

**KARYA AKHIR**

**PERBANDINGAN EKSPRESI PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 (PD-L1 PADA DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA (DLBCL) SUBTIPE GERMINAL CENTRE-LIKE B-CELL (GCB) DAN ACTIVATING B-LIKE CELL (ABC)**

***COMPARISON OF PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 (PD-L1) EXPRESSION IN DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA (DLBCL) GERMINAL CENTRE-LIKE B-CELL (GCB) AND ACTIVATING B-LIKE CELL (ABC) SUBTYPE***

**NORSIKAWATY HAYA**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1  
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
2021**

**PERBANDINGAN EKSPRESI PROGRAMMED CELL DEATH-  
LIGAND 1 (PD-L1 PADA DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA  
(DLBCL) SUBTIPE GERMINAL CENTRE-LIKE B-CELL (GCB) DAN  
ACTIVATING B-LIKE CELL (ABC)**

**KARYA AKHIR**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Spesialis-1 (Sp.1)

Program Studi  
Ilmu Patologi Anatomi

Disusun dan Diajukan Oleh

**NORSIKAWATY HAYA**

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)  
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**

## KARYA AKHIR

**PERBANDINGAN EKSPRESI PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 (PD-L1)  
PADA DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA (DLBCL) SUBTIPE GERMINAL  
CENTRE-LIKE B-CELL (GCB) DAN ACTIVATING B-LIKE CELL (ABC)**

Disusun dan diajukan oleh :  
**dr. NORSIKAWATY HAYA**

**C075172003**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis  
Program Studi Ilmu Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 29 Maret 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

**Menyetujui**

**Pembimbing Utama**



**dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA**  
NIP. 19770409 200212 1 002

**Pembimbing Pendamping**



**dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)**  
NIP. 19740330 200501 2 001

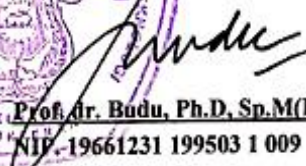
**Ketua Program Studi  
Ilmu Patologi Anatomi**



**dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)**  
NIP. 19740330 200501 2 001



**Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin**



**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
NIP. 19661231 199503 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : NORSIKAWATY HAYA  
Nomor Pokok : C075172003  
Program Studi : Ilmu Patologi Anatomi  
Konsentrasi : Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi FK UNHAS

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Maret 2021

Yang menyatakan,



NORSIKAWATY HAYA

## PRAKATA

Alhamdulillah puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran **Allah Azza Wa Jalla**, hanya atas berkat rahmat dan hidayahNya sehingga karya akhir ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulisan karya akhir ini merupakan salah satu persyaratan dalam rangka penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Disamping itu, penulis bermaksud untuk menyumbangkan pikiran mengenai *Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1)* pada *Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)*

Dalam penelitian dan penulisan karya akhir ini, penulis mendapat banyak bantuan dari berbagai pihak dan karena itu ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada:

1. **dr. M. Husni Changara, Ph.D, Sp.PA**, sebagai pembimbing pertama yang dengan penuh perhatian membimbing dan mendorong penulis selama menempuh pendidikan dan pada pada penyusunan karya akhir ini.
2. **dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)**, sebagai pembimbing kedua dalam penelitian yang selalu tulus membimbing, mendukung, mereview dan mendorong penulis hingga menyelesaikan karya akhir ini.
3. **Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM**, yang di tengah kesibukan yang sangat padat masih menyempatkan diri untuk membimbing dan membantu penulis dalam metodologi penelitian dan analisis statistik dalam karya akhir ini.

4. **dr. Gunawan Arsyadi, Sp.PA(K)**, sebagai salah satu penguji dalam meneliti, mereview dan dengan penuh ketulusan membimbing penulis baik dalam penelitian ini maupun sebagai pengajar.
5. **dr. Ni Ketut Sungowati, Sp.PA(K)**, sebagai salah satu penguji dalam penelitian dan dengan penuh ketulusan membimbing penulis baik dalam penelitian maupun pada masa pendidikan.
6. Seluruh staf pengajar di bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin tanpa terkecuali (**Prof. dr. Syarifudin Wahid, Sp.PA(K)**, **dr. Cahyono Kaelan, PhD, Sp.S, Sp.PA(K)**, **dr. Trully Djimahit, Sp.PA(K)**, **dr. Djumadi Achmad, Sp.PA(K)**, **Dr. dr. Rina Masadah, M.Phil, Sp.PA(K)**, **dr. Mahmud Ghaznawie, Sp.PA(K)**, **Dr. dr. Gatot S. Lawrence, Sp.PA(K)**, **dr. Anna Maria Tjoanto, Sp.PA(K)**, **dr. Juanita, M.Kes, Sp.PA**, **dr. Imeldy Prihatni, M.Kes, Sp.PA**, **dr. Ruth Norika Amin, M.Kes, Sp.PA**, **dr. Tri Lestari M.Kes, Sp.PA**, **dr. Syamsu Rijal, M.Kes, Sp.PA**, **dr. Wahyuni Sirajuddin, M.Kes, Sp.PA**, dan **dr. Amalia Yamin, M.Kes, Sp.PA**) atas bantuan dan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan maupun dalam penyusunan karya akhir ini.
7. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makasar, atas kesediaannya menerima penulis menjadi peserta didik di Program Pendidikan Dokter Spesialis-1, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makasar.
8. Manajer Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

9. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia atas bantuan dana pendidikan melalui Beasiswa Program Pendidikan Dokter Spesialis Kemenkes sejak tahun 2018.
10. Semua teman sejawat residen di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar atas bantuan dan dorongannya selama penulis menjalani masa pendidikan dan dalam penyusunan karya akhir ini, Khususnya **dr. Ummu Kalzum Malik, dr. Yemima Tangdiung, dan dr. Miswani Mukani Syaib.**
11. Seluruh karyawan Sentra Diagnostik Patologia Makassar, Laboratorium di bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo Makasar.
12. Orang tua (ayahanda Drs. H. **Kamran Haya**, MM, ibunda Hj. **Asiah**, ayahanda Drs. H. **Mustari Sanusi**, Apt, Msi Rahimahullah, Ibunda Dra. Hj. **Wardah Fathmah**, Apt), saudara-saudara tersayang (**Siskah Haya, Desy Arisandy Haya, Mus Muayyad, Munafirah, Mustamirah**), dan seluruh keluarga atas doa dan kasih sayangnya kepada penulis.
13. Yang tercinta suami (**Sultan Muqaddas**, S.Kel), anak-anak tercinta yang soleh dan solehah (**Habibie Ahmad Bukhori dan Haiba Aftani Burairah**) yang telah menjadi pendorong dan penyemangat terbesar bagi penulis selama menjalani pendidikan.
14. Semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak dapat di sebutkan satu persatu.

Akhirnya hanya **Allah Azza Wa Jalla** yang dapat membalas semua amalan kebaikan yang telah diberikan. Semoga karya akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan Rahmat-Nya senantiasa tercurah bagi kita semua. Akhir kata, penulis

memohon maaf yang sebesar-besarnya apabila dalam tulisan ini terhadap hal-hal yang tidak berkenan.

Makassar, Maret 2021

**NORSIKAWATY HAYA**



## ABSTRAK

**NORSIKAWATY HAYA**

**Perbandingan Ekspresi Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) Pada Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Subtipe Germinal Centre-Like B-Cell (GCB) Dan Activating B-Like Cell (ABC)**

Dibimbing oleh **M. Husni Cangara, Upik A. Miskad**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan ekspresi Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) pada subtipe molekular dari Diffuse Large B Cell Lymphoma yaitu subtipe Subtipe Germinal Centre-Like B-Cell (GCB) Dan Activating B-Like Cell (ABC). Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *cross-sectional* dengan mengambil 58 sampel Diffuse Large B Cell Lymphoma periode tahun 2017-2019 secara *simple random sampling*. Selanjutnya spesimen dari sampel ini dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan antibody *rabbit monoclonal* PD-L1 clone 28-8. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi PD-L1 pada DLBCL subtipe GCB dan ABC berdasarkan uji fisher, yaitu diperoleh nilai  $p=0,001$  ( $p<0,05$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 dapat digunakan sebagai salah satu faktor prediktif dalam menentukan prognosis dan dapat dijadikan salah satu alternatif terapi yang disertakan dalam terapi standar DLBCL.

Kata Kunci: PD-L1, DLBCL, GCB, ABC

## **ABSTRACT**

**NORSIKAWATY HAYA**

**COMPARISON OF PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND 1 (PD-L1)  
EXPRESSION IN DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA (DLBCL) GERMINAL  
CENTRE-LIKE B-CELL (GCB) AND ACTIVATING B-LIKE CELL (ABC)  
SUBTYPE**

Supervised by **M. Husni Cangara, Upik A. Miskad**

*This study aims to compare the expression of Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) on the molecular subtype of Diffuse Large B Cell Lymphoma, namely the subtype of Germinal Center-Like B-Cell (GCB) and Activating B-Like Cell (ABC). This research was conducted using a cross-sectional method by taking 58 samples of Diffuse Large B Cell Lymphoma for the period 2017-2019 by simple random sampling. Furthermore, the specimens from this sample were subjected to immunohistochemical staining with antibody rabbit monoclonal PD-L1 clone 28-8. The results showed that there was a significant difference between the PD-L1 expression on DLBCL GCB and ABC subtypes based on Fisher's test, which was obtained  $p = 0.001$  ( $p < 0.05$ ). These results indicate that PD-L1 expression can be used as a predictive factor in determining prognosis and can be used as an alternative therapy included in standard DLBCL therapy.*

*Keywords: PD-L1, DLBCL, GCB, ABC*

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
I.1. Latar Belakang Penelitian	1
I.2. Rumusan Masalah	6
I.3. Tujuan Penelitian	7
I.4. Hipotesis	7
I.5. Manfaat Penelitian	8
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
II.1. Anatomi dan Histologi Kelenjar Getah Bening	10
II.2. Prinsip Imunoediting Tumor	16
II.3. Programmed Death-1 (PD-1) dan Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1)	23
II.3.1. Regulasi PD-L1	25
II.3.2. Axis PD-1 / PD-L1 Menghambat Respon Sel T	28
II.4. Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)	30
	11

II.4.1. Mekanisme Perubahan Genetik Pada Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)	32
II.4.2. Axis PD-1/PD-L1 Pada Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)	37
II.4.3. Mekanisme Penghindaran Sel Imun Terkait Ekspresi PD-L1 pada Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)	39
II.4.4. Ekspresi PD-1/PD-L1 pada DLBCL	41
II.4.5. Blokade PD-1/PD-L1 pada DLBCL	41
II.5. Prospektif Terapi Blokade PD-1/PD-L1	44
II.6. Kerangka Teori	45
<b>BAB III. KERANGKA KONSEP</b>	
III.1 Kerangka Konsep	46
III.2 Definisi Operasional	47
III.3. Kriteria Objektif	47
<b>BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
IV.1 Desain penelitian	51
IV.2 Tempat dan Waktu penelitian	51
IV.3 Populasi Penelitian	51
IV.4 Sampel dan cara pengambilan sampel	52
IV.5 Perkiraan besar sampel	52
IV.6 Kriteria inklusi dan eksklusi	
IV.6.1 Kriteria inklusi	53
IV.6.2 Kriteria eksklusi	53
IV.7. Cara kerja	
IV.7.1 Alokasi subyek	54
IV.7.2 Prosedur pewarnaan Hematoksilin Eosin	54

IV.7.3	Prosedur pewarnaan Imunohistokimia	55
IV.7.4	Interpretasi Imunohistokimia	56
IV.8.	Pengolahan data dan Analisa data	57
IV.9.	Alur penelitian	59
IV.10.	Personalia Penelitian	59
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>		
V.1	Hasil penelitian	61
V.1.1.	Jumlah Sampel	65
V.1.2.	Karakteristik Sampel	65
V.1.3.	Analisis Perbedaan Ekspresi PD-L1 pada Subtipe Molekular DLBCL	66
V.1.4.	Hubungan Ekspresi PD-L1 dengan CD10	67
V.1.5.	Hubungan Ekspresi PD-L1 dengan BCL6	68
V.1.6.	Hubungan Ekspresi PD-L1 dengan MUM1	69
V.1.7.	Hubungan subtipe molekular dengan gambaran morfologi DLBCL	70
V.1.8.	Hubungan ekspresi PD-L1 dengan tipe morfologi DLBCL	71
V.2	Pembahasan	72
V.2.1	Perbedaan Ekspresi PD-L1 pada Subtipe Molekular DLBCL	75
V.2.2.	Perbedaan Ekspresi PD-L1 dengan CD10	76
V.2.3.	Perbedaan Ekspresi PD-L1 dengan BCL6	77
V.2.4.	Perbedaan Ekspresi PD-L1 dengan MUM1	78
V.2.5.	Hubungan ekspresi PD-L1 dengan gambaran Morfologi DLBCL	79
V.2.6.	Hubungan subtipe molecular dengan gambaran	

Morfologi DLBCL	80
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
VI.1 Kesimpulan	82
VI.2 Saran	83
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	84

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
Tabel 1. Karakteristik sampel	65
Tabel 2. Ekspresi PD-L1 pada sub tipe molekular	66
Tabel 3. Hubungan Ekspresi PD-L1 dengan profil CD10	67
Tabel 4. Ekspresi PD-L1 dengan BCL6	68
Tabel 5. Ekspresi PD-L1 dengan MUM1	69
Tabel 6. Hubungan ekspresi sub tipe molecular dengan morfologi DLBCL	70
Tabel 7. Ekspresi PD-L1 dengan morfologi DLBCL	71

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
Gambar 1. Nodul limfoid yang terdiri atas tonsil terkumpul di tiga lokasi umum pada dinding faring dan Struktur skematis kelenjar getah bening	11
Gambar 2. Histologi kelenjar getah bening	12
Gambar 3. Mekanisme prinsip imunitas alami dan adaptif	14
Gambar 4. Reaksi pusat germinal	16
Gambar 5. Fase Elimination	19
Gambar 6. Fase Equilibrium	20
Gambar 7. Fase Escape	21
Gambar 8. Tiga E pada proses immunoediting kanker	22
Gambar 9. Gambaran morfologi <i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i> (DLBCL) , centroblastic variant Gambaran polimorfik dan multilobulated.	
Algoritma Hans	32
Gambar 10. Proses Diferensiasi sel B	34
Gambar 11. Jalur onkogenik pada DLBCL sub tipe ABC	37
Gambar 12. Diagram skematik yang menunjukkan mekanisme patogenetik yang umum terjadi pada DLBCL	37
Gambar 13. Gambaran umum ekspresi PD-L1 yang meningkat pada limfoma	41
Gambar 14. Alur Algoritma Hans	48
Gambar 15. Contoh intensitas pewarnaan pada membrane sel tumor untuk pewarnaan imunohistokimia PD-L1	49
Gambar 16. Representasi pewarnaan PD-L1 pada sel tumor	50



Gambar 17. Pewarnaan imunohistokimia berdasarkan profil ekspresi gen	62
Gambar 18. Ekspresi PD-L1 dengan intensitas lemah, pembesaran 40x	63
Gambar 19. Ekspresi PD-L1 dengan intensitas sedang, pembesaran 40x	63
Gambar 20. Ekspresi PD-L1 dengan intensitas kuat, pembesaran 40x	63
Gambar 21. Ekspresi PD-L1 positif 50% atau lebih pada sel tumor pembesaran 20x	63
Gambar 22. Ekspresi PD-L1 positif $\geq 5$ - $< 50\%$ pada sel tumor, pembesaran 20x	64
Gambar 23. Ekspresi PD-L1 positif $\geq 1$ - $< 5\%$ pada sel tumor, pembesaran 20x	64
Gambar 24. Gambaran morfologi	64

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Keterangan Kelaikan Etik (Ethical Clearance)
2. Tabulasi Data

## DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

PD-L1	: Programmed death-ligand 1
HE	: hematoxylin-eosin
MHC	: major histocompatibility complex
NK	: natural killer
IFN- $\gamma$	: interferon-gamma
PD-1	: Programmed death 1
CTLA-4	: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
TCR	: T-cell receptor
BCR	: B-cell receptor
ITIM	: immune receptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM	: immunoreceptor tyrosine-based switch motif
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
PI3K	: phosphoinositide 3-kinase
HIF-1	: hypoxia-inducible factor alpha
HRE	: hypoxia response element
STAT-3	: signal transducer and activation of transcription-3
miR	: micro RNA
Bcl-xl	: B-cell lymphoma-extra large
TGF- $\beta$	: transforming growth factor beta
APC	: antigen presenting cell
mAb	: monoclonal antibody
DLBCL	: diffuse large B cell lymphoma
NHL	: non-hodgkin lymphoma

PKC : protein kinase C  
EBV : Epstein-Barr virus  
Treg : regulatory T cell  
SHM : somatic hypermutation  
CARD : caspase recruitment domain family member  
BCL2 : b-cell lymphoma 2  
PTEN : phosphatase and tensin homolog  
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase  
LAG-3 : lymphocyte activation gene-3  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
IL : interleukin  
GITR : glucocorticoid-induced TNFR family related gene

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1. Latar Belakang Penelitian

Kanker adalah masalah kesehatan masyarakat utama di seluruh dunia. Menurut perkiraan WHO untuk 2011, kanker kini menjadi penyebab kematian tersering dibandingkan penyakit jantung koroner atau stroke (Siegel & Miller, 2019).

Limfoma adalah keganasan yang menempati urutan ke tujuh yang paling sering ditemukan pada pria dan wanita (Siegel & Miller, 2019). Limfoma maligna meliputi berbagai entitas penyakit yang berbeda. Secara umum lebih sering ditemukan di negara maju dan kurang umum di negara berkembang. Wilayah Asia Timur memiliki salah satu tingkat insiden limfoma ganas terendah. Insiden limfoma maligna di seluruh dunia telah meningkat pada tingkat 3-4% selama 4 dekade terakhir, sementara beberapa stabilisasi telah diamati di negara-negara maju dalam beberapa tahun terakhir. (Huh, 2012) Terhitung sebanyak 83.180 kasus baru, dengan jumlah kasus limfoma hodgkin sebanyak 8.500 kasus dan limfoma non-hodgkin 74.680 kasus (Siegel & Miller, 2019). Dari jumlah kasus didapatkan estimasi angka kematian sebanyak 20.960 kasus, dengan jumlah 12.130 kasus kematian pada pria dan 8.830 kasus kematian pada wanita (Siegel & Miller, 2019).

limfoma maligna terdiri 3,37% dari semua keganasan di seluruh dunia. Di Korea, limfoma maligna menyumbang 3,69% dari semua keganasan pada 2008. Insiden limfoma maligna menunjukkan variasi geografis yang nyata; lebih tinggi di Amerika Utara, Australia / Selandia Baru, dan Eropa, dan lebih rendah di seluruh

Asia dan Afrika, kecuali di mana limfoma Burkitt (BL) adalah endemik. Dan terjadi peningkatan sekitar 3-4% di Amerika Serikat (Huh, 2012).

Pada data Riskesdas tahun 2013 didapatkan prevalensi penderita limfoma berdasarkan hasil wawancara mengenai diagnosis limfoma oleh dokter, didapatkan kasus limfoma maligna sebesar 0,06%, atau diperkirakan sebanyak 14.905 orang (RI, 2017).

Berdasarkan data kasus yang masuk ke Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo tahun 2015 hingga tahun 2017 didapatkan kasus limfoma non-Hodgkin sebesar 222 kasus (3,8%) dengan jumlah kematian sebesar 26 kasus (3,5%) dengan distribusi lebih banyak pada pria (140 kasus) daripada wanita (82 kasus).(RI, 2017)

Limfoma maligna adalah keganasan sistem darah yang paling umum. Limfoma maligna dibagi atas dua kelompok yaitu limfoma Hodgkin dan limfoma non-Hodgkin (Yang & Hu, 2019)(Kumar, Abbas, & Aster, n.d.). Meskipun keduanya sering terjadi di jaringan limfoid, limfoma Hodgkin dibedakan dengan adanya sel datia *Reed-Sternberg* yang khas dimana sering disertai dengan sel radang non neoplastik yang sangat banyak. Sifat biologis dan pengobatan dari kedua jenis limfoma tersebut adalah berbeda, menyebabkan upaya untuk membedakannya menjadi sangat penting (Kumar et al., n.d.).

Limfoma sel B besar difus atau *Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)* adalah jenis limfoma non-Hodgkin yang paling sering ditemukan pada orang dewasa sekitar 50% (Kumar et al., n.d.). Limfoma sel B besar difus (DLBCL) adalah gangguan heterogen yang menunjukkan arsitektur difus, fenotip sel B matang, dengan morfologi sel yang besar. Dapat dibagi menjadi beberapa subtype

berdasarkan kriteria yang berbeda seperti morfologi (sentroblastik atau imunoblastik), asosiasi virus (Infeksi EBV atau HHV8) atau kelainan genetik yang mendasarinya (Translokasi ALK) (Chan, 2010; Wd et al., 2008). Tumor sel B matur ini memaparkan antigen sel pan-B seperti CD19 dan CD20. Banyak juga mengekspresikan IgM dan atau IgG di permukaan, serta ekspresi bervariasi dari CD10 dan BCL2 (Kumar et al., n.d.). Berdasarkan analisis profil ekspresi gen (molekuler) dalam DLBCL, maka entitas DLBCL diidentifikasi dalam 2 subtype berbeda : *Germinal centre-like B-cell (GCB)* dan *Activating B-like cell (ABC)*, dimana subtype ini muncul dari tahapan diferensiasi sel B dan memperoleh kelainan onkogenik yang berbeda yang mendorong proliferasi dan kelangsungan hidup sel tumor. (Gravelle, Burroni, & Péricart, 2017)

*Programmed death-1 (PD-1; CD279)* adalah salah satu bagian dari sel T regulator yang terekspresi pada permukaan sel T, sel B dan NK aktif, monosit, dan juga beberapa bagian sel dendritik. (Pedoeem, Azoulay-Alfaguter, Strazza, Silverman, & Mor, 2014) Selain itu, PD-1 secara selektif mengalami upregulasi dalam sel T karena paparan antigen yang terus menerus sehingga ekspresi PD-1 dalam sel T adalah salah satu penanda bawah sel T tersebut mengalami kelelahan atau *exhausted*. (Y. Dong, Sun, & Zhang, 2017) PD-1 memiliki dua ligan yakni PD-L1 (B7-H1; CD274) dan PD-L2 (B7-DC; CD273). PD-L2 memiliki afinitas tiga kali lipat lebih tinggi untuk PD-1 dibandingkan dengan PD-L1. Disisi lain PD-L2 diekspresikan oleh sel yang jauh lebih sedikit jenisnya daripada PD-L1. Meskipun tidak umum hadir pada sel istirahat, PD-L2 diekspresikan dengan jelas pada sel dendritik, makrofag yang berasal dari sel mast sumsum tulang dan beberapa bagian sel garis keturunan sel B. Sebaliknya, PD-L1 diekspresikan pada kedua sel hematopoietik dan non-hematopoietik. Sebagian besar sel non-hematopoietik yang

mengekspresikan PD-L1 berasal dari keganasan padat seperti karsinoma sel ginjal, karsinoma ovarium, dan *non small cell lung carcinoma*. Yang penting, ekspresi tumor yang tinggi dari PD-L1 adalah terkait dengan peningkatan agresivitas dan risiko kematian. (Pedoeem et al., 2014) Ekspresi PD-L1 telah ditemukan positif pada sel tumor 5–40%, membantu mereka menghindari eliminasi kekebalan melalui interaksi PD-L1 pada permukaan sel kanker dengan PD-1 pada sel T. Dengan demikian, blokade sumbu PD-L1 / PD-1 membantu pengenalan dan penghapusan sel kanker. Dengan kata lain, ekspresi PD-L1 pada tumor telah digambarkan sebagai marker prediktif pada respon imun terhadap terapi imunologi anti PD-1 atau anti PD-L1 dalam beberapa tipe keganasan (Wang et al., 2018).

Penelitian sebelumnya dengan sampel limfoma maligna non Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) yang dilakukan oleh Georgiou *et al* di Cina dari Pusat Kanker Universitas Sun Yat-Sen dan Institut dan Rumah Sakit Universitas Kanker Medis Tianjin menunjukkan bahwa terdapat ekspresi PD-L1 yang lebih tinggi pada DLBCL subtype non-GCB daripada subtype GCB pada kasus-kasus yang diikuti oleh anomali genetik dan perubahan kromosom. Berdasarkan penelitian dari Chen B.J *et al* didapatkan bahwa tidak ada hubungan antara ekspresi PD-L1 dengan infeksi Epstein Barr virus (EBV). (B. J. Chen et al., 2013)

Tilly *et al* telah melaporkan bahwa lebih dari 1,2 juta pasien limfoma sel B baru didiagnosa pada tahun 2015 di seluruh dunia, dan tingkat kejadian penyakit ini telah meningkat dari tahun ke tahun. (Tilly et al., 2015) Scott *et al* menyatakan bahwa prevalensi limfoma sel-B menempati urutan ke enam di antara semua keganasan, dan tingkat mortalitasnya mencapai 53,82%. Dengan terapi standar menggunakan regimen *R-CHOP* (*Rituximab-Cyclophosphamide-Doxorubicin-Vincristine-Prednisone*) terjadi rerata kekambuhan sebesar 30% pada kasus



DLBCL. (Tilly et al., 2015) Ekspresi PD-1 dan PD-L1 biasanya bukan fitur yang mencolok dari pasien dengan kanker, meskipun beberapa penelitian telah melaporkan ekspresi berlebihan dari PD-L1 dalam subset limfoma spesifik. Blokade imun dari interaksi PD-1 / PD-L1 oleh antibodi monoklonal dapat mengembalikan aktivitas antitumor sel T sitotoksik. Imunoterapi menggunakan inhibitor PD-1 / PD-L1 telah menjadi pengobatan yang divalidasi secara klinis dan telah menghasilkan respons objektif yang tahan lama dan meningkatkan kelangsungan hidup keseluruhan (*Overall survival* = OS) pada pasien dengan neoplasma hematologis yang solid. (Zhang, Medeiros, & Young, 2018)

Penelitian ini pertama dilakukan di Makassar, dengan mengambil sampel penderita limfoma maligna non-Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL), kemudian membaginya menjadi dua subtipe (GCB dan non-GCB), serta menilai ekspresi PD-L1 sel tumor pada sampel di atas, dan selanjutnya membandingkan hasil ekspresi tersebut, yang nantinya penting untuk digunakan sebagai faktor prediktif maupun prognostik pada penderita limfoma maligna. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan sumbangsih ilmiah maupun aplikasi klinis dalam manajemen penatalaksanaan limfoma maligna yang lebih baik di masa depan.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut : Apakah terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non-Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) pada subtype *Germinal centre-like B-cell* (GCB) dan *Activating B-like cell* (ABC).

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum :**

Menilai ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non-Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) pada subtype *Germinal centre-like B-cell* (GCB) dan *Activating B-like cell* (ABC).

#### **1.3.2. Tujuan Khusus :**

1. Menentukan ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) subtype *Germinal centre-like B-cell* (GCB)
2. Menentukan ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) subtype *Activating B-like cell* (ABC).
3. Membandingkan ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) pada subtype *Germinal centre-like B-cell* (GCB) dan *Activating B-like cell* (ABC).
4. Menilai hubungan ekspresi PD-L1 dengan profil ekspresi gen (CD10, BCL6, dan MUM1) pembagian subtype *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
5. Menilai hubungan ekspresi PD-L1 dengan tipe morfologi *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
6. Menilai hubungan Subtipe molekular dengan tipe morfologi *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).

### **1.4. Hipotesis**

1. Terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 pada *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) pada sub tipe *Germinal centre-like B-cell (GCB)* dan *Activating B-like cell (ABC)*.
2. Terdapat hubungan ekspresi PD-L1 dengan masing-masing profil ekspresi gen (CD10, BCL6, dan MUM1) pembagian sub tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
3. Terdapat hubungan ekspresi PD-L1 dengan tipe morfologi *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
4. Terdapat hubungan antara sub tipe molekular dengan tipe morfologi pada *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).

#### **I.5. Manfaat Penelitian**

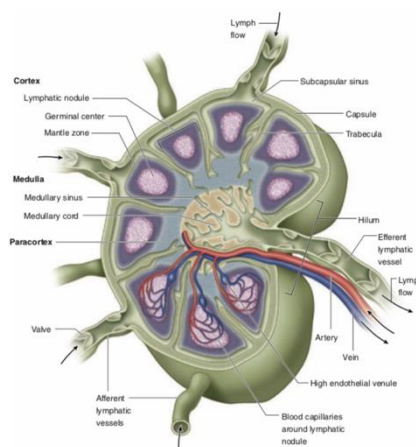
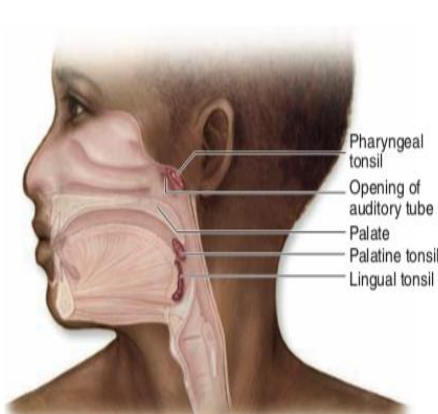
1. Memberikan informasi mengenai perbedaan ekspresi PD-L1 pada limfoma maligna non Hodgkin tipe *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) sub tipe *Germinal centre-like B-cell (GCB)* dan *Activating B-like cell (ABC/non-GCB)*.
2. Memberikan informasi mengenai hubungan ekspresi PD-L1 dengan profil ekspresi gen *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
3. Memberikan informasi mengenai hubungan ekspresi PD-L1 dengan tipe morfologi *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
4. Memberikan informasi mengenai hubungan sub tipe molekular dengan tipe morfologi *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL).
5. Memberikan informasi mengenai profil ekspresi gen *Diffuse large B-Cell lymphoma* (DLBCL) di Makassar.
6. Data penelitian ini dapat digunakan sebagai faktor prediktif dan faktor prognostik pasien limfoma maligna dan kedepannya untuk imunoterapi.

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## II.1. Anatomi dan Histologi Kelenjar Getah bening

Kelenjar getah bening adalah struktur berbentuk buncis dan bersimpai yang umumnya berdiameter 2-10 mm dan tersebar di seluruh tubuh sepanjang pembuluh limfe. Kelenjar getah bening ini ditemukan di ketiak dan selangkangan, di sepanjang pembuluh besar leher, dan banyak dijumpai dalam toraks dan abdomen, khususnya dalam mesenterium. Kelenjar getah bening membentuk serangkaian mekanisme penting dalam sistem pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme dan penyebaran sel-sel tumor. Semua limfe yang berasal dari cairan jaringan, disaring oleh sekurang-kurangnya satu kelenjar getah bening sebelum masuk ke sirkulasi. Kelenjar getah bening memiliki permukaan konveks yang merupakan tempat masuk pembuluh limfe dan lekukan konkaf, yakni hilum, tempat masuknya arteri dan saraf serta tempat untuk keluarnya vena dan pembuluh limfe dari organ. (Mescher, 1800)

1.



**Gambar**  
Nodul  
limfoid

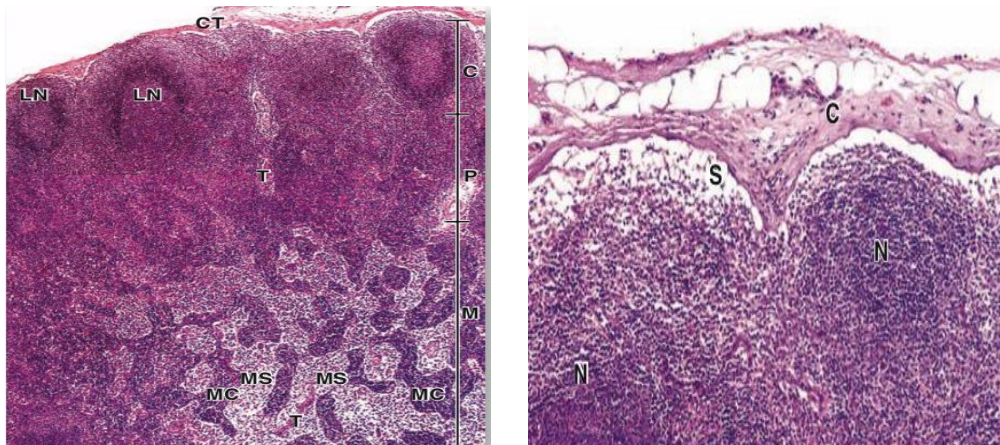
yang terdiri atas tonsil terkumpul di tiga lokasi umum pada dinding faring (kiri).  
Struktur skematis kelenjar getah bening (kanan) (Mescher, 1800)

Sel terbanyak di kelenjar getah bening adalah limfosit, makrofag, dan sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cell = APC*) lain, sel plasma, dan sel retikular; sel dendritik folikular terdapat di dalam nodul limfoid. Berbagai susunan sel dan stroma serabut retikuler yang menyangga sel membentuk korteks, medulla, dan parakorteks yang menyusup. (Mescher, 1800)

Korteks yang terletak di bawah simpai, terdiri atas komponen berikut :  
(Mescher, 1800)

- Banyak sel retikuler, makrofag, APC, dan limfosit
- Nodul imfoid, dengan atau tanpa sentrum germinal, yang terbentuk terutama dari limfosit B, yang terbenam di dalam populasi sel difus lainnya
- Area yang berada tepat di bawah simpai, yang disebut sinus subkapsuler, tempat jaringan limfoid memiliki banyak jejaring serat retikuler. Limfe yang mengandung antigen, limfosit, dan APC beredar di sekitar ruang sinus-sinus tersebut setelah dihantarkan ke sana melalui pembuluh limfe aferen.
- Sinus kortikal, yang berjalan di antara nodul limfoid, yang terbentuk dari dan berbagai gambaran struktural sinus subkapsular. Sinus-sinus ini berkomunikasi dengan sinus subcapsular melalui ruang yang mirip dengan ruang di medulla.

Parakorteks tidak memiliki batas yang tegas dengan korteks dan medulla. Parakorteks dapat dibedakan dari korteks luar dengan sedikitnya nodul limfoid sel B dan akumulasi sel T, yang dapat dibedakan dengan metode imunohistokimia. Medula memiliki dua komponen yaitu korda medularis dan sinus medularis.

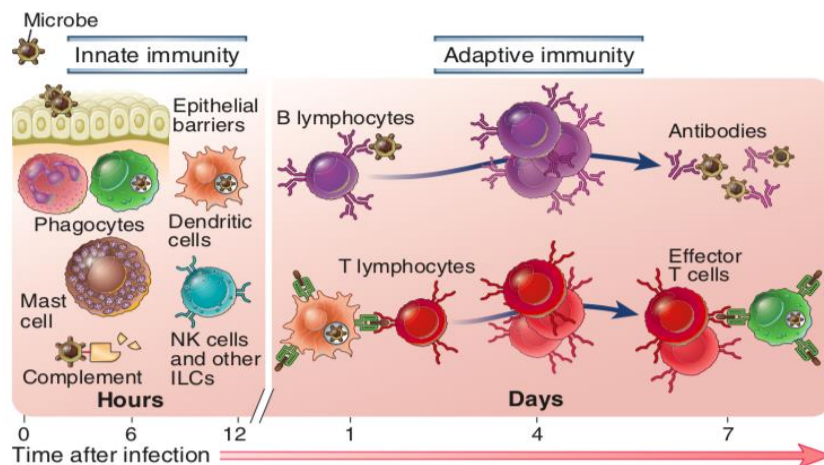


**Gambar 2.** Histologi kelenjar getah bening. Keterangan gambar kiri: korteks ( C), parakorteks (P), medulla (M), jaringan ikat simpai (CT), trabekula (T), nodul limfoid (LN), sinus medularis (MS), dan korda medularis (MC). Kanan: simpai (C), sinus subcapsular (S), nodul limfoid (N). (Mescher, 1800)

Tubuh memiliki suatu sistem sel yang disebut sistem imun, yang dapat membedakan diri sendiri (self-molekul diri sendiri), dan dari yang bukan diri sendiri (*nonself*-benda asing). Fungsi fisiologis sistem imun yang paling penting adalah mencegah serta membasmi infeksi, sistem imun juga mencegah berkembangnya beberapa tumor tertentu, dan beberapa jenis kanker dapat diobati dengan merangsang respon imun yang melawan sel tumor. Respon imun juga berperan dalam pembersihan sel mati dan memulai perbaikan jaringan. (Denman, 1992; Mescher, 1800)

***Imunitas Alami Dan Adaptif***

Mekanisme pertahanan inang terdiri dari imunitas alami, yang memberikan perlindungan segera terhadap infeksi, dan imunitas adaptif, yang berkembang lebih lambat namun memberikan perlindungan yang lebih spesialisik terhadap infeksi. (Denman, 1992) Sistem imun adaptif terdiri atas limfosit dan produk-produknya, misalnya antibodi. Respons imun adaptif terutama penting untuk pertahanan terhadap mikroba infeksius yang bersifat patogenik terhadap manusia (menyebabkan penyakit) dan mampu melawan imunitas alami mengenali struktur-struktur yang sama-sama dimiliki oleh berbagai kelas mikroba, sel-sel imunitas adaptif (limfosit), mengekspresikan reseptor yang secara spesifik mengenali berbagai molekul yang diproduksi oleh mikroba serta molekul-molekul non-infeksius. Setiap bahan yang secara spesifik dapat dikenali oleh limfosit dan antibody disebut antigen. (Denman, 1992; Mescher, 1800)



**Gambar 3.** Mekanisme prinsip imunitas alami dan adaptif

(Denman, 1992)



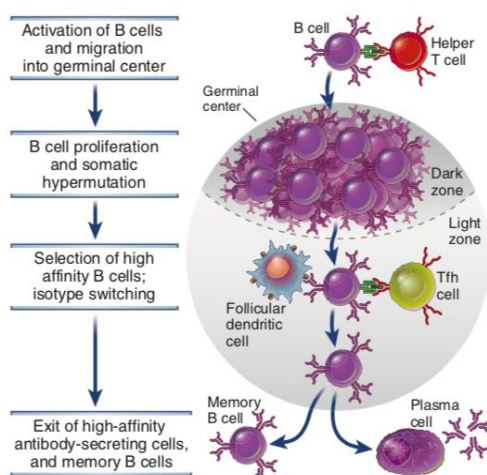
- Imunitas humoral : diperantarai oleh protein yang dinamakan antibody, yang diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi masuk ke dalam sirkulasi kemudian menetralkan dan menetralkan kemudian mengeliminasi mikroba serta toksin mikroba yang berada di luar sel inang, dalam darah, cairan ekstraseluler yang berasal dari plasma dan di dalam lumen dari organ-organ mukosa, seperti traktur gastrointestinalis dan traktus respiratorius.
- Pertahanan terhadap mikroba intraseluler tersebut dinamakan imunitas seluler dikarenakan prosesnya yang diperantarai oleh limfosit T. Beberapa limfosit T mengaktifkan fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakan oleh sel fagosit ke dalam vesikel intraseluler.

### **Ektrafolikular dan Reaksi Pusat Germinal(*Germinal Center Reaction*)**

Interaksi awal sel T dan sel B, yang terjadi pada tepi folikel limfoid, menghasilkan produksi antibodi dengan kadar yang rendah, yang kemudian mengalami perubahan isotipe tetapi umumnya memiliki afinitas yang rendah. Sel plasma yang terbentuk pada ektrafolikuler berumur pendek, hanya memproduksi antibodi untuk beberapa minggu dan sedikit pembentukan sel B memori.

Banyak proses dalam respons antibodi yang berkembang lengkap terjadi di pusat germinal yang terbentuk di folikel limfoid dan membutuhkan partisipasi *T-helper* yang khusus. Beberapa *T-helper* yang teraktifasi mengekspresikan banyak reseptor kemokin CXCR5, kemudian CXCL13 (Ligan CXCR5) yang menarik sel-sel ini ke folikel yang berdekatan. Sel T CD4+ yang bermigrasi ke dalam folikel yang

kaya sel B disebut sebagai T helper folikular (Tfh). Tfh juga mengekspresikan ICOS (*Inducible Costimulator*), PD-1 (Programmed Death-1), sitokin interleukon-21 (IL-21), IFN- $\gamma$ , IL-4, atau IL-17, yang khas untuk subset Th1, Th2, dan Th17, serta faktor transkripsi BCL-6. Beberapa sel B yang teraktivasi dari fokus ektrafolikuler bermigrasi kembali ke dalam folikel limfoid dan mulai cepat membelah sebagai respons terhadap sinyal dari sel Tfh. Diperkirakan sel B memiliki waktu ganda sekitar 6 jam, sehingga satu sel dapat memproduksi beberapa ribu progeni dalam satu minggu. Regio dari folikel yang mengandung sel B yang berproliferasi tersebut adalah pusat germinal. Pusat germinal sel B mengalami perubahan isotope dan mutasi somatik gen IgG yang ekstensif. Sel B dengan afinitas yang tinggi lah yang akan dipilih untuk menjadi sel B memori dan sel plasma yang berumur Panjang. Sel B yang berproliferasi berada di daerah (zona) gelap sementara seleksi berlangsung di zona terang yang kurang padat.



**Gambar 4.** Reaksi pusat germinal(Denman, 1992)

## II.2. Prinsip Imunoediting Tumor

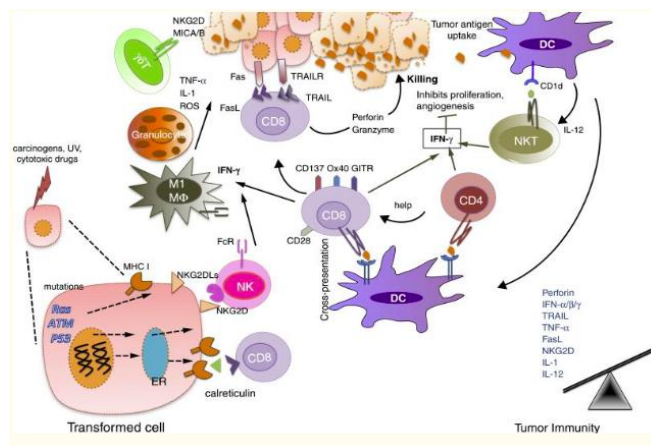
Selama lebih dari satu abad telah dikemukakan bahwa fungsi fisiologis sistem imun adaptif adalah untuk mencegah pertumbuhan berlebihan sel yang bertransformasi dan menghancurkan sel-sel tersebut sebelum mereka menjadi tumor yang berbahaya. Pengendalian dan eliminasi sel ganas oleh sistem imun disebut sebagai *immune surveillance*. Beberapa tumor dapat dijumpai pada individu dengan imunokompeten, hal ini menunjukkan bahwa sistem imun tidak mampu mencegah pertumbuhan tumor atau dengan mudah dikalahkan oleh tumor yang bertumbuh dengan cepat, dan salah satu sifat kanker adalah kemampuan untuk menghindari sistem imun.

Terminologi yang lebih luas dan lebih tepat adalah *cancer immunoediting* yang mencakup 3 proses yaitu 3 E: *elimination, equilibrium, dan escape*. (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002; Mittal, Gubin, Schreiber, & Smyth, 2014)

### A. Fase *Elimination*

Fase ini mewakili proses yang dulunya merupakan konsep *cancer immunosurveillance*, yang apabila mampu mengeradikasi tumor yang berkembang, maka tumor tidak akan masuk ke fase selanjutnya. Fase ini meliputi konsep dasar dari *cancer immunosurveillance*, dimana saat berhasil menghentikan perkembangan tumor, maka dapat dikatakan proses *editing* berjalan sempurna tanpa melewati tahap selanjutnya. Pada tahap awal dari

eliminasi, ketika suatu tumor solid mencapai ukuran tertentu, maka tumor akan bertumbuh invasif dan membutuhkan pasokan darah yang cukup akibat produksi dari protein-protein yang stromagenik dan angiogenik. Eliminasi adalah fase *immunoediting* kanker di mana baik sistem kekebalan tubuh bawaan dan adaptif bersama-sama mendeteksi dan menghancurkan tumor awal sebelum menjadi nyata secara klinis. Awalnya sel-sel normal yang mengalami kerusakan oleh zat karsinogenik dan genotoksik lainnya, sehingga terjadilah kegagalan mekanisme penekan tumor instrinsik (P53, RAS, ATM). Sel-sel tumor ini kemudian mengekspresikan molekul-molekul akibat adanya stres jaringan, seperti *calreticulin* pada permukaan, MHC-1, dan atau ligan NKG2D yang masing-masing dikenali oleh sel T efektor CD8+ dan sel NK. Sel dendritik juga mengambil dan menyilangkan antigen tumor ke sel T termasuk sel NKT. Sel-sel efektor yang diaktifkan ini melepaskan IFN- $\gamma$  yang dapat memediasi efek anti-tumor dengan menghambat proliferasi dan angiogenesis sel tumor. Sel T CD8+ dapat menginduksi apoptosis sel tumor dengan berinteraksi ke reseptor Fas dan TRAIL pada sel tumor, atau dengan mensekresi perforin dan granzim. Sel T efektor mengekspresikan molekul *co-stimulator* seperti CD28, CD137, GITR, OX40 yang berperan meningkatkan proliferasi dan kelangsungan hidup sel imun. Sel imun bawaan seperti makrofag dan granulosit juga berkontribusi terhadap kekebalan anti tumor dengan mengeluarkan TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, dan ROS. Pada fase eliminasi, keseimbangan menuju ke kekebalan anti-tumor karena peningkatan ekspresi antigen tumor, MHC-1, reseptor Fas, dan TRAIL pada sel tumor, serta perforin, granzymes, IFN- $\alpha$  /  $\beta$  /  $\gamma$ , IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  dalam lingkungan mikro tumor.

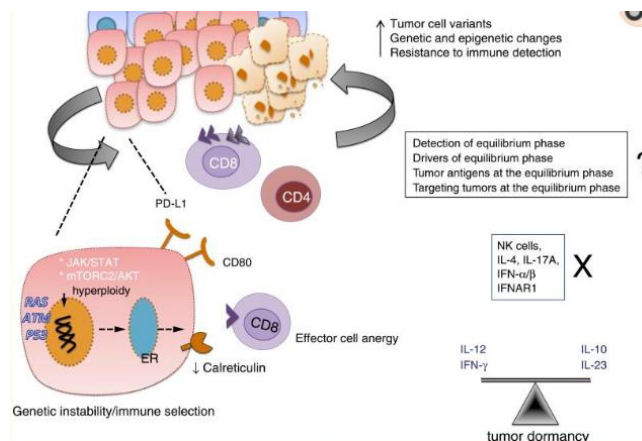


**Gambar 5.** Fase *Elimination* (Mittal et al., 2014)

## B. Fase *Equilibrium*

Pada fase *Equilibrium* immunoediting tumor, sistem kekebalan mengendalikan tumor dalam keadaan dormansi secara fungsional. Beberapa sel tumor mengalami perubahan genetik dan epigenetik dan karena tekanan sistem imun yang konstan dan terus menerus, varian sel tumor berevolusi dan meningkatkan resistensinya terhadap respon imun, serta menginduksi

imunopresi (PD-L1). Fase *equilibrium* adalah fase dimana terjadi keseimbangan antara anti-tumor (IL-12, IFN $\gamma$ ) dan tumor yang menghasilkan sitokin (IL-10, IL-23). Sistem imun adaptif diperlukan untuk mempertahankan tumor tetap berada pada kondisi dorman sementara sel NK dan sitokin IL-4, IL-17A, dan IFN- $\alpha$  /  $\beta$  dapat dibuang.

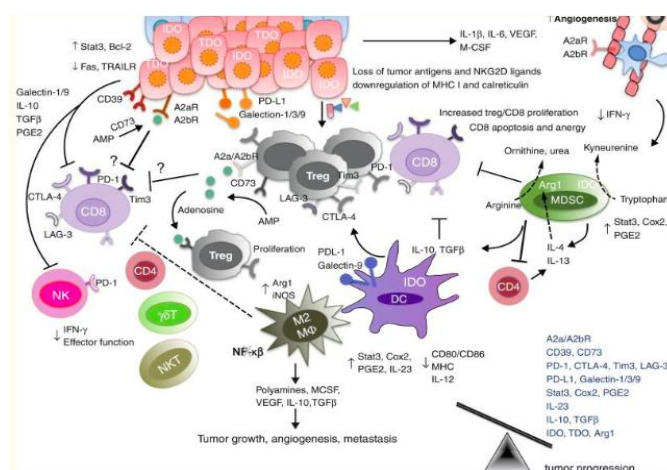


**Gambar 6.** Fase *Equilibrium*(Mittal et al., 2014)

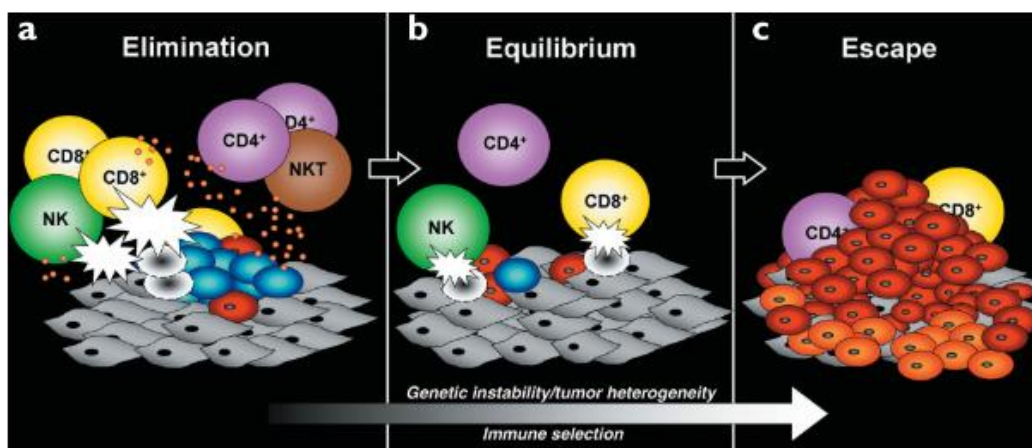
### C. Fase *Escape*

Selama fase *Escape* dari sistem immunoediting kanker, sistem kekebalan gagal untuk membatasi pertumbuhan sel tumor dan menyebabkan penyakit yang

tampak secara klinis. Pada fase ini, sel-sel tumor menghindari pengenalan kekebalan tubuh (kehilangan antigen tumor, MHC kelas I atau molekul *co-stimulator*), mengekspresikan molekul peningkatan resistensi (STAT-3), survival (molekul anti apoptosis BCL2) dan immunosupresi (IDO, TDO, PD-L1, galectin-1/3/9, CD39, CD73, reseptor adenosin) dan mensekresi sitokin VEGF, TGF- $\beta$ , IL-6, M-CSF yang meningkatkan angiogenesis. Selain itu, MDSC, makrofag M2, dan sel dendritik juga dapat mengekspresikan molekul immunoregulator seperti arginase, iNOS dan IDO dan mengeluarkan sitokin immunosupresif IL-10 dan TGF- $\beta$ , yang dapat menghambat proliferasi CD8<sup>+</sup> atau menginduksi apoptosis. MDSC dan IDO yang mengekspresikan sel dendritik juga menginduksi generasi sel T regulator, IDO, arginase, CD39 dan CD73 (enzim immunoregulasi), sedangkan IDO mengkatabolisasi tryptophan menjadi kyneurenine, arginase mengkatalisasi L-arginin menjadi ornithine dan urea, CD39 berperan sebagai katalisator metabolisme ATP menjadi AMP, selanjutnya produk tersebut dimetabolisme menjadi adenosin oleh CD73. Adenosin dapat berikatan dengan reseptor adenosine yang diekspresikan pada sel tumor, sel endotel, dan sel imun. Sel T termasuk Treg mengekspresikan reseptor penghambat seperti PD-1, CTLA-4, Tim-3, dan LAG-3 yang menekan respon imun anti-tumor dan mendukung pertumbuhan tumor. Pada fase *escape*, keseimbangan condong ke perkembangan tumor karena adanya sitokin dan molekul immunosupresif seperti IL-10, TGF $\beta$ , VEGF, IDO, dan PD-L1.



**Gambar 7.** Fase *Escape* (Mittal et al., 2014)



**Gambar 8.**  
Tiga E pada proses

immunoediting kanker (Dunn et al., 2002)

Tubuh mampu melawan dan mengeliminasi sel-sel tumor melalui mekanisme pertahanan oleh sel-sel imun. Akan tetapi tumor menggunakan beberapa mekanisme untuk dapat menghindari destruksi oleh sistem imun : (Denman, 1992)

- Beberapa tumor menghambat ekspresi antigen yang menjadi sasaran serangan sistem imun. Tumor ini disebut antigen loss variant. Jika antigen



yang hilang tersebut tidak terlibat dalam pemeliharaan sifat-sifat keganasan tumor tersebut, maka sel tumor varian tersebut akan terus tumbuh dan menyebar.

- Tumor lain ada yang menghambat ekspresi MHC kelas I, sehingga mereka tidak dapat menyajikan antigen kepada sel T CD8+. Sel NK mengenali molekul yang diekspresikan oleh sel tumor, namun tidak pada sel normal, dan sel NK akan teraktivasi jika sel targetnya tidak mempunyai molekul MHC kelas I. Oleh karena itu sel NK mempunyai mekanisme untuk membunuh sel tumor negative MHC kelas I.
- Tumor mengikat jalur yang menghambat aktivasi sel T. Beberapa tumor mengekspresikan ligan untuk reseptor penghambat sel T (misalnya *programmed death-1* (PD-1)). Tumor juga mungkin hanya memicu sedikit produksi kostimulator B pada antigen presenting cell (APC), menyebabkan kecenderungan pengikatan yang lebih memilih reseptor penghambat *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*(CTLA-4) pada sel T daripada reseptor perangsang CD28. Hasil akhirnya adalah penurunan aktivasi sel T setelah pengenalan antigen tumor. Beberapa jenis tumor dapat memicu sel T regulator (Treg), yang juga menekan respon imun anti tumor.
- Terdapat tumor lain yang dapat mensekresi sitokin immunosupresif, misalnya TGF- $\beta$ , atau memicu sel Treg yang menekan respon imun.

### **II.3. *Programmed Death-1 (PD-1) dan Programmed Death-Ligand 1(PD-L1)***

PD-1 adalah protein transmembrane tipe 1 288 asam amino (55kDa) dari keluarga super immunoglobulin, yang dikode oleh gen PDCD1. Struktur PD-1 terdiri

dari suatu *extraceluler IgV domain*, suatu regio transmembran hidrofobik, dan *intracellular domain*. *Intracellular tail* meliputi suatu bagian yang potensial fosforilasi yang berlokasi pada *immune receptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) dan *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM). Penelitian menunjukkan bahwa ITSM aktif penting untuk efek inhibitor PD-1 terhadap sel-T. (Y. Dong et al., 2017) Peran fisiologis utama PD-1 adalah dalam membatasi autoimunitas dalam konteks inflamasi (misalnya dalam menanggapi infeksi) dengan membatasi aktifitas sel T dalam jaringan perifer. (Gravelle et al., 2017)

PD-1 memiliki dua ligan yaitu PD-L1 juga disebut B7-H1; (CD274) dan PD-L2 (B7-D ; CD273), yang keduanya merupakan *coinhibitory*. (He, Yan, & Wu, 2018)

PD-L1 dikode oleh gen CD274 yang berada pada kromosom 9 manusia pada band p24. PD-L1 adalah protein 40kDa yang mengandung 290 asam amino. Disebutkan bahwa regio promotor dari gen CD274 ini terdiri dari beberapa elemen yang memberi respon terhadap IFN- $\gamma$ , yang dibutuhkan untuk meng-upregulasi ekspresi PD-L1 yang dimediasi oleh IFN- $\gamma$ . (Gravelle et al., 2017)

PD-1 diekspresikan pada sel T CD4+ dan mengaktifkan CD8+, sel B, monosit, *natural killer cell*, dan sel dendritik. Ekspresi PD-1 pada sel T dapat diinduksi IL-2, IL-7, IL-15, dan IL-21. Selain itu, PD-1 dapat mengalami upregulasi selektif akibat adanya paparan yang persisten dari antigen, sehingga ekspresi PD-1 pada sel T merupakan salah satu penanda sel T yang *exhausted* (kelelahan) (Bai et al., 2017). Tidak seperti PD-L1, yang diekspresikan secara luas, ekspresi PD-L2 / B7-DC terbatas. (Y. Dong et al., 2017)

### II.3.1. Regulasi PD-L1

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 diregulasi oleh beberapa faktor epigenetik, *signaling pathway*, dan faktor transkripsional (Y. Dong et al., 2017; He et al., 2018; Wang et al., 2018).

#### 1. Faktor epigenetik

Regulasi epigenetik terlibat dalam ekspresi PD-L1 dalam sel kanker. Micro RNAs (miRNAs), didefinisikan sebagai 22-24 nukleotida non-coding RNA rantai tunggal, yang terlibat dalam regulasi ekspresi PD-L1. Pengikatan beberapa miRNAs menyebabkan degradasi dan menekan ekspresi PD-L1. Secara khusus, banyaknya komponen miR-513, miR-570, miR-34a, miR-200, dan miR-195 dilaporkan memiliki korelasi terbalik dengan ekspresi PD-L1. miR-513, miR-195, dan miR-570 menghambat translasi protein PD-L1 dengan mengikat 3' *untranslated region* (UTR) dari komplemen RNA PD-L1. P53 dilaporkan mengatur PD-L1 melalui miR-34. Pada kasus miR-200, ditemukan proses transisi epitel ke mesenchymal (EMT) yang dimediasi oleh regulasi PD-L1 oleh miR-200. Selain itu miR-197 menekan STAT3, regulator PD-L1, untuk mengurangi ekspresi PD-L1. Studi terbaru berfokus pada metilasi promotor PD-L1 (mPD-L1) yang disarankan sebagai biomarker untuk prediksi respon terhadap *immune checkpoint blockade therapies* (ICBT) yang menargetkan ikatan PD-1 dan ligannya PD-L1.

#### 2. Signaling Pathway

### **MAPK Pathway**

Aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) jalur signalling dapat menyebabkan upregulasi ekspresi PD-L1. MAPK pathway berperan dalam upregulasi PD-L1 melalui aktivasi onkogenik dari EGFR pada *non small cell lung carcinoma* (NSCLC). MAPK pathway juga terlibat dalam upregulasi PD-L1 pada sel-sel kanker yang mendapatkan terapi obat kemoterapi.

### **PI3K/Akt Pathway**

Peranan *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/Akt pathway dalam regulasi PD-L1 pada sel kanker pertama kali dicetuskan oleh penemuan bahwa penambahan PI3K *inhibitor* pada sel-sel melanoma yang resisten terhadap penghambat BRAF menyebabkan pengurangan ekspresi PD-L1. Hal ini didukung oleh observasi bahwa penurunan PTEN menyebabkan upregulasi PD-L1 yang dihapus oleh inhibisi Akt. Menariknya, meskipun upregulasi transkripsional telah menunjukkan berkaitan dengan peningkatan PD-L1 yang diperantarai oleh PI3K/Akt, mekanisme posttranslational juga terlibat, aktivasi Akt pada sel-sel kanker kolon menyebabkan upregulasi protein PD-L1 tanpa mempengaruhi level dari ekspresi mRNA PD-L1. Tampaknya, pathway PI3K/Akt meregulasi ekspresi PD-L1 baik melalui mekanisme transkripsional maupun posttranslational tergantung tipe sel nya. Sementara inhibisi Akt menyebabkan penurunan ekspresi PD-L1. Sebaliknya, nuclear factor NF- $\kappa$ B yang merupakan target downstream dari Akt, menunjukkan meregulasi ekspresi PD-L1. Akt mengaktivasi NF- $\kappa$ B, yang menyebabkan upregulasi PD-L1 secara transkripsional, dan hal ini dapat kita jumpai pada patogenesis DLBCL.

### 3. Faktor transkripsional

Sejumlah faktor transkripsional telah dibuktikan memiliki peranan dalam penghindaran sel kanker dari sistem imun.

### **HIF-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor alpha)**

HIF-1 $\alpha$  merupakan regulator utama mRNA dan ekspresi protein PD-L1. Hipoksia menyebabkan peningkatan regulasi PD-L1 yang cepat, dramatis, dan selektif dalam MDSC, makrofag, sel dendritik, dan sel tumor pada tikus yang mengandung tumor melalui HIF-1 $\alpha$ . Lingkungan yang hipoksia menyebabkan peningkatan ekspresi HIF-1, dan juga dapat menyebabkan penekanan sistem imun dalam hal memicu proliferasi sel dan menghambat apoptosis. HIF-1 meregulasi PD-L1 dengan berikatan dengan *hypoxia response element* (HRE) dari promotor PD-L1 untuk mengaktifkan transkripsi PD-L1. Pada penelitian lain mengungkapkan koeksistensi HIF-1 $\alpha$  yang overekspresi, peningkatan level PD-L1 dan respresi fungsi sel T. Dalam situasi hipoksia juga diketahui terjadi penumpukan laktat, yang dapat memicu interaksi PD-1/PD-L1 dan dapat menimbulkan resistensi terhadap terapi kanker.

### **STAT3**

STAT3 (*signal transducer and activation of transcription-3*) telah dibuktikan berikatan dengan promotor PD-L1 untuk meregulasi ekspresi PD-L1 secara transkripsional. *Latent membran protein 1* (LMP1) dari virus *Epstein Barr* (EB) meningkatkan ekspresi PD-L1 seiring dengan peningkatan *phosphorylated*

STAT3 (pSTAT3). Secara konsisten, inhibitor JAK3 CP-690550 memblokir proses di atas dengan menekan p-STAT3.

### **NF- $\kappa$ B**

*Nuclear factor* NF- $\kappa$ B yang merupakan faktor transkripsional yang memediasi tumorigenesis terkait peradangan yang dapat meningkatkan ekspresi PD-L1. Namun mekanisme pastinya belum jelas. NF- $\kappa$ B diperlukan untuk ekspresi PD-L1 yang diinduksi LMP1, yang dibuktikan dengan penurunan induksi PD-L1 akibat adanya inhibitor NF- $\kappa$ B.

### **II.3.2. Axis PD-1 / PD-L1 Menghambat Respon sel T**

Interaksi PD-1/PD-L1 biasanya terjadi terutama di jaringan perifer, namun pada beberapa kanker, misalnya limfoma yang berkembang di organ limfoid, keterlibatan PD-1 dapat mengurangi respon anti-tumor sel T efektor. Pada tingkat intraseluler, pensinyalan ke hilir dari interaksi PD-1/PD-L1 mengurangi durasi kontak sinaptik, dengan mengatur ke bawah pensinyalan *T-Cell Receptor* (TCR) melalui jalur yang diduga melibatkan fosfatase SHP-1 dan SHP-2 dan dengan demikian merusak sinaps imunologis yang terbentuk antara sel T efektor dan sel penyaji antigen (Gravelle et al., 2017).

SHP-2 dan SHP-1 direkrut ke ITSM dari PD-1, yang mengarah ke inhibisi PI3K/Akt dan jalur pensinyalan *mitogen-activated protein kinase* pada bagian hilir TCR dan menghambat perkembangan siklus sel dalam sel-sel imun (Atefi et al., 2014).

Aktifasi jalur PI3K/Akt meningkatkan ekspresi Glut1 dan meningkatkan penyerapan glukosa yang menginduksi glikolisis dan sintesis protein dalam sel T (Y. Dong et al., 2017). Setelah PD-1 merekrut fosfatase SHP-1 dan SHP-2, jalur PI3K/Akt dihambat. Kondisi ini menghambat protein kelangsungan hidup sel, seperti *B-cell Lymphoma-xL* (Bcl-xL) yang penting untuk jalur apoptosis intrinsik; mengurangi ekspresi transporter glukosa pada membrane plasma dan penurunan regulasi umum aktifitas enzim glikolitik, yang menekan proliferasi sel-T, dengan demikian menahan kelangsungan hidup sel T dan mengurangi sintesis protein; menghambat aktivasi yang dimediasi oleh CD28 dan memicu perubahan kromatin sehingga IL-2, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$  berkurang (Bryan & Gordon, 2015; Keir, Butte, Freeman, & Sharpe, 2008).

Penelitian lain mengungkapkan bahwa keterlibatan PD-1 oleh PD-L1 dapat menghambat aktivasi PLC- $\gamma$ 1 dan RAS dan menekan jalur MEK/Erk MAP. Keterlibatan PD-1 dan PD-L1 menghambat beberapa faktor transkripsi ekspresi sel T, seperti GATA-3 dan T-bet, menekan respon sel-T. Ekspresi tinggi dari T-bet mempertahankan sel T CD8+ yang habis dan menekan ekspresi reseptor penghambatan. Selain itu, pasien dengan peningkatan kadar T-bet limfosit pada sarang tumor dan stroma menunjukkan waktu bertahan hidup yang lebih lama (Kao et al., 2011).

PD-1 juga dapat menekan perkembangan siklus sel T dengan mempengaruhi berbagai regulator siklus sel. PD-1 mencegah perkembangan siklus sel dalam fase G1 dengan meningkatkan *inhibitor cyclin-dependent kinase* (Cdk) p27kip 1 dan p15<sup>INK4B</sup> dan menekan ekspresi Cdc25A *phosphatase* yang mengaktifkan Cdk. PD-1 menghambat Skp2 dengan menghambat pensinyalan

PIK3/Akt dan RAS/MEK/ERK yang menyebabkan peningkatan p27kip1 dan penghambatan Cdk, yang menyebabkan penurunan fosforilasi Rb, sehingga menghambat pula fosforilasi pos pemeriksaan Smad3 dan meningkatkan ekspresi p15<sup>INK4B</sup> dan menahan fosfatase pengaktifasi Cdk2 Cdc25A. (Patsoukis, Sari, & Boussiatis, 2012)

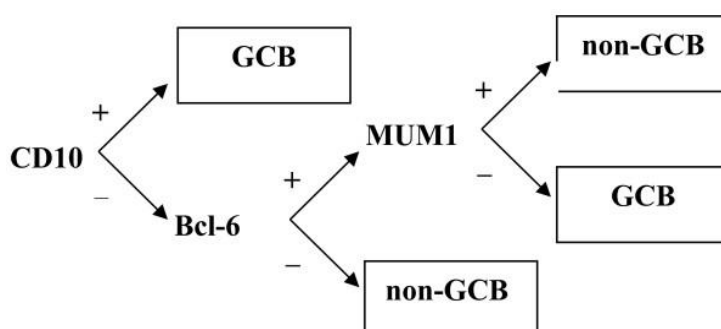
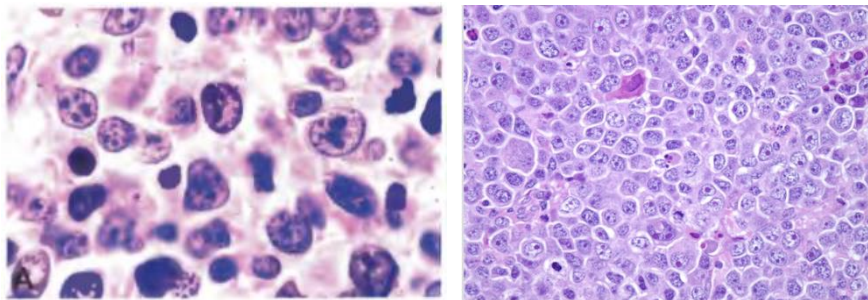
#### **II.4. Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)**

*Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)* adalah tipe limfoma sel-B yang paling umum dijumpai dan bersifat agresif, menyumbang 30-40% limfoma maligna non-Hodgkin (NHL). DLBC dapat dibagi menjadi tipe *germinal center* (GCB) atau tipe *non-germinal center* (non-GCB/ABC) sesuai dengan sel asalnya, yang diidentifikasi oleh profil ekspresi gen atau algoritma Hans. Dengan demikian, DLBCL memiliki fitur genetik yang heterogen dan hasil klinik yang mirip dengan NHL lainnya. Meskipun sekitar 60% dari pasien DLBCL dapat disembuhkan setelah pengenalan antibodi monoklonal CD20 (mAb), 30-40% dari mereka akan mengalami kekambuhan atau refrakter terhadap terapi standar. Hal ini menunjukkan perlunya lebih banyak lagi terapi efektif untuk pasien-pasien beresiko tinggi. (Song, Park, & Uhm, 2019)

Secara definisi *Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)* adalah neoplasma dari sel limfoid B sedang atau besar yang intinya sama dengan, atau lebih besar dari makrofag normal, atau lebih dari dua kali ukuran limfosit normal, dengan pola pertumbuhan difus. (Wd et al., 2008) Ada jenis DLBCL yang tidak biasa yang cenderung terjadi pada mediastinum anterior pada pasien yang lebih muda dengan dominasi perempuan. Secara morfologis, sel-sel tumor cenderung memiliki



sitoplasma pucat dengan jaringan ikat fibrosis halus di area stroma. Studi GEP menunjukkan bahwa jenis limfoma ini memiliki profil ekspresi gen yang unik yang berbeda dari dua subset utama lainnya. Menariknya, terdapat kondisi yang tumpang tindih yang signifikan dari profil ekspresi gen unik limfoma sel B besar mediastinum primer (PMBL) primer ini dengan garis sel limfoma Hodgkin yang menunjukkan bahwa kedua penyakit tersebut memiliki fitur biologis tertentu. (Rosenwald et al., 2003; Savage et al., 2003)



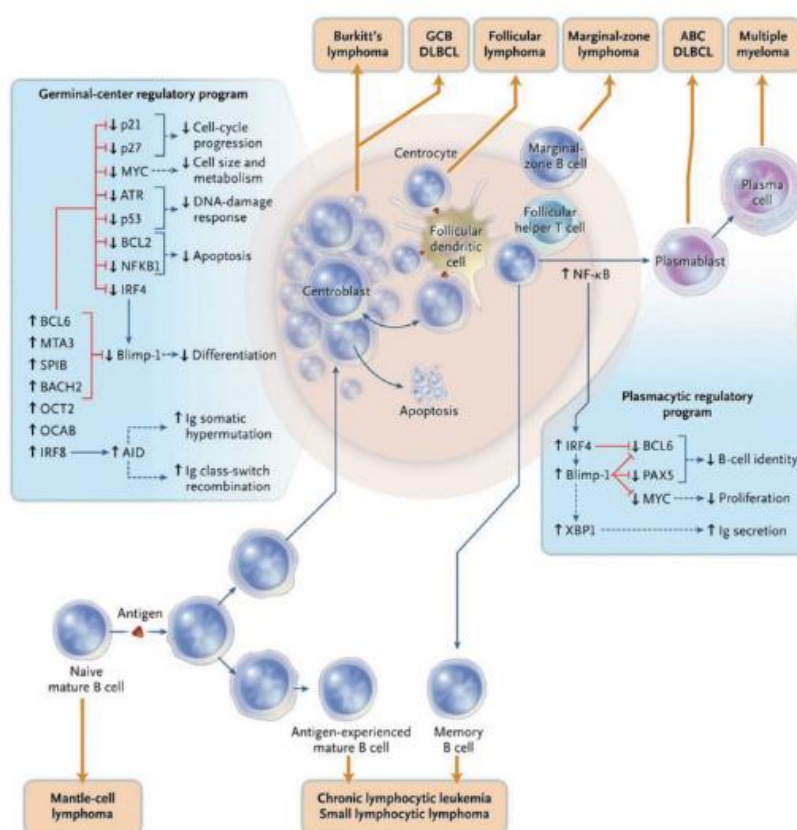
**Gambar 9. Atas :** Gambaran morfologi *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL)  
A. *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL), morfologi sentroblastik B. Gambaran morfologi immunoblastik

**Bawah :** Algoritma Hans(Wd et al., 2008)

#### **II.4.1. Mekanisme Perubahan Genetik Pada *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL)**

Translokasi kromosom pada limfoma maligna asal sel B dibagi menjadi tiga kategori: proliferasi, penghambatan diferensiasi, dan aktivitas anti apoptosis. Ketiga kategori ini penting untuk memahami mekanisme limfomogenesis. Untuk DLBCL dengan translokasi gen BCL6, ekspresi BCL6 diperlukan untuk staging limfoma pasca-GC (*Germinal centre*), namun belum jelas sinyal apa yang dibutuhkan. Jelas bahwa fungsi anti apoptosis harus ada untuk BCL2, yang diekspresikan pada post-GC. Terdapat indikasi bahwa BCL6 berfungsi melindungi sel dari diferensiasi terminal dan menunjukkan perubahan epigenetik yang disimpan dari sel induk / progenitor hematopoietik manusia (HSPC) menjadi sel B dewasa. Hasil ini menunjukkan bahwa BCL6 dapat berfungsi dalam peran "*hit and run*" dalam limfomogenesis.

Protein BCL6 menekan banyak gen yang terlibat dalam diferensiasi sel plasma, perkembangan siklus sel, dan respons terhadap kerusakan DNA dan kematian sel. Salah satu gen tersebut adalah faktor transkripsi BLIMP-1, pengatur utama diferensiasi sel plasma yang mengurangi ekspresi gen sel B matur. Faktor transkripsi BLIMP-1 dan IRF4 sangat penting untuk pembentukan sel plasma. Sel B pada *germinal centre* mulai berdiferensiasi menjadi sel plasma, dipantau oleh Interferon Regulator Factor 4 (IRF4) / MUM1, yang faktor transkripsinya diperlukan untuk konversi menjadi sel plasma. IRF4 meningkatkan ekspresi BLIMP-1, dan pertumbuhan ini ditekan oleh BCL6, sehingga diferensiasi terjadi untuk sel plasma.



G  
ambar  
10.

## Proses diferensiasi sel B dan limfomagenesis

Perubahan genetik yang ditemukan pada DLBCL, termasuk translokasi kromosom, mutasi yang disebabkan oleh ASHM (*aberrant somatic hypermutation*), mutasi somatik sporadis dan perubahan jumlah salinan, ditandai dengan penghapusan dan amplifikasi.

Pola ekspresi pada DLBCL tipe GCB serupa dengan pola normal pada pusat germinal, dimana sel tumor tipe ini mempertahankan ciri khas dari sel-sel B normal pada pusat germinal seperti CSR (*Class-switch recombination*) dan SHM (*Somatic hypermutation*). Sekitar 35% kasus terjadi translokasi t(14;18) yang mengarah pada ekspresi ektopi dari gen BCL-2 sebagai penghambat apoptosis. Dalam 15% kasus membawa mutasi dari gen MYC yang mengkode faktor transkripsi yang terkait dengan limfoma burkit, yang dideregulasi karena adanya translokasi kromosom paling umum yaitu t(8;14), selanjutnya hal ini akan meningkatkan onkogenesis dengan meningkatkan proliferasi dan kelangsungan hidup sel tumor. Selanjutnya ditemukan sekitar 11% kasus mengarah pada aktivasi AKT yang sering ditemukan pada DLBCL tipe GCB. Aktivasi *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) mengaktifkan AKT dan jalur lain yang menghambat apoptosis, mendorong pertumbuhan sel, motilitas sel dan angiogenesis, dan 8% lainnya membawa bersamaan penghapusan gen PTEN (Dobashi, 2016).

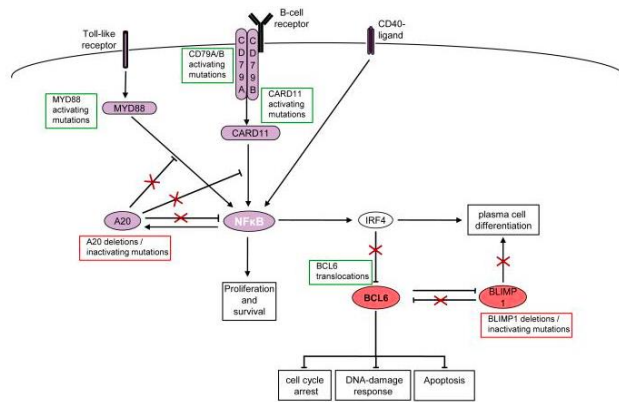
Subtipe ABC dari DLBCL memiliki pola ekspresi gen yang mirip dengan sel B normal yang diaktivasi oleh BCR *cross-linking in vitro* dan subset pusat germinal yang bertugas untuk diferensiasi sel plasma. Mutasi paling menonjol pada subtipe ini adalah pengayaan pada gen target NF- $\kappa$ B, menunjukkan bahwa aktivasi

konstitutif NF- $\kappa$ B memainkan peranan penting dalam subtipe penyakit ini. Aktivasi NF- $\kappa$ B dipengaruhi oleh gen TNFAIP3, yang mengkode NF- $\kappa$ B negatif A20, dengan sekitar 30% kasus menampilkan inaktivasi bialelik dengan cara mutasi dan atau penghapusan. A20 adalah enzim pengubah ubiquitin fungsi ganda yang terlibat dalam penghentian respons NF- $\kappa$ B. Sekitar 20% DLBCL subtipe ABC mengalami mutasi CD79A dan CD79B yang merupakan subunit dari BCR, yang menyebabkan aktivasi berbasis tirosin immunoreceptor (ITAM), yang kemudian menghambat umpan balik dari pensinyalan BCR. Secara keseluruhan, mutasi CD79A dan CD79B diperkirakan menginduksi pensinyalan BCR aktif kronis, dengan akibat aktivasi NF- $\kappa$ B, PI3K, dan jalur MAP-kinase. (Dobashi, 2016)

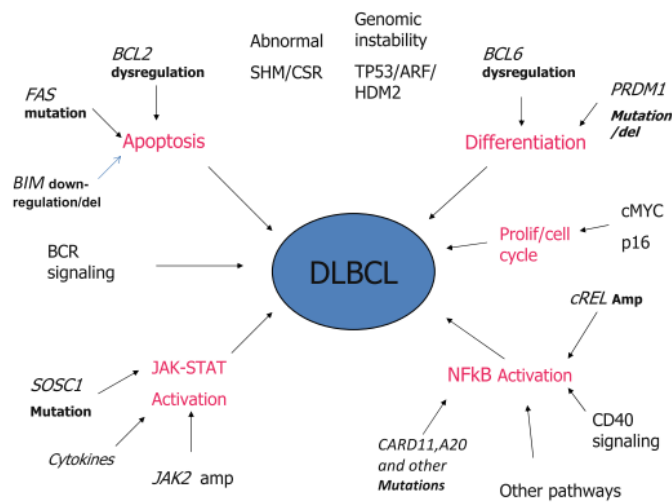
Selama respon imun normal, NF- $\kappa$ B diaktifkan setelah stimulasi dari *Toll-Like Receptor* (TLR) dan reseptor untuk IL-1 dan IL-8. MYD88 berfungsi sebagai protein adaptor pensinyalan yang mengkoordinasikan perakitan kompleks yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B setelah TLR dan stimulasi reseptor IL-1 dan IL-8, mutasi MYD88 ditemukan sekitar 30% pada DLBCL subtipe ABC (Ngo et al., 2011). Mutasi MYD88 tersebut mengandung substitusi asam amino yang sama yaitu L265P yang meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan mengaktifkan pensinyalan NF- $\kappa$ B, aktivasi JAK-kinase dari STAT3, dan sekresi IL-6, IL-10, dan IFN $\beta$  (Ngo et al., 2011).

Sel-sel B pada pusat germinal yang normal membutuhkan regulasi BCL-6 yang diturunkan dan dimediasi oleh NF- $\kappa$ B melalui ekspresi IRF4 untuk diferensiasi sel plasma. Sekitar 35% kasus, menunjukkan adanya translokasi kromosom BCL-6 yang terletak pada kromosom 3q27, diduga terjadi penekanan fungsi transkripsi dari PRDM1 sebagai regulator diferensiasi sel plasma, mengurangi respon

apoptosis yang dimediasi oleh p53 terhadap kerusakan DNA serta memberikan keuntungan sel untuk terus berproliferasi (Chan, 2010; Dobashi, 2016).



**Gambar 11.** Jalur onkogenik pada DLBCL subtipeABC(Dobashi, 2016)



**Gambar 12.** Diagram skematik yang menunjukkan mekanisme patogenetik yang umum terjadi pada DLBCL (Chan, 2010)

#### **II.4.2. Axis PD-1/PD-L1 Pada *Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)***

Subtipe GCB lebih sering muncul dengan lesi genetik seperti translokasi BCL2, delesi PTEN atau ING1, peningkatan atau penguatan MDM2 dan mutasi p53. Sebaliknya, DLBCL tipe ABC/Non-GCB menunjukkan aktivasi BCR yang kronis (misalnya mutasi CD79A/B) dan hadir dengan perubahan genetik lainnya seperti amplifikasi BCL2 atau penghapusan INK4-ARF. Jalur pensinyalan BCR kronis adalah target utama yang biasa digunakan untuk intervensi terapeutik (misalnya ibrutinib, penghambat PKC, lenalidomide) tetapi mengaktifkan mutasi (misalnya translokasi CARD11, BCL10, penghapusan A20), yang kadang menimbulkan efektifitas pada terapi. (Lenz & Staudt, 2010)

Untuk sel B yang berpartisipasi dalam reaksi pusat germinal, fase istirahat pada rantai DNA untai ganda tambahan diperkenalkan selama proses *switch class recombination*. (Tsai & Lieber, 2010) Sel-sel GCB juga mengalami hipermutasi somatik (SHM) yang terutama mempengaruhi lokus gen Imunoglobulin (Peled et al., 2008). Pada limfoma sel B yang ditangkap pada tahap diferensiasi sel GCB, proses ini terus menjadi aktif dan dapat memperkenalkan mutasi tambahan yang memicu perkembangan tumor, dimana mutasi ini mempengaruhi gen yang biasanya tidak diidentifikasi sebagai target GC-SHM (Pasqualucci et al., 2001). Ini diharapkan untuk gen yang ditranslokasi-kan ke lokus Ig tetapi SHM juga memengaruhi gen yang tidak ditranslokasi. Ada kemungkinan bahwa mekanisme SHM tidak normal pada sel-sel neoplastik ini atau mungkin terkait dengan paparan

sel yang terlalu lama terhadap SHM, atau mutasi langka yang biasanya tidak terdeteksi pada sel-sel GCB normal dipilih karena mereka menguntungkan untuk pertumbuhan sel tumor / kelangsungan hidup atau mekanisme perbaikan DNA yang mungkin mengalami kerusakan. Menariknya, bahkan ABC/Non-GCB yang tidak menunjukkan program sel GCB aktif, *activation induced cytidine deaminase* (AID), enzim esensial untuk SHM dan CSR, terus diekspresikan dan menghasilkan peristiwa mutasi yang abnormal, termasuk ketidaknormalan mekanisme *switch class recombination*. Karena semua mekanisme ini yang mengganggu integritas genomik, limfoma jauh lebih umum pada sel B daripada sel T atau NK. (Chan, 2010)

Dalam lingkungan mikro, sel-sel stroma tumor dan komposisi infiltrat sel imun mempengaruhi perkembangan penyakit DLBCL. Selain itu, kekuatan respon imun dapat secara fungsional terganggu oleh beberapa mekanisme pelarian kekebalan tumor (*escape*), terutama yang mengatur pos pemeriksaan imun seperti PD-1/PD-L1. (Honda et al., 2014)

#### **II.4.3. Mekanisme Penghindaran Sel Imun Terkait Ekspresi PD-L1 pada *Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL)***

Anomali genetik atau perubahan kromosom yang menyebabkan ekspresi PD-L1 diamati pada sekitar 20% dari DLBCL. Khususnya perubahan struktur kromosom 9p24.1 terkait erat dengan ekspresi PD-L1 di DLBCL. Baru-baru ini Georgiou *et al* melaporkan bahwa perubahan genetik seperti 12% *gains*, 3% dari amplifikasi, dan 4% dari translokasi diamati dan translokasi lain yang melibatkan lokus rantai berat Ig juga dapat menyebabkan ekspresi PD-L1 dalam DLBCL (Georgiou et al., 2016). Ekspresi PD-L1 lebih sering pada DLBCL tipe ABC/Non-



GCB dibandingkan tipe GCB. Data menunjukkan bahwa penggunaan penghambat ligasi PD-1/PD-L1 pada manajemen kasus pasien tipe ABC/Non-GCB lebih bermanfaat dibandingkan tipe GCB (Song et al., 2019).

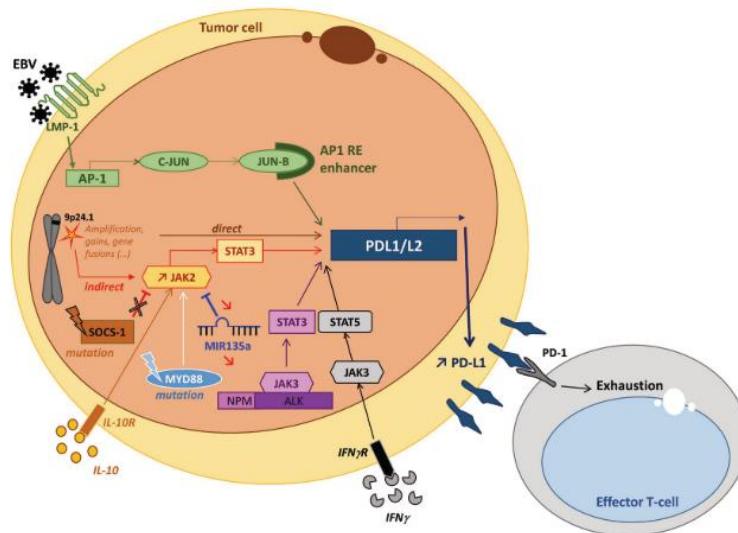
EBV juga memberikan bukti klinis bahwa sinyal instrinsik oleh infeksi virus menambah ekspresi PD-L1 dalam DLBCL. (B. J. Chen et al., 2013). Induksi ekspresi PD-L1 sebagai sinyal *immune escape* melalui pensinyalan konstitutif pada protein LMP1 dan AP-1 yang dikodekan oleh EBV dapat diaktifkan oleh kaskade JNK dan berperan pada proses limfomagenesis pada DLBCL positif EBV. (Song et al., 2019)

Sitokin inflamasi yang dideregulasi dapat berperan pada pertumbuhan sel DLBCL. Baru-baru ini jalur aktivasi JAK/STAT dapat menyimpang sebagai hilir pensinyalan IL-10, ditemukan dalam garis sel DLBCL dan diketahui secara langsung menambah ekspresi berlebih pada PD-L1. (Gupta et al., 2012; Y. Qiu, Jiang, Zhang, & Qin, 2019)

Mekanisme instrinsik lain yang terkait dengan ekspresi PD-L1 dalam sel DLBCL adalah regulasi gen oleh miR-195, yang diduga mengikat dengan 3'UTR protein PD-L1 yang kemudian menghambat ekspresinya. Dalam data terbaru, miR-195 menurun secara signifikan, sedangkan PD-L1 sebagai gen hilir sangat diekspresikan dalam garis sel DLBCL. (He et al., 2018)

Ekspresi PD-L1 dalam DLBCL ABC/Non-GCB juga dapat dihasilkan dari aktivasi pensinyalan JAK/STAT oleh mutasi MYD88. Mutasi telah ditemukan hingga 30% dari tipe ABC/Non-GCB dalam kasus DLBCL, dan mutasi MYD88 L265P ditemukan menjadi tipe onkogenik yang paling umum. (Song et al., 2019)

umum  
L1  
pada



**Gambar 13.**  
Gambaran  
ekspresi PD-  
yang  
meningkat

limfoma(Gravelle et al., 2017)

#### II.4.4. Ekspresi PD-1/PD-L1 pada DLBCL

PD-L1 dieskresikan oleh kedua sel tumor DLBCL dan oleh sel yang tidak ganas dari lingkungan mikro imun mereka, seperti makrofag. Dalam DLBCL, ekspresi PD-L1 telah dilaporkan sekitar 20-30% dari kasus DLBCL tetapi angka ini sangat bervariasi tergantung pada *cut-off* yang diterapkan (yang berkisar antara 5 hingga 30%) dan kompartemen sel yang dianalisis (tumor/non-sel tumor). (Gravelle et al., 2017)

#### II.4.5. Blokade PD-1 dan PD-L1 pada DLBCL

*Diffuse large B-cell lymphoma* adalah jenis limfoma yang paling umum pada orang dewasa. Prognosis untuk pasien DLBCL adalah bervariasi dan pada 40% kasus buruk meskipun telah diberikan terapi kombinasi rituximab dengan *cyclophosphamide-doxorubicin-ondovin-prednisone* (R-CHOP) (Chemotherapy et al., 2002). Dikarenakan angka relaps atau refrakter pada DLBCL mencapai angka

30-40% setelah terapi standar, maka strategi terapi baru diperlukan untuk meningkatkan tingkat respons dan memperpanjang angka bertahan hidup. Seperti yang telah diketahui, jalur pensinyalan PD-1/PD-L1 terkait erat dengan downregulasi fungsi sel T sitotoksik dan peningkatan angka ketahanan hidup pada DLBCL. Oleh karena itu, blokade imun PD-1/PD-L1 oleh mAb dapat memperbaiki fungsi sel T dan menambah aktifitas anti-tumor. Baru-baru ini, imunoterapi menggunakan mAb anti-PD-1 dan PD-L1 dianggap pengobatan yang wajar pada pasien dengan DLBCL yang kambuh atau refrakter. Sebenarnya, validasi telah dilakukan bahwa imunoterapi memiliki respons yang tahan lama dan tingkat kelangsungan hidup yang meningkat pada beberapa kanker solid dan keganasan hematologis. Baru-baru ini, uji klinis menggunakan beberapa mAb anti-PD-1 dan anti-PD-L1 yang dikembangkan secara aktif dilakukan pada kasus DLBCL (Song et al., 2019).

Nivolumab adalah antibodi monoklonal pemblokiran IgG-4 yang menargetkan reseptor PD-1 pada sel-T manusia (Zhang et al., 2018). Anti PD-1 mAb berikatan secara spesifik dengan PD-1, tetapi tidak dengan anggota keluarga CD28 terkait seperti CD28, CTLA-4, *Inducible co-stimulator*, sel B atau *T lymphocyte attenuator*. Blokade jalur pensinyalan PD-1 menggunakan nivolumab menyebabkan peningkatan proliferasi dari sel limfosit dan pelepasan IFN- $\gamma$ . (Bryan & Gordon, 2015)

Dalam studi ekspansi kohort *phase-1-dose-escalation* dari nivolumab yang dilakukan oleh Lesokhin et al terdapat 81 pasien dengan keganasan hematologis yang kambuh atau refrakter termasuk pasien dengan NHL (11 pasien DLBCL) dan 27 orang dengan *multiple myeloma* diterapi dengan dua dosis berbeda nivolumab (1mg/kg dan 3mg/kg setiap dua minggu). Hasilnya menunjukkan bahwa nivolumab

ditoleransi dengan baik dan lebih efektif pada DLBCL yang kambuh atau refrakter daripada NHL sel B lainnya. (Lesokhin et al., 2016)

Pembrolizumab juga merupakan IgG-4 anti-PD-1 mAb dengan afinitas tinggi. Targetnya adalah reseptor PD-1 pada sel T manusia. Itu terbukti memiliki aktifitas anti-tumor yang kuat dan profil keamanan yang menguntungkan dalam berbagai jenis kanker dan disetujui di seluruh dunia untuk neoplasma ganas tingkat lanjut. (Song et al., 2019)

Atezolizumab juga merupakan IgG1 mAb dengan target PD-L1, yang mengikat PD-L1 dan mencegah interaksi antara PD-L1 dan reseptor PD-1 dan CD80. Wilayah Fc dari atezolizumab dirancang untuk mengurangi fungsi efektor Fc dan meminimalkan sitotoksitas yang dimediasi sel yang bergantung pada antibodi, karenanya dapat mengganggu sumbu PD-1/PD-L1, dan dengan demikian mencegah kelelahan sel T, menghambat ekspresi sitokin hilir, dan respon imun pada fase akhir. (Ding et al., 2017)

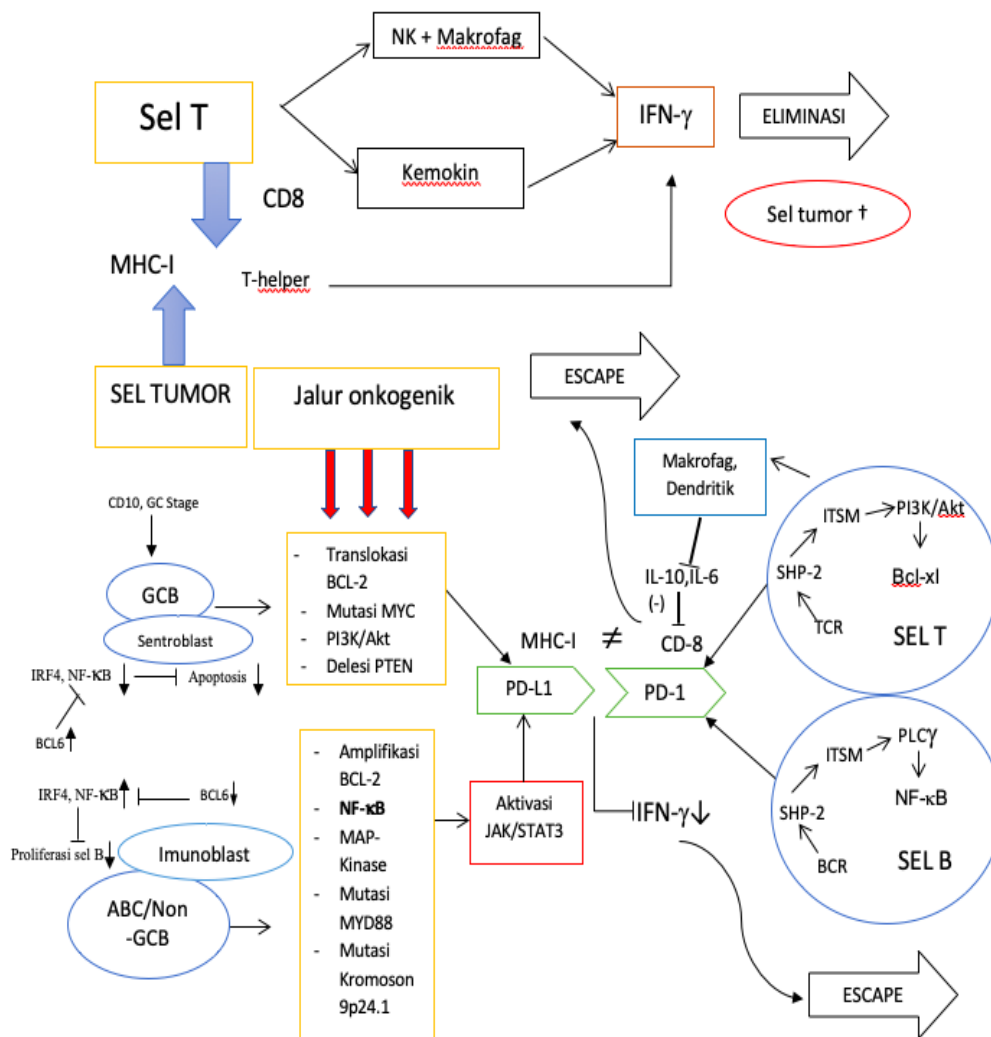
## **II.5. Prospektif Terapi Blokade PD-1/PD-L1**

Blokade PD-1/PD-L1 menunjukkan penekanan pertumbuhan tumor dan kemampuan metastasis yang lebih sedikit. Dalam model tikus kanker kandung kemih, blokade antibodi PD-1 dapat meningkatkan jumlah sirkulasi sel T-CD8 yang mengekspresikan CD107a spesifik tumor dan mengaktifkan splenosit, serta secara signifikan mengurangi ukuran tumor. (Robert et al., 2014) Blokade antibodi monoklonal dari PD-1/PD-L1 telah memberikan hasil yang efektif untuk sekelompok pasien kanker terutama pada tumor positif PD-L1, seperti melanoma, karsinoma

hepatoseluler, paru-paru, ginjal, keganasan pada kerongkongan, serta keganasan hematologis. (Msandiwa et al., 2005)

Beberapa pasien yang diobati dengan obat antagonis PD-1/PD-L1 menunjukkan pertumbuhan tumor yang cepat. Investigasi tindak lanjut pada 131 pasien yang diobati dengan antagonis PD-1 menunjukkan bahwa 12 pasien (9%) mengalami kemunduran, dan mereka yang berusia 65 tahun dan lebih tua memiliki tingkat kemunduran yang lebih tinggi. Saat ini tidak ada standar seragam untuk deteksi pra operasi PD-1/PD-L1, sehingga sulit untuk mencapai perawatan individual untuk pasien tertentu sehubungan dengan dosis dan obat yang cocok. (Jiang et al., 2019)

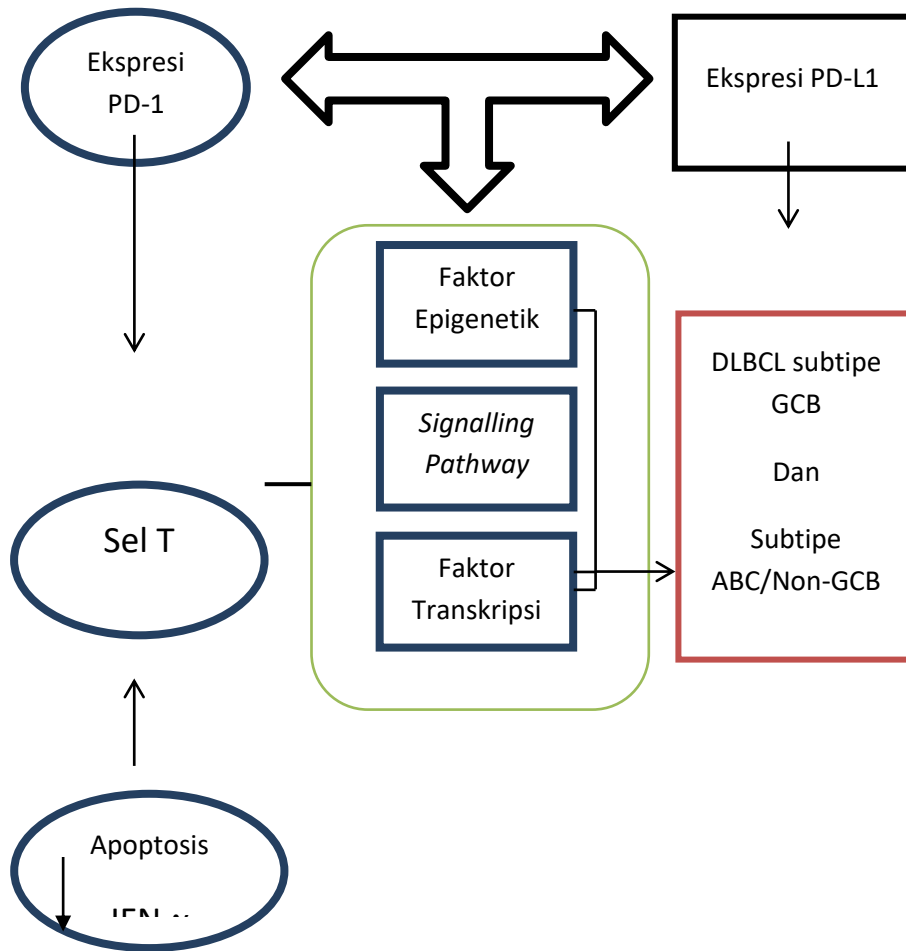
## II.6. Kerangka Teori



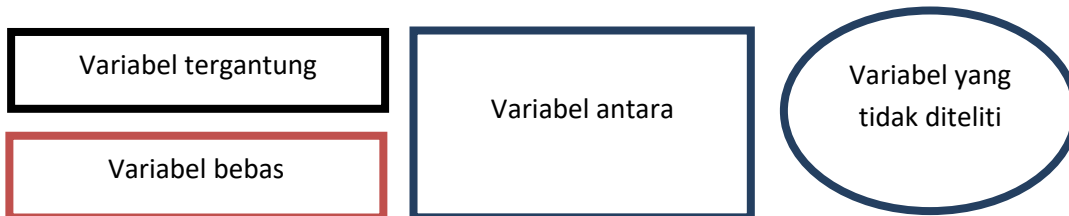
### BAB III

### KERANGKA KONSEP

#### III.1. Kerangka Konsep



Keterangan :

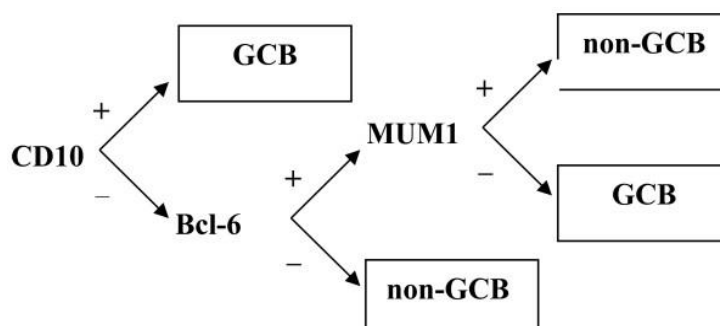


### III.2. Definisi operasional

1. *Diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL) adalah sel neoplasma folikel limfoid yang tersebar difus berasal dari sel B dan berukuran medium atau besar dengan inti yang berukuran sama atau lebih besar dari makrofag normal, atau dapat juga berukuran dua kali lebih besar dari limfosit normal.
2. Ekspresi PD-L1 adalah kuantitas sel tumor yangterwarnai coklat pada membran sel dan atau sitoplasma, diperoleh melalui hasil pemeriksaan histopatologi menggunakan pewarnaan imunohistokimia yang dilihat dengan mikroskop cahaya.
3. Pewarnaan imunohistokimia PD-L1 adalah deteksi kompleks antigen-antibodi PD-L1 dengan menggunakan antibodi *rabbit monoclonal* PD-L1 *clone* 28-8.
4. Profil ekspresi gen ditegakkan menggunakan algoritma Hans dengan menggunakan 3 antibodi melalui pewarnaan imunohistokimia. Kloning antibody yang digunakan adalah CD10 *clone* 56C6, BCL6 *clone* EP278, dan MUM1 *clone* EAU32.

### III.3. Kriteria Objektif

1. *Diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL) adalah diganosa berdasarkan pewarnaan H.E dan telah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia CD20 dan memberiksan hasil positif.
2. Selanjutnya dibedakan menjadi dua subtype yaitu *Germinal centre-like B-cell* (GCB) dan *Activating B-like cell* (Non-GCB/ABC) menggunakan algoritma Hans.





**Gambar 14.** Alur algoritma Hans dalam penentuan subtype berdasarkan profil ekspresi gen atau *Cell Of Origin (COO)*

3. Penilaian hasil positif pada profil ekspresi gen menggunakan cut off 30% untuk keseluruhan antibodi (CD10 terwarna pada membran sel/sitoplasma, BCL6 dan MUM1 terwarna pada inti).

4. Presentasi populasi sel tumor yang diwarnai untuk PD-L1 diberi skor secara independent. Intensitas warna dinilai sebagai berikut : (Chen B.J.et al.,2013)

Skor 0 = tidak terwarnai

Skor 1+ = terwarnai lemah / samar-samar

Skor 2+ = terwarnai sedang

Skor 3+ = terwarnai kuat

Pewarnaan dinyatakan “negatif” jika tidak terwarnai (skor 0), dan “positif” jika terwarnai dengan intensitas apapun (skor 1,2,3) (Phillips et al., 2015) (Laurent et al., 2016)

Ekspresi PD-L1 dihitung berdasarkan besarnya persentase sel-sel tumor (*Tumor Proportion Score/TPS*) yang terwarnai pada intensitas apapun berdasarkan pewarnaan imunohistokimia.

Skor 0 = <1%,

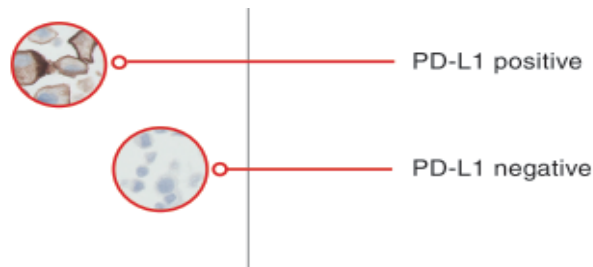
Skor 1 =  $\geq 1$  - <5%,

Skor 2 =  $\geq 5$  - <50%,

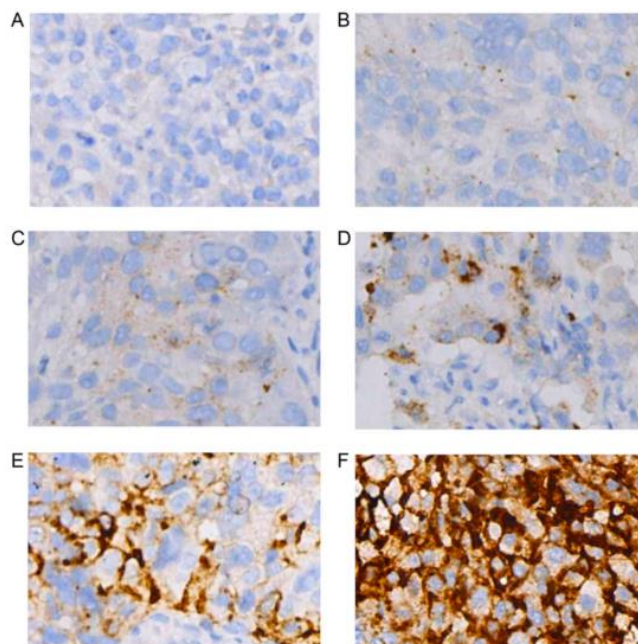
Skor 3 =  $\geq 50\%$

Nilai cut off yang digunakan 5%, selanjutnya skor dikategorikan “negatif” jika memiliki skor 0 dan skor 1, dan “positif” jika memiliki skor 2 dan 3.(García et al., 2020) (Laurent et al., 2016)

5. Variant morfologi sentroblastik : Sel dengan inti bulat, *angulated*, atau *multilobulated*, anak inti kecil *multiple* dan terletak di tepi, sitoplasma ampofilik.
- Variant morfologi imunoblastik : sel dengan inti bulat hingga oval, inti vesikuler, anak inti *single*, *prominent*, dan terletak di tengah, sitoplasma basofilik.



**Gambar 15.** Contoh intensitas pewarnaan pada membrane sel tumor untuk pewarnaan imunohistokimia PD-L1



**Gambar 16.** Representasi pewarnaan PD-L1 pada sel tumor. (A) Kontrol negative. (B) 1% positif. (C) 5% positif. (D). 10% positif. (E). 50% positif. (F) 100% atau dapat dikategorikan  $\geq 50\%$ . Seluruh gambar menggunakan pembesaran objektif 20x. (Y. Qiu et al., 2019)