



HUBUNGAN EKSPRESI TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES (TAM)/CD68 DENGAN STATUS EKSPRESI HER2 PADA KARSINOMA PAYUDARA INVASIF

Dik Puspasari^{1,2}, Hermawan Istiadi², Siti Amarwati^{1,2}

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF TAM/CD68 WITH THE STATUS OF HER2 EXPRESSION IN
INVASIVE BREAST CARCINOMA

ABSTRACT

Background: Breast cancer is the most prevalent cancer death in women in Indonesia. HER2 overexpression in breast cancer is a marker for poor prognosis. Tumor Associated Macrophage (TAM) plays a role in the growth, invasion and metastasis of tumors and closely associated with a poor prognosis. Objective of this study is to determine the relationship between the expression of TAM/CD68 with the status of HER2 expression in invasive breast carcinoma.

Methods : This is an analytic observational study with case control design. The total sample size is 50 paraffin blocks from patients who had been diagnosed with invasive carcinoma of no special type at the Dr. Kariadi Hospital Semarang in 2015–2016, which is then divided into 2 groups: HER2 positive (+) and HER2 negative (-). The data collection will be the distribution and intensity of CD68 expression using immunohistochemistry Allred score in 5 high power field of each sample.

Results : The distribution of CD68 expression of HER2-positive group is more than HER2-negative group on score of 3, 4 and 5, with a significant difference ($p = 0.001$). The intensity of the expression of CD68, HER2-positive group had a number of cells with strong intensity significantly more than HER2-negative group ($p = 0.005$).

Conclusion : The distribution and intensity of TAM/CD68 expression in HER2-positive invasive breast carcinoma is more wide and strong significantly than those in invasive breast carcinoma HER2 negative.

Keywords: Tumor Associated Macrophage (TAM), CD68, HER2, invasive breast carcinoma

ABSTRAK

Latar belakang: Kanker payudara merupakan kanker terbanyak pada wanita yang menyebabkan kematian di Indonesia. Ekspresi HER2 yang *over expressed* pada kanker payudara merupakan penanda prognosis yang buruk. Tumor Associated Macrophage (TAM) berperan dalam pertumbuhan, invasi dan metastasis tumor dan berkaitan erat dengan prognosis yang buruk. Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan antara ekspresi TAM/CD68 dengan status ekspresi HER2 pada karsinoma payudara invasif.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *case control*, dengan jumlah sampel total 50 blok paraffin dari pasien yang telah didiagnosis *invasive carcinoma of no special type* di RSUP Dr. Kariadi Semarang pada tahun 2015–2016, yang kemudian dibagi menjadi 2 kelompok : HER2 positif (+) dan HER2 negatif (-). Data yang diambil adalah distribusi dan intensitas ekspresi CD68 menggunakan *Allred immunohistochemistry score* pada 5 lapangan pandang besar pada masing-masing sampel.

Hasil : Jumlah distribusi ekspresi CD68 kelompok HER2 positif lebih banyak daripada kelompok HER2 negatif pada skor 3, 4 dan 5, dengan perbedaan yang bermakna ($p = 0,001$). Untuk intensitas ekspresi CD68, kelompok HER2 positif memiliki jumlah sel dengan intensitas kuat lebih banyak secara bermakna dibandingkan kelompok HER2 negatif ($p = 0,005$).

Simpulan : Karsinoma payudara invasif HER2 positif memiliki distribusi dan intensitas ekspresi TAM/CD68 yang lebih banyak dan lebih kuat secara bermakna dibanding kelompok karsinoma payudara invasif HER2 negatif.

Kata Kunci : Tumor Associated Macrophage (TAM), CD68, HER2, Kanker Payudara Invasif

¹Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia

²Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

PENDAHULUAN

Kanker payudara saat ini menjadi fokus perhatian kesehatan global karena menjadi penyebab kematian terbanyak pada wanita.¹ Sekitar 1,7 juta kasus baru terdiagnosis di tahun 2012, dengan sekitar 794,000 wanita terdiagnosis kanker payudara setiap tahunnya, yang merupakan 25% dari semua diagnosis kanker di dunia. Insidensi kanker payudara bervariasi antar negara dengan angka tertinggi dijumpai pada negara Amerika, Australia dan Eropa, disusul dengan Afrika serta Asia.^{2,3} Di Indonesia, kanker payudara menjadi kanker nomor satu terbanyak pada wanita yang menyebabkan kematian dengan angka 21,4% dari total kematian karena kanker.⁴ Kanker payudara diklasifikasikan secara klinis berdasarkan status ekspresi *estrogen receptor* (ER), *Progesterone receptor* (PR) dan *Human epidermal growth factor-2 receptor* (HER-2).⁵ Status ekspresi HER2 yang *over expressed* pada jaringan kanker payudara telah ditemukan sejak setengah abad lalu sebagai penanda prognosis yang buruk, dan hingga saat ini terhitung 15% dari semua kasus kanker payudara.⁶ Hingga saat ini, kasus kanker payudara sering terdiagnosis dan diterapi pada saat sudah stadium lanjut. Sekitar 5–10% pasien dari seluruh kasus terdiagnosis kanker payudara yang telah bermetastasis. Angka relapse dan metastasis juga masih cukup tinggi. Sebanyak 30–50% pasien kanker payudara mengalami relaps pasca operasi dan kemoterapi.⁷ Kemoterapi dan *targetting therapy* yang telah dikembangkan untuk kanker payudara bekerja pada sel-sel tumor yang sedang aktif membelah atau yang mengekspresikan protein reseptor tertentu, sehingga sel-sel tumor yang dalam status dormant ataupun yang tidak mengekspresikan protein reseptor tersebut diduga berperan dalam kejadian relaps dan metastasis.^{8,9}

Sel-sel tumor pada kanker payudara, berada dalam lingkungan bersama dengan sel-sel radang, sel stroma, sel endotel, sitokin, kemokin dan sebagainya, disebut sebagai tumor *micro-environment*. Banyak studi saat ini menunjukkan bahwa tumor *microenvironment* berperan penting dalam perkembangan tumor hingga relapsnya tumor. Pada jaringan tumor, terdapat infiltrasi sel-sel makrofag, yang disebut sebagai *tumor associated macrophages* (TAM). TAM terhitung sekitar 10–65% dari seluruh sel-sel inflamasi yang berperan dalam

pertumbuhan, invasi dan metastasis tumor. Infiltrasi TAM yang tinggi dalam jaringan tumor berkaitan erat dengan prognosis yang buruk.^{8,9} TAM dapat memproduksi berbagai sitokin, kemokin serta *growth factor* epitelial maupun endothelial, yang berperan penting dalam pertumbuhan tumor dan metastasis. Beberapa studi telah dilakukan di luar negeri yang menyebutkan bahwa tingginya ekspresi TAM berhubungan erat dengan prognosis yang buruk pada beberapa kanker, termasuk kanker payudara, khususnya dengan status ER PR negatif dan HER2 positif.^{2,10} Namun, hingga saat ini belum banyak penelitian tentang TAM pada pasien-pasien kanker payudara di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *case control* untuk menilai hubungan antara ekspresi TAM dengan status HER2 pada pasien kanker payudara invasif di RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia. Sampel dari penelitian ini adalah sampel blok paraffin dari pasien kanker payudara invasif yang telah didagnosis sebagai *invasive carcinoma of no special type* di RSUP Dr. Kariadi Semarang dan dilakukan pemeriksaan immunohistokimia HER2 pada tahun 2015–2016 yang diambil secara *consecutive sampling* dengan jumlah sampel total 50 blok paraffin. Sampel kemudian dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok HER2 positif (+) dan kelompok HER2 negatif (-), dengan jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 25 blok paraffin.

Sediaan histopatologi dengan pengecatan hematoxylin - eosin diperiksa ulang gambaran histopatologinya dengan menggunakan *Elston-Ellis modification of Scarf-Bloom-Richardson grading system* pada semua sampel. Seluruh sampel yang telah terkumpul kemudian dilakukan pengecatan immunohistokimia CD68 yang merupakan *marker tumor associated macrophage* (TAM). Data yang diambil dari penelitian ini adalah ekspresi HER2 dan CD68 masing-masing kelompok dengan menggunakan *Allred immunohistochemistry score* yang mengukur distribusi proporsi sel yang terekspresi positif dengan nilai : skor 0 = tidak terekspresi, skor 1 = $\leq 1 / 100$ sel terekspresi, skor 2 = $\leq 1 / 10$ sel terekspresi, skor 3 = $\leq 1 / 3$ sel terekspresi, skor 4 = $\leq 2 / 3$ sel terekspresi, skor 5 = $> 2 / 3$ sel

terekspresi; dan intensitas ekspresi sel dengan nilai : skor 1 = intensitas lemah, skor 2 = intensitas sedang dan skor 3 = intensitas kuat. Data diambil melalui pembacaan oleh 2 ahli patologi anatomi secara *blind* pada 5 lapangan pandang besar, pembesaran 400X obyektif, pada area dengan ekspresi antibodi yang terbanyak dan terkuat, tanpa nekrosis. Dengan sampel yang berjumlah 25 tiap kelompok dan dibaca pada 5 lapangan pandang besar, sehingga total akan didapatkan 125 data ekspresi TAM tiap kelompoknya. Analisis data untuk menguji hubungan antara ekspresi TAM dan HER2 menggunakan uji *Chi-Square* dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$.

HASIL

Selama periode 01 Januari 2015 – 31 Desember 2016, terdapat 50 kasus kanker payudara yang telah didiagnosis sebagai *invasive carcinoma of no special type* dan telah diperiksa status imunohistokimia HER2 di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang, Indonesia. Sampel tersebut dibagi menjadi 2 kelompok berdasarkan status HER2, yaitu 25 sampel pada kelompok HER2 (+) dan 25 sampel pada kelompok HER2 (-).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia CD68 yang merupakan marker *tumor associated macrophage* (TAM) pada masing-masing sampel

meliputi proporsi distribusi ekspresi CD68 dan intensitas ekspresi CD68 ditunjukkan pada tabel 1 dan 2.

Distribusi ekspresi CD68 pada kelompok HER2 positif terdapat pada skor 2 sampai dengan skor 5, terbanyak pada skor 3 dengan rentang distribusi ekspresi $\leq 1 / 3$ sel setiap lapangan. Sedangkan pada kelompok HER2 negatif jumlah distribusi ekspresi CD68 terbanyak pada skor 2 dengan rentang distribusi ekspresi $\leq 1/10$ sel.

Jumlah distribusi ekspresi CD68 kelompok HER2 positif lebih banyak daripada kelompok HER2 negatif pada skor 3, 4 dan 5, sedangkan pada skor 1 dan 2 ekspresi CD68 lebih banyak pada kelompok HER2 negatif daripada kelompok HER2 positif. Berdasarkan uji *Chi-Square* didapatkan bahwa jumlah total sel yang terekspresi CD68 lebih banyak pada kelompok HER2 positif dibanding kelompok HER2 negatif, dengan perbedaan yang bermakna ($p = 0,001$).

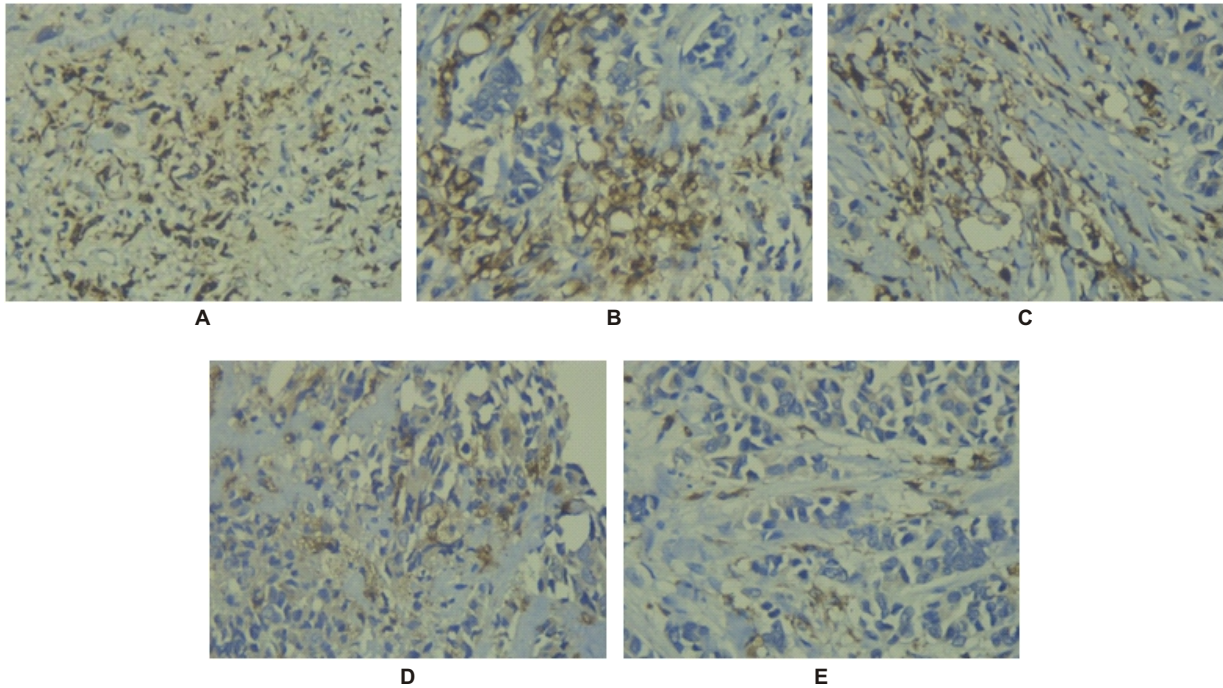
Sedangkan untuk intensitas ekspresi CD68, kelompok HER2 positif terbanyak pada intensitas kuat dan kelompok HER2 negatif terbanyak dengan intensitas sedang. Berdasarkan uji *Chi-Square* didapatkan bahwa kelompok HER2 positif memiliki jumlah sel dengan intensitas kuat lebih banyak secara bermakna dibandingkan kelompok HER2 negatif ($p = 0,005$).

Tabel 1. Distribusi ekspresi CD68 pada kelompok HER2 positif dan HER2 negatif

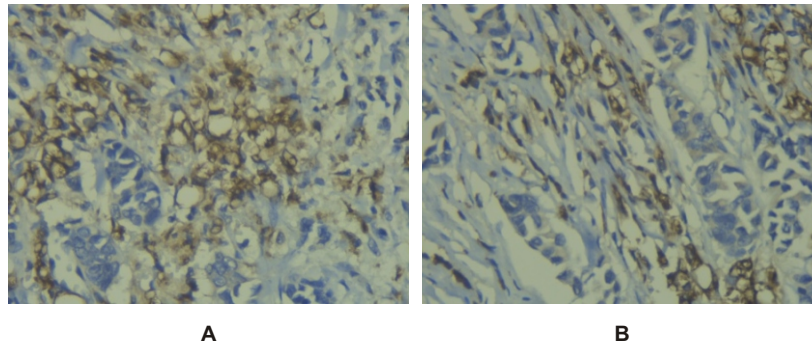
Kelompok	$\leq 1/100$	$\leq 1/10$	$\leq 1/3$	$\leq 2/3$	$> 2/3$	Total	p
	sel Skor 1	sel Skor 2	sel Skor 3	sel Skor 4	sel Skor 5		
HER2 Positif	0	8	52	45	20	125	0,001
HER2 Negatif	32	55	31	4	3	125	
Total	32	63	83	49	23	250	

Tabel 2. Intensitas ekspresi CD68 pada kelompok HER2 positif dan HER2 negatif

Kelompok	Intensitas		Total	p
	Sedang	Kuat		
HER2 Positif	62	63	125	0,005
HER2 Negatif	83	42	125	
Total	145	105	250	



Gambar 1. Gambaran skor distribusi ekspresi CD68 pada kanker payudara *invasive*. A = Skor 1 ($\leq 1/100$ sel), B = Skor 2 ($\leq 1/10$ sel), C = Skor 3 ($\leq 1/3$ sel), D = Skor 4 ($\leq 2/3$ sel), E = Skor 5 ($> 2/3$ sel)



Gambar 2. Gambaran skor intensitas ekspresi CD68 pada kanker payudara *invasive*. A = sel-sel yang terekspresi sebagian besar menunjukkan intensitas kuat, B = sel-sel yang terekspresi sebagian besar menunjukkan intensitas sedang.

PEMBAHASAN

Inflamasi saat ini dianggap berperan dalam terjadinya kanker yang meliputi inisiasi, promosi, angiogenesis, dan metastasis.^{11,12} Aktivasi onkogen dapat menginduksi terbentuknya mediator-mediator radang dan infiltrasi sel-sel radang. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa tipe sel radang dan fungsinya dapat berperan dalam memicu pertumbuhan maupun menghambat pertumbuhan tumor. Infiltrasi sel radang leukosit pada tumor telah lama diketahui berhubungan

dengan karsinogenesis.^{13,14} Di antara populasi sel-sel radang, makrofag memiliki peran yang sangat besar, 50% dari keseluruhan sel radang di sekitar tumor pada karsinoma payudara terdiri dari makrofag. Makrofag ini disebut sebagai *Tumor associated macrophage* (TAM).⁸ TAM berasal dari monosit darah perifer yang bermigrasi ke jaringan dengan perantaraan mediator kimia dan berdiferensiasi menjadi makrofag yang beredar, dan direkrut ke dalam tumor oleh berbagai kemokin dan faktor pertumbuhan dilepaskan oleh sel-sel tumor, termasuk kanker payudara.^{11,13,14}

Pada kanker payudara, TAM dapat memproduksi berbagai sitokin dan kemokin, serta faktor-faktor pertumbuhan untuk sel epitel dan sel endotel, yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan tumor, neoangiogenesis dan metastasis. TAM mengekspresikan dan melepaskan berbagai faktor pertumbuhan seperti faktor pertumbuhan epidermal, *fibroblast growth factor* (FGF-2), *transforming growth factor* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan platelet *derived growth factor* (PDGF), sedangkan sel-sel kanker payudara maupun sel-sel kelenjar payudara yang normal tidak mengekspresikannya. Selain itu, TAM mampu memacu proses neoangiogenesis pada kanker payudara. Neoangiogenesis awalnya dianggap disebabkan hanya oleh sel tumor sendiri, namun penelitian terkini menyebutkan bahwa TAM memegang peranan penting dalam regulasi angiogenesis tumor. TAM masuk ke dalam lingkungan tumor oleh berbagai faktor proangiogenic, termasuk IL-1, VEGF, IL-8, bFGF, dan TNF- α .^{11,13-15}

Dengan demikian, tampak bahwa TAM memicu pertumbuhan massa tumor pada kanker payudara. Jumlah TAM yang sedikit tampak berefek pada regresi tumor dan menghambat metastasis, sebaliknya, peningkatan jumlah infiltrat TAM mempercepat perkembangan tumor dan metastasis tumor. Peningkatan jumlah TAM berkorelasi dengan aktivitas proliferasi tumor yang tinggi dan indeks Ki-67 yang tinggi. Pada kanker payudara, diketahui bahwa Infiltrasi sel-sel radang limfosit diketahui berhubungan dengan status reseptor hormon yang negatif dan HER2 positif serta berhubungan dengan stadium dan derajat kanker yang lebih tinggi, sedangkan sel limfosit B yang teraktivasi dapat membantu untuk meregresi tumor.^{9,10,12,15}

Pada penelitian kami, tampak bahwa distribusi dan intensitas ekspresi TAM lebih banyak dan lebih kuat secara bermakna pada kelompok karsinoma payudara invasif HER2 positif dibanding kelompok HER2 negatif. HER2 positif diketahui berhubungan erat dengan prognosis pasien karsinoma payudara yang buruk, sehingga dapat dikatakan bahwa semakin banyak dan kuat ekspresi CD68/TAM menjadi penanda prognosis pasien yang lebih buruk. Hasil ini sesuai dengan beberapa penelitian di luar negeri yang menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara kepadatan

makrofag TAM dengan status reseptor progesteron negatif, HER2 positif dan kanker payudara dengan *basal phenotype*.^{10,15}

SIMPULAN

Karsinoma payudara invasif HER2 positif memiliki distribusi dan intensitas ekspresi TAM/CD68 yang lebih banyak dan lebih kuat secara bermakna dibanding kelompok karsinoma payudara invasif HER2 negatif, sehingga memiliki prognosis yang lebih buruk.

Ucapan Terima Kasih

Instalasi laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi dan Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNDIP.

DAFTAR PUSTAKA

1. Diaby V, Tawk R, Sanogo V, Xiao H, Montero AJ. A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer HHS Public Access. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151(1):27-40. doi:10.1007/s10549-015-3383-6.
2. Indonesia Cancer Organisations and. Indonesia Cancer Statistic. <http://www.cancerindex.org/Indonesia>. Published 2016.
3. Bandera E V., Makarinec G, Romieu I, John EM. Racial and Ethnic Disparities in the Impact of Obesity on Breast Cancer Risk and Survival: A Global Perspective. *Am Soc Nutr.* 2015;(5):803-819. doi:10.3945/an.115.009647.non-Hispanic.
4. World Health Organization. World Health Organization - Cancer Country Profiles: 2014 INDONESIA. *Cancer Ctry Profiles.* 2014:22-23.
5. Eng A, McCormack V, dos-Santos-Silva I. Receptor-Defined Subtypes of Breast Cancer in Indigenous Populations in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 2014;11(9). doi:10.1371/journal.pmed.1001720.
6. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly RM, Wolff AC. Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast.* 2014;23(2):128-136. doi:10.1016/j.breast.2013.11.011.
7. Cheng YC, Ueno NT. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2012;19(3):191-199. doi:10.1007/s12282-011-0276-3.
8. Zhang C, Hu X, Liu X-Y, et al. Effect of tumor-associated macrophages on gastric cancer stem cell in omental milky spots and lymph node micrometastasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):13795-13805.
9. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2015;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010. Tumor-associated.
10. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86(November):1065-1073. doi:10.1189/jlb.0609385.
11. Eiro N, Gonzalez L, Fernandez-Garcia B, Lamelas M.

- Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *Plos One Press*. 2012.
12. Fernandez-garcia B, Junquera S, Lamelas ML, Lo A, Vizoso FJ, Gonza LO. Impact of CD68 / (CD3 + CD20) Ratio at the Invasive Front of Primary Tumors on Distant Metastasis Development in Breast Cancer. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052796.
 13. Ch'ng ES, Jaafar H, Tuan Sharif SE. Breast tumor angiogenesis and tumor-associated macrophages: histopathologist's perspective. *Patholog Res Int*. 2011;2011:572706. doi:10.4061/2011/572706.
 14. Chan S, Hill M, WJ G. The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2006;11(1):3-11.
 15. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. ??? 2012;12(1):1. doi:10.1186/1471-2407-12-306.