot (CT) jika hanya ada satu pita yang berubah dan homosigot jika kedua pita berubah (CC); Polimorfisme gen VEGF +405C>G dianggap positif jika gen yang mengkode asam amino pada urutan +405 C berubah menjadi G yang dilihat pada *electrophoregram*. Disebut heterosigot (CG) jika hanya ada satu pita yang berubah dan homosigot jika kedua pita berubah (GG); RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, untuk melihat polimorfisme gen VEGF (-460T>C, +405C>G); *Sequencing* DNA dilakukan untuk mengetahui titik nukleotida yang mengalami polimorfisme dan dibandingkan dengan database gen VEGF pada manusia.

Data diambil melalui wawancara, pemeriksaan fisis, USG, laparoskopi, dan pemeriksaan biologi molekuler untuk melihat adanya polimorfisme gen VEGF -460 dan +405.

Data yang diperoleh dianalisis dengan program statistik SPSS versi 13, dilakukan analisis univariat, bivariat dan uji lainnya sesuai dengan tujuan dan skala ukur yang sesuai. Hasil yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk narasi dan diperjelas dengan tabel dan grafik, untuk uji statistik, tingkat kemaknaan yang digunakan adalah 5% ($p < 0,05$).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Selama periode bulan Januari 2007 sampai dengan Oktober 2007 telah dilakukan penelitian untuk menilai hubungan polimorfisme gen VEGF dengan kejadian endometriosis. Jumlah sampel adalah 78 orang yang terdiri dari 50 penderita didiagnosis endometriosis dan dikelompokkan sebagai kasus, dan 28 penderita dengan diagnosis bukan endometriosis dikelompokkan sebagai kontrol.

Karakteristik sampel

Umur 50 orang penderita endometriosis didapatkan antara 21-43 tahun ($32,32 \pm 5,82$ SD) sedangkan umur 28 orang kontrol (tanpa endometriosis) antara 14-47 tahun ($30,75 \pm 6,25$ SD). Tidak ada perbedaan umur yang didapatkan antara kasus dan kontrol ($p=0,615$). Pada penelitian lain untuk menilai hubungan polimorfisme gen VEGF dan endometriosis dilakukan oleh Bhanoori M dkk di India dengan jumlah sampel kasus endometriosis 215 orang di mana rentang umur antara 20-40 tahun ($27,5 \pm 4,4$ SD), dan kontrol 210 orang dengan rentang umur antara 22-39 ($26,7 \pm 3,9$ SD). Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Kim SH dkk⁸⁴ (2005) dengan jumlah sampel kasus endometriosis 215 orang di mana rentang umur antara 18-50 ($31,0 \pm 7,2$ SD), dan kontrol 219 orang dengan rentang umur antara 20-54 tahun ($43,4 \pm 10,1$ SD).

Penegakan diagnosis dan tindakan operatif yang dilakukan adalah dengan laparoskopi, kecuali pada 3 kasus endometriosis berat disertai perlengketan dilakukan tindakan laparotomi eksplorasi. Dari 50 kasus endometriosis, 17 kasus adalah stadium I/II dan 33 kasus adalah stadium III/IV.

Indikasi operasi untuk total sampel adalah dismenore 23 (30%), nyeri pelvis 22 (28%), massa adneksa 17 (22%), infertilitas 11 (14%), dan indikasi lain-lain 5 (6%). Tidak ada perbedaan antara umur pasien dan indikasi operasi pada kasus dan kontrol. (Tabel 1).

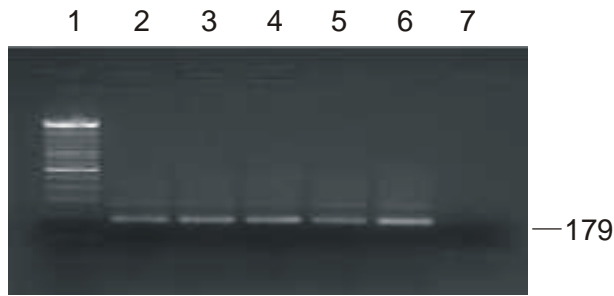
Tabel 1. Distribusi karakteristik sampel penelitian

Karakteristik	Kasus (50) n(%)	Kontrol (28) n(%)	Total	Nilai p
Umur	Mean 32,32±5,82SD	Mean 30,75±6,25SD		0,269
Indikasi operasi:				
- Dismenore	14(28)	9(32)	23(30)	0,930
- Nyeri Pelvis	15(30)	7(25)	22(28)	
- Massa Adneksa	10(20)	7(25)	17(22)	
- Infertilitas	8(16)	3(11)	11(14)	
- Lain-lain	3(6)	2(7)	5(6)	

Sumber data primer

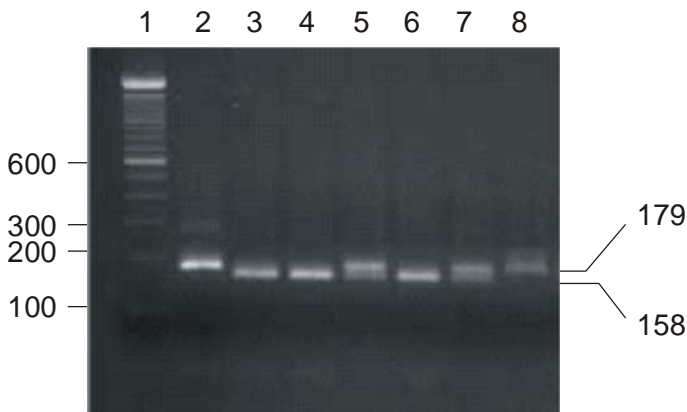
Hasil RFLP polimorfisme gen VEGF -460 dan +405

Penelitian ini mengidentifikasi adanya polimorfisme gen VEGF -460 dan +405 pada kasus maupun kontrol. Untuk polimorfisme VEGF -460 dilakukan RFLP dengan enzim restriksi BsaHI (Gambar 2).



VEGF-460

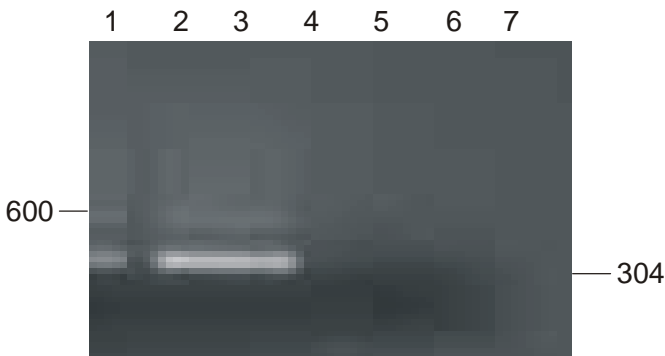
Gambar visualisasi produk PCR
 1. Penanda DNA100 pb
 2. - 6. Produk PCR sampel
 7. Kontrol negatif



Gambar visualisasi produk RFLP
 1. Penanda DNA100 pb
 2. Kontrol produk PCR tanpa dipotong
 3. 4. dan 6. Homosigot C/C
 5. dan 7. Heterosigot C/T
 8. Homosigot T/T

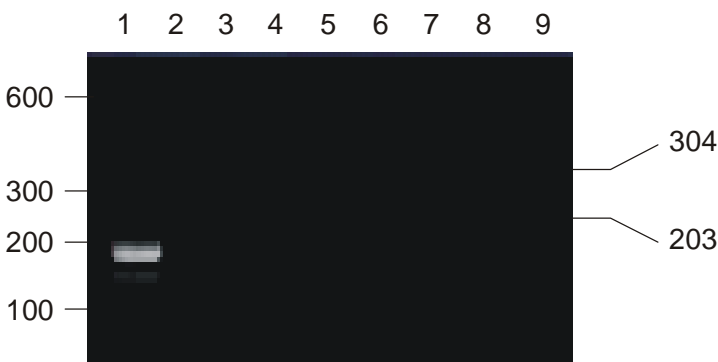
Gambar 2. Hasil RFLP gen VEGF -460.

Untuk polimorfisme VEGF +405 dilakukan RFLP dengan enzim restriksi Faq I (Gambar 3).



VEGF+405

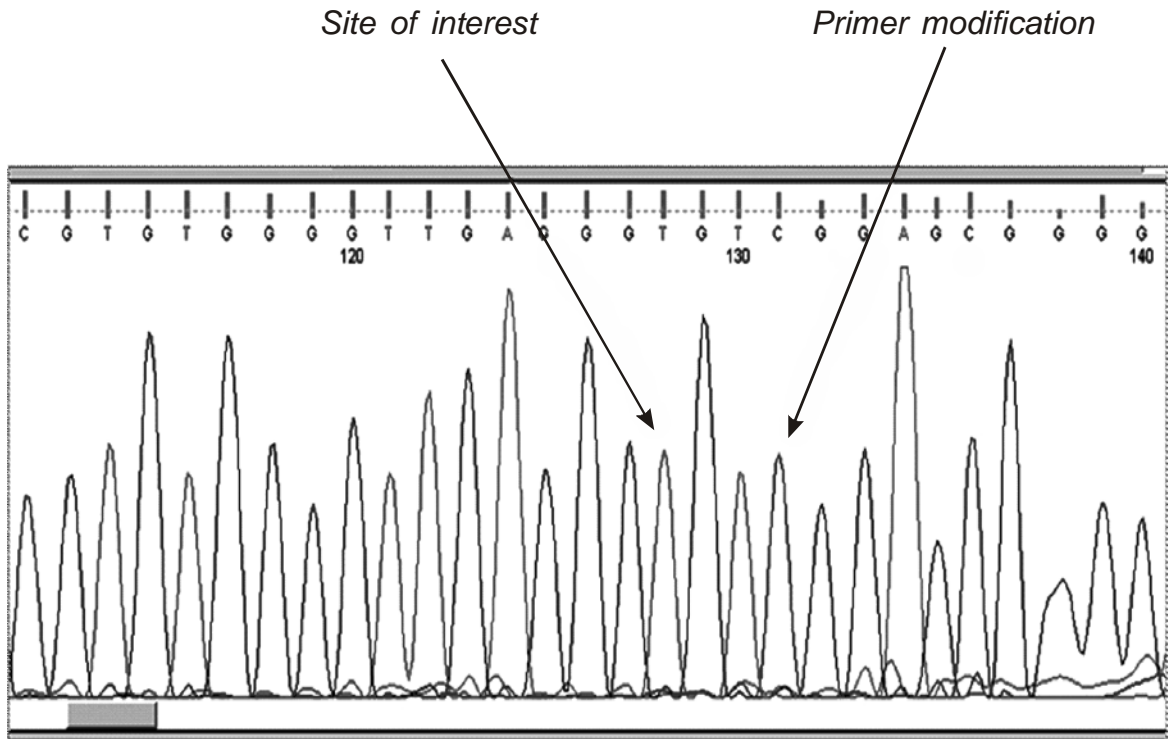
Gambar visualisasi produk PCR
 1. Penanda DNA100 pb
 2. - 6. Produk PCR sampel
 7. Kontrol negatif



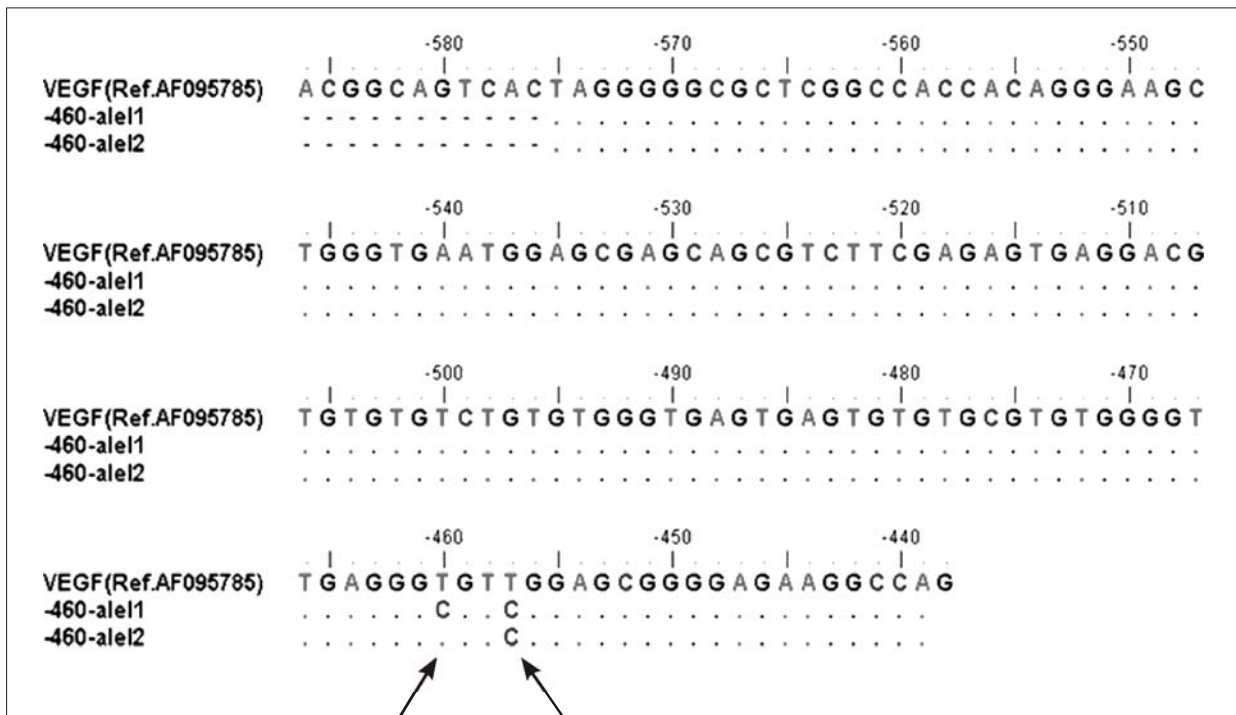
Gambar visualisasi produk RFLP
 1. Penanda DNA100 pb
 2. Kontrol produk PCR tanpa dipotong
 3. Heterosigot C/G
 4. 5. 6. 7. dan 9. Homosigot G/G
 8. Homosigot C/C

Gambar 3. Hasil RFLP gen VEGF +405

HASIL SEKUENSING VEGF

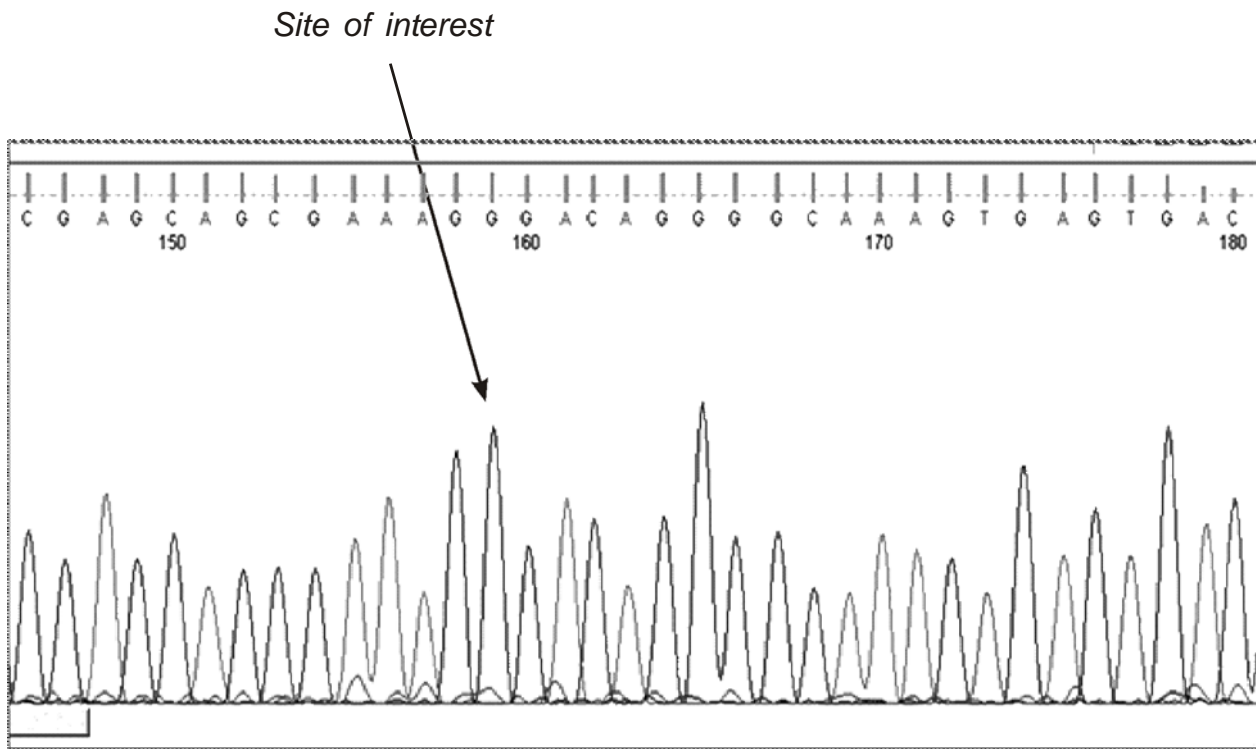


Gambar 4. Gambaran *electrophoregram* VEGF -460.

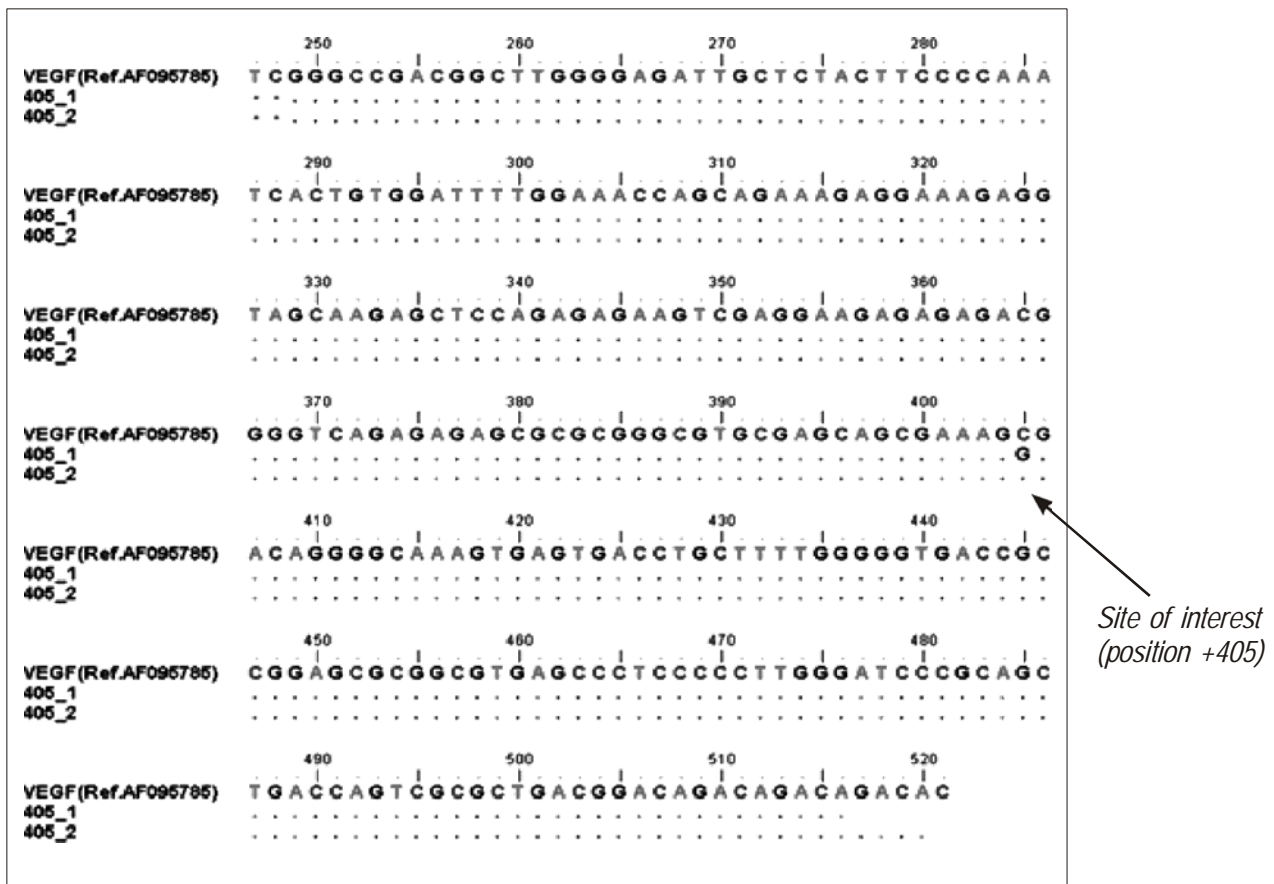


Site of interest (position -460)

Gambar 5. Titik mutasi gen -460T>C.



Gambar 6. Gambaran *electrophoregram* gen VEGF +405.



Gambar 7. Titik mutasi gen +405C>G.

Polimorfisme gen VEGF -460 dan endometriosis

Tabel 2. Distribusi genotif dan alel VEGF -460 pada kasus dan kontrol

	Genotif -460			p	Frekuensi alel -460			OR 95% CI
	TT n (%)	CT n (%)	CC n (%)		C n (%)	T n (%)	p	
Kontrol (n = 28)	16(57,1)	11(39,3)	1(3,6)	0,009	13(23,2)	43(76,8)	0,009	OR1 = 7,526 (0,86-65,6)
Kasus (n = 50)	18(36,0)	19(38,0)	13(26,0)	0,04	45(45,0)	55(55,0)		OR2 = 11,56 (1,35-98,46)
Total	34(43,6)	30(38,5)	14(17,9)		58(37,2)	98(62,8)		

p = 0,032

Untuk distribusi frekuensi genotif dan alel VEGF -460 dapat dilihat pada Tabel 2, di mana frekuensi genotif -460 pada 50 kasus endometriosis adalah TT=18 (36,0%), CT=19 (38,0%), dan CC=13 (26,0%). Sedangkan frekuensi genotif -460 pada 28 kontrol adalah TT=16 (57,1%), CT=11(39,3%), dan CC=1 (3,6%). Frekuensi alel VEGF -460 pada 50 kasus endometriosis adalah C=45 (45,0%) dan T= 55 (55%). Frekuensi alel VEGF -460 pada 28 kontrol adalah C=13 (23,2%) dan T=43 (76,8%).

Terdapat perbedaan bermakna antara distribusi genotif polimorfisme -460 pada kasus dan kontrol (p<0,05). Demikian juga frekuensi alel C didapatkan meningkat pada kasus dibanding dengan kontrol, dan perbedaan ini secara statistik bermakna (p<0,05), Hal ini menyebabkan peningkatan proporsi genotif CC pada kasus. Perempuan yang mengalami polimorfisme gen VEGF -460 untuk CC mempunyai risiko untuk menderita endometriosis sebesar 7,5 kali lebih besar dibanding dengan CT (95% CI, 0,863-65,606, p=0,04). Sementara untuk perempuan dengan polimorfisme gen VEGF -460 untuk CC dibandingkan dengan *wild type* (TT) mempunyai risiko untuk menderita endometriosis

sebesar 11,5 kali (95% CI, 1,35-98,46, p=0,009). Kedua nilai *Odd Ratio* ini (OR 1 dan OR 2) menggambarkan terjadinya peningkatan risiko kejadian endometriosis pada polimorfisme gen VEGF -460. Penelitian lain yang dilakukan oleh Hisch dkk (2004) mendapatkan pengaruh polimorfisme gen VEGF-460 terhadap kejadian endometriosis pada populasi di Taiwan. Namun pada penelitian yang dilakukan oleh Hisch dkk mendapatkan risiko untuk menderita endometriosis meningkat pada individu dengan homosigot TT dan alel T. Berbeda dengan penelitian ini yang mendapatkan peningkatan risiko untuk menderita endometriosis pada individu dengan homosigot CC dan alel C. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Bhanoori M dkk (2005) di India dan Kim SH dkk⁸⁴ (2005) di Korea tidak mendapatkan hubungan antara polimorfisme gen VEGF-460 dan endometriosis.

Bila gen VEGF-460 dianalisis distribusi genotif non CC dan CC pada kasus dan kontrol, maka ditemukan perbedaan bermakna antara kedua kelompok (p<0,05). Genotif CC VEGF-460 9,5 lebih banyak ditemukan pada endometriosis dibanding kontrol.

Polimorfisme Gen VEGF +405 dan Endometriosis

Tabel 3. Distribusi genotif dan alel VEGF +405 pada kasus dan kontrol

	Genotif +405			P	Frekuensi alel +405			OR 95% CI
	CC n (%)	CG n (%)	GG n (%)		C n (%)	G n (%)	P	
Kontrol (n = 28)	9(32)	11 (39)	8(29)	0,555	29(51,8)	27 (48,2)	0,006	OR1 = 0,658, (0,206-2,098)
Kasus (n = 50)	16 (32)	23(46)	11(22)	0,47	29(29,0)	71(71,0)		OR2 = 0,688 (0,198-2,387)
Total	25(32)	34(44)	19(24)		58(37,2)	98 (62,8)		

$p = 0,777$

Untuk distribusi frekuensi genotif dan alel VEGF +405 dapat dilihat pada Tabel 3. Frekuensi genotif +405 pada 50 kasus endometriosis adalah CC=16 (32%), CG=23 (46%), dan GG=11 (22%) dan frekuensi genotif +450 pada 28 kontrol adalah CC = 9 (32%), CG=11 (39%), dan GG=8 (29%). Sedangkan frekuensi alel pada 50 kasus adalah C=29 (29,0%) dan G=71 (71,0%) dan pada 28 kontrol adalah C=29 (51,8%) dan G=27 (48,2%) (Tabel 3).

Terdapat perbedaan tidak bermakna antara distribusi genotif polimorfisme +405 pada kasus dan kontrol ($p>0,05$). Variasi polimorfisme GG terhadap CG juga tidak menunjukkan adanya risiko terhadap kejadian endometriosis secara bermakna. (OR 0,658, 95%CI (0,206-2,098), $p=0,47$). Demikian juga variasi polimorfisme GG terhadap *wild type* CC tidak menunjukkan adanya risiko yang berbeda secara bermakna (OR 0,688, 95%CI (0,198-2,387), $p=0,555$), namun terdapat peningkatan frekuensi alel G pada kasus dibanding kontrol, dan perbedaan ini secara statistik bermakna ($p<0,05$).

Penelitian yang dilakukan oleh Bhanoori M dkk (2005) di India dan Kim SH dkk (2005) di Korea justru mendapatkan hubungan antara polimorfisme gen VEGF +405 dan endometriosis.

Penelitian ini berbeda dengan Bhanoori dkk yang mendapatkan proporsi genotif GG yang lebih tinggi pada kasus (65,1%) maupun kontrol (53,8%) dibanding genotif lain CG (kasus = 33,3%, kontrol = 37,6%) dan CC (kasus = 1,9%, kontrol = 8,6%). Sedangkan penelitian Kim dkk mendapat genotif CC lebih tinggi pada kasus (23,3%) dibanding kontrol (13,2%). Lebih lanjut Kim dkk menyimpulkan bahwa perempuan dengan genotif CC mempunyai peningkatan risiko yang signifikan untuk menderita endometriosis dibanding perempuan tanpa genotif CC.

KESIMPULAN

Penelitian ini mengidentifikasi adanya polimorfisme gen VEGF -460 dan +405 pada sampel penelitian. Untuk VEGF -460 terdapat perbedaan bermakna antara distribusi genotif polimorfisme CC antara kasus dan kontrol ($p<0,05$). Perempuan yang mengalami polimorfisme gen VEGF -460 untuk CC mempunyai risiko untuk menderita endometriosis sebesar 7,5 kali lebih besar dibanding dengan tanpa polimorfisme (CT) (95% CI, 0,863-65,606, $p=0,04$). Sementara untuk perempuan dengan polimorfisme gen VEGF -460 untuk CC dibandingkan dengan *wild type* (TT) mempunyai risiko untuk menderita endometriosis sebesar 11,5 kali (95% CI, 1,35-98,46, $p=0,009$). Kedua nilai *Odds Ratio* ini (OR 1 dan OR 2) menggambarkan terjadinya peningkatan risiko kejadian endometriosis pada polimorfisme gen VEGF -460.

RUJUKAN

1. Evers JLH. Do all women have endometriosis? Reflections on pathogenesis. In Minaguchi H and Sugimoto O. Endometriosis Today Advances in Research and Practice. The proceeding of Vth Congress on Endometriosis, Yokohama, Japan October 1996
2. Lebovic DI. Immunology of endometriosis. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2002;22(3)
3. D'Hooghe TM, Hill JA. Immunology of endometriosis. In: Immunology of reproduction. Edited by Bronson R, Anderson DJ. Cambridge. Blackwell Scientific: 1996;322-356
4. Attar Erkut. Current concept and research in the pathogenesis of endometriosis. Endometriosis zone- Hot Topic. June 1999. [http://www.endozone.org/secure/hot topic.asp](http://www.endozone.org/secure/hot%20topic.asp)
5. Kyama CM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003

6. McLaren J, Prentice A, Charmock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1996. 11: 220-233
7. McLaren J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update*, 2000.6: 45-55
8. Shifren J, J Tseng C, Zoloudek. Ovarian steroid regulation Vascular endothelial growth factor in the human endometrium: Implication for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:3112-8
9. Donnez J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13(6):1690-8
10. Xie K, Wei D, Shi Q. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & Growth factor Reviews* 15, Elsevier Ltd (2004) 297-324.
11. Felmeden DC, Blain AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal* 2003;24:588-90.
12. Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. Best practice and research clinical obstetrics and gynecology. 2004;18(2):245-63
13. Hsich YY, Chang CC, Tsai FJ. T allele for VEGF -460 polymorphism at the 5' Untranslated region associated with higher susceptibility in endometriosis. *J Reprod Med* 2004; 49:468-72
14. Stevens A, Saden J, Brebchley PE. Haplotype analysis of the polymorphic human Vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Research* 2003, 63:812-6
15. Ray D. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not diabetic proteinuria in diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:861-9
16. Hua Lu. Association of genetic polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene with breast cancer survival. 2004; 65(12):5015-9
17. Lee SJ. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Cancer epidemiology Biomarkers Prevention*. 2005; 14(3):571-5
18. Lin CC. Vascular endothelial growth factor gene -460C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology*. 2003; 62:374-7
19. Bhanoori M, Arvind Babu K, Reddy Puvankumar NG. The Vascular endothelial growth factor +405 G>C 5'Untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. *Hum Reprod Advance access* 2005.
20. Bedaiwy and Falcone T. Laboratory testing for endometriosis. *Clin Chim Acta* 2004; 340:41-56
21. Hull ML, Charmock-Jones DS, Chan CL. Anti angiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:2889-99
22. Nap AW. Anti angiogenic therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 89:1089-95
23. Kim Sh, Choi YM, Choung SH. Vascular endothelial growth factor gen +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:10; 2904-8