

Korelasi Ekspresi PD-L1 dengan TILs CD8+ pada Kanker Paru Jenis Karsinoma Bukan Sel Kecil

Erisca Ayu Utami¹, Ika Kartika¹, Suly Auline Rusminan¹, Erial Bahar², Krisna Murti²

¹Departemen Patologi Anatomi, ²Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Rumah Sakit Mohammad Hoesin, Palembang.

Penulis Korespondensi: dr. Ika Kartika, SpPA(K).

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
Rumah Sakit Mohammad Hoesin, Jl. Jend. Sudirman Km 3.5, Palembang 30126

Email: ika.kartika1003@gmail.com eriscaayu@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang

Kanker paru jenis karsinoma bukan sel kecil merupakan kelompok kanker paru epitelial yang terdiri dari adenokarsinoma, karsinoma sel skuamosa (KSS) dan karsinoma sel besar (KSB). Di dalam lingkungan mikrotumor, ikatan PD-L1 dan PD-1 merupakan unsur *immune checkpoint* berperan dalam menekan aktivitas TILs CD8⁺ sehingga mempengaruhi prognosis KPKBSK. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi ekspresi PD-L1 dengan TILs CD8⁺ pada KPKBSK.

Metode

Studi *cross sectional* dilakukan pada kasus KPKBSK yang teregistrasi sejak 1 Januari 2017 sampai 31 Januari 2020 di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya/RSU Dr. Moh. Hoesin Palembang dengan jumlah 24 sampel. Seluruh sampel dipulas menggunakan antibodi PD-L1 dan CD8, kemudian dilakukan penilaian ekspresi PD-L1 pada massa tumor dan kepadatan TILs CD8+ pada area intratumor dan peritumor. Penilaian terhadap korelasi ekspresi PD-L1 dengan TILs CD8 pada KPKBSK dianalisis secara statistik

Hasil

Hanya dua subtipe yaitu adenokarsinoma dan KSS yang ditemukan pada penelitian ini. Adenokarsinoma merupakan subtipe terbanyak (54,1%), sampel kelompok didominasi oleh usia <60 tahun dan merupakan subtipe yang paling banyak mengekspresikan PD-L1 secara kuat (TPS \geq 50%). Tidak terdapat korelasi signifikan antara ekspresi PD-L1 dengan TILs CD8+ pada KPKBSK ($p=0,679$ dan $p=0,826$) namun berdasarkan karakter klinikopatologi ditemukan hubungan signifikan antara PD-L1 dengan stadium penyakit dan antara kepadatan TILs CD8+ intratumor dengan stadium penyakit ($p=0,048$ dan $p=0,017$).

Kesimpulan

Ekspresi PD-L1 positif lebih banyak ditemukan pada subtipe adenokarsinoma dibandingkan dengan KSS. Tidak terdapat korelasi ekspresi PD-L1 dengan kepadatan TILs CD8+ pada KPKBSK.

Kata kunci : ekspresi PD-L1, kanker paru jenis karsinoma bukan sel kecil, kepadatan TILs CD8+

Correlation of PD-L1 Expression with TILs CD8+ in Non-small Cell Carcinoma Lung Cancer

ABSTRACT

Background

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is an epithelial carcinoma of the lung which consists of adenocarcinoma, squamous cell carcinoma (SCC), and large-cell carcinoma (LCC). In a microtumor environment, PD-L1 and PD-1 bonds are immune checkpoints that act in suppressing the activity of CD8⁺ TILs, thus affecting the prognosis of NSCLC. Aims of this study is to determine the correlation between PD-L1 expression with CD8⁺ TILs in NSCLC.

Methods

This was a cross-sectional study of NSCLC registered in Department of Anatomical Pathology Faculty of Medicine University of Sriwijaya/Dr. Moh. Hoesin Palembang Hospital since 1 January 2017 to 31 January 2020 with a total of 24 samples. All samples were immunostained using PD-L1 and CD8 antibodies. PD-L1 expression was assessed in tumor mass and CD8 expression in intratumoral and peritumoral TILs.

Results

Only two subtypes, adenocarcinoma and SCC, were found in this study. Adenocarcinoma was the most frequent subtype (54.1%), sample group is dominated by <60 years old and was the subtype that expressed the PD-L1 most strongly (TPS \geq 50%). There was not significant correlation between PD-L1 expression with CD8+ TILs in NSCLC ($p=0.679$ and $p=0.826$) but based on clinicopathological characteristics, there was a significant relationship between PD-L1 with disease stage and between intratumoral CD8+ TILs density with disease stage ($p=0.048$ and $p=0.017$).

Conclusion

Adenocarcinoma subtype had stronger expression of PD-L1 compared to SCC. There was no correlation between PD-L1 and CD8+ TILs density in NSCLC.

Key words : expression of PD-L1, non small cell lung cancer, density of CD8+ TILs.

PENDAHULUAN

Berdasarkan data dari *American Cancer Society*, jumlah angka kematian karsinoma paru lebih tinggi jika dibandingkan dengan angka kematian yang disebabkan oleh karsinoma payudara, kolon dan prostat.¹ Data GLOBOCAN tahun 2018 menyebutkan bahwa terdapat 1,7 juta kasus akibat karsinoma paru dan sekitar 2.093.876 (11,6%) kasus baru didiagnosis sebagai karsinoma paru.² Di Indonesia, angka kejadian akibat karsinoma paru menduduki urutan ke-8 di Asia Tenggara dan urutan ke-23 di Asia.³

Secara klinis karsinoma paru terbagi menjadi kanker paru jenis karsinoma sel kecil (KPKSK) atau *small cell lung carcinoma* dan kanker paru jenis karsinoma bukan sel kecil (KPKBSK) atau *non small cell lung cancer*.⁴ Kanker paru jenis karsinoma bukan sel kecil adalah kelompok karsinoma epitelial paru yang terdiri dari tiga tipe histologi yaitu adenokarsinoma, karsinoma sel skuamosa (KSS) dan karsinoma sel besar (KSB).^{1,4} Diantara tipe-tipe histologi karsinoma paru, adenokarsinoma merupakan tipe histologi paling banyak angka kejadiannya di seluruh dunia melebihi KSS.^{5,6}

Sistem imun memainkan peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel tumor. *Programmed death ligand 1* (PD-L1) juga dikenal sebagai B7-H1/CD274 memainkan peran integral dengan reseptornya yaitu *programmed death-1 receptor* (PD-1) dalam mengurangi dan menghambat aktivasi sel T sehingga mengakibatkan penurunan regulasi dari respon imun terhadap tumor.⁷ Ekspresi PD-L1 dalam sel tumor telah dilaporkan secara signifikan terkait dengan *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs), hal ini menunjukkan bahwa lingkungan mikrotumor memiliki peran dalam perkembangan sel tumor.⁸ Penelitian mengenai ekspresi PD-L1 dikombinasikan dengan TILs CD8⁺ pada KPKBSK telah dilakukannya oleh Tokito dkk pada tahun 2015, membuktikan bahwa kurangnya ekspresi PD-L1 dan banyaknya TILs CD8⁺ secara signifikan berhubungan dengan faktor prognostik yang menguntungkan.⁹ Penelitian lain yang dilakukan oleh Yangwei dkk tahun 2017 menyebutkan bahwa ekspresi PD-L1 yang tinggi dihubungkan dengan prognostik baik di mana memiliki terapi tambahan berupa imunoterapi.⁴

Berbagai hasil penelitian di atas menunjukkan kontradiksi mengenai ekspresi PD-L1

sebagai faktor prognostik. Oleh karena itu pada penelitian ini, menilai ekspresi PD-L1 dengan kepadatan TILs CD8⁺ untuk melihat nilai prognostik yang lebih kuat, dibandingkan hanya menilai ekspresi PD-L1 saja.^{10,11}

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian uji korelasi dengan desain potong lintang (*cross sectional*) pada sediaan yang telah didiagnosis dan ditelaah ulang sebagai kelompok dari KPKBSK di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya/RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang terdaftar pada periode 1 Januari 2017-31 Januari 2020.

Sampel

Sampel penelitian ini berasal dari preparat hematoksilin-eosin (HE) yang telah didiagnosis secara histopatologik sebagai kelompok KPKBSK dan pada kasus sulit atau memiliki diagnosis banding telah dibuktikan dengan pemeriksaan imunohistokimia. Pengambilan sampel menggunakan tehnik *total sampling* kemudian didapatkan sampel penelitian sebanyak 24 sampel.

Pewarnaan

Pada seluruh sampel penelitian dilakukan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi primer monoklonal mouse Anti-Human PD-L1 *Clone 22C3* DAKO code M3653 menggunakan PH 9, pengenceran 1/10 dengan inkubasi *overnight* dan antibodi kedua yaitu monoklonal mouse Anti-Human CD8 *Clone 144B* RTU code IS62330-2 dengan inkubasi selama 1 jam.

Penilaian ekspresi PD-L1 berdasarkan TPS. *Tumor proportion score* (TPS) adalah persentase sel tumor yang viabel menunjukkan membran sel tumor terwarnai parsial atau komplit (\geq skor1+) terhadap semua sel tumor yang viabel pada sampel (positif dan negatif). Tingkat ekspresi TPS dibagi menjadi <1% ekspresi negatif, \geq 1-49% ekspresi positif dan \geq 50% ekspresi positif kuat. Awalnya penilaian dilakukan dengan perbesaran lemah (40x) untuk memilih 4 fokus area tumor yang mengekspresikan PD-L1. Selanjutnya dengan perbesaran kuat (400x) masing-masing fokus dihitung

dan dijumlahkan kemudian dibagi 4 untuk menentukan TPS.

Penilaian ekspresi CD8 terlihat pada pulasan membran dan sitoplasma sel. Penelitian dilakukan dengan cara menghitung jumlah infiltrasi limfosit T sitotoksik pada area intratumor dan peritumor dengan intensitas lemah-kuat pada membran sel, yaitu pada daerah yang diinfiltrasi paling padat sel limfosit. Awalnya penilaian dilakukan dengan perbesaran lemah (40x) untuk memilih 5 fokus area kepadatan limfosit yang tertinggi. Selanjutnya dengan perbesaran kuat (400x) masing-masing fokus dihitung menggunakan aplikasi *Image J* kemudian hasil yang didapat dibagi 5 untuk menentukan nilai mean.

Analisa Data

Data dianalisis menggunakan SPSS versi 23.0 dengan uji korelasi yaitu uji *Pearson* untuk data yang terdistribusi normal dan uji *Spearman* pada data yang terdistribusi tidak normal. Selain itu pada penelitian ini juga dievaluasi ada tidak nya hubungan dengan karakter klinikopatologik yaitu menggunakan uji *Chi-Square* dan *t-test*.

HASIL

Analisis deskriptif dilakukan untuk menentukan proporsi subjek penelitian berdasarkan karakter klinikopatologik meliputi usia, jenis kelamin, stadium penyakit dan subtipe histologik. Hasil analisis menunjukkan bahwa distribusi berdasarkan usia paling banyak ditemukan pada usia <60 tahun yaitu sebanyak 13 kasus (54,1%), dengan usia termuda 32 tahun dan usia tertua 72 tahun. Adenokarsinoma adalah kelompok terbanyak yaitu sebanyak 13 kasus (54,1%) sedangkan sisanya KSS 11 kasus (45,8%). Subjek penelitian lebih banyak berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 20 orang (83,3%) tidak berbeda antara kelompok adenokarsinoma dan KSS. Dari sampel penelitian mayoritas pasien berada pada stadium IV yaitu sebanyak 16 kasus (66%) di mana subtipe adenokarsinoma lebih banyak dibanding KSS sedangkan sisanya adalah pasien dengan stadium III yang berjumlah 8 kasus (33%) (Tabel 1).

Tabel 1. Karakter klinikopatologik.

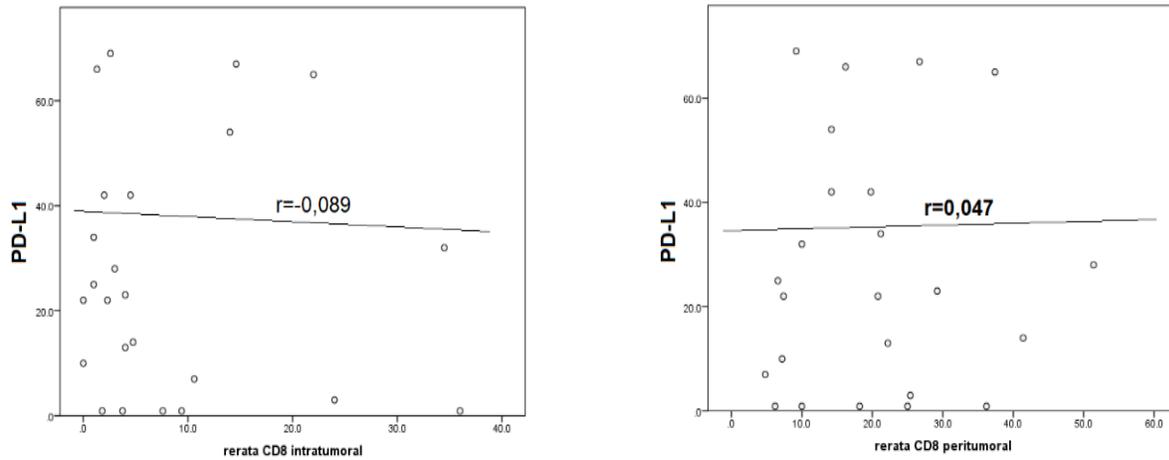
Karakter klinikopatologik	N	%
Usia		
<60 tahun	13	54,1%
≥60 tahun	11	45,8%
Jenis kelamin		
Laki-laki	20	83,3%
Perempuan	4	16,7%
Stadium Penyakit		
I	0	0
II	0	0
III	8	33,3%
IV	16	66,7%
Subtipe histologik		
Adenokarsinoma	13	54,1%
KSS	11	45,8%
KSB	0	0

Tabel 2 menunjukkan korelasi antara PD-L1 dengan TILs CD8+ intratumoral dan peritumoral. Berdasarkan uji *Pearson* dan *Spearman* yang digunakan didapatkan hasil korelasi yang tidak signifikan. Nilai p dianggap bermakna jika $p < 0.05$ ($p = 0,005$), selain itu uji korelasi ini juga melihat melihat arah dan kekuatan korelasi nilai r. Korelasi PD-L1 dengan TILs CD8 intratumor memiliki nilai r -0,089 ($p = 0,679$) nilai r negatif menunjukkan terdapat arah korelasi terbalik atau berlawanan yaitu jika ekspresi PD-L1 meningkat maka TILs CD8+ intratumor menurun. Begitupun korelasi PD-L1 dengan TILs CD8+ peritumor memiliki nilai r 0,047 ($p = 0,826$) yaitu nilai r positif memiliki korelasi yang searah. Semakin meningkat ekspresi PD-L1 maka semakin meningkat TILs CD8+ peritumor namun jika dikaitkan dengan nilai p keduanya tidak memiliki hubungan yang signifikan ($p = 0,679$ dan $p = 0,826$). (Grafik 1) Berikut ini lampiran panduan interpretasi hasil uji hipotesis dalam menggunakan uji korelasi (Tabel 3).

Tabel 2. Uji korelasi ekspresi PD-L1 dengan CD8

Hubungan korelasi	PD-L1	
	***r	P
TILCD8+ Intratumor	-0,089	*0,679
TILCD8+ Peritumor	0,047	**0,826

*Uji *Spearman Corelation*, $p < 0,05$, **Uji *Pearson Corelation* $p < 0,05$.



Grafik 1. Korelasi PD-L1 dengan TILCD8+ intratumor dan peritumor.

Tabel 3. Panduan interpretasi hasil uji hipotesis.

No	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan korelasi (<i>r</i>)	0,0 s/d <0,3 0,3 s/d <0,7 >0,7	Lemah Sedang Kuat
2	Nilai <i>p</i>	<i>p</i> < 0,05 <i>p</i> > 0,05	Terdapat korelasi bermakna Antara dua variabel yang diuji Tidak terdapat korelasi bermakna antar dua variabel yang diuji
3	Arah korelasi	+ (positif) - (negatif)	Searah, semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lain Berlawanan arah, semakin besar nilai satu variabel semakin kecil pula nilai variabel lain

s/d : sampai dengan

Tabel 4 melakukan penilaian hubungan PD-L1 terhadap karakter klinikopatologik meliputi usia, jenis kelamin, stadium penyakit dan subtipe histologik yang menggunakan Uji *Chi-Square*, nilai *p* signifikan jika <0,05. Dari penilaian tersebut didapatkan bahwa hubungan antara PD-L1 dengan usia, jenis kelamin dan subtipe histolo-

gik menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Hanya stadium penyakit yang memiliki hubungan signifikan (*p*=0,048). (Tabel 4).
 *Hanya tabel dengan hasil signifikan yang dilampirkan, karena terbatasnya jumlah tabel yang disajikan.

Tabel 4. Hubungan ekspresi PD-L1 dengan stadium penyakit.

Karakter klinikopatologik	Ekspresi PD-L1			P value
	Negatif <1%	Positif >1-49%	Positif kuat ≥50%	
Stadium penyakit				
Stadium III	-	7 (87,5%)	1 (12,5%)	<i>p</i> =0,048
Stadium IV	5 (31,3%)	7 (43,8%)	4 (25%)	
Total	5 (20%)	14 (60%)	5 (20%)	

*Uji *Chi-square*

Tabel 5 menilai hubungan antara kepadatan TILs CD8+ intratumor dan peritumor terhadap karakter klinikopatologik meliputi usia, jenis kelamin, stadium penyakit dan subtipe histologik dengan menggunakan uji *t-test*. Uji tersebut menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara TILs CD8+ terhadap usia,

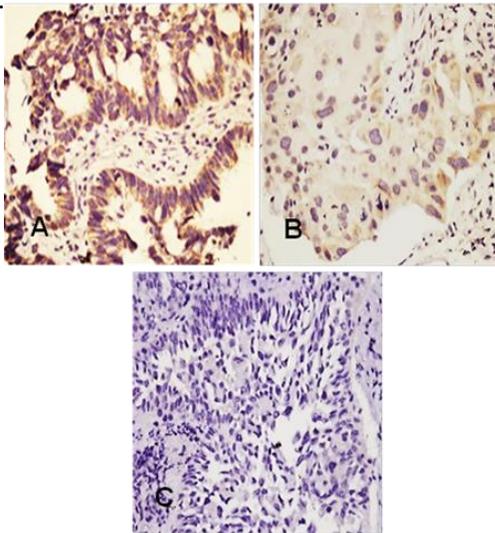
jenis kelamin dan subtipe histologik. Pada analisis ini hanya ditemukan hubungan yang signifikan antara TILs CD8+ intratumor dengan stadium penyakit (*p*=0,017). (Tabel 5).
 *Hanya tabel dengan hasil signifikan yang dilampirkan, karena terbatasnya jumlah tabel yang disajikan.

Tabel 5. Hubungan antara kepadatan TILs CD8+ terhadap stadium penyakit

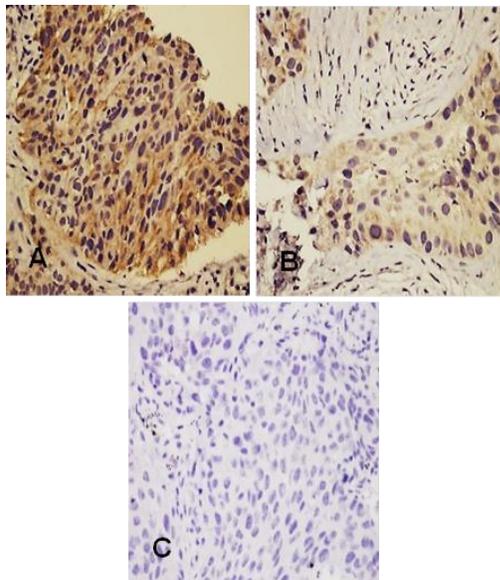
Karakter klinikopatologik	Ekspresi CD8			
	Intratumor	*p value	Peritumor	*p value
Stadium penyakit				
Stadium III	12,5 (6,6-41,4)	p=0,017	18,62±12,35	p=0,997
Stadium IV	19 (4,8-51,4)		20,74±12,73	

*Uji *t-test*

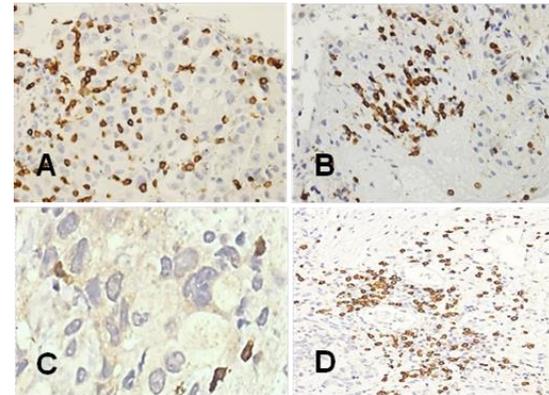
Gambaran ekspresi PD-L1 pada membran sel tumor dengan intensitas pewarnaan lemah sampai kuat baik komplit atau parsial melalui pemeriksaan imunohistokimia. (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Ekspresi PD-L1 pada Adenokarsinoma. A. TPS ≥50% (B) TPS ≥1-49%. (C). TPS <1%. (Pembesaran 400x).



Gambar 2. Ekspresi PD-L1 pada KSS A. TPS ≥50% (B) TPS ≥1-49%. (C). TPS <1%. (Pembesaran 400x).



Gambar 3. Kepadatan TILs CD8+ pada adenokarsinoma (A&B) dan KSS (C&D). A. Kepadatan TILsCD8+ intratumor dengan rerata 36. B. Kepadatan TILCD8+ peritumor dengan rerata 25. C. Kepadatan TILsCD8+ intratumor dengan rerata 3. D. Kepadatan TILsCD8+ peritumor dengan rerata 51. (Pembesaran 400x)

DISKUSI

Berdasarkan kelompok usia, KPKBSK terbanyak pada kelompok usia <60 tahun yaitu sebanyak 13 kasus (54,1%) dan usia ≥60 tahun sebanyak 11 kasus (45,8%). Pembagian kelompok usia pada penelitian ini berdasarkan mayoritas terjadinya karsinoma paru pada usia tua dengan insidensi tersering diatas usia 60 tahun yang hampir sama di seluruh dunia.¹²

Usia dianggap mempengaruhi faktor prognosis di mana kelompok usia penderita diatas 60 tahun memiliki faktor prognosis yang kurang baik. Hal tersebut disebabkan pasien dengan usia muda cenderung memiliki respon yang lebih baik terhadap pengobatan khususnya kemoterapi jika dibandingkan pada pasien dengan usia lebih tua namun untuk memastikan prognosis harus dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melihat data *overall survival* dan *disease free survival*.^{13,14}

Berdasarkan WHO jenis kelamin merupakan salah satu faktor prognostik, di mana jenis kelamin laki-laki merupakan salah satu indikator prognostik yang kurang baik pada KPKBSK, walaupun tidak semua penelitian menunjukkan hasil signifikan.^{12,15} Ignasius dkk

melakukan penelitian retrospektif pasien-pasien yang berasal dari Asia, menyatakan bahwa jenis kelamin perempuan memiliki prognosis yang lebih baik dikarenakan perbedaan biologis dan pengaruh hormonal (estrogen) yang terjadi. Adanya perbedaan mutasi antara etnis Asia dan *Caucasian* di jelaskan pada penelitian Wei Zhou dkk dan David dkk, penelitian tersebut menyebutkan perbedaan mutasi EGFR dan KRAS berperan penting pada kedua Etnis tersebut. Pasien etnis Asia lebih sering mengalami mutasi EGFR dibanding *Caucasian* dengan prevalensi 47% vs 13% sedangkan mutasi KRAS lebih sering terjadi pada etnis *Caucasian* dengan prevalensi 26% vs 16%. Hal tersebut dikaitkan dengan pengobatan *tyrosine kinase inhibitor* (TKI) yang memiliki respon terhadap pasien dengan mutasi EGFR.^{16,17}

Stadium penyakit merupakan salah satu faktor prognosis yang menentukan angka ketahanan hidup pasien karsinoma paru. Penelitian Xia dkk menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 yang positif, lebih banyak pada pasien dengan stadium lanjut yang telah terjadi metastasis. Hal tersebut menjelaskan terjadinya proses *immunoediting* khususnya fase *escape* di mana aktivasi dari jalur PD-1 dan PD-L1 menyebabkan sel tumor menghindari dari sistem imun sehingga metastasis dengan cepat dapat terjadi.^{18,19}

Subtipe histologi KPKBSK terbanyak pada penelitian ini adalah adenokarsinoma yaitu sebanyak 13 kasus (54.2%). Beberapa penelitian menyatakan bahwa tidak ada perbedaan prognosis secara signifikan antara adenokarsinoma dengan KSS namun apabila dilihat dari OS pada kedua subtipe tersebut maka subtipe adenokarsinoma memiliki *longer progression-free survival*. Perbedaan *survival* tersebut dikatakan pada penelitian Kawase dkk disebabkan oleh perbedaan latar belakang pasien seperti mutasi, faktor genetik dan agresivitas massa tumor.²⁰

Korelasi Ekspresi PD-L1 dengan TILs CD8+

Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat korelasi antara PD-L1 dengan TILs CD8+. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan Gen lin dkk juga menyatakan bahwa tidak terdapat korelasi signifikan antara PD-L1 dan TILs CD8+ serta penelitian tersebut tidak mendukung kombinasi kedua penanda tersebut untuk digunakan sebagai faktor prognostik pada

KPKBSK.⁷ Hasil penelitian yang tidak signifikan dapat disebabkan akibat keterbatasan dalam penelitian seperti, jumlah sampel yang terlalu kecil, kesulitan dalam menilai ekspresi PD-L1 dan sedikitnya TILs yang dapat dievaluasi pada jaringan biopsi yang berukuran kecil serta penggunaan klon PD-L1 yang bervariasi dalam setiap penelitian. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk menentukan antibodi yang tepat dan disesuaikan dengan perubahan molekular yang terjadi pada karsinoma paru.⁷

Penilaian antara rerata kepadatan TILs CD8+ intratumor dan peritumor dilakukan pada area paling padat, penilaian dilakukan pada 2 hingga 5 lapang pandang area dan dibagi berdasarkan jumlah area yang didapat. Adanya jumlah area penilaian yang berbeda disebabkan oleh terdapat beberapa sampel biopsi yang berukuran kecil sehingga sulit untuk menilai infiltrasi sel limfosit. Walaupun tidak signifikan, hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan antara rerata kepadatan TILs CD8+ intratumor dan peritumor di mana rerata kepadatan TILs CD8+ peritumor lebih tinggi. Hal tersebut dikaitkan dengan sedikitnya jumlah area penilaian pada CD8 intratumor yang tidak memenuhi 5 lapang pandang area pada penelitian ini. Hasil penelitian Bapista dkk juga menunjukkan kepadatan TILs CD8+ lebih banyak ditemukan pada peritumor dibanding intratumor. Hal tersebut dikarenakan fungsi TILs CD8+ peritumor masih belum terganggu sehingga dapat melindungi sel inang dari perkembangan kanker. Sebaliknya, fungsi TILs CD8+ intratumor telah berkurang dengan adanya massa tumor dan ikatan PD-1 dan PD-L1 yang membuat sel T menjadi inaktif.^{22,24} Sel-sel limfosit pada area intratumor merupakan sel-sel sitotoksik yang bertugas langsung menghancurkan sel tumor sedangkan sel-sel sitotoksik di area peritumor dipercaya bekerja dengan cara mengeluarkan sitokin untuk menginduksi sel-sel tumor yang mengalami *senescence* dan berperan penting dalam menghambat proliferasi sel tumor. Kepadatan TILs CD8+ peritumor juga dihubungkan dengan faktor prognostik dan efektivitas terhadap pengobatan.^{25,26} Kemungkinan adanya disfungsi dari sel T juga dapat terjadi pada area intratumor, hal ini dijelaskan pada penelitian Joel dkk di mana terdapat banyak mekanisme molekular dan selular yang berkontribusi dalam disfungsinya sel T atau kegagalan sel T dalam menghancurkan sel

tumor. Literatur ini menjelaskan sifat sel T dalam lingkungan mikrotumor yaitu seperti sel T anergi, sel T *exhaustion*, *senescence* dan *stemness*.²⁷

Sel T anergi terjadi akibat hanya terdapat satu sinyal yang mengenal antigen sehingga tidak teraktivasi menjadi sel T efektor.²⁸ Sedangkan sel T *exhaustion*/lelah, diartikan sebagai sel T efektor yang mengalami penurunan fungsi dalam mensekresikan sitokin, kehilangan fungsi efektor dan resisten terhadap reaktivasi. Tahap lelahnya sel T dapat terjadi akibat proses aktivasi yang berulang-ulang akibat manipulasi yang dilakukan oleh sel tumor dalam mengekspresikan ligan PD-L1 yang kemudian akan ditangkap oleh reseptor PD-1 hingga akhirnya sel T menjadi kelelahan dan sel tumor berproliferasi.^{26,30}

Sel T *senescence*/penuaan, secara fisiologis dapat terjadi akibat proses dari sel yang lelah ditandai dengan pemendekan telomer dan perubahan fenotip (kehilangan ekspresi CD28) serta penghentian pada siklus sel. Pemendekan telomer mengakibatkan sel cepat menua dan perubahan fenotip mengakibatkan sel T tidak dapat menghancurkan sel tumor.^{27,30}

Sebagai kesimpulan, adanya sel T anergi, *exhaustion* dan *senescence* dapat mengganggu kemampuan sel T untuk mengeliminasi sel tumor. Mungkin lebih rendahnya kepadatan sel T intratumor berhubungan dengan salah satu mekanisme diatas atau kombinasi. Sehubungan dengan hal ini pada penelitian yang akan datang sebaiknya ditambahkan *marker* untuk melihat kemungkinan tersebut antara lain PD-1, CTLA-4, LAG3, CD160.²⁷

Hubungan antara Ekspresi PD-L1 dengan Karakter Klinikopatologik

Hasil yang signifikan pada penelitian ini hanya ditemukan pada hubungan ekspresi PD-L1 dengan stadium penyakit. Penelitian ini didukung oleh Tang dkk dan Haiyue Wang dkk yang menyatakan ekspresi PD-L1 yang positif terlihat pada tumor dengan stadium lanjut.^{25,30} Hal ini dikaitkan dengan invasi sel tumor ke jaringan sekitarnya akibat berkurangnya beberapa rantai laminin ($\alpha 3$ dan $\alpha 5$).³⁰ Laminin sendiri berfungsi dalam mengatur interaksi yang terjadi pada membran basal satunya transisi sel tumor ke jaringan mesenkimial. Sel tumor mengalami perubahan fenotip dan

didukung oleh berbagai mutasi yang terjadi sehingga dapat menstimulasi ekspresi PD-L1, hal tersebut memainkan peran penting dalam terjadinya metastasis. Adanya proses metastasis ini menyebabkan meningkatnya stadium dan ber-kurangnya harapan hidup.²⁸

Ekspresi PD-L1 positif paling banyak terlihat pada subtype adenokarsinoma, karena angka mutasi cukup tinggi seperti adanya mutasi TP53, KRAS, EGFR, BRAF, ROS1 dan fusi RET serta fusi gen ALK juga relatif lebih sering terjadi pada adenokarsinoma dibanding KSS.^{21,22}

Adapun ekspresi PD-L1 negatif pada sel tumor, baik pada subtype adenokarsinoma maupun KSS, serupa dijumpai pada penelitian Ribas dkk. Penelitian mereka menyebutkan, ekspresi negatif dipengaruhi dua faktor. Faktor pertama dikarenakan tidak adanya sel T atau sel imun yang menginfiltrasi pada area tumor maupun sekitar tumor sehingga tidak ada sel T yang teraktivasi untuk menginduksi ekspresi PD-L1 pada sel tumor. Faktor kedua hilangnya reseptor IFN γ , seperti diketahui IFN γ memiliki banyak efek lain yang dapat merusak sel tumor, kemungkinan adanya proses *immunoediting* dapat mengakibatkan hilangnya sinyal dari reseptor IFN γ yang menyebabkan ketidakmampuan untuk menginduksi ekspresi PD-L1.^{28,29}

Hubungan antara Kepadatan TILs CD8+ dengan Karakter Klinikopatologik

Berdasarkan penelitian diatas kepadatan TILs CD8⁺ tidak memiliki hubungan dengan sebagian besar karakter klinikopatologik yang diteliti namun TILs CD8⁺ dipercaya memiliki nilai faktor prognosis meskipun beberapa penelitian masih menganggap kontroversi. Penelitian Haiyu dkk dan Shota dkk menyatakan bahwa TILs CD8⁺ intratumor tidak dikaitkan dengan faktor prognosis melainkan TILs CD8⁺ peritumor yang dikaitkan dengan prognosis dan terjadinya rekurensi massa tumor.^{25,26} Penelitian tersebut menyebutkan semakin tinggi kepadatan TILs CD8⁺ peritumor maka prognosis akan semakin baik dan berkurangnya kejadian rekurensi.²⁶

Penelitian ini memiliki keterbatasan serta kelemahan, seperti jumlah sampel yang terlalu kecil karena sedikitnya jumlah kasus karsinoma paru yang dilakukan tindakan pembedahan, masih banyaknya tumor dengan diagnosis banding sehingga tidak memenuhi kriteria penerimaan. Tidak adanya kasus KSB

yang dapat dijadikan sampel penelitian, penggunaan antibodi PD-L1 yang kurang tepat sehingga kesulitan untuk menilai ekspresi PD-L1 yang terpulas lemah pada sel tumor. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kualitas sediaan yang kurang baik serta pulasan yang masih dilakukan secara manual dan belum sesuai standar yang sudah ditetapkan. Dibutuhkan alat seperti *autostainer* dan *enhancer* untuk penggunaan antibodi klon 22C3 dari perusahaan DAKO, yang mana diharapkan adanya alat-alat tersebut dapat mengekspresi PD-L1 secara kuat dan lebih spesifik pada membran sel tumor.

KESIMPULAN

Adenokarsinoma merupakan subtype terbanyak dan paling kuat mengekspresikan PD-L1. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat korelasi antara PD-L1 dengan TILs CD8+ kemungkinan akibat sedikitnya jumlah kasus serta adanya disfungsi sel T. Rerata kepadatan TILs CD8+ area peritumor sedikit lebih tinggi jika dibandingkan area intratumor namun tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pawelczyk K, Piotrowska A, Ciesielska U, Jablonska K, Glatzel PN, Grzegorzolka J, *et al.* Role of PD-L1 expression in non small cell lung cancer and their prognostic significance according to clinicopathological factors and diagnostic markers. *Inj J Mol Sci.* 2019; 20: 6-19.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomotaram I, Siegel R, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394-424.
3. Angka Kejadian Kanker di Indonesia (Online). 2019 July 11 (cited 2018 Jan 31); Available from; URL:<http://www.kemkes.go.id>
4. Zappa C, Mousa SA. Non small cell lung cancer:current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5: 288-300.
5. Cooper T, Christina V, Sandra A, Jennifer H, Lisa G, Scolyer H, *et al.* PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *J Lung Cancer.* 2015; 5: 1-32.

6. Weinberger SE, Corkrill BA, Mandel J. Principles of pulmonary medicine. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2019. p 258-68.
7. Tokito T, Azuma K, Kawahara A, Ishii H, Yamada K, Matsuo N, *et al.* Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TILs density in stage III non small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer.* 2015; 2016(55): 7-14.
8. Shimizu K, Okita R, Saisho S, Maeda A, Nojima Y, Nakata M. Comparative study of the PD-L1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte between surgically resected and matched re-biopsy specimens in recurrent non-small cell lung cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2019; 15: 605-12.
9. Fumet JD, Richard C, Ledys F, Klopfenstein Q, Joubert P, Routhy B, *et al.* Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *Br J Cancer.* 2018; 119: 950-60.
10. Shimizu K, Okita R, Saisho S, Maeda A, Nojima Y, Nakata M. Comparative study of the PD-L1 expression and CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte between surgically resected and matched re-biopsy specimens in recurrent non-small cell lung cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2019; 15: 605-12.
11. Guindy DM, Helal DS, Sabry NM, Nash MA. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression combined with CD8 tumor infiltrating lymphocytes density in non-small cell lung cancer patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2018; 30: 125-31.
12. Travis WD, Noguchi M, Yatabe Y, Brambilla E, Nicholson AG, Aisner SC, *et al.* Adenocarcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Lyon: IARC; 2015. p 26-43.
13. Kozielsk J, Kaczmarczyk1G, Porebska I, Szmygin K, Gotecki M. Lung cancer in patient under the age of 40 years. *Wspokzesna Onkol.* 2012; 16: 413-5.
14. Zhou Fei, Zhou C. Lung cancer in never smokers the east asian experience. *Transl Lung Cancer Res.* 2018; 7: 450-63.
15. Elguindy DM, Helal D, Sabry N, Abo M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression combined with CD8 tumor

- infiltrating lymphocyte density in non small cell lung patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2018; 30: 125-131.
16. Ignatius S, Ziogas A, Zell J. Survival in non small cell lung cancer (NSCLC) and is independent of smoking status. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 1083-93.
 17. Wei Z, David C. East meets west: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviours of lung cancer between east Asians and Caucasians. *Chin J Cancer.* 2011; 30: 287-92.
 18. Bremnes RM, Busund LT, Kilv er TL, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, *et al.* The role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer. *IASLC.* 2016; 11: 789-800.
 19. Zeng D, Fang Y, Yun Q, Gen H, Miao C, Yin X, *et al.* Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patient with non small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016; 12: 13765-81.
 20. Kawase A, Yoshida J, Ishi G, Nakao M, Aokage K, Hishida T, *et al.* Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal. *Jpn J Clin Oncol.* 2012; 42: 189-95.
 21. Hsu PC, Jablons DM, Yang CT, You L. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, yes-Associated Protein (YAP) and the regulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 1-19.
 22. Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, Su J, Xie Z, Liu S-Y, *et al.* Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016; 23: 3012-24.
 23. Sabari JK, Santini F, Bergagnini I, Lai WV, Arbour KC. Changing the therapeutic landscape in non-small cell lung cancers: the evolution of comprehensive molecular profiling improves access to therapy. *Curr Oncol. Rep.* 2017; 19: 1-8.
 24. Bapista M, Sarian L, Pinto G, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.* 2016; 47: 78-84.
 25. Wang H, Li Z, Dong B, Sun W, Yang X, Liu R, *et al.* Prognostic significance of PD-L1 expression and CD8+ T cell infiltration in pulmonary neuroendocrine tumors. *Diagn Pathol.* 2018; 5: 1-10.
 26. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Sonoda T, Ogi K, Miyakawa A, *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2019; 8: 80-93.
 27. Crespo J, Sun H, Welling T, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25: 214-21.
 28. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Canada: Elsevier; 2014. p 199-231.
 29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology function and disorders of the immune system. 5th ed. Canada: Elsevier; 2016. p 10-42.
 30. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present and future. *J Clin Invest.* 2015; 125: 3384-91.