

Hubungan Derajat Diferensiasi dan Tingkat Kedalaman Invasi Tumor terhadap Densitas Sel Limfosit T CD3⁺ dan Limfosit B CD20⁺ pada Adenokarsinoma Kolorektal

Novitasari, Ketut Mulyadi, Luh Putu In Indrayani Maker
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana
Denpasar

ABSTRAK

Latar belakang

Pemahaman mengenai lingkungan mikro lokal tumor sebagai salah satu faktor prognosis dan prediktif masih perlu ditingkatkan. Salah satunya adalah respon imun adaptif *in situ* (intratumoral dan peritumoral). Infiltrat sel-sel imun bersifat sangat heterogen antar tipe tumor dan antar pasien. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur densitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ intratumoral dan peritumoral pada berbagai kelompok derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor sebagai bukti adanya respon imun adaptif *in situ* pada karsinoma kolorektal (KKR).

Metode

Penelitian ini menggunakan metode analitik potong lintang dengan sampel sebesar 46 kasus yang kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia CD3 dan CD20. Perbedaan ekspresi pada masing-masing kelompok dianalisis dengan uji One Way Anova dan Kruskal-Wallis, sedangkan hubungan antara variabel bebas dan tergantung dinilai dengan uji multipel regresi linear dengan tingkat kemaknaan (α)=0,05.

Hasil

Hasil uji statistik memperlihatkan perbedaan bermakna densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral antar kelompok derajat diferensiasi ($p=0,000$) dan tingkat kedalaman invasi tumor ($p=0,042$); densitas sel limfosit B CD20⁺ intratumoral dengan tingkat kedalaman invasi tumor ($p=0,029$); dan densitas sel limfosit B CD20⁺ peritumoral dengan derajat diferensiasi ($p=0,021$) dan tingkat kedalaman invasi tumor ($p=0,000$). Pada uji multipel regresi linear, didapatkan hubungan yang bermakna antara derajat diferensiasi terhadap densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral ($p=0,000$) dan tingkat kedalaman invasi tumor terhadap sel limfosit B CD20⁺ peritumoral ($p=0,000$).

Kesimpulan

Terdapat hubungan antara derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral dan limfosit B CD20⁺ peritumoral pada adeno-karsinoma kolorektal sebagai bukti adanya respon imun adaptif pada keganasan.

Kata kunci: derajat diferensiasi, sel limfosit B CD20⁺, sel limfosit T CD3⁺, tingkat kedalaman invasi tumor.

ABSTRACT

Background

The understanding of tumor's micro local environment as one of prognostic and predictive factors still needs to be encouraged. One of them is *in situ* adaptive immune response including intratumoral and peritumoral. Indeed, immune infiltrates are very heterogeneous between tumor types and patients. This study aimed to estimate the intratumoral and peritumoral densities of lymphocyte T CD3⁺ and lymphocyte B CD20⁺ between groups of differentiation grading and the depth of tumor invasion as an evidence of *in situ* immune response in colorectal carcinoma (CRC).

Methods

This analytic cross-sectional study was performed on 46 samples. Immunostaining CD3 and CD20 were performed to all sample. Results were analyzed using One Way Anova and Kruskal Wallis. The correlations between independent and dependent variables were analyzed using multiple linear regression with significance level at $\alpha=0.05$.

Results

The statistical results showed significantly difference between density of intratumoral lymphocyte T CD3⁺ with differentiation grading ($p=0.000$) and the depth of tumor invasion ($p=0.042$); density of intratumoral lymphocyte B CD20⁺ with the depth of tumor invasion ($p=0.021$); and density of peritumoral lymphocyte B CD20⁺ with differentiation grading ($p=0.021$) and the depth of tumor invasion ($p=0.000$). Multiple linear regression analysis showed significantly correlation between differentiation grading and density of intratumoral lymphocyte T CD3⁺ ($p=0.000$) and the depth of tumor invasion to density of peritumoral lymphocyte B CD20⁺ ($p=0.000$).

Conclusion

There is correlation between differentiation grading and the depth of tumor invasion with density of intratumoral lymphocyte T CD3⁺ and peritumoral lymphocyte B CD20⁺ in colorectal adenocarcinoma as an evidence of adaptive immune response in malignancy.

Key words: depth of tumor invasion, differentiation grading, lymphocyte B CD20⁺, lymphocyte T CD3⁺.

PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal (KKR) adalah salah satu neoplasma yang kejadiannya sering dan telah menjadi masalah kesehatan yang serius di Indonesia pada umumnya dan di Bali pada khususnya. Kanker ini insidennya lebih tinggi di negara maju dan dikaitkan dengan pola makan dan gaya hidup. Adenokarsinoma kolorektal merupakan salah satu jenis neoplasma yang terbanyak yang ada di dalam klasifikasi KKR berdasarkan klasifikasi dari *World Health Organization* (WHO) tahun 2010.

Pedoman klinis penatalaksanaan KKR terutama berdasarkan atas klasifikasi TNM yang disetujui oleh *American Joint Commission on Cancer* (AJCC). Berdasarkan pedoman, terapi tambahan tidak direkomendasikan pada pasien-pasien KKR stadium I atau stadium II risiko rendah setelah menjalani pembedahan radikal.¹⁻⁴ Hal ini dikarenakan, secara teori, pasien-pasien tersebut dapat sembuh total dan mencapai kelangsungan hidup jangka panjang. Namun, sekitar 10% pasien dengan stadium I dan 20% pasien dengan stadium II mengalami rekurensi atau metastasis, serta adanya heterogenitas *outcome* yang ditemukan pada pasien dengan stadium II. Oleh karena itu, stadium TNM saja tidak bisa menjadi penanda kewaspadaan awal untuk metastasis atau rekurensi setelah operasi. Diperlukan adanya marka-marka tambahan sebagai parameter prognosis dan prediktif terapi tambahan setelah operasi untuk melengkapi sistem TNM.² Salah satu faktor prognostik tersebut adalah respon imun *in situ* (intratumoral dan peritumoral).

Lingkungan mikro lokal tumor baik itu intratumoral maupun peritumoral, terdiri dari sel-sel tumor, matriks ekstraseluler, sel-sel imun, sitokin dan faktor-faktor lainnya. Semuanya mempunyai peran penting dalam pembentukan, pertumbuhan, invasi, serta metastasis tumor.^{2,5} Sel-sel imun hadir dalam berbagai derajat (mulai dari tidak ada hingga sangat padat) pada lingkungan mikro tumor di intratumoral dan peritumoral, yang dapat diamati pada praktik patologis rutin.⁵ Lingkungan mikro tumor memiliki peran ganda: menyediakan oksigen dan nutrisi bagi tumor juga sekaligus bisa menekan pertumbuhan tumor.^{5,6} Sel-sel imun yang menjadi bagian dari lingkungan mikro tumor terdiri dari infiltrat radang respon imun *innate* (makrofag, neutrofil, sel *mast*, sel *Natural Killer*,

dan sel dendritik imatur) dan infiltrat radang respon imun adaptif (sel dendritik matur, sel limfosit B, dan sel limfosit T).⁶

Banyak laporan penelitian menunjukkan manfaat kelangsungan hidup yang dihubungkan dengan keberadaan sel-sel limfosit di intratumoral dan peritumoral. Hal ini memberi kesan bawa infiltrasi limfosit bersifat efektif untuk menghambat progresi tumor. Bagaimanapun juga, adalah penting untuk membedakan antar tipe-tipe limfosit yang berbeda, oleh karena mereka semua mempunyai fungsi-fungsi yang berbeda dalam lingkungan mikro tumor. Sebuah pendekatan yang umum dipakai untuk mendapatkan pemahaman yang lebih lagi mengenai interaksi antara tumor dan sistem imun di intratumoral dan peritumoral adalah dengan cara mengkuantifikasi jumlah TIL, dan menghubungkannya dengan karakteristik-karakteristik tumor dan hasil keluaran prognosis.⁷ Oleh karena infiltrasi sel limfosit tidak tersebar secara homogen merata pada KKR, perhatian selanjutnya lebih terfokus pada nilai-nilai prediktif sel limfosit berdasarkan area distribusinya, baik itu di intratumoral, peritumoral/tepi invasif tumor, dan di struktur limfoid tersier.^{6,8}

Sel T dan B berkolaborasi untuk menghasilkan respon imun yang poten sehingga bisa menghasilkan kerusakan jaringan yang ekstensif. Pada konteks ini, sel B memperkuat respon sel T dengan cara memproduksi antibodi, sitokin dan kemokin, bekerja sebagai *antigen presenting cells* (APC) lokal, dan mengorganisir pembentukan struktur limfoid tersier untuk mempertahankan imunitas jangka panjang. Hubungan antara tumor dengan sel B reaktif mungkin merupakan kondisi yang penting untuk menghasilkan respon sel T yang poten dan berkepanjangan melawan kanker.⁹

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor berhubungan dengandensitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ pada lokasi intratumoral dan peritumoral pada adenokarsinoma kolorektal.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif non eksperimental, menggunakan *design* deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Penelitian dilakukan di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Univer-

sitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar sejak 20 Juni hingga 30 September 2015. Populasi penelitian ini adalah semua blok parafin dari bahan operasi penderita adenokarsinoma kolorektal yang diperiksa secara histopatologi pada Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar sejak 1 Januari 2012 sampai 30 April 2015 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi sampel adalah sediaan yang berasal dari bahan operasi tumor kolorektal dengan diagnosis histopatologi adenokarsinoma dan sediaan harus mengandung massa tumor yang menunjukkan invasi terdalam. Sedangkan kriteria eksklusi sampel adalah kasus adenokarsinoma kolorektal yang telah mendapatkan terapi tambahan berupa kemoterapi maupun radioterapi, blok parafin yang rusak dan berjamur, banyak mengandung jaringan nekrosis dan perdarahan. Sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi terdiri dari 15 kasus adenokarsinoma dengan derajat diferensiasi baik, 16 kasus sedang, dan 15 kasus buruk; serta 3 kasus dengan kedalaman invasi T1, 14 kasus T2, 15 kasus T3, dan 14 kasus T4.

Adenokarsinoma kolorektal adalah keganasan epitel kelenjar kolorektal yang menunjukkan invasi menembus muskularis mukosa. Kriteria diagnosis adenokarsinoma kolorektal berdasarkan gambaran mikroskopis yang menunjukkan adenokarsinoma klasik maupun varian-variananya.¹⁰⁻¹³ Derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal dibagi tiga yaitu derajat baik, sedang, dan buruk berdasarkan komponen glanduler yang masih tersisa. KKR derajat baik memiliki komponen glanduler lebih dari 95%, derajat sedang memiliki komponen glanduler 50-95%, dan derajat buruk memiliki komponen glanduler 0-49%.¹¹ Tingkat kedalaman invasi tumor dinyatakan dalam komponen T dibagi menjadi empat yaitu T1, T2, T3, dan T4. Tumor yang telah menembus muskularis mukosa dimasukkan dalam kategori T1. Tumor yang menginvasi sampai ke muskularis propria dimasukkan dalam kategori T2. Tumor yang menginvasi subserosa atau ke dalam jaringan perikolika atau perirektal non-peritonealisasi digolongkan menjadi T3. Tumor yang mem-perforasi peritoneum viseral dan atau secara langsung menginvasi organ atau struktur lain termasuk dalam kategori T4.^{10,11,14} Interpretasi

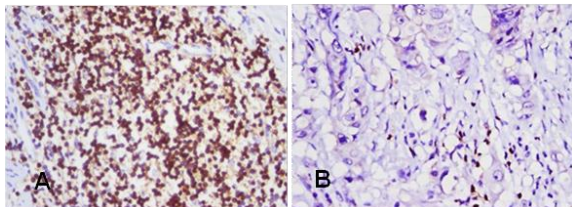
histomorfologi ini dilihat dengan pulasan hematoxilin dan eosin (H&E), menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21.

Preparat hasil pulasan H&E sesuai nomor-nomor yang telah dikumpulkan, dievaluasi ulang oleh peneliti dan dua ahli patologi untuk memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Setelah itu dilakukan pemotongan ulang blok parafin, untuk diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia anti-CD3 dari *Abcam* dan anti-CD20 dari *Biocare*. Dilakukan penghitungan densitas dengan mikroskop cahaya binokuler *Olympus CX21* menggunakan pembesaran 40x untuk melihat distribusi sel limfosit yang terpulas positif, dan pembesaran 400x untuk melihat intensitas pewarnaan pada sel limfosit yang terpulas positif. Sel limfosit yang dinyatakan positif adalah sel limfosit yang terpulas coklat pada membran sel. Sistem skoring mempergunakan metode kuantitatif yaitu menghitung jumlah sel limfosit T yang terpulas positif CD3 dan sel limfosit B yang terpulas positif CD20 pada lapangan pandang yang berukuran 1 milimeter persegi (sel/mm^2) dengan menggunakan lensa okuler bermikrometer (*ocular micrometer lense model XY11*). Penghitungan dilakukan secara manual mempergunakan *manual counter clicker* pada lapangan pandang yang menunjukkan densitas terpadat^{6,15} baik itu di lokasi intratumoral maupun peritumoral. Kontrol positif diambil dari jaringan kelenjar getah bening.

Data-data pengamatan mikroskopis disajikan dalam bentuk tabel dan narasi. Data densitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ terlebih dahulu diuji normalitas data dengan uji Shapiro-Wilk dilanjutkan uji One Way Anova karena data berdistribusi normal, kecuali untuk densitas sel limfosit B CD20⁺ intratumoral mempergunakan uji Kruskal-Wallis karena data tidak berdistribusi normal. Hubungan antara derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ intratumoral dan peritumoral diuji dengan multipel regresi linear. Tingkat kemaknaan (α) pada penelitian ini ditetapkan pada $p < 0,05$, dengan nilai *confident interval* (CI) 95%. Analisis statistik terhadap data penelitian dilakukan dengan menggunakan program komputer STATA SE 12.1 for windows.

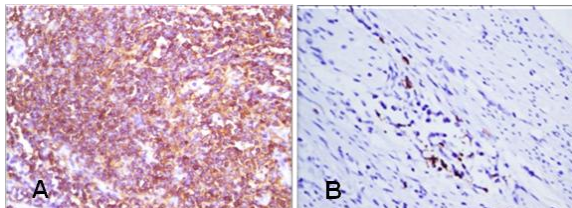
HASIL

Sel limfosit T terpusat positif dengan pewarnaan imunohistokimia CD3 pada kasus adenokarsinoma kolorektal dengan distribusi dan densitas yang berbeda (Gambar 1).



Gambar 1. Imunohistokimia CD3 pada kasus adenokarsinoma kolorektal. A. Densitas padat sel limfosit T CD3⁺; B. Densitas rendah sel limfosit T CD3⁺ (pembesaran 400x).

Sel limfosit B terpusat positif dengan pewarnaan imunohistokimia CD20 pada kasus adenokarsinoma kolorektal dengan distribusi dan densitas yang berbeda (Gambar 2).



Gambar 2. Imunohistokimia CD20 pada kasus adenokarsinoma kolorektal. A. Densitas padat sel limfosit B CD20⁺; B. Densitas rendah sel limfosit B CD20⁺ (pembesaran 400x).

Tabel 1. Perbandingan rerata densitas sel limfosit antar kelompok derajat diferensiasi.

Kelompok subyek	N	Densitas sel limfosit			p
		Jenis sel	Lokasi	Rerata	
Derajat baik	15	T CD3 ⁺	Intra-tumoral	162,33 ± 63,088	0,000
				281,88 ± 116,821 336,87 ± 116,049	
Derajat sedang	16	T CD3 ⁺	Peri-tumoral	354,0 ± 134,478	0,180
				484,0 ± 234,825 396,73 ± 201,483	
Derajat buruk	5	B CD20 ⁺	Peritumoral	160,73 ± 169,094	0,509
				213,75 ± 300,403 166,33 ± 288,246	
Derajat buruk	5	B CD20 ⁺	Peritumoral	434,0 ± 164,673	0,021
				342,38 ± 195,386 259,20 ± 122,179	

Tabel 2. Perbandingan rerata densitas sel limfosit antar kelompok tingkat kedalaman invasi tumor.

Kelompok subyek	N	Densitas sel limfosit			p
		Jenis sel	Lokasi	Rerata	
T1	3	T CD3 ⁺	Intra-tumoral	233,0 ± 68,088	0,042
				233,71 ± 104,168 219,73 ± 103,111 337,93 ± 143,568	
T2	14	T CD3 ⁺	Peri-tumoral	376,0 ± 141,266	0,475
				472,79 ± 237,264 357,13 ± 123,012 421,50 ± 232,037	
T3	15	B CD20 ⁺	Intra-tumoral	571,0 ± 582,742	0,029
				197,43 ± 168,210 99,07 ± 98,144 168,79 ± 303,689	
T4	14	B CD20 ⁺	Peri-tumoral	652,33 ± 64,299	0,000
				417,0 ± 172,919 333,07 ± 112,405 220,36 ± 136,203	

Tabel 3. Analisis multipel regresi linear hubungan derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ intratumoral dan peritumoral.

Variabel bebas	Variabel tergantung	Koefisien β	p	95% Confidence interval for β	
				Lower bound	Upper bound
Derajat diferensiasi T	CD3 ⁺ intratumoral	83,274	0,000	40,309	126,24
		7,484	0,690	-30,093	45,064
Derajat diferensiasi T	CD3 ⁺ peritumoral	35,914	0,393	-48,035	119,864
		-27,276	0,458	-100,701	46,148
Derajat diferensiasi T	CD20 ⁺ intratumoral	51,221	0,327	-52,901	155,344
		-90,79	0,051	-181,858	0,278
Derajat diferensiasi T	CD20 ⁺ peritumoral	-31,817	0,273	-89,586	25,951
		-104,218	0,000	-154,743	-53,692

Analisis komparabilitas diuji dengan One Way Anova dan Kruskal-Wallis berdasarkan rerata densitas sel limfosit T CD3⁺ dan limfosit B CD20⁺ pada area intratumoral dan peritumoral antar kelompok derajat diferensiasi (Tabel 1) dan tingkat kedalaman invasi tumor (Tabel 2). Analisis hubungan antara variabel bebas dan tergantung dilakukan dengan uji multipel regresi linear yang disajikan pada Tabel 3.

Analisis di atas menunjukkan hubungan antara variabel bebas dan tergantung. Efek murni derajat diferensiasi, setelah mengendalikan variabel tingkat kedalaman invasi tumor, tampak berhubungan dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral secara signifikan (p=0,000). Setiap kenaikan satu tingkat derajat diferensiasi didapatkan kenaikan densitas sel limfosit T CD3⁺ sebesar 83,274. Efek murni tingkat kedalaman invasi tumor, setelah

mengendalikan variabel derajat diferensiasi, tampak berhubungan dengan densitas sel limfosit B CD20⁺ peritumoral ($p=0,000$). Setiap kenaikan satu tingkat kedalaman invasi tumor didapatkan penurunan densitas sel limfosit B CD20⁺ peritumoral sebesar 104,218. Jadi, terlihat bahwa ada hubungan yang signifikan antara derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral dan limfosit B CD20⁺ peritumoral.

DISKUSI

Kehadiran respon imun adaptif di dalam lingkungan mikro lokal tumor mempunyai peran ganda, seperti yang telah disebutkan sebelumnya yaitu bagaikan pedang bermata dua. Pada satu sisi, sel-sel imun terlibat dalam inisiasi dan progresi tumor. Pada sisi yang lain, sel-sel imun memegang peranan dalam mengontrol pertumbuhan dan penyebaran tumor.¹⁶

Rudolf Virchow, sekitar 150 tahun yang lalu, sebagai tokoh yang pertama kali mendeskripsikan infiltrasi limfosit pada tumor dan berteori bahwa kanker bertumbuh pada area inflamasi kronis. Selanjutnya, pandangan ini didukung dengan penjabaran sekitar 15-20% tumor yang bertumbuh dari inflamasi kronis, seperti: virus hepatitis B dan *C. helicobacter pylori*, dan virus papiloma. Pada saluran pencernaan, inflamasi kronis telah terbukti sebagai salah satu faktor risiko kehadiran KKR. *Ulcerative colitis* dan *Crohn's disease*, berhubungan dengan peningkatan risiko perkembangan menjadi KKR. Bagaimanapun juga, kejadian KKR yang berhubungan dengan kolitis tidak melebihi 2% dari seluruh kejadian KKR.¹⁶

Peran protektif sel-sel imun dalam perkembangan tumor disebut *immunosurveillance*. Terdapat tiga fase *immunosurveillance*, yaitu: eliminasi, ekuilibrium, dan *escape*. Pada fase eliminasi, respon imun *innate* dan adaptif berinteraksi untuk mendeteksi antigen tumor dan mengeliminasinya. Pada fase kedua, respon imun dan sel-sel tumor berada pada titik ekuilibrium/keseimbangan, di mana *immunosurveillance* tumor bersifat menahan, akan tetapi tidak dapat mengeliminasi secara komplit sel-sel tumor yang mengalami evolusi klonal. Selanjutnya klonal-klonal sel tumor tersebut menjadi berkurang sifat imunogeniknya sehingga mampu meloloskan diri dari pertahanan respon imun

innate dan adaptif dan berproliferasi tanpa terdeteksi.^{16,17}

Peran ganda respon imun pada lingkungan mikro lokal tumor dilakukan oleh sel-sel imun dengan tipe yang berbeda-beda. Sel-sel imun tersebut juga memiliki kecenderungan komposisi, distribusi, dan densitas yang berbeda-beda pula.^{18,19}

Penelitian ini memfokuskan pada respon imun adaptif yang diperankan oleh sel-sel limfosit, yaitu limfosit T sebagai pemeran respon imun seluler dan limfosit B sebagai pemeran respon imun humoral.^{20,21} Respon imun seluler dimediasi oleh sel limfosit T, bertanggungjawab akan respon pertahanan melawan zat asing intraseluler. Respon imun humoral dimediasi oleh antibodi yang dihasilkan oleh sel limfosit B, memberikan proteksi terhadap zat asing ekstraseluler.^{17,20,21} Analisis keberadaan sel-sel limfosit pada KKR primer secara *in situ* melalui pemeriksaan IHK menyokong hipotesis mengenai adanya pengaruh respon imun adaptif pada keganasan. Secara spesifik, densitas TIL yang tinggi pada tumor primer berhubungan dengan prognosis yang baik secara independen selain faktor-faktor prognosis lainnya.²²

Reaksi limfositik pada kasus KKR telah diteliti cukup banyak dan melibatkan berbagai jenis sel-sel imun. Beberapa penelitian menilai reaksi limfositik secara menyeluruh yang diteliti dari pengecatan H&E saja dihubungkan dengan derajat diferensiasi dan stadium tumor berdasarkan AJCC. Terdapat perbedaan bermakna antara skor reaksi limfositik menyeluruh dengan derajat diferensiasi ($p<0,0001$) dan stadium tumor ($p=0,002$; $p<0,05$).²³ Penelitian dengan hasil yang sama juga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara densitas TIL dengan derajat diferensiasi ($p=0,002$; $p<0,05$). Namun, tidak didapatkan perbedaan bermakna antara densitas TIL dengan tingkat kedalaman invasi tumor ($p=0,53$; $p>0,05$).²⁴

Penelitian terdahulu, melakukan penghitungan densitas sel limfosit T CD3⁺ dan membandingkannya dengan derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor (T3 dan T4). Hasil analisis regresi linear menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna di antara densitas sel CD3⁺ dengan derajat diferensiasi ($p=0,69$; $p>0,05$) dan tingkat kedalaman invasi tumor ($p=0,25$; $p>0,05$).²⁵ Noshio dan kawan-

kawan melakukan penghitungan densitas sel limfosit T CD3⁺ dan membandingkannya dengan berbagai variabel klinikopatologis, diantaranya derajat diferensiasi dan stadium penyakit. Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna antara densitas sel CD3⁺ dengan derajat diferensiasi ($p=0,49$; $p>0,05$) dan stadium penyakit ($p=0,29$; $p>0,05$).²⁶ Penelitian-penelitian tersebut juga melakukan penghitungan densitas sel imun berdasarkan area distribusinya.

Penelitian lainnya terdahulu yang dilakukan oleh Halama dan kawan-kawan, densitas dan lokasi sel-sel imun dinilai secara kuantitatif pada kasus KKR yang bermetastasis ke hati. Pengecatan IHK mempergunakan CD3, CD8, dan *granzyme* B. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa densitas sel limfosit T pada tepi invasif lesi metastatik menunjukkan perbedaan yang bermakna antara pasien yang berespon dengan kemoterapi dan pasien yang tidak berespon. Jadi, respon kanker terhadap kemoterapi berhubungan dengan tingginya densitas sel limfosit T pada tepi invasif dan memberikan prognosis yang baik.²²

Semua subset dari sel T dapat ditemukan di dalam tumor dan di tepi invasif. Pada KKR, proporsi tumor dengan densitas sel T *memory* CD4⁺ dan sel T CD8⁺ akan menurun seiring dengan perburukan derajat dan peningkatan kedalaman invasi lokal tumor, yang dinilai sebagai nilai T pada klasifikasi TNM. Hal ini berarti densitas sel tersebut lebih rendah pada derajat rendah dan tingkat kedalaman invasi tumor T4 dibandingkan T1. Distribusi lokasi dari sel T juga memiliki kecenderungan yang berbeda-beda antar subsetnya, di mana sel T CD8⁺ memiliki kecenderungan di intratumoral.²⁷ Pada penelitian ini, kami melakukan pengecatan IHK dengan CD3⁺ sebagai marka pan sel T dan tidak menilai masing-masing subset dari sel T tersebut. Hasil yang kami dapatkan, tidak sejalan dengan teori pernyataan di atas. Densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral berbeda bermakna antar kelompok derajat diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor. Rerata densitas sel limfosit T CD3⁺ semakin meningkat seiring dengan peningkatan derajat diferensiasi dan semakin dalamnya tingkat invasi tumor. Densitas sel limfosit T CD3⁺ terpadat ditemukan pada derajat diferensiasiburuk dan tingkat kedalaman invasi T4. Ketidaksesuaian dengan

teori bisa disebabkan karena agregat sel T yang terpulas CD3 mencakup banyak subset sel T secara umum (selain sel T *memory* CD4⁺ dan sel T CD8⁺). Apabila dilakukan pemeriksaan IHK terhadap setiap subset sel T, maka mungkin akan didapatkan dominasi sel-sel T yang bersifat pro-tumorigenesis dan bersifat inhibitor antitumor pada KKR dengan derajat diferensiasi buruk dan tingkat kedalaman invasi T4.

Densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral didapatkan berbeda bermakna pada penelitian ini. Hal ini dimungkinkan sesuai dengan peranan sel limfosit T dalam respon imun seluler. Sel limfosit T memberikan respon terhadap antigen intraseluler dalam hal ini adalah antigen tumor intraseluler. Kontak langsung dengan sel-sel tumorlah yang memungkinkan terjadinya hal tersebut, sehingga bisa ditemukan banyak sel limfosit T yang berada pada area intratumoral.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa densitas sel limfosit B CD20⁺ baik intratumoral maupun peritumoral menurun seiring dengan perburukan derajat diferensiasi dan peningkatan kedalaman invasi tumor. Densitas sel limfosit B CD20⁺ intratumoral dan peritumoral tertinggi didapatkan pada derajat diferensiasibaik dan tingkat kedalaman invasi T1. Hal ini sesuai dengan teori *immunosurveillance*. Penurunan progresif densitas sel limfosit B CD20⁺ seiring dengan perkembangan tumor menunjukkan keberhasilan sel-sel tumor untuk meloloskan diri dari respon imun *in situ*. Pada fase tersebut diyakini telah terjadi evolusi klonal yang menyebabkan sel tumor tidak dikenali lagi sebagai antigen yang spesifik oleh sel-sel imun sehingga tidak merangsang kehadiran sel-sel imun di sekitar tumor.²⁸

Sel limfosit B terutama ditemukan di daerah tepi invasif tumor yang sedang berkembang dan di struktur limfoid tersier yang berdekatan dengan massa tumor.²⁷ Hal ini serupa dengan hasil penelitian ini, di mana sel B didapatkan lebih banyak di area peritumoral daripada intratumoral, serta adanya kecenderungan membentuk jaringan limfoid tersier di area peritumoral. Sel limfosit B juga telah diobservasi terlokalisasi bersamaan dengan sel T dan diketahui memberikan berbagai fungsi pendukung pada sel T. Sel-sel CD20⁺ dapat mendukung aksi sel-sel T efektor melalui berbagai mekanisme.²⁹

Mekanisme peranan sel limfosit B dalam konteks antitumor masih belum banyak diketahui. Beberapa kemungkinan dikemukakan berdasarkan penelitian-penelitian eksperimental, autoimunitas, dan kasus-kasus transplantasi. Sel limfosit B menghasilkan beberapa molekul efektor yang mempunyai mekanisme potensial tersendiri dalam meningkatkan imunitas terhadap tumor, salah satunya adalah antibodi.⁹ Terdapat tiga jalur besar mekanisme antibodi dalam membunuh sel tumor, yaitu membunuh sel tumor secara langsung, membunuh sel tumor secara tidak langsung, dan ablasi vaskuler dan sel stromal. Mekanisme tidak langsung ini cukup dominan di mana sel B memodulasi sel-sel imun lainnya (sel limfosit T dan sel NK). Sel B berperan sebagai antibodi independen juga membantu presentasi antigen dan memproduksi sitokin yang berefek sitotoksik.^{9,30}

Pada penelitian ini juga dilakukan penilaian multipel regresi linear antar variabel. Uji tersebut menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antaradegradasi diferensiasi dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit B CD20⁺ peritumoral. Hal ini sejalan dengan teori yang menunjukkan densitas yang tinggi sel limfosit T intratumoral khususnya subset sel T sitotoksik oleh karena peranan antitumornya yang bersifat langsung membunuh sel tumor.^{21,27,31} Sedangkan sel limfosit B memiliki kecenderungan membentuk jaringan limfoid tersier di peritumoral oleh karena peranan antitumornya yang bersifat tidak langsung, mendukung aksi sel-sel T efektor melalui berbagai mekanisme.^{9,27,29,32}

KESIMPULAN

Penelitian ini memperlihatkan adanya hubungan antaradegradasi diferensiasi dan tingkat kedalaman invasi tumor dengan densitas sel limfosit T CD3⁺ intratumoral dan limfosit B CD20⁺ peritumoral pada adenokarsinoma kolorektal sebagai bukti adanya respon imun adaptif pada keganasan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Koch M, Beckhove P, Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, *et al.* Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer. *Annals Surg.* 2006; 244: 986-93.

2. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, *et al.* Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014; 110: 1595-605.
3. Mojarad EN, Azimzadeh P, Kuppen PJK. Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in patients with colorectal cancer. *Transl Gastrointest Cancer.* 2014; 3: 141-3.
4. Reissfelder C, Stamova S, Gossmann C, Braun M, Bonertz A, Walliczek U, *et al.* Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest.* 2015; 125: 739-51.
5. Ogino S, Galo J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer Immunology-Analysis of Host and Tumor Factors for Personalized Medicine. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012; 8: 711-9.
6. Pages F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukocyte Biol.* 2008; 84: 981-7.
7. Gooden MJM, Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011; 105: 93-103.
8. Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 174-84.
9. Nelson BH. CD20⁺ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Immunol.* 2010; 10: 4977-81.
10. Fenoglio-Preiser CM. editor. *Gastrointestinal pathology: an atlas and text.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
11. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P. Tumours of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen A, editors. *World Health Organization: classification of tumours, pathology and genetics of tumours of the digestive system.* Third ed. Lyon: IARC Press; 2010.
12. Homick JL, Odze RD. Polyps of the large intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, editors. *Surgical Pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.

13. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3: 153-73.
14. Rubin P, Hansen JT. TNM Staging Atlas with Oncoanatomy. Second Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams and Wilkins; 2012.
15. Deschoolmeester V, Baay M, Marck EV, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* 2010; 11: 147-72.
16. Caro GD, Marchesi F, Laghi L, Grizzi F. Immune Cells: Plastic Players along Colorectal Cancer Progression. *J Cellular Mol Med.* 2013; 17: 1088-95.
17. Salama P, Platell C. Host Response to Colorectal Cancer. *ANZ J Surg.* 2008; 78: 745-53.
18. Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Fridman CS, Kroemer G. Prognostic and Predictive Impact of Intra- and Peritumoral Immune Infiltrates. *Am Ass Cancer Res.* 2011; 71: 5601-6.
19. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 2013; 39: 11-24.
20. Abbas AK, Lichtman AH. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. Third Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
21. Kumar, Abbas, Aster. Diseases of the Immune System. In: Kumar Vinay, editor. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease Ninth Edition.* Philadelphia: Saunders Elsevier; 2015.
22. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoemig I, Benner A, Spille A. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011; 71: 5670-8.
23. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, *et al.* Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG Island Methylator Phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 6412-20.
24. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Arch Surg.* 2012; 147: 366-71.
25. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, *et al.* CD3⁺ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *The Lancet Oncol.* 2009; 10: 877-85.
26. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010; 222: 350-66.
27. Fridman WH, Pages F, Fridman CS, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev.* 2012; 12: 298-306.
28. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, *et al.* Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 610-8.
29. Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Fang J, Wang G, *et al.* T cell and antigen-presenting cell subsets in the tumor microenvironment. *Cancer Immunother.* 2013; 10: 17-32.
30. Vornhagen AS, Scholer HA, Gryschock L, Malcher J, Wennhold K, Marquez MG, *et al.* Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget Advance Publications.* 2014: 4651-63.
31. Monroe JG, Rothenberg E. *Molecular Biology of B-cell and T-cell Development.* New York: Springer Science and Business Media; 2013.
32. Caro GD, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, *et al.* Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predict better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 2147-58.