

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan studi analitik komparatif menggunakan desain potong lintang (*cross sectional*) pada 2 kelompok untuk menganalisis perbedaan ekspresi PD-L1 pada KNF. Masing-masing kelompok dibagi menjadi kelompok stadium awal (15 sampel) dan stadium lanjut (15 sampel). Pemeriksaan dilakukan dengan imunohistokimia pada pasien KNF stadium awal dan KNF stadium lanjut. Berikut ini akan dibahas mengenai karakteristik responden dan ekspresi PD-L1 pada KNF stadium awal dan stadium lanjut.

5.1 Karakteristik Responden Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan kejadian KNF lebih banyak terjadi pada laki (60%) dibandingkan dengan perempuan (40%) dengan rasio 1,5:1 baik pada KNF stadium awal dan stadium lanjut. Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa kejadian KNF lebih sering terjadi pada laki-laki dibandingkan dengan perempuan dengan rasio 2-3:1 baik di daerah endemik maupun non endemik.^{1,23} Mahdavi et al yang melaporkan 71,02% dari 68.272 pasien KNF adalah pria.⁷ *Global Burden Cancer* pada tahun 2018 juga melaporkan kasus baru KNF terutama ditemukan pada pria sebesar 72.37% dari 129.079 kasus baru KNF.²⁵ Banyaknya penderita laki-laki dibandingkan dengan perempuan sering dikaitkan dengan kebiasaan merokok dan pekerjaan laki-laki. Beberapa kepustakaan menyebutkan bahwa merokok mempunyai peranan penting sebagai karsinogen pada KNF terutama pada populasi laki-laki.³³ Perokok aktif dengan konsumsi rokok lebih dari 30 bungkus/tahun dapat meningkatkan risiko kejadian KNF dibandingkan dengan perokok aktif yang kurang dari 30 bungkus per tahun. Laki-laki juga rentan terpapar dengan debu dikarenakan mayoritas pekerja adalah laki-laki dengan risiko aktifitas pekerjaan di lingkungan udara yang buruk.³⁶

Rata-rata umur responden penderita KNF stadium awal adalah $52,1 \pm 13,9$ tahun dengan kelompok usia terbanyak adalah ≥ 60 tahun. Sedangkan, rata-rata umur responden penderita KNF stadium lanjut adalah $47,3 \pm 12,9$ tahun dengan kelompok

usia terbanyak adalah 40-49 tahun. Sesuai dengan beberapa penelitian epidemiologi yang menyebutkan bahwa insiden KNF meningkat pada usia 30 tahun, dimana 93% terjadi setelah melewati usia 30 tahun dengan puncak tertinggi saat usia 45-55 tahun.²⁹ Safavi³² dalam penelitiannya mendapatkan rata-rata umur penderita KNF adalah 47.16 ± 18.38 dengan perbandingan laki-laki dan perempuannya 2.08:1. Sedangkan Adham⁹ mendapatkan insiden tertinggi KNF di RS Ciptomangunkusumo Jakarta terdapat pada kelompok umur yang sama.

Dalam penelitian ini didapatkan sebagian besar tipe histopatologi dari pasien KNF stadium awal adalah WHO tipe III sebanyak 9 kasus (60%) dan pada KNF stadium lanjut sebanyak 8 kasus (53,3%). Sebagaimana penelitian di daerah endemik lainnya, tipe histopatologi yang paling banyak ditemukan adalah histopatologi tipe WHO III yaitu tidak berkeratin tidak berdiferensiasi.^{9,77} Lo⁷⁸ menyebutkan bahwa 97% kasus di daerah endemis adalah WHO tipe III. Sesuai dengan penelitian Handayani di RS Hasan Sadikin Bandung pada pasien KNF pada tahun 2010-2017 didapatkan tipe WHO III paling banyak ditemukan sebanyak 58,3%, Rahman²⁷ di RSUP Dr.M.Djamil Padang pada tahun 2010, didapatkan paling banyak WHO tipe III sebanyak 55,2% diikuti dengan WHO tipe II sebanyak 42,1%. Adham⁹ dalam penelitiannya di RS Ciptomangunkusumo Jakarta mendapatkan WHO tipe III sebanyak 85% kasus. Pada penelitian ini didapatkan histopatologi tipe WHO 1 pada KNF stadium akhir sebanyak 1 kasus (6,7%). Berbeda dengan penelitian Faiza¹² yang mendapatkan pasien dengan histopatologi tipe 1 atau karsinoma sel skuamosa berkeratin sebanyak 13,64%. Beberapa literatur menyebutkan bahwa tipe WHO 1 sangat jarang terjadi di daerah endemik, dan lebih sering di daerah non endemis. WHO tipe 1 sering berhubungan dengan alkohol dan tembakau serta serologi EBV negatif.³⁶

Pada penelitian ini klasifikasi T tumor primer terbanyak yang ditemukan dari semua responden KNF adalah T2. Yeung⁷⁹ di Hongkong mendapatkan klasifikasi T terbanyak dari 46 pasien KNF yang diteliti adalah T2 sebanyak 36,95% dan yang paling sedikit adalah T4 sebanyak 6,5%. Ruan⁸⁰ di China juga mendapatkan klasifikasi tumor primer paling banyak pada 37 pasien KNF yang ditelitinya adalah T2 sebanyak 35,1% dan yang paling sedikit adalah T4 sebanyak 5,4%.

Sebagian besar pasien pada penelitian ini adalah stadium IV, yaitu sebanyak 11 pasien (36,7%), 9 pasien terdiagnosis pada stadium II (30%), diikuti oleh 6 orang pasien dengan stadium I (20%) dan 4 orang pasien dengan stadium III (13,3%) Berbagai penelitian menyebutkan juga bahwa penderita KNF sering datang pada stadium akhir. Wu⁸¹ di China melaporkan bahwa >70% pasien KNF datang pada stadium lanjut yaitu stadium III dan IV. Melani⁸² dalam penelitian di RS Adam Malik Medan mendapatkan 75% pasien KNF datang pada stadium IV. Faiza¹² dalam penelitiannya mendapatkan 86,36% pasien datang pada stadium akhir, disini stadium akhir yang dimaksud adalah stadium III dan IV. Dawolo⁸³ dalam penelitiannya di RS Mohammad Hosein Palembang juga mendapatkan 77,27% pasien KNF datang pada stadium IV.

5.3 Perbedaan ekspresi PD-L1 antara stadium awal dengan stadium lanjut pada Karsinoma Nasofaring

Dalam beberapa tahun terakhir, imunoterapi telah menjadi metode baru pengobatan kanker. Saat ini, terapi blokade *immune checkpoint* adalah salah satu metode imunoterapi tumor yang paling banyak digunakan. Jalur yang melibatkan PD-1 dan PD-L1 telah diterapkan dalam pengobatan klinis berbagai kanker yang telah disetujui untuk berbagai jenis kanker, termasuk melanoma, *non-small cell lung cancer* (NSCLC), limfoma Hodgkin, kanker kandung kemih, *renal cell carcinoma* (RCC), *head and neck squamous cell carcinoma* (HN-SCC), kanker payudara, Merkel cell carcinoma, *hepatocellular carcinoma* (HCC) and *gastric cancer* (GC). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 berdasarkan stadium KNF. Deng dkk⁸⁴ di Guangdong China menemukan perbedaan bermakna secara statistik ekspresi PD-L1 pasien stadium awal dan stadium akhir ($p = 0,002$). Ekspresi PD-L1 ditemukan meningkat pada stadium lanjut sebanyak 67,3% dan stadium awal sebanyak 43,4%. Pada penelitian tersebut tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi PD-L1 berdasarkan jenis kelamin, umur dan klasifikasi

T. Li dkk¹⁸ menemukan ekspresi PD-L1 yang tinggi secara signifikan pada stadium IV dibandingkan pasien stadium I-III. Zhou¹⁹ melaporkan peningkatan ekspresi PD-L1 secara signifikan ditemukan sebanyak 74,3% pada stadium III-IV lebih tinggi daripada stadium I-II. Selain itu, Zhou juga menemukan peningkatan ekspresi yang

signifikan berhubungan dengan klasifikasi T pada KNF, pada T1-2 didapat sebanyak 41,9% dan T3-4 sebanyak 74,3%. Pada penelitian Yajuan Zhou dkk⁷¹, ditemukan ekspresi PD-L1 yang tinggi sebanyak 67,6% pada stadium IV KNF dan tidak ditemukan perbedaan signifikan berdasarkan klasifikasi T.

Pada penelitian ini, secara imunohistokimia dengan penilaian TPS didapatkan ekspresi kuat PD-L1 tampak pada 3 sampel KNF stadium awal (20%) dan 4 sampel KNF stadium lanjut (26,7%). Berdasarkan analisis data didapatkan nilai $p=1,00$ ($p>0,05$) yang artinya tidak terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 yang bermakna antara stadium awal dengan stadium lanjut pada KNF. Pada penilaian IRS didapatkan ekspresi kuat PD-L1 tampak pada 1 sampel KNF stadium awal (0,7%) dan 4 sampel KNF stadium lanjut (26,7%). Berdasarkan analisis data didapatkan nilai $p=0,33$ ($p>0,05$) yang artinya tidak terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 yang bermakna antara stadium awal dengan stadium lanjut pada KNF. Pada penelitian ini penilaian ekspresi PD-L1 pada pemeriksaan IHK menggunakan dua sistem skoring dengan *Tumor Proportion Score* (TPS) dan *Immuno Reactive Score* (IRS). Minichsdorfer⁷⁶ menyebutkan sejauh ini belum ada sistem skoring yang di validasi untuk PD-L1 karena itu terdapat perbedaan sistem skoring yang di pakai di beberapa penelitian. Penilaian TPS merupakan skor tunggal yang bersifat kualitatif yang menilai ekspresi hanya dengan melihat proporsi sel yang terwarnai saja, sedangkan menurut Fedchenko⁸⁵ penilaian IRS merupakan skor kombinasi yang menggabungkan kualitatif dan semikuantitas terdiri atas dua komponen yakni penghitungan skor proporsi sel yang positif terwarnai dan penilaian skor intensitas pewarnaan. Skor kombinasi dianggap lebih sensitif daripada skor tunggal.⁸⁵

Sebuah penelitian metaanalisis mengenai nilai prognostik dan klinikopatologi ekspresi PD-L1 pada 1.315 pasien KNF yang mengikutkan 11 penelitian tahun 2016-2019 yang dilakukan di China, Hongkong, Filipina, Thailand, Taiwan dan Jepang didapatkan bahwa peningkatan ekspresi PD-L1 tidak berhubungan dengan stadium tumor ($p=0,1$), klasifikasi T tumor primer, usia dan jenis kelamin. Pada penelitian tersebut didapatkan peningkatan ekspresi PD-L1 berhubungan dengan OS yang buruk pada pasien stadium III-IV ($p=0,049$), sehingga disimpulkan bahwa PD-L1 dapat dijadikan faktor prognostik untuk KNF.⁸⁶ Pada penelitian Zhang dkk⁸⁷ di Changsa, China, didapatkan ekspresi kuat PD-L1 pada stadium lanjut sebanyak

62,9% dari 114 pasien lebih banyak dibandingkan pada stadium awal sebanyak 59,6% dari 57 pasien tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi PD-L1 berdasarkan stadium KNF ($p=0,647$). Sedangkan berdasarkan klasifikasi T terdapat perbedaan bermakna secara statistik ($p=0,002$), ekspresi kuat PD-L1 terbanyak didapatkan pada kelompok pasien T4 sebanyak 69,3% dari 75 pasien, pada kelompok T3 sebanyak 65,4% dari 78 pasien, pada kelompok T2 sebanyak 63,1% dari 103 pasien dan pada kelompok T1 sebanyak 28% dari 25 pasien. Pada penelitian ini juga tidak ditemukan perbedaan bermakna ekspresi PD-L1 berdasarkan umur, jenis kelamin dan jenis histopatologi. Pada penelitian ini ditemukan peningkatan ekspresi PD-L1 berhubungan dengan peningkatan ekspresi PD-1 dan p-S6. S6 merupakan target *downstream* jalur onkogenik PI3K/Akt/mTOR. Overekspresi p-S6 dapat menyebabkan disregulasi mTor. Jalur PI3K terlibat pada regulasi ekspresi PD-L1. Peningkatan ekspresi PD-L1 juga berhubungan dengan peningkatan ekspresi PD-1 oleh CD8+ T dan sekresi IFN γ .

Pada penelitian Cao⁸⁸ di Macau, China didapatkan dari pemeriksaan IHK dengan skor presentase sel yang terwarnai, PD-L1 terekspresi kuat sebanyak 30,2% pada stadium lanjut dan sebanyak 20,8% pada stadium awal tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik ekspresi PD-L1 antara stadium awal dan stadium lanjut KNF.

Penelitian Lee dkk¹⁶ di Hongkong juga mendapatkan ekspresi kuat PD-L1 didapatkan sebanyak 22,2 % pada stadium lanjut lebih banyak dibanding 18,75% pada stadium awal tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik ekspresi PD-L1 antara KNF stadium awal dan stadium lanjut ($p=0,86$).

Zhao⁷⁰ pada penelitiannya di Fujian China juga menemukan tidak adanya perbedaan bermakna secara statistik peningkatan ekspresi PD-L1 berdasarkan stadium tumor ($p=0,118$), ditemukan sebanyak 46,3% pada stadium I-III dan sebanyak 53,7% pada stadium IV. Sedangkan berdasarkan klasifikasi T tumor primer terdapat perbedaan signifikan ($p= 0,033$), ekspresi kuat ditemukan sebanyak 72,2% pada kelompok T3-T4 dan sebanyak 27, 8% pada kelompok T1-T2. Penelitian ini menyimpulkan ekspresi PD-L1 di sel tumor bisa jadi diregulasi oleh mekanisme tumor-intrinsik seperti aktivasi jalur sinyal onkogenik dan jalur pensinyalan lain yang terkait, terlepas dari sinyal inflamasi di lingkungan mikro tumor.

Zhu⁶⁸ melaporkan terdapat dua mekanisme regulasi PD-L1 oleh sel tumor yaitu : resistensi imun bawaan (*innate immune resistance*) dan resistensi imun adaptif. Resistensi imun bawaan terjadi ketika peningkatan ekspresi PD-L1 pada sel-sel tumor diinduksi oleh jalur sinyal onkogenik. Ekspresi PD-L1 sebagai resistensi imun adaptif dapat diinduksi oleh IFN- γ yang disekresikan sel T aktif.⁵⁸ Selain itu, Ju dkk⁸⁹ menyebutkan bahwa ekspresi PD-L1 juga diatur oleh amplifikasi genomik, regulasi transkripsi dan regulasi epigenetik. Mekanisme inilah yang mengatur ekspresi PD-L1 tumor pada level yang berbeda.

PD-L1 terletak pada kromosom 9p24.1. Amplifikasi wilayah 9p24.1 berhubungan erat dengan peningkatan level PD-L1 pada berbagai jenis kanker. Telah ditemukan bahwa *copy number alteration* (CNAs) dari PD-L1 terjadi pada berbagai jenis tumor yang secara langsung mengarah pada peningkatan regulasi ekspresi PD-L1 yang berbeda. Beberapa penelitian yang dikutip oleh Ju dkk⁸⁹ melaporkan bahwa frekuensi CNA tertinggi dari PD-L1 telah ditemukan di *primary mediastinal B-cell lymphoma* (PMBCL), *classic lymphoma Hodgkin* (cHL) dan kanker payudara, masing-masing di 63%, 40% dan 29%. Namun, dalam GC, NSCLC dan *diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL), CNA jauh lebih rendah, dengan frekuensi masing-masing 15%, 1,9%, 5,3% dan 3 %. Zerdes⁹⁰ juga menyimpulkan bahwa peningkatan CNA berkorelasi positif dengan level protein PD-L1 yang diekspresikan oleh sel tumor.

Pada regulasi epigenetik, modifikasi epigenetik seperti *microRNA* (miRNA), metilasi DNA promotor dan modifikasi histon dapat mengatur pengenalan dan pengikatan faktor transkripsi ke elemen DNA tanpa mempengaruhi urutan DNA, sehingga mengubah struktur kromatin dan mengatur level ekspresi PD-L1. miRNA adalah kelas *non-coding single-stranded RNAs* yang mengandung 22-24 nukleotida. miRNA menghambat translasi atau degradasi mRNA target dengan berikatan ke wilayah 3' yang belum diterjemahkan (3'UTR) dari mRNA target. Sejumlah miRNA telah ditemukan untuk mengatur level ekspresi PD-L1 pada berbagai jenis kanker, termasuk miR513.^{89,90} Fang⁶⁹ yang meneliti hubungan LMP1 dan IFN γ dalam mengatur ekspresi PD-L1 pada KNF juga melaporkan bahwa miR513 berperan dalam mekanisme *post transcriptional* yang mengatur ekspresi PD-L1. Tulalamba⁵⁰ juga melaporkan beberapa seluler miRNA yang berbeda-beda yang di ekspresikan

KNF menyebabkan perubahan ekspresi gen seluler yang mempengaruhi berbagai jalur pensinyalan dalam proliferasi sel dan apoptosis KNF.

Sejumlah faktor transkripsi telah ditemukan untuk mengatur aktivasi transkripsi PD-L1. Faktor transkripsi ini termasuk MYC, STAT3, NF- κ B, AP1, dan *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1). Onkogen MYC adalah faktor transkripsi yang diekspresikan secara berlebihan dan diaktifkan dalam berbagai tumor dan terlibat dalam tumorigenesis. Namun, ada kontroversi tentang regulasi ekspresi PD-L1 oleh MYC. Casey dkk⁹¹ menemukan bahwa penghambatan MYC pada sel tumor mengakibatkan penurunan mRNA PD-L1 dan ekspresi protein. MYC dapat mengikat langsung ke promotor PD-L1 dan meningkatkan respon imun anti tumor. Sebaliknya, Hogg dkk⁹² melaporkan bahwa tingkat transkripsi MYC menghambat ekspresi mRNA PD-L1. Fang⁶⁹ melaporkan bahwa STAT3 adalah faktor transkripsi lain yang dilaporkan yang terlibat dalam regulasi ekspresi PD-L1, STAT3 meningkatkan ekspresi PD-L1 dengan mengikat promotor PD-L1. Juga dilaporkan bahwa LMP1 dari virus Epstein-Barr dapat menginduksi ekspresi PD-L1 melalui penginduksian fosforilasi STAT3. Noman melaporkan⁹³ *Hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) adalah faktor karsinogenik penting lainnya dan memiliki signifikansi klinis dalam mengatur ekspresi PD-L1 dalam sel tumor. Ekspresi berlebihan HIF-1 α menginduksi peningkatan level PD-L1.

Ditemukan juga bahwa *ubiquitination*, *deubiquitination*, glikosilasi dan fosforilasi dapat mempengaruhi stabilitas protein PD-L1 dalam sel kanker, sehingga mengatur ekspresi protein PD-L1. Beberapa protein dilaporkan mengatur stabilitas protein PD-L1 melalui ubiquitination. CSN5 adalah komponen kelima dari kompleks *Component of Signalosome* (CSN), yang berisi *Jab1/MPN domain metalloenzyme* (JAMM). CSN5 memiliki aktivitas deubiquitinasi melalui motif JAMM dan berperan penting selama tumorigenesis. Lim dkk⁹⁴ menemukan bahwa makrofag mengeluarkan TNF- α untuk mengaktifkan NF- κ B dan kemudian menginduksi transaktivasi CSN5. Aktivasi CSN5 menghasilkan deubiquitinasi PD-L1 dalam sel kanker dan meningkatkan stabilitas PD-L1.⁸⁹

Minichsdorfer⁷⁶ di Austria hanya menemukan ekspresi kuat PD-L1 sebanyak 20% pada 55 sampel KNF ras Caucasian yang diperiksa. Penelitian tersebut mendapatkan ekspresi kuat PD-L1 berhubungan dengan penurunan OS pasien.

penelitian tersebut mendapatkan hanya 63% pasien menunjukkan EBV positif dan disimpulkan bahwa EBV negatif memiliki lingkungan imunologi mikrotumor yang berbeda dengan EBV positif dan ini berhubungan dengan perbedaan ekspresi PD-L1 pada KNF. Minichsdorfer⁷⁶ juga menggunakan antibodi klon 22C3 Dako seperti pada penelitian ini yang termasuk dalam alat diagnostik yang disetujui FDA untuk pewarnaan PD-L1 di berbagai jenis *solid malignancies*. Penelitian tersebut juga memberikan kesimpulan tambahan mengenai perbedaan ekspresi PD-L1 yang dilaporkan di beberapa literatur kemungkinan dapat disebabkan karena tidak ada antibodi seragam yang digunakan untuk pewarnaan IHK untuk PD-L1. Buttner⁹⁵ juga melaporkan hasil pewarnaan IHK PD-L1 dapat berbeda tergantung pada antibodi yang digunakan. Selain itu, tidak ada algoritma penilaian PD-L1 untuk KNF yang tervalidasi sejauh ini yang telah dikembangkan dan tidak ada konsensus mengenai skoring kepositifan PD-L1 yang diterima secara luas.

Di Indonesia sendiri penelitian ekspresi PD-L1 yang sudah dipublikasi dilakukan oleh Handoko dkk⁹⁶ di RSCM, penelitian awal ini menemukan peningkatan ekspresi PD-L1 pada 24 jaringan KNF dibandingkan dengan 8 jaringan nasofaring normal dengan menggunakan pemeriksaan ELISA. Sedangkan Godhowiardjo dkk⁹⁷ menemukan ekspresi kuat PD-L1 pada 9 spesimen KNF (36%) dari 25 spesimen KNF stadium lanjut dengan pemeriksaan IHK. Pada penelitian ini tidak terdapat spesimen KNF stadium awal. Penelitian ini juga menyimpulkan terdapatnya hubungan bermakna peningkatan ekspresi PD-L1 dengan TILs. Perbedaan berbagai hasil penelitian ekspresi PD-L1 tersebut kemungkinan dapat dipengaruhi juga oleh faktor infeksi EBV yang memicu jalur onkogenik dan proses genetik serta ada tidaknya TILs di lingkungan mikrotumor yang mempengaruhi regulasi ekspresi PD-L1 pada sel tumor.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Ekspresi kuat PD-L1 ditemukan lebih banyak pada KNF stadium lanjut dibandingkan KNF stadium awal
2. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi PD-L1 antara stadium awal dengan stadium lanjut KNF

6.2 Saran

1. Pola pemeriksaan ekspresi PD-L1 dengan metode imunohistokimia ini dapat digunakan pada penderita karsinoma nasofaring di RSUP Dr. M. Djamil, Padang
2. Diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk EBV dan TILs yang berpengaruh terhadap ekspresi PD-L1 pada KNF

