

Korelasi antara Ekspresi *Tumor Infiltrating Lymphocytes* CD4 dan CD8 dengan Kanker Ovarium Tipe Epitel Stadium Lanjut yang Bebas Penyakit dan Kekambuhan

SITI SALIMA, SUPRIADI GANDAMIHARDJA, ALI BUDI HARSONO

Divisi Onkologi Ginekologi, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin, Bandung.

Diterima: 18 Februari 2016; Direview: 22 Februari 2016; Disetujui: 14 Maret 2016

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer has the high incidence and mortality. One of them is because of high of recurrency in ovarian cancer. The recurrence rate is probably related to the immunological system through the role of TILs CD8 and CD4. This study is a retrospective case-control. Subjects were paraffin block of ovarian epithelial advanced stage patient who come to the hospital Dr Hasan Sadikin with the period 2012 to 2014, which already had completed therapy. There were 22 samples, consisting of 12 cases of ovarian cancer were free of disease and 10 cases of recurrence ovarian cancer. Statistical analysis using unpaired t test found significant difference the levels of TILs CD8 between recurrence ovarian cancer and disease-free, mean ovarian cancer with disease free is $20,91 \pm 12,70$, and mean of recurrence ovarian cancer $5,900 \pm 6,081$ ($p < 0,05$) but the expression of TILs CD4 showed no significant difference by using Mann Whitney test. Positive correlation between the expression levels of TILs CD8 with ovarian cancer whose disease-free, using statistical test of correlation eta, and has a fairly strong correlation strength based on criteria Guilford. There is a positive correlation between the expression levels of TILs CD8 with disease free of ovarian cancer, which means that the higher the expression TILs CD 8 shows the higher the number of ovarian cancer were free of disease, and the recurrence rate would be lower.

Keyword: epithelial ovarian cancer advanced, TILs CD8, TILs CD4, free of disease, recurrence

ABSTRAK

Kanker ovarium tipe epitel mempunyai insidensi dan angka kematian yang tinggi. Tingginya angka mortalitas pada kanker ovarium salah satunya berhubungan dengan tingginya angka kekambuhan. Angka kekambuhan ini mungkin berkaitan erat dengan sistem imunologi melalui peran *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TILs) CD8 dan CD4. Penelitian ini menggunakan studi analitik retrospektif *case control* dengan mengambil data dan blok parafin jaringan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut pada periode 2012-2014, yang terdiri dari kanker ovarium stadium lanjut yang telah dilakukan terapi lengkap. Kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan dari 22 subjek penelitian terdiri dari 12 kasus merupakan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut bebas penyakit dan 10 kasus kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang mengalami kekambuhan. Terdapat perbedaan yang bermakna tingkat ekspresi TILs CD8 antara kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang bebas penyakit dan yang mengalami kekambuhan, kelompok bebas penyakit rata-rata sebesar $20,91 \pm 12,70$, sedangkan pada kelompok kekambuhan rata-rata sebesar $5,900 \pm 6,081$, dengan nilai $p < 0,05$. Sebaliknya, ekspresi TILs CD4 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Selain itu, juga didapatkan korelasi positif antara tingkat ekspresi TILs CD8 dengan kanker ovarium yang bebas penyakit. Dengan menggunakan uji statistik korelasi eta, didapatkan nilai r untuk nilai korelasi CD8 sebesar 0,607, sedangkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Penelitian ini menyimpulkan bahwa semakin tinggi tingkat ekspresi TILs CD8, semakin tinggi angka kanker ovarium yang bebas penyakit dan semakin rendah kejadian kanker ovarium yang mengalami kekambuhan.

Kata Kunci: kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut, TILs CD8, TILs CD4, bebas penyakit, kekambuhan.

KORESPONDENSI:

Siti Salima, dr., SpOG,
Departemen Obstetri
dan Ginekologi
RS Dr. Hasan Sadikin
Bandung. Jl Pasteur No.38
Bandung, Jawa Barat.
Telp. 022-2039086.
E-mail: dr.salima@gmail.com

PENDAHULUAN

Kanker ovarium merupakan salah satu keganasan ginekologi dengan angka kematian yang cukup tinggi.¹ Insidensi kanker ovarium di Asia Tenggara sebanyak 47.689 kasus atau 5,2% dari seluruh kanker pada wanita dan merupakan peringkat ke-4. Di Indonesia menempati peringkat ke-5 setelah kanker payudara, kolorektum, kanker serviks, dan kanker paru-paru. Insidensi kanker ovarium di Indonesia sebanyak 9.664 kasus atau 6,2% dengan angka mortalitas 7.031 kasus atau 6,7%, Five years prevalence 23.773 kasus atau 6,3%.¹ Kanker ovarium mempunyai angka mortalitas tertinggi di antara kanker ginekologi lain, dengan perkiraan 14.300 kematian pada tahun 2003 di Amerika Serikat.² Kanker ovarium juga dikenal sebagai "silent killer". Kanker ovarium pada stadium awal tidak menunjukkan gejala yang spesifik dan sering kali tidak menimbulkan keluhan. Keluhan atau gejala biasanya baru timbul saat kanker ovarium sudah dalam stadium lanjut dan mempunyai prognosis yang buruk.³

Mortalitas yang tinggi pada kanker ovarium antara lain disebabkan oleh tingginya angka kekambuhan yang terjadi karena tidak respons terhadap terapi, meskipun kanker ovarium termasuk tumor yang cukup sensitif terhadap kemoterapi. Angka kekambuhan pada kanker ovarium tergantung ada beberapa faktor, di antaranya residu tumor pascaoperasi, keterlambatan kemoterapi, dan imunitas pasien terhadap tumor.

Pentingnya *tumor-infiltrating lymphocytes* (TILs) yang berperan pada tumor ganas seperti kanker ovarium menunjukkan bahwa parameter imunologi signifikan dan berguna dalam menilai prognosis pasien kanker.³ Banyak penelitian membuktikan bahwa sebagian besar sel efektor yang berperan dalam mekanisme anti-tumor adalah sel T CD8, yang secara fenotip dan fungsional identik dengan CTL yang berperan dalam sel yang terinfeksi virus atau sel alogenik. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan mengenal dan membunuh sel-sel potensial ganas yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein seluler mutan atau protein virus onkogenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I.⁴

Sel T CD4 atau sel helper pada umumnya bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel-sel itu dapat berperan dalam respons antitumor dengan memproduksi berbagai sitokin yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL menjadi sel efektor. Di samping itu, sel T CD4 yang diaktivasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan interferon γ yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan sensitivitas tumor terhadap lisis CTL.⁴

CD8 *cytotoxic T lymphocytes* (CTLs) secara langsung mampu membunuh sel tumor. CD4 limfosit T helper (Th) adalah sitokin mensekresi heterogen limfosit

T. T helper tipe 1 limfosit (Th1) memiliki peran penting dalam mengaktifkan CTLs. T helper tipe 2 (Th2) limfosit merangsang kekebalan humoral dan mengaktifkan eosinofil. Dalam hal kekebalan antitumor, aktivasi Th2 kurang efektif dibandingkan aktivasi Th1. Dengan demikian, bila diketahui peningkatan kadar CD8, diharapkan keberhasilan dari terapi juga tinggi.⁵

Salah satu metode untuk memprediksi apakah akan terjadi kekambuhan atau tidak dapat dilihat dari imunitas tubuh penderita terhadap tumor, terutama pada penelitian ini, adalah kanker ovarium. Diharapkan dengan mengetahui tingkat ekspresi TILs CD8 dan CD4 dapat memperkirakan apakah akan terjadi kekambuhan atau tidak.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan studi analitik retrospektif *case control* dengan mengambil data dan blok parafin jaringan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut pada periode 2012-2014, yang terdiri dari kanker ovarium stadium lanjut yang telah dilakukan sitoreduksi optimal dengan residu tumor kurang dari 1 cm, yang kemudian dilanjutkan dengan kemoterapi carboplatin-paclitaxel selama 6 siklus. Data tersebut akan dibedakan antara kelompok kanker ovarium yang bebas penyakit dan kekambuhan. Kanker ovarium bebas penyakit pada penelitian ini adalah kanker ovarium tipe epitel yang telah dilakukan sitoreduksi optimal dan kemoterapi carboplatin-paclitaxel sebanyak 6 siklus, kemudian tidak ditemukan gejala secara klinik atau massa tumor kembali minimal 6 bulan pasca-kemoterapi. Sebaliknya, kelompok kanker ovarium yang mengalami kekambuhan adalah timbul gejala klinik dan massa tumor kurang dari 6 bulan pasca-kemoterapi.

Blok parafin tersebut dilakukan pemeriksaan imunohistokimia ekspresi *tumor infiltrating lymphocytes* CD4 dan CD8. Pemeriksaan imunohistokimia menggunakan *mouse monoclonal* CD4 dan CD8 *antibody*. Imunoekspresi sel epitel untuk CD8 dan CD4 dinilai berdasarkan distribusi. Untuk distribusi dihitung jumlah limfosit pada inti sel tumor pada 3 lapang pandang secara acak, dengan pembesaran 40 kali.

Uji statistik untuk membandingkan karakteristik dua kelompok penelitian digunakan uji t tidak berpasangan jika data berdistribusi normal dan uji Mann Whitney sebagai alternatifnya jika data tidak berdistribusi normal. Kemudian untuk data numerik, sebelum dilakukan uji statistik, data numerik tersebut dinilai dengan uji normalitas menggunakan Shapiro Wilks test karena jumlah data kurang dari 50. Uji ini digunakan untuk

menguji apakah data berdistribusi normal atau tidak normal. Untuk menganalisis korelasi antara CD8 dan CD4 dengan kanker ovarium bebas penyakit atau kekambuhan digunakan korelasi eta.

Setelah melalui pengujian dan hasilnya signifikan maka untuk menentukan keamatan hubungan bisa digunakan kriteria Guilford.⁶

HASIL

Selama periode tersebut didapatkan 22 subjek penelitian yang termasuk kriteria inklusi. Data ini terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu 12 kasus bebas penyakit 6 bulan pasca-terapi komplisit dan 10 kasus kekambuhan.

Tabel 1: Karakteristik subjek penelitian

Variabel	Kelompok		Nilai P
	Bebas penyakit N= 12	Kekambuhan N=10	
Usia			0,237
Mean±STD	46,91±11,61	39,60±15,58	
Median	49,0	46,00	
Range (min-maks)	24,0-66,0	14,0-59,0	
Jenis histopatologi			0,996
musinosum	8 (66,7%)	5 (50,0%)	
Serosum	2 (16,7%)	2 (20,0%)	
Endometrioid	1 (8,3%)	3 (30,0%)	
clear cell	1 (8,3%)	0 (0,0%)	

Keterangan:

Untuk data numerik usia, nilai p dihitung berdasarkan uji T tidak berpasangan. Untuk data kategorik histopatologi nilai p dihitung berdasarkan uji Kolmogorov Smirno. Nilai kemaknaan berdasarkan nilai $p < 0,05$. Tanda* menunjukkan nilai $p < 0,05$, artinya signifikan atau bermakna secara statistik.

Tabel 2: Perbedaan tingkat ekspresi CD4 pada kelompok bebas penyakit dan kekambuhan

Variabel	Kelompok		Nilai P
	Bebas penyakit N= 12	Kekambuhan N=10	
CD4			0,5397
Mean±STD	7,166±6,422	6,600±9,227	
Median	7,000	2,500	
Range (min-maks)	0,00-23,00	0,00-30,00	

Keterangan:

Untuk data numerik nilai p dihitung berdasarkan uji Mann Whitney karena data tidak berdistribusi normal. Nilai kemaknaan berdasarkan nilai $p < 0,05$. Tanda* menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang artinya signifikan atau bermakna secara statistik.

Tabel 3: Perbedaan tingkat ekspresi CD8 pada kelompok bebas penyakit dan kekambuhan

Variabel	Kelompok		Nilai P
	Bebas penyakit N= 12	Kekambuhan N=10	
CD 8			0,002**
Mean±STD	20,91±12,70	5,900±6,081	
Median	20,500	4,000	
Range (min-maks)	4,00-50,00	0,00-17,00	

Keterangan:

Untuk data numerik nilai p dihitung berdasarkan uji T tidak berpasangan karena distribusi normal. Nilai kemaknaan berdasarkan nilai $p < 0,05$. Tanda* menunjukkan nilai $p < 0,05$ artinya signifikan atau bermakna secara statistik.

Tabel 4: Kolerasi antara ekspresi TILs ekspresi CD8 dengan kanker ovarium yang bebas penyakit

Variabel	Kelompok	R	Nilai P
CD 8	13,47±12,66	0,607	0,000**

Keterangan:

Kolerasi antara nominal dengan numerik menggunakan korelasi Eta. Nilai kemaknaan $p < 0,05$. Tanda ** menunjukkan signifikan atau bermakna secara statistik. r : koefisien korelasi

Tabel 5: Kolerasi antara tingkat ekspresi TILs CD4 dengan kanker ovarium yang bebas penyakit

Variabel	Kelompok	R	Nilai P
CD 4	6,608±7,590	0,038	0,621

Keterangan:

Kolerasi antara nominal dengan numerik menggunakan korelasi Eta. Nilai kemaknaan $p < 0,05$. Tanda ** menunjukkan signifikan atau bermakna secara statistik. r : koefisien korelasi

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan usia rata-rata kelompok yang mengalami kekambuhan sedikit lebih muda daripada kelompok yang bebas penyakit. Hal ini mungkin terjadi karena terdapat satu pasien yang berumur 14 tahun, yaitu rentang umur 14-59 tahun. Akan tetapi, perbedaan ini tidak bermakna secara statistik dengan $p = 0,237$ sehingga tidak menunjukkan bukti bahwa usia merupakan perancu pada penelitian ini. Seperti halnya usia pasien, distribusi jenis histopatologi pun menunjukkan perbedaan tidak bermakna pada penelitian ini. Pada kedua kelompok lebih banyak berjenis histopatologi musinosum

dalam distribusi. Hal ini serupa pada kedua kelompok. Bachmayr-Heyda, dkk., mengadakan penelitian dengan jumlah pasien 203 orang. Rata-rata usia pasien saat didiagnosis adalah 56 tahun (antara 18-85 tahun). Jenis histopatologi merupakan tipe epitel, terdiri dari 179 (88,8%) tipe serosum dan 24 (11,8%) tipe non-serosum.⁷ Fujita, dkk., mengadakan penelitian dengan jumlah pasien 13 dengan kontrol 11 pasien. Karakteristik jenis histopatologi terdiri dari 7 tipe serosum, 3 pasien dengan tipe musinosum, 2 pasien dengan tipe endometrioid, serta 1 tidak diketahui histopatologi.⁸

Tumor-infiltrating lymphocytes efektif dalam menunda perkembangan tumor. Namun, penting untuk membedakan antara berbagai jenis limfosit T, karena mereka semua memiliki fungsi yang berbeda dalam lingkungan mikrotumor. CD8 *cytotoxic lymphocyte T* (CTLs) secara langsung mampu membunuh sel tumor. CD4 limfosit T helper (Th) adalah sitokin mensekresi heterogen limfosit T. T helper limfosit tipe 1 (Th1) memiliki peran penting dalam mengaktifkan CTLs. T helper limfosit tipe 2 merangsang kekebalan humoral dan mengaktifkan eosinofil. Dalam hal kekebalan antitumor, aktivasi Th2 kurang efektif dibandingkan aktivasi Th1. Selain Th1 dan Th2, CD4 *regulatory T lymphocyte* (Treg) menekan limfosit T efektor.⁹

Pada penelitian ini, berdasarkan uji beda pada tabel 2 tampak bahwa tingkat ekspresi TILs CD4 pada kedua kelompok hampir sama dan menunjukkan perbedaan statistik yang tidak bermakna. Sebaliknya, perbedaan tingkat ekspresi CD8 sangat bermakna antara kanker ovarium yang mengalami kekambuhan dan bebas penyakit. Hal ini dapat terjadi karena dalam penghancuran tumor CD4 perlu rantai yang panjang untuk mengaktifkan beberapa mata rantai, termasuk CD8, seperti dapat dilihat pada tabel 3. Dengan demikian, perannya dipengaruhi oleh respons dari mata rantai lain yang menyebabkan tidak adanya perbedaan tingkat ekspresi pada kedua kelompok. Hal ini berbeda dengan CD8 yang merupakan TIL efektor sehingga keberadaan CD8 tampaknya sejalan dengan penghancuran sel tumor yang terbukti dari perbedaan yang sangat bermakna dari kedua kelompok penelitian dan berkorelasi cukup kuat dengan rendahnya kekambuhan.

Beberapa penelitian lain seperti Kaplan-Meier kurva dan uji *log rank* menunjukkan bahwa pasien positif TILs CD8 secara signifikan mempunyai prognosis lebih baik secara keseluruhan dan

kelangsungan hidup serta *progression-free survival* dibandingkan pasien dengan TILs CD8 T negatif (5 *years survival rate* \pm SD, positif vs negatif: $86,9 \pm 6,1\%$ vs $39,0 \pm 8,7\%$), $P < 0,001$ dan $75,0 \pm 7,7\%$ vs $31,6 \pm 7,5\%$, $P < 0,001$.

Piersma dkk., mengamati keberadaan sel T CD8 intratumor pada kanker serviks berhubungan dengan kurangnya penyebaran pada nodus limfe dan secara tidak langsung berpengaruh pada prognosis. Jumlah sel limfosit T CD8 infiltratif sel tumor yang tinggi merupakan faktor prognosis ketahanan hidup yang baik pada beberapa studi, termasuk kanker endometrium, kanker ovarium, kanker kolorektal, dan kanker esophagus.¹⁰

Sebaliknya, penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat ekspresi TILs CD4 pada kelompok bebas penyakit rata-rata sebesar $7,166 \pm 6,422$, sedangkan pada kelompok kekambuhan rata-rata sebesar $6,600 \pm 9,227$. Analisis statistik menunjukkan perbandingan CD4 yang merupakan perbandingan data numerik dua kelompok tidak berpasangan dan diuji dengan uji statistik non-parametrik Mann Whitney untuk variabel CD4 karena analisis menunjukkan data tidak berdistribusi normal.

Hasil uji statistik pada kelompok penelitian CD4 menunjukkan nilai $p = 0,539$, di mana nilai p ini lebih besar dari 0,05 (nilai $p > 0,05$). Ini berarti, tidak signifikan atau tidak bermakna secara statistik. Dengan demikian, dapat dijelaskan bahwa tidak terdapat perbedaan rerata yang signifikan atau bermakna secara statistik CD4 antara kedua kelompok penelitian, yaitu bebas penyakit dan kekambuhan. Hal ini mungkin terjadi karena CD4 tidak bersifat sebagai antitumoral secara langsung seperti CD8.

Peran sel T CD4 masih kontroversial dan dianggap sebagai pedang bermata dua karena CD4 memainkan peran dalam mengenali dan memelihara respons imun antikanker. Sel T CD4 penting dalam respons antigen spesifik primer, serupa CD8 dengan kemampuan mengembangkan sel memori fungsional jangka panjang. Pada imunitas antitumor, CD4 sel T penting dalam memelihara fungsi adaptif dari sel T CD8. Sebaliknya, sel T CD4 atau T regulator (Treg) penting untuk mengendalikan respons imun terhadap antigen *self* dan *non-self*. Tumor infiltratif Treg memiliki prognosis lebih buruk karena menekan proliferasi limfosit T efektor sehingga menekan respons imun tumor spesifik dan memungkinkan pertumbuhan tumor.¹⁰

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa ada korelasi atau hubungan yang cukup kuat atau moderat antara tingkat ekspresi CD8 dengan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang bebas penyakit, dengan nilai r untuk nilai korelasi CD 8 sebesar 0,607. Sedangkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara TILs CD8 dengan kanker ovarium stadium lanjut tipe epitel bebas penyakit. Artinya, semakin tinggi tingkat ekspresi TILs CD8, semakin tinggi angka kanker ovarium bebas penyakit. Sebaliknya, semakin rendah angka kanker ovarium dengan kekambuhan. Ini berbeda dengan CD4 yang menunjukkan korelasi atau hubungan yang tidak signifikan antara CD4 dengan kanker ovarium yang bebas penyakit.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan tingkat ekspresi TILs CD8 dan CD4 antara kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang bebas penyakit dengan yang mengalami kekambuhan. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa terdapat korelasi atau hubungan yang positif antara tingkat ekspresi TILs CD8 dengan kanker ovarium tipe epitel stadium lanjut yang bebas penyakit. Semakin tinggi tingkat ekspresi TILs CD8, semakin tinggi angka kejadian kanker ovarium yang bebas penyakit, namun berbanding terbalik semakin rendah angka kekambuhan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Society AC. Cancer Facts & Figure-1998. Atlanta, GA: American Cancer Society Inc; 1998.
2. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 2004;10(9):942-9.
3. Taylor K, Schwartz PE. Screening for early ovarian cancer. *Radiology* 1994;192(1):1-10.
4. Zang RY, Harter P, Chi DS, et al. Predictors of survival in patients with recurrent ovarian cancer undergoing secondary cytoreductive surgery based on the pooled analysis of an international collaborative cohort. *British Journal Cancer* 2011;105:890-896.
5. Polverino G, Parazzini F, Stellato G, Scarfone G, Cipriani S, Bolis G. Survival and prognostic factors of women with advanced ovarian cancer and complete response after a carboplatin-paclitaxel chemotherapy. *Gynecologic oncology* 2005;99(2):343-7.
6. Guilford J.P., Psychometric Methods , Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited 1979.
7. Bachmayr-Heyda A, Aust S, Heinze G, et al. Prognostic Impact of Tumor Infiltrating CD8 T Cells in Association with Cell Proliferation in Ovarian Cancer Patient- a Study of The OVCAD Consortium. *BMC Cancer* 2013; 13: 422.
8. Fujita K, Ikarashi H, Takakuwa K, et al. Prolonged Disease Free Period in Patient with Advanced Epithelial Ovarian cancer after Adoptive Transfer of TIL. *Clin Cancer Res.* 1995; 1:501-507.
9. Levine DA, Jennifer F, Fleming GF, Barakat RR, Markman M, Randall ME. Handbook for principles and practice of gynecologic oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 2012
10. Stumpf M, Haenburg A, Riener MO, et al. Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T Lymphocytes. *British Jou Ca.* 2009;101:1513-1531.