

Perbandingan Ekspresi PD-L1 dan TILS pada Karsinoma Payudara Triple Negative dan HER2 Enriched

Muhammad Asprianto, Krisna Murti, Citra Dewi, Erial Bahar
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
RSUP Dr. Mohammad Hoesin
Palembang

Penulis korespondensi: dr. Krisna Murti, M.Biotech., PhD., SpPA.
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Jl. Jenderal Sudirman Km. 3½, Palembang 30126.
email: krisna.murti@stud-mail.uni.com aspriantoika@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma payudara *triple negative* dan *HER2 enriched* merupakan subtype agresif dengan prognosis paling buruk diantara subtype karsinoma payudara lainnya. Karsinoma payudara dengan kepadatan tinggi (TILs) sering berhubungan dengan DFS (*Disease Free Survival*) dan OS (*Overall Survival*) lebih lama. Prognosis kanker payudara juga dipengaruhi oleh adanya ligasi antara *Programmed Cells Death-1* (PD-1) dan *Programmed Cells Death-Ligands 1* (PD-L1) yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ dan sel tumor. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbandingan kepadatan PD-L1 dan TILs pada karsinoma payudara subtype molekuler *triple negative* dan *HER2 enriched*.

Metode

Penelitian *cross sectional design* dengan 35 sampel dipulas anti-PD-L1 (*clone* SP142; Abcam). TILs dihitung pada slaid pulasan *Hematoxylin-Eosin* (HE), bersama dengan penghitungan ekspresi PD-L1 menggunakan *Image J*. Data klinikopatologi didapat dari rekam medis. Seluruh data dianalisis menggunakan SPSS versi 25.0

Hasil

Terdapat perbedaan bermakna kepadatan PD-L1, subtype *HER2 enriched* memiliki kepadatan PD-L1 3,3 kali lebih besar dibanding *triple negative* ($p=0,021$; OR=3,3). Terdapat perbedaan tidak bermakna dari kepadatan TILs pada kedua subtype terhadap karakteristik klinikopatologi ($p>0,05$). Terdapat korelasi sangat lemah antara PD-L1 dan TILs.

Kesimpulan

Subtype *triple negative* dan *HER2 enriched* banyak dijumpai pada kelompok usia di atas 40 tahun dengan ILV positif dan *grading* histopatologi tinggi. Ekspresi PD-L1 dan TILs dapat digunakan untuk mendeteksi karsinoma payudara subtype *triple negative* dan *HER2 enriched*.

Kata kunci: ekspresi PD-L1 dan TILs, subtype triple negative, HER2 enriched.

PD-L1 and TILS Expression among Triple Negative and HER2 Enriched Molecular Subtype of Breast Carcinoma

ABSTRACT

Background

Triple negative and positive HER 2 subtype breast carcinoma are aggressive subtype that have worst prognosis among other subtype. High level of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) is associated with longer disease free survival and overall survival. Breast cancer is also influenced by the presence of ligation between PD-1 and PD-L1, expressed by activated CD8⁺ T cells and tumor cells, consecutively. To analysed the comparison of PD-L1 expression levels in triple negative breast cancer and HER2 enriched subtype.

Methods

A cross sectional study was conducted with 35 samples, which were immunostained with an anti-PD-L1 antibody. TILs were measured on HE slides, and together with PD-L1 expression were calculated using image J. Clinicopathological data were obtained from medical record. All data were analysed by SPSS V25.0

Results

A significant difference was observed between PD-L1 expression in HER2 enriched and triple negative samples, where the HER2 enriched subtype had a possibility to express PD-L1 3.3 times higher than those of triple negative ($p = 0.021$; OR = 3.3). There were no significant differences in clinicopathological characteristics or TILs density in both subtypes. Likewise, no significant differences was found among PD-L1 expression, and intratumoral and stromal TILs expression.

Conclusion

Majority patient of both subtypes are mostly older than 40 years old, with positive LVI and higher histological grading. The HER2 expression showed a higher level of PD-L1 than triple negative. There was no significant difference of TILs expression between these two subtypes of breast cancer.

Key words: PD-L1 and TILs expression, subtype triple negative, HER2 enriched.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering didiagnosis pada sebagian besar negara, merupakan penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita di seluruh dunia. Laporan dari GLOBOCAN *International Agency for Research on Cancer* (IARC) memperkirakan 2,1 juta wanita di seluruh dunia didiagnosis kanker payudara pada tahun 2018 dengan angka kematian sebesar 626.679 orang.¹ Data di Bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang yang belum dipublikasi sejak tahun 2014 sampai dengan 2018 memperlihatkan karsinoma payudara menduduki peringkat pertama dari 10 penyakit terbanyak.

Kanker payudara *triple negative* memiliki proporsi 10%-20% dari semua tumor payudara dan ditandai dengan tidak adanya ekspresi *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR) dan *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu). Kanker payudara subtipe molekular jenis ini memiliki kemungkinan metastasis jauh lebih besar dan kelangsungan hidup lebih buruk dibandingkan kanker payudara subtipe luminal,² meskipun telah diberikan rejimen kemoterapi.² Karsinoma payudara HER2 *enriched* merupakan subtipe lain, ditandai dengan tingginya ekspresi ERBB2 dan gen lain dari amplikon 14q seperti *growth factor receptor-bound protein 4* (GRB4) serta ekspresi luminal rendah hingga menengah. Mayoritas tumor HER2 *enriched* adalah hormon reseptor (HR) negatif namun dijumpai sekitar 30% dengan HR positif.³ Karsinoma payudara jenis ini juga sering dikaitkan dengan diferensiasi buruk, metastasis ke kelenjar getah bening, rekurensi dan tingkat kematian yang tinggi sehingga prognosis lebih buruk.⁴

Komponen utama lingkungan mikro-tumor diwakili oleh TILs yang terdiri dari sel T CD3⁺, CD4⁺ (*helper*), CD8⁺ (sitotoksik), sel Treg, sel B dan NK.⁵ Komposisi sel imun yang terlibat dalam imunitas bawaan dan adaptif bervariasi pada setiap tipe tumor atau lokasi organ. Kelompok leukosit ini memiliki kontribusi dominan baik yang berperan sebagai pro ataupun antitumor.⁶ Infiltrasi TILs padat yang terdiri dari sel T (CD8⁺, CD4⁺) dan NK sering dikaitkan dengan angka survival yang lebih panjang, sehingga dapat menjadi nilai prognostik.⁷ Sel T antitumor yang bergerak menyerang tumor dapat diaktifkan atau ditekan sehingga terbentuk polarisasi fenotip

dari sel T apakah bersifat protumorigenik atau anti-tumor.⁶

Prognosis kanker payudara juga dipengaruhi oleh adanya ligasi antara *programmed cells death-1* (PD-1) dan ligannya yaitu *programmed cells death-ligands 1* (PD-L1). *Programmed cells death-1* (PD-1) diekspresikan oleh sel T yang diaktifkan terutama sel T sitotoksik (CD 8) sedangkan PD-L1 diekspresikan oleh sel tumor.⁸ *Programmed Cell Death-ligand 1* (PD-L1) yang diekspresikan oleh sel tumor dan sel hematopoietik ditentukan oleh stimulasi IFN- γ dan TNF- α . Makrofag mengekspresikan PD-L2, sedangkan sel dendritik (DC) dan sel mast berperan mensekresikan IL-4 dan IFN- γ .⁹ Mekanisme PD-1/PD-L1 memediasi resistensi imun tergantung pada aksesibilitas dari PD-L1 pada tumor. Ekspresi PD-L1 dinilai baik dengan adanya *upregulation* PI3K-Akt kinase atau sekresi IFN- γ dan ekspresi PD-L1, variabilitas dua jenis resistensi imun yang biasa diamati yaitu (1) resistensi imun bawaan dan (2) resistensi imun adaptif.⁹

Penelitian ini bertujuan menganalisis perbandingan ekspresi PD-L1 dan *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs) pada karsinoma payudara subtipe molekular HER2 *enriched* dan *triple negative* yang berkaitan dengan faktor prognosis dan pilihan terapi. Sampai saat ini, di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang belum ada penelitian mengenai perbandingan ekspresi PD-L1 dan TILs pada karsinoma payudara subtipe molekular *triple negative* dan HER2 *enriched*. Pengambilan sampel dilaksanakan di Bagian Patologi Anatomi RSUP Mohammad Hoesin Palembang periode 1 Januari 2016-30 November 2019.

METODE

Penelitian ini dilakukan dengan desain potong lintang (*cross sectional*) dengan pengambilan data sekunder. Sampel pada penelitian ini adalah blok parafin dan preparat Hematoksin-Eosin (HE) dari spesimen kanker payudara yang telah didiagnosis secara histopatologis sebagai karsinoma payudara invasif tipe non spesifik dan metaplastik yang berasal dari hasil operasi mastektomi maupun biopsi. Sampel dari preparat HE digunakan untuk menilai kepadatan TILs intratumoral maupun intrastromal. Sampel juga telah dikelompokkan subtipe molekular menjadi HER2 *enriched* dan *triple negative* dengan pemeriksaan IHK dengan

penanda ER, PR, HER2 dan Ki-67. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *total sampling*. Pulasan menggunakan antibodi anti PD-L1 (*clone* SP142 dilusi 1:100; Medaysis) dilakukan untuk melihat ekspresi PD-L1 pada sel-sel tumor. Perhitungan ekspresi TILs intratumoral dan intrastromal, serta ekspresi sel-sel tumor dan ekspresi PD-L1 dilakukan menggunakan aplikasi *image J*, oleh dua orang Spesialis Patologi di Bagian Patologi Anatomi RSMH Palembang. Apabila terdapat perbedaan interpretasi dari kedua ahli Patologi tersebut akan dimintakan pendapat dari ahli Patolog ketiga.

Pada perbesaran lemah (100x) dipilih 5 area paling padat, lalu pada perbesaran kuat (400x) dipilih kembali 5 area terpadat. Pada masing-masing sampel, kemudian ditentukan rerata (*mean*). Seluruh nilai rerata sampel dianalisa dengan kurva ROC yang kemudian ditentukan nilai *cut off* untuk mengkategorikan ekspresi PD-L1 dan TILs menjadi kepadatan tinggi atau rendah. Intensitas pulasan diabaikan dalam menentukan tingkat ekspresi PD-L1. Hal ini dikarenakan proses fiksasi maupun prosesing jaringan tidak seragam dan kualitas yang belum terstandarisasi. Setelah data terkumpul lengkap kemudian dimasukkan dalam tabel induk dan dianalisis semua variabel yang diteliti untuk dikelompokkan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi dan untuk mengetahui perbandingan antara kepadatan ekspresi PD-L1 dan TILs yang berskala kategorik. Perhitungan statistik dilakukan menggunakan analisis bivariat dengan uji analisis Mann-Whitney, *Chi-Square* atau *T test*. Semua hasil yang didapat dianalisis menggunakan SPSS versi 25.0.

HASIL

Distribusi karakteristik klinikopatologi

Total sampel pada penelitian ini berjumlah 35 terdiri atas 28 (80%) sampel karsinoma payudara *triple negative* dan 7 (20%) sampel HER2 *enriched*. Karsinoma invasif tipe non spesifik sebanyak 94% dan karsinoma metaplastik sebanyak 6%. Pada penelitian ini sampel usia pasien >40 tahun jumlahnya lebih banyak (57% sampel) dibandingkan usia ≤40. Pada kelompok usia ≤40 tahun didapatkan subtipe HER2 *enriched* sebanyak 13,3% dan *triple negative* sebanyak 86,7%. Pada kelompok usia >40 tahun dijumpai subtipe HER2 *enriched* sebanyak 25% dan *triple negative* sebanyak 75%. Sebanyak 26 sampel memiliki ILV positif terdiri dari subtipe HER2 *enriched* sebesar 18,5% dan *triple negative* sebesar 81,5%. Berdasarkan *grading* histopatologis mayoritas sampel penelitian adalah karsinoma payudara *grade* III yaitu sebesar 68,6%, diikuti *grade* II sebanyak 28,6% dan *grade* I sebesar 2,8% dari total sampel. Karsinoma payudara *grade* III dijumpai pada subtipe HER2 *enriched* sebesar 12,5% dan *triple negative* sebanyak 87,5%. Kelompok *grade* II terdiri dari *triple negative* 60% dan HER2 *enriched* sebanyak 40%, sedangkan *grade* I dijumpai 1 sampel subtipe *triple negative* (Tabel 1).

Ekspresi PD-L1 pada karsinoma payudara subtipe molekuler *triple negative* dan HER2 *enriched*

Pada penelitian ini terlihat data ekspresi PD-L1 tidak terdistribusi normal. Kemudian ditentukan nilai mediannya, pada HER2 *enriched* memiliki nilai median 36.2. Pada *triple negative* tampak lebih rendah dengan nilai median 10 dengan angka minimum 0 dan nilai maksimum 86,8.

Tabel 1. Distribusi karakteristik klinikopatologi sampel penelitian pada subtipe molekuler HER2 *enriched* dan *triple negative*.

Karakteristik klinikopatologi	HER <i>enriched</i> (n=7)		Triple <i>negative</i> (n=28)		Total (n=35)		*p
	n	%	n	%	n	%	
Usia							
≤ 40	2	13,3	13	86,7	15	100	0,346
> 40	5	25,0	15	75,0	20	100	
ILV							
Positif	5	18,5	21	82,5	26	100	0,808
Negatif	2	22,2	7	77,8	9	100	
Grading							
I	0	0,0	1	100	1	100	0,222
II	4	40,0	6	60,0	10	100	
III	3	12,5	21	87,5	24	100	
Subtipe histopatologi							
<i>Invasive carcinoma</i> , NOS	7	21,2	26	88,8	33	100	
<i>Metaplastic carcinoma</i>	0	0,0	2	100	2	100	

*Uji Mann-Whitney, nilai p bermakna jika p<0,05%

Hasil analisis statistik menggunakan metode kurva ROC didapatkan nilai sensitivitas 71,4% dan spesifitas sebesar 76,7% serta nilai *cut off point* untuk ekspresi PD-L1 pada penelitian ini adalah sebesar 32. Berdasarkan nilai *cut off* ini, kemudian dikategorikan ekspresi PD-L1 menjadi tinggi dan rendah, dikatakan rendah jika ≤ 32 dan tinggi jika > 32 . Pada sub tipe *HER2 enriched* dijumpai 57,1% memiliki ekspresi PD-L1 tinggi,

sedangkan 42,9% dengan ekspresi PD-L1 rendah. Pada sub tipe *triple negative* terdapat 28,6% memiliki ekspresi tinggi dan 71,4% dengan ekspresi PD-L1 rendah (nilai *odd ratio* (OR) sebesar 3,3; $p < 0,05$). Hal ini berarti penderita karsinoma payudara sub tipe *HER2 enriched* kemungkinan memperlihatkan ekspresi PD-L1 tinggi 3.3 kali lebih besar dibandingkan sampel *triple negative* (Tabel 2).

Tabel 2. Kepadatan PD-L1 pada sub tipe molekuler *triple negative* dan *HER2 enriched*.

Sub tipe molekuler	Kepadatan PD-L1				Total		*p
	Tinggi		Rendah		n	%	
	n	%	n	%			
<i>HER2 enriched</i>	4	57,1	3	42,9	7	100	0,021
<i>Triple negative</i>	8	28,6	20	71,4	28	100	

**Chi-Square test*, bermakna bila $p < 0,05$. OR: 3.3 (95% CI: 0.9-80.0)

Kepadatan TILs intratumoral maupun intrastromal pada sub tipe molekuler *triple negative* dan *HER2 enriched*

Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) intratumoral pada sampel *HER2 enriched* memiliki nilai median sebesar 87.0 dan *triple negative* 123.2 ($p=0.460$). Kepadatan TILs intrastromal pada *triple negative* memiliki nilai median 279.0, sedangkan *HER2 enriched* 252.2. Dengan

menggunakan metode yang sama dengan PD-L1 didapatkan nilai *cut off point* untuk TILs intratumoral sebesar 75,2. Pada sub tipe *HER2 enriched* yang memiliki ekspresi TILs intratumoral tinggi sebesar 85,7%, sedangkan pada sub tipe *triple* sebesar 75% sampel (Tabel 3). Hasil uji *Chi-Square* dijumpai perbedaan tidak bermakna ekspresi TILs intratumoral diantara kedua sub tipe molekuler (nilai $p > 0,05$).

Tabel 3. Kepadatan TILs intratumoral pada tiap sub tipe molekuler.

Sub tipe molekuler	Kepadatan TILs intratumoral				Total		*p
	Tinggi		Rendah		n	%	
	n	%	n	%			
<i>Triple negative</i>	6	85,7	1	14,3	7	100	0,546
<i>HER2 enriched</i>	21	75	7	25	28	100	

**Chi-Square test*, bermakna bila $p < 0.05$. OR: 3.3 (95% CI: 0.9-80.0)

Dari metode kurva ROC didapatkan nilai *cut off* dari TILs intrastromal sebesar 177,1. Sebanyak 71,4% sampel *HER2 enriched* memili-

ki ekspresi tinggi sedangkan pada *triple negative* didapatkan sebesar 75% (Tabel 4).

Tabel 4. Kepadatan TILs intrastromal pada tiap sub tipe molekuler.

Sub tipe molekuler	Kepadatan TILs intrastromal				Total		*p
	Tinggi		Rendah		n	%	
	n	%	n	%			
<i>HER2 enriched</i>	5	71,4	2	28,6	7	100	0,612
<i>Triple negative</i>	21	75,0	7	25,0	28	100	

**Chi-Square test*, bermakna bila $p < 0.05$. OR: 0,8 (95% CI: 0.6-0.9)

Kepadatan TILs intratumoral dan TILs intrastromal terhadap kepadatan PD-L1.

Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan hubungan tidak bermakna antara ekspresi PD-L1 dan

TILs intratumoral/intrastromal. Ekspresi PD-L1 berbanding terbalik dengan ekspresi TILs, nilai kekuatan korelasi sangat lemah (Tabel 5).

Tabel 5. Kepadatan PD-L1 terhadap tingkat kepadatan TILs intratumoral dan intrastromal.

Kepadatan PD-L1	Kepadatan TILs								*p	r		
	intratumoral				intrastromal							
	Tinggi		Rendah		Tinggi		Rendah					
n	%	n	%	n	%	n	%					
Tinggi	16	69,6	7	30,4	0,148	-0,25	22	95,7	1	4,3	0,478	-0,124
Rendah	11	91,7	1	8,3			12	100	0	0,0		
Total	27	77,1	8	22,9			34	97,1	1	2,9		

*Uji korelasi *Pearson*, nilai p bermakna jika $p < 0,05$

**nilai r=kekuatan korelasi, kekuatan korelasi sangat lemah jika $r < 0,2$, lemah jika $r = 0,21-0,4$, sedang jika $r = 0,41-0,6$, kuat jika $r = 0,61-0,8$ dan sangat kuat jika $r > 0,8$.

Perbedaan kepadatan TILs pada setiap karakteristik klinikopatologi.

Kepadatan TILs terhadap usia

Ekspresi TILs intratumoral tinggi dijumpai sebanyak 59,3% pada kelompok usia >40 tahun, sedangkan 40,7% dijumpai pada usia ≤40 tahun. Ekspresi TILs intrastromal tinggi, 65,2% dijumpai pada usia >40 tahun, sedangkan 34,8% dijumpai pada kelompok usia ≤40 tahun (Tabel 6). Namun hasil perhitungan ini secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$).

Ekspresi TILs terhadap ILV

Ekspresi TILs intratumoral tinggi sebagian besar memiliki ILV positif. Sedangkan, untuk ekspresi rendah seluruh sampel memiliki ILV positif. Pada ekspresi TILs intrastromal tinggi dijumpai seba-

nyak 96,2% memiliki ILV positif dan satu sampel dengan ILV negatif (Tabel 6). Secara statistik menunjukkan hasil tidak bermakna ($p = 0,558$ dan 0,551).

Ekspresi TILs terhadap grading histopatologis

Mayoritas sampel dengan ekspresi TILs intratumoral tinggi dijumpai pada tumor *grade* II dan III masing-masing 33,3% dan 66,7%, sedangkan untuk *grade* I hanya dijumpai 1 sampel yang memiliki ekspresi TILs intratumoral rendah. Ekspresi TILs intrastromal tinggi terbanyak didapatkan pada tumor *grade* III yaitu sebanyak 67,7%, *grade* II sebanyak 29,4% dan sisanya pada *grade* I sebanyak 2,9%. Secara statistik menunjukkan hasil yang tidak bermakna (Tabel 6).

Tabel 6. Perbedaan kepadatan TILs pada setiap karakteristik klinikopatologi.

Karakteristik klinikopatologi	TILs intratumoral				*p	TILs intrastromal				*p
	Tinggi		Rendah			Tinggi		Rendah		
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Usia										
≤ 40	11	40,7	2	25,0		8	34,8	3	25,0	0,344
>40	16	59,3	6	75,0	-	15	65,2	9	75,0	
Total	27	100	8	100,0		23	100,0	12	100,0	
ILV										
Positif	18	69,2	9	100,0	0,058	25	96,2	9	100,0	0,551
Negatif	8	30,8	0	0,0		1	3,8	0	0,0	
Total	26	100,0	9	100,0		26	100,0	9	100,0	
Grading histopatologi										
Grade I	0	0,0	1	12,5	0,112	1	2,9	0	0	0,790
Grade II	9	33,3	1	12,5		10	29,4	0	0	
Grade III	18	66,7	6	75,0		23	67,7	1	100,0	
Total	27	100,0	8	100,0		34	100,0	100,0		

*Uji *Chi-Square* nilai p bermakna jika $p < 0,05$

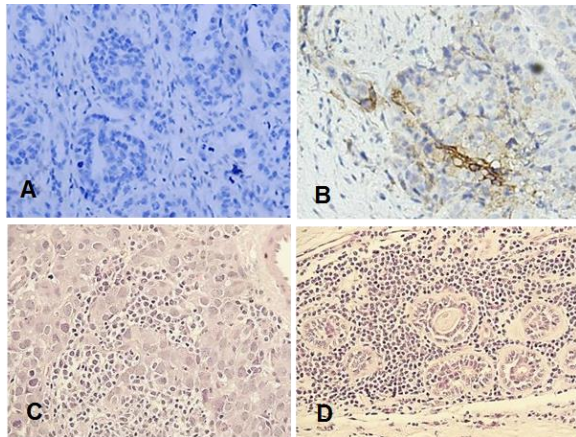
Positivitas PD-L1 dan ekspresi TILs

Penilaian positivitas PD-L1 terlihat pada membran sitoplasma yang terpulas warna coklat.⁵⁷ Pada penelitian ini terlihat perbandingan pulasan negatif dan positif dari PD-L1 serta gambaran TILs intratumoral dan intrastromal dengan ekspresi tinggi (Gambar 4A-D).

DISKUSI

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa wanita usia muda lebih banyak menderita kanker payudara subtype HER2 *enriched* dan *triple negative* yang mempunyai prognosis buruk dan menyebabkan kematian pada usia ≤40 tahun.⁷² Karena itu usia 40 tahun dipilih sebagai *cut off*.¹⁰ Meskipun

kurang dari 5% kanker payudara didiagnosis pada usia ≤ 40 tahun pada wanita di Amerika Serikat, namun dalam populasi tersebut terdapat persentase lebih tinggi pada sub tipe molekuler yang agresif seperti HER2 *enriched* dan *triple negative*.¹⁰ Selain itu, adanya variasi usia yang dijumpai pada penelitian ini kemungkinan diakibatkan adanya perbedaan suku, kebudayaan, tingkat edukasi dan gaya hidup.¹¹



Gambar 4A. Ekspresi negatif pada pulasan PD-L1 pada *invasive carcinoma*, NOS sub tipe *triple negative* (nomor kasus 6). (perbesaran 400x). B. Kepadatan PD-L1 tinggi pada *metaplastic carcinoma* sub tipe *triple negative* (nomor kasus 19) sub tipe *triple negative* dengan nilai rata-rata kepadatan 76,6 (perbesaran 400x). C Kepadatan TILs intratumoral tinggi (nomor kasus 30). Pulasan HE pada *invasive carcinoma*, NOS sub tipe *triple negative* (pembesaran 400x). D. Kepadatan TILs intrastromal tinggi (nomor kasus 18) *invasive carcinoma*, NOS sub tipe *triple negative* (perbesaran 400x).

Pada penelitian ini pasien *triple negative* maupun HER2 *enriched* lebih banyak dijumpai pada usia lebih tua. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pasien dengan kedua sub tipe ini lebih banyak dijumpai pada kelompok usia lebih muda.¹⁰ Hal ini diduga karena keterbatasan jumlah kasus kedua sub tipe ini di RSMH; atau karena data penelitian sampel sub tipe HER2 *enriched* jumlah kurang memadai, sehingga variasi usia yang ada sangat sedikit. Karsinoma payudara kedua sub tipe molekuler ini pada wanita usia tua dikatakan memiliki sifat biologi kurang agresif dengan laju proliferasi rendah, ekspresi hormon reseptor dan Bcl-2 lebih tinggi dibandingkan dengan pasien lebih muda.^{12,13} Stadium tumor harus diperhati-kan untuk konfirmasi mengingat

pasien usia tua tidak mengikuti skrining dengan baik yang mengakibatkan pasien terlambat untuk didiagnosa, sehingga sering dijumpai tumor mempunyai sifat agresif seperti pada usia muda.¹² Kanker payudara *triple negative* dan HER2 *enriched* yang muncul pada usia lebih muda memiliki peningkatan risiko kambuh dalam 5 tahun setelah diagnosis. Usia muda dikaitkan dengan penurunan angka harapan hidup dan insiden lebih tinggi dan merupakan penanda prognostik dan prediktif yang kurang menguntungkan.¹³ Angka kejadian metastasis otak yang lebih tinggi dan kelangsungan hidup bebas metastasis otak lebih pendek dapat dijumpai pada usia muda.¹² Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melihat dampak usia pada tiap sub tipe karsinoma payudara membagi 3 kelompok usia menjadi muda-tua ($\leq 65-74$), tua (74-85), paling tua (≥ 80 tahun). Pada penelitian ini dijumpai 76,5% metastasis otak berasal dari kelompok muda-tua, sedangkan 23,5% sisanya berasal dari kelompok tua. Namun, tidak ada metastasis otak yang dijumpai pada pasien kelompok usia paling tua.¹² Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melaporkan tingkat metastasis ke otak pada *triple negative* yang lebih rendah pada usia tua dibandingkan dengan yang lebih muda (meskipun tidak signifikan).¹²

Hasil penelitian menunjukkan positivitas sebesar 69,2%. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa karsinoma payudara sub tipe *triple negative* umumnya memiliki ILV positif,¹⁴ dan positivitas ILV memberikan informasi prognostik yang signifikan meskipun dengan nilai prediksi terbatas.¹⁵ Selain itu, adanya ILV berkaitan dengan peningkatan risiko metastasis ke kelenjar getah bening aksila dan metastasis jauh yang dapat memprediksi sifat agresif tumor dan prognosis buruk sesuai dengan karakteristik karsinoma payudara *triple negative* dan HER2 *enriched*.¹⁶ Invasi limfovaskuler adalah faktor yang terkait dengan peningkatan risiko kekambuhan.¹⁷

Pada penelitian ini didapatkan *Grading* histopatologis tinggi pada sub tipe *triple negative* yang dikaitkan dengan prognosis buruk. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *grading* histopatologi belum terintegrasi dengan sistem TNM, tetapi terdapat pola yang konsisten antara peningkatan *grading* dan peningkatan angka survival yang buruk.¹⁸ Hal ini diduga berkaitan dengan beberapa karak-

teristik *triple negative* seperti DFS lebih pendek, mitosis tinggi, mutasi p53, deregulasi Rb dan integrin, ekspresi berlebih dari *P-cadherin*, *fascin*, *caveolin 1* dan *2*, *alpha-beta crystallin* dan EGFR serta penurunan ekspresi PTEN.¹⁹

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa karsinoma payudara subtipe HER2 *enriched* memperlihatkan ekspresi PD-L1 tinggi 3,3 kali lebih besar dibanding pada subtipe *triple negative*. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang dijelaskan dengan adanya *cross talk* antara HER2 dan jalur PD-L1.²⁰ Pada beberapa kanker, termasuk sel-sel kanker payudara yang bersifat imunogenik teridentifikasi banyak sekali ligan PD-1 (PD-L1, PD-L2) yang berperan untuk mengikat *immune checkpoint* dan memblokir respon imun.²⁰ Selain jalur pensinyalan berbasis jalur sinyal PD-1/PD-L1, paparan sitokin seperti IFN- γ , IL-4, GM-CSF, kelainan pada pensinyalan EGFR dan perubahan genetik (mutasi PIK3CA) dapat menginduksi ekspresi PD-L1 yang berlebihan pada HER2 *enriched*.^{20,21} Secara khusus tautan-IFN terkait dengan peningkatan regulasi kompleks mayor-histokompatibilitas (MHC-1) dan PD-L1 pada sel karsinoma payudara HER2 *enriched*. Penghambatan pensinyalan HER2 (melalui penonaktifan gen atau penghambatan kinase) mempengaruhi ekspresi PD-L1 dalam berbagai cara pengaturan. Aktivasi PD-L1 juga berhubungan dengan regulasi kompleks yang melibatkan PI3K/PTEN/AKT/mTOR dan faktor transkripsi seperti STAT1, STAT3, HIF, c-Jun dan NF- κ B.^{20,22}

Hasil ini diduga terpengaruh oleh jumlah PD-L1 yang tidak proporsional, sebab ekspresi PD-L1 tertinggi umumnya dijumpai pada subtipe *triple negative* diikuti subtipe HER2 *enriched*.²³ Kehilangan PTEN sering dijadikan dasar teori adanya peningkatan ekspresi PD-L1 yang paling sering ditemukan pada subtipe *triple negative* diikuti HER2 *enriched*.²⁴ Ekspresi PD-L1 yang diatur melalui jalur PI3K/AKT dan/atau RAS/MAPK dapat ditekan oleh kehadiran gen penekan tumor seperti PTEN.²⁵

Pada penelitian ini terlihat kecenderungan bahwa ekspresi TILs intratumoral pada HER2 *enriched* memiliki ekspresi tinggi 2 kali dibanding *triple negative*, namun secara statistik menunjukkan perbedaan tidak bermakna. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa keberadaan TILs ini secara khusus dikaitkan dengan prognosis yang lebih baik terutama pada HER2 *enriched*.²⁷ Ekspresi

TILs tinggi secara signifikan berhubungan dengan perpanjangan DFS dan OS.²⁷ Subtipe HER2 *enriched* dikenal lebih imunogenik dibanding dengan subtipe lain, karena sel-sel tumor yang mengekspresikan HER2 dapat berperan sebagai antigen yang dapat merangsang respon sistem imun.²⁶ Sel imun pada TILs antara lain CD8⁺ sitotoksik dan NK memainkan peran prognostik yang relevan pada HER2 *enriched* ditandai dengan ekspresi TILs tinggi.²⁶

Hal berbeda ditemukan pada TILs intrastromal di mana subtipe *triple negative* sedikit lebih tinggi dibanding sampel HER2 *enriched* yang secara statistik menunjukkan perbedaan tidak bermakna. Peningkatan TILs intrastromal berkaitan dengan peningkatan periode *recurrent free survival* (RFS) dengan prognostik lebih baik.²⁶ Ekspresi TILs tinggi pada lingkungan tumor akibat mutasi somatik yang mengarah pada terbentuknya *neo-antigen* dan memperburuk respon imun. Karsinoma payudara *triple negative* cenderung memiliki infiltrat limfositik yang sangat padat (>50%), disebut *lymphocyte predominant breast cancer* (LPBC). Pada karsinoma payudara *triple negative* juga dijumpai infiltrat limfositik intratumoral lebih rendah dibanding infiltrasi limfositik intrastromal.²⁸

Populasi TILs yang utama terdiri dari sel T CD8⁺, sel T CD4⁺ dan sel Treg. Subtipe *triple negative* cenderung memiliki rerata jumlah sel-sel dengan ekspresi FoxP3⁺ yang lebih tinggi dibandingkan dengan subtipe lain. Rasio perbandingan antara sel FoxP3⁺ dengan CD8⁺ tertinggi dijumpai pada tumor *basal-like* dan terendah pada luminal A baik pada intratumoral maupun intrastromal.²⁸ Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan tingkat ekspresi TILs intrastromal tinggi pada subtipe *triple negative* dibanding pada subtipe HER2 *enriched*.²⁹

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan antara nilai rerata TILs intratumoral dan intrastromal pada *triple negative* dan HER2 *enriched*, diduga karena adanya interaksi kompleks antara sel tumor-sel imun pada kanker payudara *triple negative* dan HER2 *enriched* akibat perbedaan imunogenisitas kedua subentitas.³⁰ Peneliti lain menyatakan bahwa perbedaan dapat disebabkan oleh penghitungan TILs intrastromal pada pulasan HE yang lebih mudah dibanding pada TILs intratumoral.⁶ Komponen TILs intratumoral lebih heterogen

dan sulit diamati pada pulasan HE (tanpa menggunakan metode IHK atau imunofluoresensi) dan masih harus dibedakan dari sel-sel kanker. Nilai TILs intrastromal tidak terpengaruh oleh ekspresi dan pola pertumbuhan sarang karsinoma oleh karena TILs intrastromal yang dihitung hanya yang ada pada ruang antar sarang karsinoma.⁶ Sel imun pada karsinoma payudara cenderung menunjukkan rasio sel FoxP3⁺(Treg) terhadap sel T CD8⁺ lebih tinggi pada lingkungan mikrotumor intratumoral. Interaksi Treg dan T CD8⁺ menekan aktivasi fungsi sel T serta menekan proliferasi dan menginduksi apoptosis sel T.^{28,31}

Ekspresi TILs secara keseluruhan berkorelasi dengan ekspresi PD-L1.³² Ada kecenderungan yang kuat bahwa prognosis akan menjadi lebih baik pada pasien karsinoma payudara dengan ekspresi TILs tinggi.³³ Keberadaan sel imun (TILs) secara signifikan dikaitkan dengan DFS yang lebih lama, sedangkan ekspresi PD-L1 sendiri (baik pada sel imun dan sel tumor) menunjukkan nilai prognostik yang tidak bermakna pada kanker payudara.³⁴ Adanya ragam teknis metode penelitian baik teknik imunohistokimia, penerapan algoritma penilaian dan komposisi serta dinamika sistem imun lingkungan tumor menjadi kesulitan untuk menentukan hubungan ekspresi TILs dan PD-L1.³⁴

Kepadatan tinggi baik pada TILs intratumoral maupun intrastromal yang lebih banyak dijumpai pada kelompok usia lebih tua memberikan gambaran prognostik yang baik.³⁵ Meskipun mekanisme peningkatan ekspresi TILs pada kelompok usia yang lebih tua pada pasien *triple negative* dan *HER2 enriched* belum sepenuhnya dapat dijelaskan.³⁶ Temuan ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa karakteristik kedua subtype molekuler pada wanita usia tua dikatakan memiliki sifat yang kurang agresif dengan laju proliferasi rendah.¹²

Sebagian besar karsinoma payudara dengan ekspresi TILs intratumoral dan intrastromal tinggi memiliki ILV positif. Invasi limfovaskuler ini memberikan gambaran prognostik buruk terkait dengan peningkatan risiko metastasis ke kelenjar getah bening aksila, metastasis jauh dan agresivitas tumor.¹⁶ Pada penelitian ini dijumpai *grading* histopatologi tinggi memiliki kepadatan TILs tinggi pula. Kepadatan TILs tinggi merupakan prognostikator pada *triple negative* dan *HER2 enriched*, sebaliknya

grading histopatologi tinggi dikaitkan dengan *survival* yang rendah.^{31,37} Pola konsisten antara angka *survival* yang rendah dan *grading* histopatologi tinggi demikian pula sebaliknya.³⁸ Pada penelitian ini dijumpai ekspresi TILs tinggi pada *grading* histopatologi tinggi. Hal ini diduga karena komposisi TILs terdiri dari limfosit B, sel T CD8⁺ yang tidak fungsional atau Treg,⁵ dan yang diduga sampel penelitian didominasi Treg.³⁹ Peneliti lain menyatakan bahwa sel T seharusnya fungsional, tetapi pada situasi lingkungan mikrotumor sampel menunjukkan disfungsi akibat ligasi PD-1/PD-L1.³¹ Hasil penelitian dapat dibuktikan dengan pemeriksaan menggunakan marker CD8, FOXP3.³⁹ Penelitian sebelumnya menemukan adanya perbedaan bermakna antara ekspresi TILs pada tiap *grading* histopatologi.^{40,41}

KESIMPULAN

Subtipe *triple negative* dan *HER2 enriched* banyak dijumpai pada kelompok usia di atas 40 tahun dengan ILV positif dan *grading* histopatologi tinggi. Ekspresi PD-L1 dan TILs dapat digunakan untuk mendeteksi karsinoma payudara subtipe *triple negative* dan *HER2 enriched*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferley J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S. GLOBOCAN 2018 cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base; 2018;1:11.
2. Lester SC. The breast. In: Kumar VK, Abbas AK, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathology Basis of Disease. 9th Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p1043-70.
3. Trop I, Le Blanc SM, David J, Lalonde L, Tran-Thanh D, Labelle M, et al. Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. Radio Graphics. 2014; 34:1178-95.
4. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Na Q, Yun W, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. Cancer Immunol Res. 2014; 2:361-70.
5. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. J Clin Invest. 2015; 125:3384-91.
6. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations

- by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26:259-71.
7. Zgura A, Galesa L, Bratila E, Anghela R. Relationship between tumor infiltrating lymphocytes and progression in breast cancer. *J Clin Med.* 2018;13:317-20.
 8. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Na Q, Yun W, Harrington S, *et al.* PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:361-70.
 9. Alsaab HO, Sau1 S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise1 K, *et al.* PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations and clinical outcome. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 561.
 10. Alabdulkareem H, Pinchinat T, Khan S, Landers A, Christos P, Simmons R, *et al.* The impact of molecular subtype on breast cancer recurrence in young women treated with contemporary adjuvant therapy. *Breast J.* 2018;24:148-53.
 11. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5:283-98.
 12. Bergen ES, Tichy C, Berghoff AS, RudasM, Dubsy P, Bago-Horvath Z, *et al.* Prognostic impact of breast cancer subtypes in elderly patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157:91-9.
 13. KolečkováM, Kolář Z, Ehrmann J, Kořínková G, Trojanec R. Age-associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2017; 13: 4201-7.
 14. Ahn KJ, Park, Choi Y. Lymphovascular invasion as a negative prognostic factor for triple negative breast cancer after surgery. *Radiat Oncol J.* 2017;35:332-9.
 15. Liao GS, Hsu HM, Chu CH, Hong ZJ, Fu CY, Chou YC, *et al.* Prognostic role of lymphovascular invasion and lymph node status among breast cancer subtypes. *J Med Sci.* 2018;38:54-61.
 16. Ryu YJ, Kang SJ, Cho JS, Yoon JH, Park MH. Lymphovascular invasion can be better than pathologic complete response to predict prognosis in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Medicine.* 2018;97:1-7.
 17. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018;27:95-120.
 18. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecularpathogenesis. *Gen & Dis* 2018: 5:77-106.
 19. Setyawati Y, Rahmawati Y, Widodo I, Ghozali A, Purnomosari D. The Association between molecular subtypes of breast cancer with histological grade and lymph node metastases in Indonesian woman. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19:1263-8.
 20. Padmanabhan R, Kheraldine HS, Meskin N1, Vranic S, Al Moustafa A. Review Crosstalk between HER2 and PD-1/PD-L1 in Breast Cancer: From Clinical Applications to Mathematical Models. *Cancers.* 2020; 636: 1-25.
 21. Vernieri C, Milano M, Brambilla M, Mennitto A, Maggi C, Cona MS, *et al.* Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit Rev Oncol.* 2019; 139: 53-66.
 22. Zerdes I, Matikas A, Bergh J, Rassidakis GZ, Foukakis T. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in Cancer: Biology and Clinical Correlations. *Oncogene.* 2018; 37:4639-61.
 23. Qin T, Zeng YD, Qin G, Xu F, Lu JB, Fang WF, *et al.* High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6:33972-1.
 24. Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in cancer initiation, development and treatment: beyond immune evasion. *Front Oncol.* 2018;386:1-8.
 25. Khan F, Esnakula A, Ricks-Santic LJ, Zafara R, Kanaan Y, Naab T. Loss of PTEN in high grade advanced stage triple negative breast ductal cancers in African American women. *Path-Res and Pract Elsevier.* 2018;214: 673-8.
 26. Griguolo G, Pascual T, Prat A. Interaction of host immunity with HER2-targeted treatment and tumor heterogeneity in HER2-

- positive breast cancer. *J Immun Ther Cancer*. 2019; 90:1-14.
27. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21:687-92.
 28. Yu T, Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance *Chin J Cancer Res*. 2017;29:237-52.
 29. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, *et al*. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer*. 2019;118:41-8.
 30. Romero-Cordoba S, Meneghini E, Sant M, Iorio MV, Sfondrini L, Paolini B, *et al*. Decoding immune heterogeneity of triple negative breast cancer and its association with systemic inflammation. *Cancers*. 2019; 911:1-20.
 31. Li F, Ren Y, Wang Z. Programmed cell death-ligand 1 expression in breast cancer and its association with patients' clinical parameters. *J Cancer Res Ther*. 2018; 14: 150-4.
 32. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, Van der Linden R, Hooijere GKJ, Horlings HM, *et al*. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunol*. 2018;12:1-15.
 33. Lee KH, Kim EY, Yun JS, Park YL, Do SI, Chae SW, *et al*. The prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes and hematologic parameters in patients with breast cancer. *BMC Cancer*. 2018; 938:1-9.
 34. Evangelou Z, Papoudou-bai A, Karpathiou G, Kourea H, Kamina S, Goussia A, *et al*. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinicopathological analysis in women younger than 40 years old. *In Vivo*. 2020; 34: 639-47.
 35. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Perez Gracia JL, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:457-72.
 36. Bai YG, Gao GX, Zhang H, Zhang S, Liu YH, Duan XN, *et al*. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in residual tumors of patients with triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Chinese Med J*. 2020;133:552-60.
 37. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161,708 cases of breast cancer from the SEER program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138: 1048-52.
 38. Takada K, Kashiwagi S, Goto W, Asano Y, Takahashi K, Takashima T, *et al*. Use of the tumor infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment response to combination therapy with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for advanced HER2-positive breast cancer. *J Transl Med*. 2018;16:1-11.
 39. Yoshida K, Okamoto M, Sasaki J, Kuroda C, Ishida H, Ueda K. Anti-PD-1 antibody decreases tumour infiltrating regulatory T cells. *BMC Cancer*. 2020;20:1-10.
 40. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, *et al*. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathol*. 2016;69:25-34.
 41. Noske A, Möbus V, Weber K, Schmatloch S, Weichert W, Köhne CH, *et al*. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the germinal adjuvant intergroup node-positive study. *Eur J Cancer*. 2019;114:76-88.