



INTISARI SAINS MEDIS

Published by Intisari Sains Medis



CrossMark

Hubungan antara *Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) dengan ekspresi *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik sub tipe *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2) enriched di RSUP Sanglah, Bali, Indonesia

Popi Imelda Margareth Sitompul^{1*}, Herman Saputra¹, Luh Putu Iin Indrayani Maker¹,
I Gusti Ayu Sri Mahendra Dewi¹, Ni Putu Sriwidyani¹, I Made Muliarta²

ABSTRACT

Background: Breast cancer is the most common malignancy cancer in women. This malignancy is molecularly heterogeneous, where overexpression of the HER-2 growth factor receptor generally has a more aggressive nature. The role of immune system interaction, namely Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) expression, is associated with prognostic and predictive factors. Therefore, this study aims to investigate the association between stromal TIL with PD-L1 expression in invasive breast carcinoma non-specific type HER-2 enriched subtype.

Methods: This study was an observational analytical study with cross-sectional design from January 1st 2015 to December 31st 2019. The samples were taken from a paraffin block of patients with invasive breast carcinoma non-specific type, that has performed histopathological examination, ER, PR, HER-2 and FISH/CISH immunohistochemistry examination at the

Anatomical Pathology Laboratory of Sanglah Hospital Denpasar. The samples obtained were stained with PD-L1 immunohistochemistry. The preparation was evaluated to assess TIL. Data were analyzed using SPSS version 20 for Windows.

Results: The study found a statistically significant association between stromal TIL with PD-L1 expression in tumor cells ($p = 0.018$). There is statistically significant association between stromal TIL with PD-L1 expression in TIL ($p = 0.001$). There is statistically significant association between stromal TIL with PD-L1 expression in total tumor cells and TIL ($p = 0.007$) in invasive breast carcinoma non-specific type HER-2 enriched subtype at Sanglah Hospital, Denpasar.

Conclusion: In conclusion, there is an association between stromal TIL with the expression of PD-L1 in tumor cells and TIL in invasive breast carcinoma non-specific type HER-2 enriched subtype.

Keywords: HER-2 enriched, breast carcinoma, PD-L1, TIL.

Cite This Article: Sitompul, P.I.M., Saputra, H., Maker, L.P.I.I., Dewi, I.G.A.S.M., Sriwidyani, N.P., Muliarta, I.M. 2021. Hubungan antara *Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) dengan ekspresi *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik sub tipe *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2) enriched di RSUP Sanglah, Bali, Indonesia. *Intisari Sains Medis* 12(2): 543-550. DOI: [10.15562/ism.v12i2.1021](https://doi.org/10.15562/ism.v12i2.1021)

ABSTRAK

Latar Belakang: Kanker payudara merupakan keganasan tersering pada wanita. Keganasan ini bersifat heterogen ditinjau dari aspek molekuler, dimana overekspresi HER-2 umumnya memiliki sifat yang lebih agresif. Peranan sistem imun, yakni ekspresi *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) dan *Programmed Death-Ligand 1* (PDL-1) dihubungkan dengan faktor prognostik. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan

untuk mengevaluasi hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik sub tipe HER-2 enriched.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan studi potong lintang mulai dari 1 Januari 2015 sampai 31 Desember 2019. Sampel adalah blok parafin penderita karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik yang telah

¹Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, RSUP Sanglah, Bali, Indonesia;

²Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Bali, Indonesia;

*Korespondensi:

Popi Imelda Margareth Sitompul;
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran,
Universitas Udayana, RSUP Sanglah, Bali, Indonesia;
poppyimsitompul@gmail.com

Diterima: 08-04-2021
Disetujui: 26-07-2021
Diterbitkan: 10-08-2021

dilakukan pemeriksaan histopatologi, imunohistokimia ER, PR, HER-2 dan FISH/CISH di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Sanglah Denpasar. Sampel yang diperoleh dilakukan pulasan imunohistokimia PD-L1. Preparat sampel digunakan untuk menilai TIL. Data dianalisis dengan SPSS versi 20 untuk Windows.

Hasil: Pada penelitian ditemukan hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor ($p=0,018$). Terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada TIL ($p=0,001$).

Kata kunci: HER-2 *enriched*, karsinoma payudara, PD-L1, TIL.

Sitasi Artikel ini: Sitompul, P.I.M., Saputra, H., Maker, L.P.I.I., Dewi, I.G.A.S.M., Sriwidayani, N.P., Muliarta, I.M. 2021. Hubungan antara *Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) dengan ekspresi *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtipe *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2) *enriched* di RSUP Sanglah, Bali, Indonesia. *Intisari Sains Medis* 12(2): 543-550. DOI: [10.15562/ism.v12i2.1021](https://doi.org/10.15562/ism.v12i2.1021)

Terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL ($p=0,007$) pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtipe HER-2 *enriched* di RSUP Sanglah Denpasar.

Kesimpulan: Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat hubungan bermakna antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 sel tumor dan TIL pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtipe HER-2 *enriched*.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker pada wanita yang paling sering didiagnosis dan dengan jumlah kasus baru tertinggi maupun jumlah kematian yang besar.¹ Prevalensi kanker payudara di Indonesia tahun 2013 mencapai 0,5 per 1.000 orang perempuan, sedangkan prevalensi kanker payudara di Provinsi Bali sebesar 0,6 per 1.000 orang perempuan.² Kanker payudara bersifat heterogen dengan pola ekspresi gen yang berbeda sehingga mengakibatkan perbedaan perilaku, prognosis dan penatalaksanaan.^{3,4} Perkembangan dan progresi kanker payudara yang invasif terjadi akibat berbagai faktor yang berinteraksi secara kompleks, termasuk lingkungan mikro seperti *stromal* dengan sistem imun, dimana adanya *tumor infiltrating lymphocytes* (TIL) pada kanker payudara berhubungan dengan prognosis yang lebih baik.⁵⁻⁹

Kanker payudara dikelompokkan dan karakteristiknya pada tingkat molekuler untuk tujuan terapi yang efektif. Namun, karena adanya keterbatasan waktu dan pembiayaan pada sebagian besar sistem kesehatan, maka klasifikasi kanker payudara molekuler *surrogate* sebagian besar berdasarkan pada pemeriksaan biomarker imunohistokimia seperti ER, PR, HER-2, dan Ki-67.^{4,10} Kelompok gen mengelompokkan variasi karsinoma payudara invasif menjadi 4 subtipe intrinsik kanker payudara yaitu luminal A, luminal B, *HER-2-enriched* dan *basal-like*

dimana *HER-2 enriched* termasuk yang memiliki prognosis buruk.^{3,4,10,11}

Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) memainkan peran penting dalam mekanisme penghindaran sel kanker terhadap sistem imun.^{5,12} Konsentrasi PD-L1 pada jaringan normal sangat rendah, sebaliknya tereksresi berlebihan pada sel neoplastik, yang kemudian mengurangi ekspresi sitokin, mensupresi aktivasi sel limfosit T dan mengeliminasi respon imun.⁵ Adanya pengaruh lingkungan mikro seperti TIL dan temuan PD-L1 memberikan cakrawala baru bagi prognosis dan terapi target yang tentunya akan berbeda-beda karena sifat alami karsinoma payudara yang heterogen.^{5,13} Beberapa penelitian telah mempublikasikan hubungan TIL dan ekspresi PD-L1 pada kanker payudara secara umum maupun pada kanker payudara dengan HER-2 positif dengan hasil yang kontroversial dan belum sepenuhnya dapat dijelaskan. Penelitian oleh Kim *et al.* melaporkan bahwa ekspresi PD-L1 positif pada sel tumor menunjukkan *disease free survival* yang lebih baik pada karsinoma payudara HER-2 positif dengan ekspresi negatif reseptor hormon ($p=0,039$).¹⁴ Namun, pada studi yang dilakukan oleh Muenst *et al.* ditemukan bahwa ekspresi PD-L1 mempunyai *overall survival* yang buruk pada karsinoma payudara dengan luminal B HER-2 positif (HR= 5,127, $p= <0,0001$) dan *HER-2 enriched* (HR= 2,834, $p=$

0,0131).¹⁵

Untuk alasan tersebut, penelitian ini dilakukan untuk membuktikan hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor, TIL dan total sel tumor dan TIL pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtipe *HER-2 enriched* di Bali.

METODE

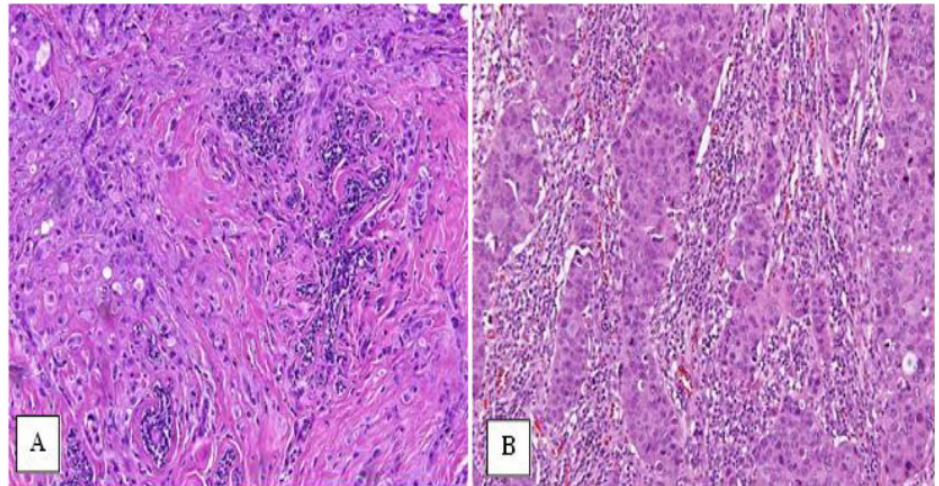
Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan yang digunakan adalah *cross-sectional study*, dengan bidang ilmu imunopatologi yang hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor, TIL dan total sel tumor dan TIL pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtipe *HER-2 enriched* di RSUP Sanglah Denpasar.

Sampel penelitian ini adalah penderita karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi, imunohistokimia ER, PR, HER-2 dan *Fluorescence In Situ Hybridization/Chromogenic In Situ Hybridization* (FISH/CISH) di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Sanglah Denpasar dari tanggal 1 Januari 2015 sampai 31 Desember 2019 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan peneliti. Kriteria inklusi yang dipakai adalah sediaan blok parafin dalam kondisi baik dan masih mengandung sel tumor dan stroma yang cukup untuk dianalisis serta data

klinis yang lengkap yang tercantum pada SIMARS atau data rekam medis. Kriteria eksklusi yang dipakai yaitu blok parafin yang tidak cukup untuk dilakukan pemotongan ulang, atau rusak, atau berjamur atau tidak ditemukan. Besar sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yaitu sebesar 33.

Penilaian *stromal TIL* dengan pulasan Hematoksin dan Eosin, menggunakan mikroskop cahaya binokuler *Olympus CX23* yang dilakukan oleh peneliti dan 2 orang spesialis Patologi Anatomi. Interpretasi TIL dinilai dengan estimasi secara visual menggunakan rekomendasi oleh *International Working Group 2014*, TIL dinilai dalam bentuk persentase *stromal TIL* dengan denominator adalah area jaringan stromal (yaitu area yang ditempati oleh sel-sel radang mononuklear dibanding total jaringan *stromal intratumoral*). Area yang dilaporkan rata-rata area *stromal TIL*, bukan hanya berfokus pada *hotspot*. Sesuai dengan penelitian sebelumnya *stromal TIL* dibagi menjadi dua kategori, yaitu rendah ($\leq 60\%$) dan tinggi ($>60\%$).^{5,14}

Pulasan imunohistokimia PD-L1 menggunakan Anti-PD-L1 *rabbit monoclonal antibody Ventana PD-L1 (SP263)*. Ekspresi PD-L1 dilihat dengan pulasan imunohistokimia, menggunakan mikroskop cahaya binokuler *Olympus CX23* yang dilakukan oleh peneliti dan 2 orang spesialis patologi anatomi. Pulasan imunohistokimia PDL-1 adalah pada membran dan/atau sitoplasma sel tumor yang dapat terpulas homogen maupun heterogen, berwarna coklat dengan intensitas lemah hingga kuat. Pulasan pada membran bisa pada seluruh maupun sebagian membran. Pulasan pada sitoplasma bisa tersebar merata maupun berupa granul halus. Pulasan imunohistokimia PD-L1 pada sel tumor dan TIL dengan menggunakan sistem *Allred score*.^{14,15} Penilaian intensitas pulasan PD-L1 pada sel tumor dan TIL menggunakan perbesaran kuat (400x) yang dibagi menjadi skor: 0, bila tidak terpulas; 1, bila terpulas lemah, 2, terpulas sedang; dan 3, terpulas kuat. Penilaian persentase sel yang terpulas positif menggunakan perbesaran lemah (40x) dan diberikan nilai sebagai berikut: 0, bila tidak terpulas; 1, bila terpulas $<1\%$;



Gambar 1. (A) Massa tumor dengan *stromal TIL* rendah dan (B) *stromal TIL* tinggi (pulasan H&E, pembesaran 200x).

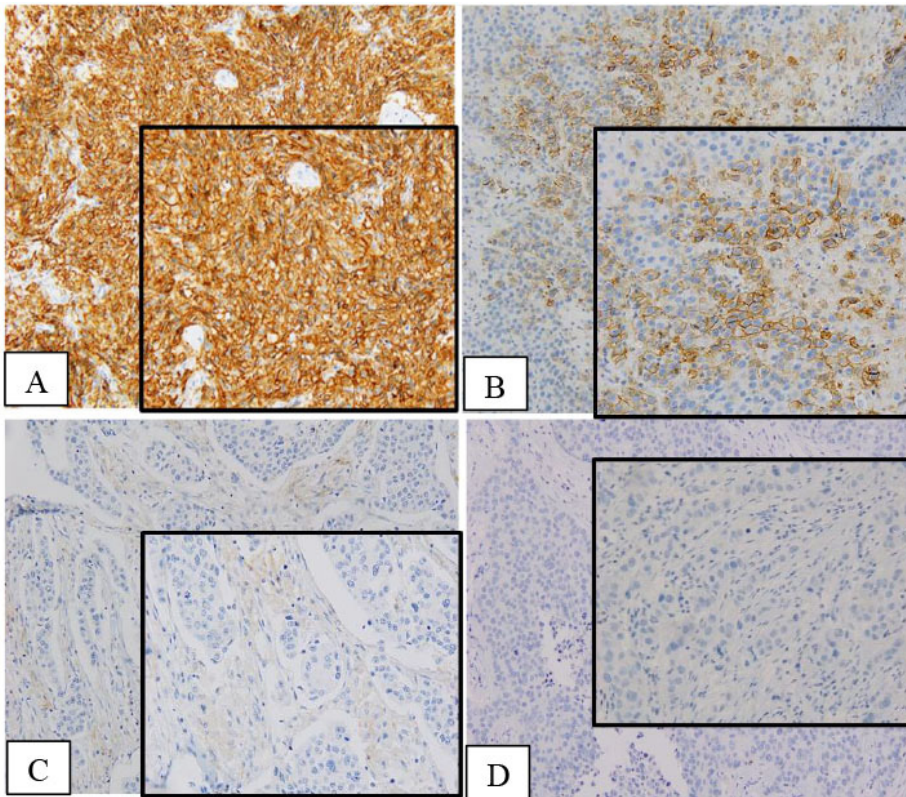
Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian

Parameter	Nilai
Usia (Tahun) (rerata \pm SB)	54,12 \pm 9,49
TIL (%), median (min-maks)	40 (10-80)
PD-L1 (rerata \pm SB)	
Sel Tumor	4,70 \pm 1,61
TIL, median (min-maks)	5 (2-8)
Total Sel Tumor dan TIL	9,58 \pm 3,26
Ukuran (pT), n (%)	
T1, T2	7 (21,2)
T3, T4	26 (78,8)
Grade Histologi, n (%)	
Grade 1	0 (0,0)
Grade 2	11 (33,3)
Grade 3	22 (66,7)
Invasi Limfovaskular, n (%)	
Tidak ada	12 (36,4)
Ada	21 (63,6)
Metastasis Limfonodi, n (%)	
Tidak ada	11 (33,3)
Ada	22 (66,7)
Metastasis Organ Lain, n (%)	
Tidak ada	29 (87,9)
Ada	4 (12,1)
Stadium Klinis, n (%)	
Dini (I, II)	9 (27,2)
Lanjut (III, IV)	24 (72,7)
<i>Stromal TIL</i> , n (%)	
$> 60\%$	6 (18,2)
$\leq 60\%$	27 (81,8)

TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes; PD-L1: Programmed Death-Ligand 1; Min: Minimum; Maks: Maksimum

2, terpulas 1-10%; 3, terpulas $>10-33,3\%$; 4, terpulas $>33,3-66,6\%$; serta 5, bila terpulas $>66,6-100\%$.¹⁶ Skor imun akhir terentang dari 0 hingga 8, didapatkan dari menjumlahkan antara intensitas pulasan dan persentase sel terpulas.

Nilai *cut-off* dibagi menjadi rendah dan tinggi ditentukan berdasarkan distribusi data. Jika data berdistribusi normal nilai rerata digunakan sebagai nilai *cut-off*. Sedangkan jika data tidak berdistribusi normal, nilai *median* digunakan sebagai



Gambar 2. (A) Pulasan imunohistokimia PD-L1 pada sel tumor dengan intensitas pulasan skor 3, (B) intensitas pulasan skor 2, (C) Pulasan imunohistokimia PD-L1 pada sel tumor dan TIL dengan intensitas pulasan skor 1, dan (D) intensitas pulasan skor 0.

Tabel 2. Hubungan antara *Stromal/TIL* dengan Ekspresi PD-L1 pada Sel Tumor

<i>Stromal TIL</i>	Ekspresi PD-L1 pada sel tumor (N=33)		Total	p
	Tinggi (n=17)	Rendah (n=16)		
Tinggi, n (%)	6 (100,0)	0 (0,0)	6 (100,0)	0,018*
Rendah, n (%)	11 (40,7)	16 (59,3)	27 (100,0)	

Uji *Fisher-Exact*; TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes; PD-L1: Programmed Death-Ligand 1; *secara statistik bermakna apabila nilai-p kurang dari 0,05

Tabel 3. Hubungan antara *Stromal/TIL* dengan Ekspresi PD-L1 pada TIL

<i>Stromal TIL</i>	Ekspresi PD-L1 pada TIL (N=33)		Total	p
	Tinggi (n=12)	Rendah (n=21)		
Tinggi, n (%)	6 (100,0)	0 (0,0)	6 (100,0)	0,001
Rendah, n (%)	6 (22,2)	21 (77,8)	27 (100,0)	

Uji *Fisher-Exact*; TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes; PD-L1: Programmed Death-Ligand 1; *secara statistik bermakna apabila nilai-p kurang dari 0,05.

nilai *cut-off*.^{14,17} Ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL didapatkan dengan menjumlahkan skor imun sel tumor dan skor imun TIL (skor imun total).¹⁴ Nilai *cut-off* dibagi menjadi rendah dan

tinggi ditentukan berdasarkan distribusi data. Jika data berdistribusi normal nilai rerata digunakan sebagai nilai *cut-off*. Sedangkan jika data tidak berdistribusi normal, nilai median digunakan sebagai

nilai *cut-off*.^{14,17} Bila terjadi perbedaan pendapat atau dalam interpretasi stromal TIL dan ekspresi PD-L1 maka dilakukan kesepakatan bersama secara konsensus.

Data diolah dengan menggunakan Program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 20.0 untuk *Windows*. Analisis deskriptif meliputi karakteristik sampel. Analisis *Fisher-Exact* dilakukan karena tidak memenuhi syarat uji *Chi-Square* dimana bertujuan menganalisis hubungan hubungan antara *stromal TIL* dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor, TIL dan total sel tumor dan TIL dengan nilai batas kemaknaan (α) ditentukan pada probabilitas (p) <0,05.

HASIL

Besar sampel adalah 33, dimana usia termuda adalah 34 tahun dan usia tertua 73 tahun. Gambaran karakteristik sampel penelitian disajikan pada **Tabel 1**. Rerata usia sampel penelitian adalah $54,12 \pm 9,49$ tahun. Sebagian besar sampel didapatkan pada T3,T4 sebanyak 26 sampel (78,8%), pada grade 3 sebanyak 22 sampel (66,7%), dengan invasi limfovaskular sebanyak 21 sampel (63,6%), dan dengan metastasis kelenjar getah bening sebanyak 22 sampel (66,7%). Mayoritas sampel tanpa metastasis organ lain sebanyak 29 sampel (87,9%), namun sebagian besar didapatkan pada stadium lanjut sebanyak 24 sampel (72,7%). Berdasarkan parameter *stromal TIL*, mayoritas dengan *stromal TIL* rendah sebanyak 27 sampel (81,8%) dibandingkan *stromal TIL* tinggi (>60%) sebanyak 6 sampel (18,2%), dengan median persentase *stromal TIL* adalah 40%. Gambar histopatologi pulasan H&E dari massa tumor dengan *stromal TIL* rendah dan tinggi dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Evaluasi terhadap pulasan imunohistokimia PD-L1 pada sampel dengan menggunakan metode *Allred score*, ditemukan bahwa data berdistribusi normal. Sehingga, rerata nilai *Allred score* ekspresi PD-L1 pada sel tumor yaitu sebesar $4,70 \pm 1,61$ dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL yaitu sebesar $9,58 \pm 3,26$ (**Tabel 1**). Sampel dengan nilai *Allred score* diatas atau sama dengan nilai rerata digolongkan sebagai ekspresi PD-L1 pada sel tumor tinggi dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL tinggi dan

Tabel 4. Hubungan antara Stromal TIL dengan Ekspresi PD-L1 pada Total Sel Tumor dan TIL.

Stromal/TIL	Ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL (N=33)		Total	P
	Tinggi (N=16)	Rendah (N=17)		
Tinggi, n (%)	6 (100,0)	0 (0,0)	6 (100,0)	0,007
Rendah, n (%)	10 (37,0)	17 (63,0)	27 (100,0)	

Uji Fisher-Exact; TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes; PD-L1: Programmed Death-Ligand 1; *secara statistik bermakna apabila nilai-p kurang dari 0,05

bila dibawah nilai *Allred score* digolongkan sebagai ekspresi PD-L1 pada sel tumor rendah dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL rendah.

Pada penelitian ini juga didapatkan data berdistribusi tidak normal, maka median nilai *Allred score* pada ekspresi PD-L1 pada TIL yaitu sebesar 5 (2-8) (Tabel 1). Sampel dengan nilai *Allred score* di atas atau sama dengan nilai median digolongkan sebagai PD-L1 pada TIL tinggi dan bila nilai *Allred score* dibawah nilai median digolongkan sebagai ekspresi PD-L1 pada TIL rendah. Gambar pulasan imunohistokimia PD-L1 pada sel tumor, TIL serta pada total sel tumor dan TIL dengan intensitas pulasan skor 3, 2, 1, dan 0 dapat dilihat pada Gambar 2A-D.

Tabel 2 menunjukkan hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor menggunakan uji Fisher-Exact. Tabel tersebut menunjukkan bahwa 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor tinggi. Tidak didapatkan sampel dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor rendah. Sebanyak 11 sampel (40,7%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor tinggi, sedangkan sisanya sebanyak 16 sampel (59,3%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor rendah. Hasil analisis Fisher-Exact menunjukkan nilai $p=0,018$, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor (Tabel 2).

Tabel 3 menunjukkan hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada TIL menggunakan uji Fisher-Exact. Terdapat 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada TIL tinggi. Tidak didapatkan sampel dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1

pada TIL rendah. Sebanyak 6 sampel (22,2%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada TIL tinggi sedangkan sisanya sebanyak 21 sampel (77,8%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada TIL rendah. Hasil analisis fisher exact menunjukkan nilai $p=0,001$, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada TIL (Tabel 3).

Tabel 4 menunjukkan hubungan antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL menggunakan uji Fisher-Exact. Terdapat 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL tinggi. Tidak didapatkan sampel 0 (0,0%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL rendah. Sebanyak 10 sampel (37%) dengan *stromal* *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL tinggi, sedangkan sisanya sebanyak 17 sampel (63,0%) memiliki *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 total sel tumor dan TIL rendah. Hasil analisis fisher exact menunjukkan nilai $p=0,007$, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor dan TIL (Tabel 4).

PEMBAHASAN

Rerata usia sampel penelitian ini adalah 54,12 tahun. Hasil ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, didapatkan rerata usia sampel di usia dewasa tua, yakni antara 48,5 sampai dengan 59,4.¹⁸⁻²¹ Namun pada penelitian karsinoma payudara khusus dengan HER2 positif, ditemukan median umur 46 tahun, lebih muda dibandingkan populasi pada

penelitian ini. Stanton *et al.* melaporkan bahwa sebanyak 16% kanker payudara dengan HER2 positif adalah *Lymphocyte-predominant breast cancer (LPBC)* atau minimal 50% jaringan tumor diinvasi oleh TIL.^{22,23} Pada penelitian tersebut juga ditemukan sepuluh dari 47 pasien dengan HER2+ memiliki *stromal* TIL yang tinggi (>40%), 11 diantaranya *stromal* sedang (10-40%) dan sebagian besar pasien dengan derajat TIL rendah (<10%). Penelitian yang dilakukan Nuciforo *et al.* ditemukan bahwa TIL secara umum pada karsinoma payudara adalah 10% (2-20%), begitu juga pada subtype HER2 *enriched* dengan median distribusi 10%.²⁴ Begitu juga *The NeoALTO trial (Neoadjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization)* ditemukan hasil serupa dengan median TILs 12,5% (5,0-30,0%).¹⁸ Jika dibandingkan dengan data tersebut, hasil penelitian ini mendapatkan nilai median lebih tinggi yaitu sebesar 40% (10-80%). Berdasarkan proporsinya, sebagian besar (81,8%) dengan *stromal* rendah. Perbedaan distribusi *stromal* TIL tersebut mungkin karena pada penelitian sebelumnya dilakukan pada sampel dengan stadium awal sedangkan pada penelitian ini sebagian besar sampel adalah stadium III/IV (69,7%).

Berdasarkan ukuran tumor, sebagian besar 26 sampel (78,8%) merupakan T3 dan T4. Pada penelitian lain ditemukan pada HER2 positif sebagian besar merupakan T1 dan T2, hanya sebagian kecil dengan ukuran tumor T3. Sebagian besar HER2 positif mengalami metastasis kelenjar getah bening.¹⁹ Begitu juga dengan hasil penelitian ini didapatkan 22 sampel (66,7%) mengalami metastasis kelenjar getah bening. Metastasis kelenjar getah bening cenderung lebih rendah pada distribusi TIL tinggi (>60%) dibandingkan dengan distribusi TIL yang lebih rendah ($\leq 60\%$). Namun sebaliknya pada invasi limfovaskular.¹⁹

Ekspresi TIL yang tinggi berhubungan secara signifikan dengan HER2-positif dan *grade* histologi 3.²¹ Namun pada penelitian lainnya ditemukan sebagian besar HER2 positif memang berada pada *grade* histologi 3 dibandingkan *grade* 2 baik pada TIL tinggi maupun rendah.¹⁹ Metastasis pada HER2+ terjadi pada 30 dari 348 orang. Metastasis tulang

merupakan tempat yang paling sering terjadi (50%). Hasil penelitian tersebut mirip dengan penelitian ini, ditemukan 4 dari 33 sampel (12,1%) mengalami metastasis. Berdasarkan stadium klinis, pada penelitian ini ditemukan sebagian besar sampel berada pada stadium 3 atau 4. Hal tersebut sejalan dengan penelitian oleh Zerki *et al.*, dimana ditemukan sebagian besar sampelnya berada pada stadium tersebut.²²

Pada penelitian karsinoma payudara pada wanita usia yang lebih muda (<40 tahun) ditemukan ekspresi PD-L1 pada sel tumor sebanyak 20% dan pada sel imun 44,44%.²⁵ Sedangkan pada penelitian ini, menggunakan sistem skoring berdasarkan penjumlahan intensitas pulasan dan persentase pulasan PD-L1. Hasil yang didapatkan skor rerata PDL-1 pada sel tumor 4,70 dan median PD-L1 pada TIL 5 dan rerata PD-L1 pada total sel tumor dan TIL 9,58. Hasil penelitian ini cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya mungkin disebabkan karena sebagian besar sampel berada pada stadium yang lebih tinggi III/IV dan *grade* 3. Penelitian Kim A *et al.*, menunjukkan ekspresi PD-L1 berhubungan signifikan dengan derajat histologi yang lebih tinggi.¹⁴

Relevansi klinis dari sistem imun host pada kanker payudara sudah lama diteliti. Penelitian yang berkembang selama dekade terakhir ini telah memperlihatkan heterogenitas kanker payudara, sehingga mendorong peneliti untuk meneliti apakah peranan sistem imun pada keganasan serupa di berbagai sub tipe molekuler penyakit. Adanya infiltrat limfosit yang tinggi secara konsisten berhubungan dengan prognosis yang lebih baik pada pasien-pasien kanker payudara *triple negative* dan HER-2 positif.^{23,25}

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) adalah sel-sel imun mononuklear yang menginfiltrasi jaringan tumor pada sebagian besar jenis tumor solid termasuk karsinoma payudara.^{18,25} Populasi TIL terdiri atas sel T sitotoksik (CD8+) dan helper (CD4+), sel B, sel dendritik folikuler dan granulosit. *Stromal* TIL merupakan TIL yang menginfiltrasi jaringan stroma yang berada di dekat sel-sel tumor. *Stromal* TIL terlokalisasi secara tersebar pada stroma diantara sel-sel karsinoma dan

tidak memiliki kontak secara langsung dengan sel-sel karsinoma, berbeda halnya dengan TIL intra tumor yang secara aktif menginfiltrasi pusat sel tumor dimana mereka memiliki kontak langsung dengan sel-sel tumor.²⁵

Sebagian besar kanker payudara HER-2 positif memiliki tingkat infiltrasi imun yang tinggi serupa dengan kanker payudara *triple negative*.²³ Pada penelitian ini ditemukan 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor tinggi. Sedangkan 11 sampel (40,7%) dengan *stromal* TIL rendah sebanyak dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor tinggi, sisanya sebanyak 16 sampel (59,3%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada sel tumor rendah. Pada analisis *fisher exact* disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor dengan nilai $p=0,018$.

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil yang didapatkan pada beberapa penelitian terdahulu. Kim A *et al.*, mengevaluasi PD-L1 baik ditingkat mRNA dan protein.¹⁴ Pada penelitian ditemukan bahwa ekspresi PD-L1 positif pada sel tumor berhubungan dengan *grade* histologi yang tinggi dan TIL yang tinggi ($p=0,012$ dan $p=0,007$). Ekspresi PD-L1 mRNA yang lebih tinggi berhubungan dengan *stromal* infiltrasi TIL yang lebih tinggi (masing-masing $p<0,001$).

PD-L1 adalah *immune checkpoint* yang berfungsi untuk menjaga tubuh *host* dari reaksi autoimun dengan cara meningkatkan apoptosis dari sel T spesifik antigen yang terdapat pada kelenjar getah bening dan mengurangi apoptosis dari sel *Treg*.²⁶ PD-L1 juga terdapat pada berbagai jenis kanker dengan fungsi yang sama yaitu mengakibatkan disfungsi sel imun dan apoptosis sehingga mengurangi respon imun pada sel kanker tersebut.^{27,28} *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) sebagai tempat berikatan PD-L1, umumnya ditemukan pada *tumour-infiltrating lymphocytes*. Ekspresi PD-L1 dipergunakan oleh sel kanker untuk menghindari penghancuran oleh sel imun. Aktivasi PD-1 dengan PD-L1 melalui jalur MAPK/ERK menjelaskan hubungan antara tumor invasif dengan kontrol imunitas antitumor.^{28,29} Dalam proses

karsinogenesis, PD-L1 akan terekspresi secara berlebihan.^{28,30}

Pada penelitian ini didapatkan sebanyak 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada TIL tinggi. Sedangkan hanya 6 sampel (22,2%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada TIL tinggi, sisanya sebanyak 21 sampel (77,8%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada TIL rendah. Pada analisis *fisher exact* disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada TIL dengan nilai $p=0,001$. Hal ini sesuai dengan hasil yang didapatkan pada beberapa peneliti terdahulu. Kurozumi S *et al.*, mengamati pengaruh ekspresi PD-L1 terhadap gambaran klinikopatologi dari karsinoma payudara invasif HER-2 positif.²¹ Pada penelitian ditemukan ekspresi PD-L1 pada kanker payudara HER-2 positif yang telah mendapatkan terapi *neoadjuvant chemotherapy* (NAC) dengan trastuzumab, PD-L1 positif berhubungan erat dengan *stromal* TILs tinggi dan TILs CD8+ yang tinggi ($p<0,0001$ dan $p=0,00087$). Peneliti juga mengamati ekspresi PD-L1 pada semua tipe karsinoma payudara invasif. Pada penelitian ditemukan PD-L1 positif berhubungan dengan *stromal* TIL yang tinggi, ekspresi negatif reseptor estrogen dan progesteron dan derajat histologi (masing-masing nilai $p<0,0001$).

Pada penelitian ini didapatkan sebanyak 6 sampel (100%) dengan *stromal* TIL tinggi dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL tinggi. Sedangkan 10 sampel (37,0%) dengan *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL tinggi, sisanya sebanyak 17 sampel (63%) memiliki *stromal* TIL rendah dan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL rendah. Pada analisis *fisher exact* disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada total sel tumor dan TIL dengan nilai $p=0,007$.

Hasil ini sebanding dengan hasil penelitian Kim A *et al.*, yang menemukan terdapat korelasi bermakna antara *stromal* TIL dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor ($r=0,549$; $p<0,001$), ekspresi PD-L1 pada TIL ($r=0,648$; $p<0,001$), serta ekspresi PD-

L1 pada total sel tumor dan TIL ($r=0,666$; $p<0,001$).¹⁴ Korelasi positif pada kedua penelitian ini mungkin dapat dijelaskan oleh respon penghindaran atau resistensi tumor terhadap sel imun adaptif. Sel tumor dapat menggunakan jalur fisiologi normal seperti infeksi patogen untuk melawan sistem imun penjamu. PD-L1 dapat teraktivasi sebagai respons terhadap sinyal inflamasi seperti interferon (IFN). Penelitian pada kanker payudara HER2+ menunjukkan *Myxovirus resistance A (MxA)* yang merupakan marker IFN berhubungan signifikan dengan *stromal TILs*. Selain itu, melalui respon imun *innate*, PD-L1 dapat terinduksi melalui jalur sinyal *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*.³¹ Berdasarkan hasil penelitian-penelitian tersebut peningkatan PD-L1 pada sel tumor dan TIL kemungkinan sebagai respon sel tumor terhadap invasi imun.

SIMPULAN

Terdapat hubungan antara *stromal TIL* dengan ekspresi PD-L1 pada sel tumor, TIL, serta total sel tumor dan TIL pada karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtype HER-2 *enriched* di RSUP Sanglah Denpasar. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi faktor prognostik yang bermanfaat dalam penatalaksanaan karsinoma payudara invasif tipe tidak spesifik subtype HER-2 *enriched*.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan terkait publikasi dari penelitian ini.

ETIKA PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar dengan No. 2198/UN 14.2.2.VII.14/LT/2020.

PENDANAAN

Penelitian ini tidak mendapatkan bantuan dana hibah dari pemerintah maupun sektor swasta lainnya.

KONTRIBUSI PENULIS

Seluruh penulis memiliki kontribusi yang sama dalam penulisan laporan penelitian ini baik dari penyusunan kerangka konsep, pengumpulan data, analisis data, hingga interpretasi hasil penelitian dalam bentuk publikasi ilmiah.

DAFTAR PUSTAKA

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, 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(6):394-424.
- Kemenkes RI. Balitbang Kemenkes RI. Riset kesehatan dasar. 2013.
- Rao C, Shetty J, Prasad K. Immunohistochemical Profile and Morphology in Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Diagn Resp*. 2013;7(7):1361-5.
- Rakha EA, Allison KH, Ellis IO, Horii R, Masuda S, Penault-Llorca F, et al. Invasive breast carcinoma: general overview. In WHO Classification of Tumor Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification of Tumours of the Breast. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2019:82-101.
- 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. 2020;34(2):639-47.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget*. 2017; 8(12):19310-19322
- Lee MC, Buitrago DH, Kadota K, Ujiie H, Woo K, Sima CS, et al. The tumor immune microenvironment in octogenarians with stage I non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2014;3(11):e967142.
- Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Francoise VE, et al. Prognostic and significance value of tumor infiltrating lymphocyte in phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860-67.
- Fulawka L, Halon A. Ki-67 evaluation in breast cancer: The daily diagnostic practice. *Indian J PatholMicrobiol*. 2017;60(2):177-84.
- Gannon LM, Cotter MB, Quinn CM. The Classification Invasive Carcinoma of The Breast. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13(8):941-54.
- Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller B, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor response to

- neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):105-113.
- Gajewski TF. The Next Hurdle in Cancer Immunotherapy: Overcoming the Non-T-Cell-Inflamed Tumor Microenvironment. *Semin Oncol*. 2016;42(4):663-71.
 - Kim A, Lee SJ, Kim YK, Perk WY, Park DY, Kim JY, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumour cell and tumour infiltrating lymphocytes of HER2-positive breast cancer and its prognostic value. *Scientific Reports*. 2017;7(1):11671.
 - Muenst S, Schaefer AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(1):15-24.
 - Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SF, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol*. 2016;47(1):78-84.
 - Campbell MJ, Julious SA. Statistics in Medicine: citations of papers in the first ten years. *Stat Med*. 1994;13(1):3-10.
 - Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and associations with pathological complete response and event-free survival in HER2-positive early-stage breast cancer treated with lapatinib and trastuzumab: a secondary analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA oncology*. 2015;1(4):448-454.
 - Lee HJ, Kim JY, Park IA, Song IH, Yu JH, Ahn JH, et al. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab. *American journal of clinical pathology*. 2015;144(2):278-288.
 - Sugie T, Sato E, Miyashita M, Yamaguchi R, Sakatani T, Kozuka Y, et al. Multispectral quantitative immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in relation to programmed death-ligand 1 expression in triple-negative breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. 2020;27(4):519-526.
 - Kurozumi S, Inoue K, Matsumoto H, Fujii T, Horiguchi J, Oyama T, et al. Prognostic Utility Of Tumor-Infiltrating Lymphocytes In Residual Tumor After Neoadjuvant Chemotherapy With Trastuzumab For HER2-Positive Breast Cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1583.
 - Zekri J, Saadeddin A, Alharbi H. Frequency and clinical characteristics of HER2 overexpressed breast cancer in Saudi Arabia: a retrospective study. *BMC womens health*. 2021;21(1):10.
 - Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA oncology*. 2016;2(10):1354-1360.
 - Nuciforo P, Prat A, Llombart A, Fasani R, Paré L, Pascual T, et al, Holgado E. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in HER2-positive (HER21) early breast cancer treated with neoadjuvant lapatinib and trastuzumab without chemotherapy in the PAMELA Trial. *Annals of Oncology*. 2017;28 (suppl_5):v43-v67.

25. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nrclinonc*. 2016;13(4):228-41.
26. Francisco ML, Sage TP, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010;236:219-42.
27. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*. 2015;27(3):409-416.
28. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *J Clin Pathol*. 2018;71(3):189-194.
29. Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, Ritprajak P, Hashiguchi M, Hirose S, et al. B7 H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin. *Cancer Research*. 2011;71(4):1235-43.
30. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular Pathways: Next Generation Immunotherapy-Inhibiting Programmed Death-Ligand-1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res*. 2012;18(24):6580-7.
31. Lee SJ, Hwang CS, Kim YK, Lee HJ, Ahn SJ, Shin N, et al. Expression of Myxovirus Resistance A (MxA) Is Associated with Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Breast Cancers. *Cancer Res Treat*. 2017;49(2):313-321.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution