

Laporan Penelitian

Korelasi positif ekspresi *cyclooxygenase-2* dengan *microvessel density* pada karsinoma nasofaring**Nova Rahma Hasibuan, Farhat, Tengku Siti Hajar Haryuna, Ashri Yudhistira**

Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok-Bedah Kepala Leher

Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara

Rumah Sakit Umum Pusat Haji Adam Malik

Medan

ABSTRAK

Pendahuluan: Tumor memerlukan proses pembentukan pembuluh darah baru untuk tumbuh dan bermetastasis yang dikenal sebagai proses angiogenesis. Angiogenesis dapat dinilai secara imunohistokimia dengan *Microvessel Density* (MVD). Proses angiogenesis dapat dipicu oleh berbagai faktor angiogenik. Beberapa penelitian menemukan ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) meningkat pada kanker. COX-2 dapat merangsang pengeluaran faktor-faktor angiogenik. Pada penelitian ini akan dilihat apakah angiogenesis, yang dinilai dengan MVD, pada karsinoma nasofaring memiliki korelasi dengan COX-2. **Tujuan:** Mengetahui korelasi ekspresi COX-2 dengan MVD pada penderita karsinoma nasofaring di RSUP H. Adam Malik Medan. **Metode:** Penelitian ini bersifat analitik dengan studi potong lintang. Dua puluh empat sampel diperiksa secara imunohistokimia untuk ekspresi COX-2 dan MVD. Kemudian hasil dianalisa dengan uji Spearman. **Hasil:** Ekspresi COX-2 positif ditemukan pada 17 (70,83%) subyek dan dijumpai negatif pada 7 (29,17%). Ditemukan 17 (70,83%) jaringan karsinoma nasofaring dengan MVD tinggi dan 7 (29,17%) dengan MVD rendah. Ditemukan adanya korelasi positif sedang antara ekspresi COX-2 dengan MVD ($r=0,559$; $p=0,005$). **Kesimpulan:** Ditemukan ada korelasi positif sedang antara ekspresi COX-2 dan MVD pada karsinoma nasofaring.

Kata kunci : Karsinoma nasofaring, *Cyclooxygenase-2*, *Microvessel density*

ABSTRACT

Introduction: Tumor needs new blood vessel formation to grow and metastasize. New blood vessel formation is known as angiogenesis. Angiogenesis is determined by *Microvessel Density* (MVD) using immunohistochemical examination. Angiogenesis was affected by various angiogenic factors. Recent studies found elevated COX-2 expression in cancers. COX-2 can stimulate angiogenic factors. This research assessed the correlation between COX-2 and angiogenesis, determined by MVD. **Purpose:** To find out the correlation between COX-2 and MVD in nasopharyngeal carcinoma in H. Adam Malik Hospital. **Method:** This is a cross sectional analytical research. Twenty four samples was observed by immunohistochemical examination for COX-2 expression and MVD. The results then were analyzed using Spearman correlation test. **Result:** Positive COX-2 expression was found in 17 (70.83%) subjects and negative in 7 (29.17%) subjects. High MVD was found in 17 (70.83%) subjects and low MVD was found in 7 (29.17%) subjects. There was moderate positive correlation between COX-2 expression and MVD ($r=0,559$; $p=0,005$). **Conclusion:** COX-2 is moderate positively correlated with MVD in nasopharyngeal carcinoma.

Keywords : Nasopharyngeal carcinoma, *Microvessel density*, *Cyclooxygenase-2*.

Alamat korespondensi: dr. Nova Rahma Hasibuan. RSUP H. Adam Malik Medan. Jl. Bunga Lau No. 17 Medan. Telp.061-8364581. Hp.081370062883 Email: ova_hsb@yahoo.com

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah tumor ganas yang berasal dari epitel yang melapisi permukaan nasofaring.¹ KNF merupakan salah satu keganasan yang paling sering dijumpai pada bangsa Cina dan Asia. Di Asia Tenggara insidensinya adalah 5-9 kasus per 100.000 populasi.² Sementara di Indonesia, insidensinya adalah 3,9 kasus per 100.000 populasi.³ Pada poliklinik onkologi bedah kepala leher Departemen Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher RSUP H. Adam Malik Medan pada tahun 2006-2010 ditemukan 335 kasus baru KNF.⁴

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim penting pada jalur biosintetik prostaglandin (PG), tromboksan dan prostasiklin dari asam arakhidonat. Ekspresi seluler COX-2 meningkat di atas normal pada stadium awal karsinogenesis dan selama perkembangan serta pertumbuhan invasif tumor.⁵⁻⁷

COX-2 terekspresi pada beberapa tumor dan dalam perkembangannya terbukti sebagai penyebab karsinogenesis.^{5,8,9}

Prostaglandin dan enzim COX-2, yang mengatalisis produksi prostaglandin, merupakan mediator inflamasi yang terlibat dalam proses angiogenesis keganasan.¹⁰

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru. Pertumbuhan jaringan pembuluh darah baru sangat penting untuk proliferasi sel kanker, karena proliferasi bergantung pada suplai oksigen, zat makanan dan pembuangan zat sisa yang adekuat. Menurut Folkman seperti yang dikutip oleh Nishida et al¹¹ angiogenesis juga berperan penting dalam penyebaran sel kanker. Sel-sel kanker dapat menembus masuk ke dalam pembuluh darah ataupun limfe, bersirkulasi melalui aliran intravaskuler, dan kemudian berproliferasi pada tempat yang lain yang dikenal sebagai metastasis.¹²

Pendekatan secara patologis untuk memperkirakan adanya suatu angiogenesis adalah dengan perkiraan secara mikroskopik densitas pembuluh darah (*microvessel density*/MVD) dari jaringan tumor melalui pemeriksaan immunohistokimia.¹³

Induksi COX-2 atau ekspresi berlebihan berhubungan dengan peningkatan produksi prostaglandin-E2 (PGE2). PGE2 ditemukan meningkat pada karsinogenesis kanker kolorektal, menunjukkan adanya hubungan antara perkembangan tumor dan biosintesis prostaglandin. PGE2 dapat meningkatkan regulasi Bcl-2 yang merupakan protein antiapoptosis yang diperantarai oleh aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). PGE2 juga dapat meregulasi *epidermal growth factor receptor* (EGFR) melalui pelepasan amphiregulin. PGE2 juga mengaktifasi Src kinase yang menginduksi pertumbuhan sel.¹⁴

PGE2 juga penting pada invasi tumor. Penelitian Ma et al. sebagaimana di kutip oleh Sebolowski¹⁴ dapat meningkatkan angka metastasis. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa PGE2 meningkatkan level VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). VEGF memproduksi matrix metalloprotein (MMP) untuk memulai suatu proses angiogenesis. MMP memecah ekstraseluler matrix. Hal ini merangsang migrasi sel endotel. Sel endotel mulai membelah begitu mereka bermigrasi ke jaringan sekitarnya. Kemudian tersusun menjadi pembuluh darah dan kemudian berkembang menjadi pembuluh darah matur.¹¹

Dengan memperhatikan latar belakang di atas maka peneliti merasa tertarik untuk meneliti korelasi antara ekspresi COX-2 dengan angiogenesis, yang dinilai dengan MVD, pada penderita karsinoma nasofaring di RSUP H. Adam Malik Medan.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan studi potong lintang (*cross sectional*). Populasi penelitian adalah penderita yang didiagnosis sebagai penderita karsinoma nasofaring berdasarkan hasil biopsi histopatologi yang berobat ke Divisi Onkologi-Bedah Kepala Leher Departemen THT-KL FK USU/RSUP H. Adam Malik Medan. Besar sampel yang diperlukan untuk mengetahui korelasi ekspresi COX-2 dengan MVD dihitung dengan menggunakan rumus besar sampel untuk penelitian analitik korelatif yaitu sebanyak 24 yang memenuhi kriteria inklusi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan nasofaring penderita KNF. Bahan jaringan diperiksa secara imunohistokimia dengan menggunakan antibodi COX-2 dan antibodi *Monoclonal Mouse anti-Human CD31 Endothelial cell* (untuk pemeriksaan MVD). Kemudian dilakukan penilaian terhadap ekspresi COX-2 dan MVD oleh tiga orang ahli patologi. Penilaian ekspresi COX-2 bersifat semikuantitatif yang dinyatakan dengan Skor Intensitas COX-2, berupa intensitas warna yang terekspresi (warna coklat), dinilai: 0=berarti negatif, 1=intensitas lemah, 2=intensitas sedang, 3=intensitas kuat. Skor luas (tingkat pewarnaan) COX-2 ditentukan menurut persentase luas area pewarnaan positif dibandingkan dengan area jaringan karsinoma pada 1-3 lapang pandang (LP), dinilai: 0=berarti negatif, 1=pewarnaan positif <10% jumlah sel, 2=pewarnaan positif 10-50% jumlah sel, 3=pewarnaan positif >50% jumlah sel.

Untuk skor akhir ekspresi COX-2, sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Tan dan Putti¹⁵ digunakan skor imunoreaktif. Skor imunoreaktif diperoleh dengan mengalikan skor luas dengan skor intensitas. Skor imunoreaktif 4 atau lebih dinilai ekspresi COX-2 positif, Skor imunoreaktif <4 dinyatakan sebagai COX-2 negatif.

Penghitungan densitas pembuluh darah mikro dilakukan dengan metode yang sama dengan yang dilakukan oleh Sari.¹⁶ Dengan pembesaran 40X diidentifikasi area dengan densitas pembuluh darah paling tinggi disebut dengan area *Hot Spot*. Kemudian dilakukan penghitungan kelompok sel endotel pembuluh darah dengan atau tanpa lumen pada pembesaran 200X. Evaluasi dilakukan oleh 3 orang ahli Patologi tanpa mengetahui data klinis pasien. Hasil ukur dinyatakan dalam jumlah pembuluh darah mikro (Microvessel/MV) per lapangan pandang (LP). Jumlah pembuluh darah mikro ≥ 45 MV/LP dinyatakan sebagai MVD tinggi dan <45 MV/LP dinyatakan sebagai MVD rendah.

HASIL

Sampel penelitian diambil secara *non probability consecutive sampling* dari populasi penelitian hingga memenuhi jumlah sampel minimal berdasarkan rumus perhitungan besar sampel untuk korelasi yaitu 24 sampel. Diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik	N	%
Umur (tahun)		
≤20	1	4,17
21-40	4	16,66
41-60	16	66,67
>60	3	12,50
Jenis kelamin		
Laki-laki	18	75,00
Perempuan	6	25,00
Tipe histopatologi		
<i>Keratinizing squamous cell carcinoma</i>	1	4,17
<i>Non keratinizing squamous cell carcinoma</i>	12	50,00
<i>Undifferentiated carcinoma</i>	11	45,83
Ukuran tumor primer		
T1	5	20,83
T2	5	20,83
T3	6	25,00
T4	8	33,34
Pembesaran kelenjar getah bening leher		
N0	1	4,17
N1	5	20,83
N2	9	37,50
N3	9	37,50
Stadium		
I	0	0
II	2	8,33
III	7	29,17
IV	15	62,50

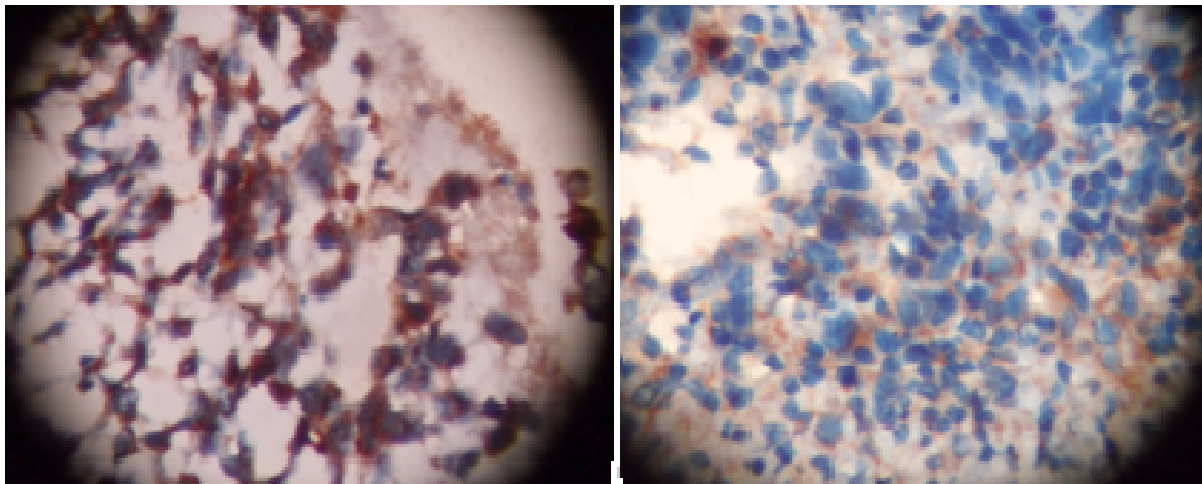
Rentang usia terbanyak pada penelitian ini adalah 41-60 tahun yaitu sebanyak 16 subyek (66,67%). Subyek laki-laki sebanyak 18 subyek (75,00%) dan perempuan 6 subyek (25,00%).

Berdasarkan tipe histopatologi, terbanyak dijumpai tipe *non keratinizing squamous cell carcinoma* sebanyak 12 subyek (50,00%) dan paling sedikit dengan tipe *keratinizing squamous cell carcinoma* yaitu sebanyak 1 subyek (4,17%). Ukuran tumor primer

terbanyak dijumpai pada penelitian ini adalah T4 yaitu 8 subyek (33,34%), paling sedikit T1 yaitu 5 subyek (20,83%). Pembesaran kelenjar getah bening terbanyak adalah N2 dan N3 yaitu masing-masing 9 subyek (37,50%), paling sedikit N0 yaitu 1 subyek (4,17%). Stadium terbanyak dijumpai adalah stadium 4 yaitu sebanyak 15 (62,50%) dan tidak dijumpai pasien dengan stadium 1.

Tabel 2. Distribusi frekuensi ekspresi COX-2

Ekspresi COX-2	N	%
Positif	17	70,83
Negatif	7	29,17
Total	24	100,00

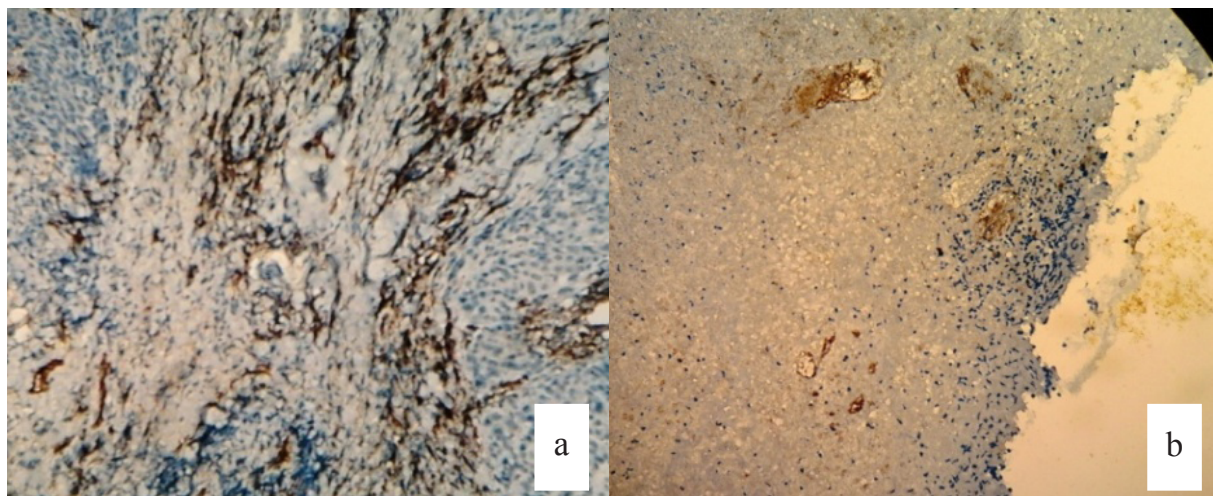
**Gambar 1.** Hasil pewarnaan imunohistokimia dengan hasil ekspresi COX-2 positif (a) dan negatif (b)

Setelah pemeriksaan imuno-histokimia, ditemukan ekspresi COX-2 positif pada 17

(70,83%) subyek penelitian dan negatif pada 7 (29,17%) subyek (tabel 2, gambar 1).

Tabel 3. Distribusi frekuensi *microvessel density*

MVD	N	%
Tinggi (≥ 45 MV/LP)	17	70,83
Rendah (< 45 MV/LP)	7	29,17
Total	24	100,00

**Gambar 2.** Hasil pewarnaan imunohistokimia dengan hasil MVD tinggi (a) dan MVD rendah (b)

Pemeriksaan MVD secara imunohistokimia menemukan 17 (70,83%) jaringan karsinoma

nasofaring dengan MVD tinggi dan 7 (29,17%) dengan MVD rendah (tabel 3, gambar 2).

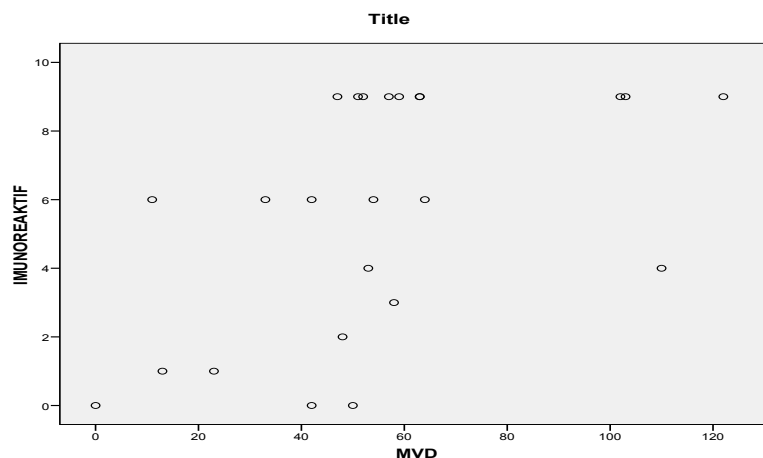


Diagram 1. Korelasi Ekspresi COX-2 dengan MVD

Tabel 4. Tabel Korelasi antara COX-2 dengan MVD

	IMUNOREAKTIF	Correlation coefficient	MVD
Spearman's rho		.559(**)	
		Sig. (2-tailed)	.005
		N	24

$r = 0,559 ; p = 0,005$

Diagram 1 dan tabel 4 menunjukkan adanya korelasi positif sedang antara COX-2 dengan MVD dengan koefisien korelasi (r) 0,559, dengan p=0,005.

DISKUSI

Subyek pada penelitian ini berkisar antara usia 16-71 tahun dengan rerata 47,54±11,651. Kelompok usia terbanyak adalah kelompok usia 41-60 yaitu sebanyak 16 (tabel 4.1). Meskipun tidak sama persis namun sejalan dengan peneliti-peneliti lainnya yang mendapatkan penderita KNF terbanyak pada kelompok usia 36-60 tahun.^{4,17,18}

Pada penelitian ini perbandingan subyek dengan jenis kelamin laki-laki dan perempuan adalah 2,7:1 (Tabel 4.1). Beberapa penelitian di berbagai negara juga menunjukkan penderita

KNF laki-laki lebih banyak daripada perempuan dengan rata-rata perbandingan 2-3:1.²⁰⁻²³

Tipe histopatologi terbanyak adalah *non keratinizing squamous cell carcinoma*. Ukuran tumor primer terbanyak dijumpai pada penelitian ini adalah T4. Pembesaran kelenjar getah bening terbanyak dijumpai adalah N2 dan N3 serta stadium terbanyak dijumpai adalah stadium 4 (tabel 4.1).

Gejala dini KNF tidak khas, mirip dengan infeksi saluran nafas atas sehingga kurang mendapat perhatian dari penderita maupun dokter pemeriksa. Selain itu letak tumor yang tersembunyi di nasofaring sehingga sulit diperiksa, peralatan yang kurang memadai, pengetahuan yang kurang, kepercayaan pada pengobatan non medis, takut berobat ke dokter dan kondisi sosial ekonomi yang lemah dari penderita seringkali menjadi kendala dalam

menegakkan diagnosis penyakit ini. Oleh karena itu gejala dini dari KNF sering terlewatkan dan pasien terdiagnosis setelah ukuran tumor dan pembesaran kelenjar getah bening berukuran besar serta pada stadium lanjut.

Pada penelitian ini dijumpai adanya ekspresi COX-2 positif pada 17 (70,83%) subyek (tabel 4.2).

Xu et al²⁴ menemukan 73,3% penderita karsinoma nasofaring dengan ekspresi COX-2 positif. Ji et al²⁵ menyatakan bahwa COX-2 positif ditemukan pada 38/63 (63,31%) penderita karsinoma tiroid, sedangkan Wu et al²⁶ menyatakan bahwa pada kanker kolorektal ditemukan 84,9% menunjukkan ekspresi COX-2 positif.

Prostaglandin endoperoxidase sintase-2 atau COX-2 adalah enzim kunci dalam produksi prostaglandin. Enzim ini ditemukan meningkat pada berbagai keganasan, seperti pada kolon, paru, payudara dan kepala leher, dan dapat dipicu oleh berbagai sitokin, hormon dan promoter tumor.

Prostaglandin dan isoenzim COX-2 dapat membantu proses karsinogenesis dengan merubah proses sel normal seperti proliferasi sel, angiogenesis, apoptosis, imunomodulasi dan metabolisme karsinogen. Prostaglandin dapat meningkatkan proliferasi sel dengan bantuan pemodifikasi biologis seperti poliamin. Peningkatan level poliamin dihubungkan dengan peningkatan sintesis DNA, sebagai hasil aktifitas *ornithine decarboxylase*. Pada epitel kolon dan sel epidermal, ditunjukkan bahwa promoter tumor endogen dan eksogen merangsang aktifitas *ornithine decarboxylase* melalui proses yang tergantung pada PGE2. PGE2 dinyatakan merupakan proliferasi keratinosit sel manusia yang penting. Pada model karsinoma kulit induksi *ornithine decarboxylase* terlihat pada tumorigenesis.²⁷

Overproduksi dari PGE2 sebagai akibat peningkatan COX-2 juga dapat mengirimkan sinyal yang tidak sesuai pada sel, sehingga merangsang pertumbuhan sel atau mengurangi apoptosis.²⁷

Hal diatas menjelaskan mengapa pada penelitian ini ditemukan jumlah subyek dengan ekspresi COX-2 positif lebih besar dibandingkan dengan yang negatif.

Pada penelitian ini diperoleh nilai MVD adalah antara 0-122 MV/LP dengan rata-rata $55 \pm 30,219$. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Sari,¹⁶ maka ditetapkan batas MVD disebut tinggi apabila ≥ 45 MV/LP. Sehingga pada penelitian ini diperoleh MVD tinggi pada 17 (70,83%) subyek (tabel 4.3).

Penelitian oleh Xu et al²⁴ menemukan rata-rata MVD sebesar 32. Sari¹⁶ pada penderita KNF tak berdiferensiasi mendapatkan MVD berkisar antara 3–188 dengan rerata $61,2 \pm 48,31$ MV/LP, sedangkan Roychowdury et al¹⁹ mendapatkan kisaran MVD 14-101 MV/LP dengan rerata 48. Penelitian Zhao et al²⁸ pada kanker lambung mendapatkan rerata MVD $28,46 \pm 8,28$, dengan *cut off point* 28, didapatkan 67 pasien dengan MVD tinggi dan 37 pasien dengan MVD rendah.

Perbedaan hasil MVD pada berbagai penelitian ini mungkin disebabkan perbedaan teknik pembacaan dan teknik pewarnaan dengan *marker* yang berbeda seperti CD31, CD34, CD105 dan faktor VIII, dan hingga saat ini belum ada penelitian yang membandingkan berbagai teknik pewarnaan ini untuk menentukan teknik pewarnaan yang ideal.²⁹

Pada penelitian ini ditemukan adanya korelasi positif sedang antara ekspresi COX-2 dan MVD dengan koefisien korelasi 0,559 dan tingkat kemaknaan $p=0,005$ (Diagram 4.1 dan tabel 4.10).

Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Sari¹⁶ yang menemukan adanya korelasi positif dengan koefisien korelasi 0,615 dengan tingkat kemaknaan tinggi ($p < 0,01$) antara tingkat ekspresi *cyclooxygenase-2* dengan gambaran angiogenesis.

Pada penelitian Tan dan Putti¹⁵ menyatakan MVD berkisar antara 1-59 (rata-rata 24,2), namun tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna MVD pada kelompok COX-2 positif dengan COX-2 negatif ($p = 0,774$).

Gallo et al⁶ menyatakan ditemukan adanya peningkatan angiogenesis pada tumor dengan ekspresi COX-2 positif ($p = 0,007$). Wu et al²⁶ menyatakan bahwa COX-2 positif ditemukan pada 84,9% kanker kolorektal. Dari jaringan dengan COX-2 positif tersebut ditemukan 55,3% dengan ekspresi VEGF positif. Secara statistik ditemukan hubungan positif antara COX-2 dengan VEGF dengan koefisien korelasi 0,409 ($p = 0,015$). VEGF merupakan salah satu faktor angiogenik. Sehingga ekspresi VEGF positif akan menunjukkan adanya angiogenesis.

Berbeda dengan Tan dan Putti¹⁵ yang tidak menemukan adanya hubungan antara ekspresi COX-2 dengan MVD pada karsinoma nasofaring.

Angiogenesis merupakan proses dimana pembuluh darah baru terbentuk dan tumbuh. Angiogenesis dapat terjadi pada keadaan fisiologi, seperti pada masa reproduksi dan penyembuhan luka, serta pada keadaan patologis seperti pada pertumbuhan tumor ganas dan metastasis kanker. Terjadinya angiogenesis dipengaruhi oleh faktor-faktor proangiogenik termasuk prostaglandin. Prostaglandin berasal dari asam arakhidonat oleh kerja enzim *cyclooxygenase-1* (COX-1) atau *cyclooxygenase-2* (COX-2).¹⁰ Hal ini dapat menjelaskan mengapa ditemukan adanya korelasi yang positif antara COX-2 dan MVD pada penelitian ini.

Penelitian-penelitian mengenai MVD pada KNF sebelumnya menggunakan berbagai jenis antibodi yaitu faktor VIII, CD34 dan CD31. Tergantung kepada laboratorium pemeriksa dan bagaimana reaksi antibodi di jaringan. Sebaiknya ketiga antigen dibandingkan pada jaringan karsinoma yang akan diperiksa sebelum menentukan jenis antigen mana yang lebih baik. Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak dilakukan perbandingan penggunaan ketiga jenis antibodi, mengingat besarnya biaya reagen antibodi, disamping itu Taweevisit et al²³ pada penelitiannya terhadap jaringan karsinoma nasofaring menemukan bahwa CD31 adalah antibodi yang terbaik memberikan pewarnaan terhadap pembuluh darah, dan mewarnai latar belakang lebih sedikit dan tidak mewarnai sel-sel lain. Ini yang menjadi alasan pemilihan CD31 pada penelitian ini. Di masa yang akan datang perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan dan teknik penilaian MVD yang terbaik, sehingga dapat diadopsi sebagai standar pemeriksaan MVD.

Penelitian ini mendapatkan ada korelasi positif sedang antara ekspresi COX-2 dan MVD pada karsinoma nasofaring. Dengan diketahui adanya korelasi COX-2 dan MVD yang positif pada karsinoma nasofaring, maka secara teori pemberian penghambat COX-2 akan dapat menghambat proses angiogenesis kanker, namun hal ini perlu dibuktikan lebih lanjut melalui penelitian eksperimental.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1(23):1-5.
2. Her C. Nasopharyngeal cancer and the southeast Asian patient. *Am Fam Physician* 2001; 63(9):1776-80.
3. Fachiroh J, Schouten T, Hariwiyanto B, Paramita DK, Harijadi A, Haryana SM, et al. Molecular diversity of Epstein-Barr virus IgG and IgA antibody responses in

- nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese, and European subjects. *J Infect Dis* 2004; 190:53–62.
4. Puspitasari D. Gambaran karsinoma nasofaring di RSUP H. Adam Malik Medan Tahun 2006-2010. Tesis. Medan: Magister Universitas Sumatera Utara; 2011.
 5. Muroso S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukawa M. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *PNAS* 2001; 98(12):6905-10.
 6. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V. Cyclooxygenase-2 Pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001; 3(1):53-61.
 7. Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance?. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(19):1440-52.
 8. Andrianto Y. Peranan pemeriksaan immunohistokimia COX-2 pada karsinoma nasofaring. Tesis. Medan: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara; 2008.
 9. Levita J, Istyastono EP, Nawawi A, Mutholib A, Esch IJP, Ibrahim S. Analyzing the interaction of andrographolide and neoandrographolide, diterpenoid compounds from *andrographis paniculata* (Burm F) nees, to cyclooxygenase-2 enzyme by docking simulation. *ITB J Sci* 2009; 41A(2):110-9.
 10. Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL. Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Med Chem* 2000; 7:1163-70.
 11. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health and Risk Manag* 2006; 2(3):213-9.
 12. Poon RT, Ng I, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, et al. Tumor microvessel density as a predictor recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1775–85.
 13. Choi WWL, Lewis MM, Lawson D, Goen QY, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic *microvessel density* in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18:143-52.
 14. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol* 2010; 1-21.
 15. Tan KB, Putti TC. Cyclooxygenase 2 expression in nasopharyngeal carcinoma: immunohistochemical findings and potential implications. *J Clin Pathol* 2005; 58(5):535–8.
 16. Sari VA. Korelasi tingkat ekspresi cyclooxygenase-2 dan gambaran angiogenesis pada karsinoma nasofaring tak berdiferensiasi. Tesis. Jakarta: Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit THT FKUI; 2004.
 17. Harahap MPH. Ekspresi vascular endothelial growth factor pada karsinoma nasofaring. Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2009.
 18. Siregar SM. Hubungan EBNA-1 dengan karsinoma nasofaring di RSUP H. Adam Malik Medan. Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2010.
 19. Roychowdhury DF, Tseng A, Fu KK, Weinberg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. *Am Cancer Soc* 1996; 77(8):1419-26.
 20. Chien CR, Chen SW, Hsieh CY, Liang JA. Retrospective comparison of the AJCC, 5th edition classification for nasopharyngeal carcinoma with the AJCC 4th edition. An experience in Taiwan. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(8):363-9.

21. Lin JC, Chen KY, Wang WY, Jan JS, Liang WM, Wei YH. Evaluation of cytokeratine 19 mRNA as a tumor marker in the periheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Int J Cancer* 2002; 97:548-53.
22. Segawa Y, Yamamoto H, Shiratsuchi H, Hirakawa N, Komune S, Tsuneyoshi M. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and their prognostic implications in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2009; 21(5):1197-202.
23. Tawevisit M, Keelawat S, Thoner PS. Correlation of microvascular density and proliferation index in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Asian Biomed* 2010; 4(2):315-21.
24. Xu X, Hu G, Li S, Xue F, Li D, Dai D, Chen Y. Expression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and its relation to angiogenesis and prognosis. *Chinese-German J Clin Oncol* 2006; 5(2):104-7.
25. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX-2 Expression and Tumor Angiogenesis in Thyroid Carcinoma Patients among Northeast Chinese Population-Result of a Single-Center Study. *Int J Med Sci* 2012; 9(3):237-42.
26. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(16):2323-6.
27. Rishikesh MK, Sadhana SS. Prostaglandins and Cyclooxygenase: Their Probable Role in Cancer. *Indian J Pharmacol* 2003; 35:3-12.
28. Zhao HC, Qin R, Chen XX, Sheng X, Wu JF, Wang DB, et al. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(47):7598-603.
29. Rao VUS, Shenoy AM, Karthikeyan B. Role of angiogenetic markers to predict neck node metastasis in head and neck. *J Cancer Res Ther* 2011; 6(2):142-6.