



Hubungan Ekspresi LMP-1 dengan Overall Survival Pasien *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* di RSUP Dr Kariadi Semarang

Relation of Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) Expression with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Overall Survival in Kariadi General Hospital

Silpi Hamidiyah^{1*}, Udadi Sadhana², Hermawan Istiadi², Vega Karlowee², Ika Pawitra Miranti²

¹Residen Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

*Penulis korespondensi: Silpi Hamidiyah. Email: silpi.hamidiyah@gmail.com

Article Info

Article History:

Received : 21 April 2022

Accepted : 30 Juni 2022

Kata Kunci:

Ekspresi LMP1;
DLBCL;
survival;
limfoma.

Keywords:

LMP1 expression;
DLBCL;
Survival;
lymphoma.

Abstrak

Latar Belakang: *Latent membrane protein 1 (LMP1)* merupakan onkoprotein abnormal yang paling utama ditemukan pada infeksi virus Epstein-Barr (EBV). LMP1 sering terekspresi pada berbagai keganasan terkait EBV, salah satunya adalah *diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)*. Beberapa literatur telah menjelaskan keterlibatan EBV terhadap *outcome* klinis pasien namun nilai prognostik dari ekspresi LMP1 terhadap *overall survival* pasien DLBCL terkait EBV masih belum dapat dijelaskan.

Metode: Penelitian dengan desain *cross sectional* ini melibatkan 50 pasien DLBCL yang didiagnosis antara Januari 2017 sampai Juni 2018. Pengamatan dilakukan selama 60 bulan. Data yang dikumpulkan meliputi usia, gejala B, stadium tumor, subtipe molekuler, dan *survival* 5 tahun. Analisis data menggunakan uji beda dan kurva *Kaplan-Meier*.

Hasil: Dari 50 pasien, sebagian besar berusia diatas 40 tahun (88%), jenis kelamin laki-laki (60%), subtipe non GCB (62%), mengeluhkan semua gejala B (30%) dan stadium I (38%). Sebanyak 21 pasien meninggal (42%). Pasien dengan skor LMP1 yang tinggi menunjukkan *overall survival* yang lebih buruk secara bermakna dibandingkan dengan skor LMP1 yang rendah ($P < 0.001$).

Kesimpulan: DLBCL yang mengekspresikan LMP1 berhubungan dengan rendahnya *overall survival* 5 tahun dibandingkan dengan yang tidak mengekspresikan LMP1.

Abstract

Background: *Latent Membrane Protein 1 (LMP1)* is the most common oncoprotein found in Epstein-Barr virus (EBV) infection. LMP1 is frequently expressed in various EBV-related malignancies, one of which is *diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)*. Several literatures have described the involvement of EBV in patient outcomes, but the prognostic value of LMP1 expression on DLBCL survival has not been elucidated.

Method: This study conducted with *cross sectional design* and involved 50 DLBCL patients diagnosed between January 2017 and June 2018, and 60 months observations. The data collected included age, B symptoms, tumor stage, molecular subtype, and 5-year survival. Data analysis using *difference test and Kaplan-Meier curves*.

Result: Of 50 patients, mostly were over 40 years old (88%), male (60%), non-GCB (62%), complained all B symptoms (30%) and stage I (38%). A total of 21 patients died (42%) through 5 years of observations. In this

study, patients with higher LMP1 scores significantly showed shorter overall survival ($P < 0.001$).

Conclusion: LMP1 expressing DLBCL associated with poorer 5-year overall survival compared to non-LMP1 expressing DLBCL.

PENDAHULUAN

DLBCL merupakan proliferasi neoplastik dari sel limfosit B yang bersifat invasif dan mempunyai insidensi sekitar 68.2% di Indonesia, sedikit lebih tinggi dari negara barat (37%) dan negara-negara lain di Asia (30 - 60%).¹ Sekitar separuh pasien DLBCL mempunyai *overall survival* yang rendah dan kurang merespon imunokemoterapi.¹⁻³ Berbagai etiologi telah diusulkan, salah satunya adalah peranan infeksi EBV terhadap limfomagenesis.⁴

EBV ditemukan di seluruh dunia dengan prevalensi berkisar 80-95% dan semakin tinggi di negara berkembang.⁴⁻⁶ Infeksi EBV dapat berlangsung akut dan laten tergantung protein yang dihasilkan. Protein yang menjadi marker pada limfomagenesis adalah protein fase laten, salah satunya yaitu protein LMP1. LMP1 berperan dalam berbagai overaktivitas jalur pensinyalan dan supresi dari gen-gen penekan tumor.

Ekspresi LMP1 dihubungkan dengan proliferasi, invasi, agresivitas dan metastasis tumor sehingga berkorelasi dengan rendahnya *overall survival* pasien DLBCL.⁴⁻⁷

Identifikasi EBV melalui LMP1 mempunyai potensi sebagai nilai prognostik dan imunoterapi pada DLBCL namun di Indonesia hingga saat ini belum banyak penelitian yang tersedia mengenai hubungan ekspresi LMP1 terhadap survival DLBCL. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan ekspresi LMP1 terhadap *overall survival* pasien DLBCL di RSUP Dr Kariadi Semarang.

METODE

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain *cross sectional*. Sebanyak 50 pasien yang telah didiagnosis DLBCL menggunakan imunohistokimia CD20, CD3 dan KI67, antara Januari 2017 sampai Juni 2018 oleh

dokter spesialis patologi anatomik Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang. Pasien dilakukan pengamatan selama 5 tahun (60 bulan) setelah diagnosis. Data yang dikumpulkan meliputi usia, gejala B, stadium tumor, subtype molekuler, dan *survival* 5 tahun.

Karakteristik klinis setiap pasien dikumpulkan yang terdiri dari usia pasien saat diagnosis yang dibagi menjadi usia < 40 tahun dan > 40 tahun, gejala B yaitu gejala-gejala yang timbul akibat aktivasi sel limfosit B meliputi demam berkepanjangan, keringat malam hari, penurunan berat badan >10% dalam 1 bulan yang diperoleh dari rekam medis pasien, stadium tumor *Ann Arbor* yang diperoleh dari rekam medis meliputi stadium I hingga IV, subtype molekuler limfoma non Hodgkin meliputi *germinal center B-cell* atau GCB dan non *germinal center B-cell* atau non GCB, skor LMP1 merupakan skor hasil perkalian antara nilai presentase sel-sel tumor yang positif (nilai 0 untuk tidak ada sel yang terpulask; 1 untuk < 25% sel yang terpulask; 2 untuk 25 – 50% sel yang terpulask; 3 untuk 50 – 75% sel yang terpulask; dan 4 untuk > 75% sel yang terpulask) dengan nilai intensitas pewarnaan (nilai 0 untuk tidak terwarna; 1 untuk lemah; 2 untuk sedang; 3 untuk kuat), meliputi skor 0 – 12. Misalnya skor untuk <25% sel yang terpulask dengan intensitas lemah maka skornya adalah $1 \times 1 = 1$ sedangkan skor untuk 80% sel yang terpulask dengan intensitas sedang maka skornya adalah $4 \times 2 = 8$.

Variabel berikutnya adalah *outcome* (meninggal) yang menurut beberapa literatur diamati selama kurun waktu 60 bulan.^{1,3,5} Analisis data menggunakan uji beda dan kurva *Kaplan-Meier*. Penelitian ini akan dilakukan setelah mendapatkan ethical clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) RSUP Dr.

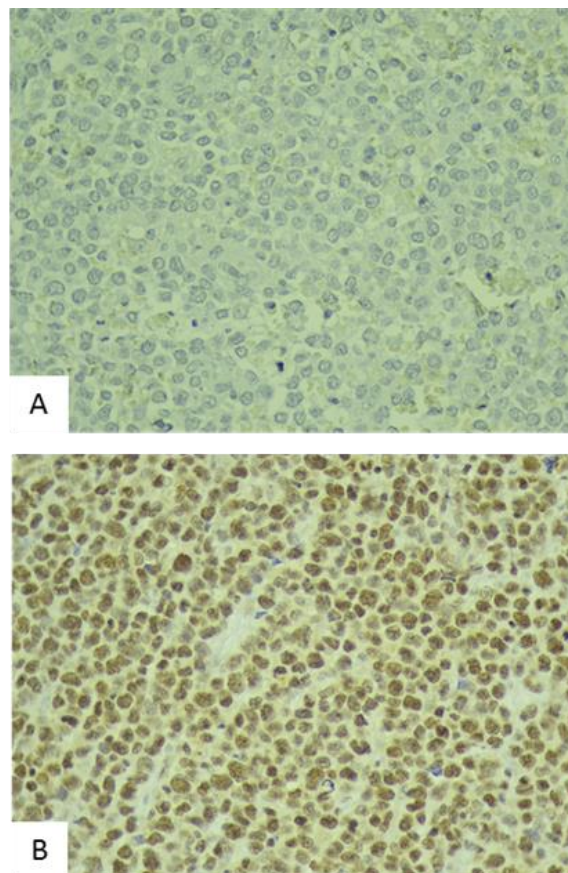
Kariadi (Nomor izin : No.818/EC/KEPK-RSDK/2021).

Metode pemeriksaan imunohistokimia

Blok paraffin dari setiap pasien dikumpulkan, kemudian dipotong menggunakan mikrotom hingga menghasilkan pita jaringan dengan ketebalan 3-4 μm . Selanjutnya pita paraffin dideparafinisasi menggunakan xylol dan rehidrasi.

Antigen *retrieval* dengan pH 6 selama 40 menit dalam *microwave* bersuhu 96°C. *Slide* kemudian dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Eliminasi peroksidase endogen menggunakan H_2O_2 peroksidase selama 20 – 30 menit. Bilas air mengalir

selama 10 menit dan cuci dengan PBS. *Slide* ditetesi *background sniper* selama 10 menit kemudian ditetesi antibodi LMP1 dengan pengenceran 1:100 dalam suhu 2-8°C. Semua *slide* yang sudah diwarnai akan dinilai di bawah mikroskop pada pembesaran 100 dan 400x. Positivitas LMP1 dinilai berdasarkan persentase sel-sel tumor yang positif x intensitas pewarnaan. Nilai untuk jumlah persentase sel tumor yang positif meliputi nilai 0 untuk tidak ada sel yang terpulas; 1 untuk < 25%; 2 untuk 25 – 50%; 3 untuk 50 – 75%; dan 4 untuk > 75%, sedangkan nilai untuk intensitas pewarnaan meliputi nilai 0 untuk tidak terwarna; 1 untuk lemah; 2 untuk sedang; 3 untuk kuat (Gambar 1).⁸



Gambar 1. Hasil pulasan imunohistokimia LMP1 pada jaringan DLBCL (LMP1; 400x). A) Pulasan LMP1 dengan skor 0, dan B) Pulasan LMP1 dengan skor 12.

Analisis statistik

Analisis data secara statistik menggunakan program *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 21 (IBM Chicago, IL). Hubungan antara variabel penelitian diuji dengan *Chi square test* dan uji beda dengan derajat kemaknaan $p < 0.05$ serta analisis kurva *Kaplan-Meier* dengan uji *Log-rank* untuk analisis *survival* pasien DLBCL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Karakteristik klinikopatologis pasien

Lima puluh pasien DLBCL di RS Dokter Kariadi Semarang diikutsertakan dalam penelitian ini. Sebagian besar pasien terdiagnosis saat usia > 40 tahun (88%), jenis kelamin laki-laki (60%). Sebagian besar pasien (30%) mengeluhkan semua gejala B. Stadium tumor *Ann Arbor* sebagian besar menunjukkan stadium 1 (38%) dan subtype molekular Non GCB (62%). (Tabel 1)

Tabel 1. Karakteristik klinikopatologis pasien DLBCL (n = 50)

Variabel	F	%	Mean \pm SD
Usia			
< 40	6	12,0	
≥ 40	44	88,0	
Jenis kelamin			
Laki-laki	30	60,0	
Perempuan	20	40,0	
Subtipe			
GCB	19	38,0	
Non GCB	31	62,0	
Stadium			
1	19	38,0	
2	16	32,0	
3	10	20,0	
4	5	10,0	
Gejala B			
0	13	26,0	
1	14	28,0	
2	8	16,0	
3	15	30,0	
Skor LMP1			4,57 \pm 3,63
Keluaran			
Meninggal	21	42,0	
Hidup	29	58,0	
Waktu pengamatan			39,44 \pm 24,85

Ekspresi LMP1 terhadap *overall survival* DLBCL

Selama pengamatan 5 tahun (60 bulan), sebanyak 21 pasien meninggal

(42%), dan 29 pasien mampu bertahan hidup (58%). Rerata skor LMP1 adalah sebesar 4.57 ± 3.63 . Hasil uji beda menggunakan *Mann Whitney* menunjukkan nilai signifikansi $P < 0.001$, dengan rata-rata

skor LMP1 pada pasien meninggal (7.33 ± 3.78) dengan pasien hidup (2.57 ± 1.71) (Tabel 2). Hasil uji regresi logistik ekspresi LMP1 terhadap *overall survival* menunjukkan nilai signifikansi ($p=0.002$)

(Tabel 3). Hasil uji *survival Kaplan-Meier* menunjukkan nilai signifikansi $P 0.001$ terhadap hubungan skor LMP1 dengan *overall survival* pasien DLBCL.

Tabel 2. Hasil uji hubungan skor LMP1 terhadap *overall survival* DLBCL

Keluaran	LMP1 (mean \pm SD)	p
Meninggal	7,33 \pm 3,78	<0,001 ^{‡*}
Hidup	2,57 \pm 1,71	

Tabel 3. Hasil uji regresi logistik faktor-faktor yang berpengaruh terhadap *overall survival* pasien DLBCL

Variabel	p	OR	IK 95%	Keterangan
Stadium	0,037	0,327	0,115 – 0,933	Signifikan
Gejala B	0,055	0,395	0,153 – 1,022	Tidak signifikan
LMP1	0,002	0,395	0,217 – 0,721	Signifikan

Karakteristik klinikopatologis terhadap *overall survival* DLBCL

Dua puluh satu pasien meninggal (42%), dan 29 pasien mampu bertahan hidup (58%) selama pengamatan 5 tahun (60 bulan). Pada pasien yang meninggal, sekitar 19 orang (43.2%) berusia di atas 40

tahun, 13 orang berjenis kelamin laki-laki (43.3%), 13 orang mempunyai subtype Non GCB (41.9%), 5 orang dengan stadium 4 (100%), dan 12 orang (80%) mengeluhkan semua gejala B. Hasil uji *survival* terhadap data klinis menunjukkan nilai signifikansi $p < 0.001$ pada stadium dan gejala B. (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil uji Kaplan-Meier berdasarkan keluaran

Variabel	Keluaran		Estimasi (bulan)	p [§]
	Meninggal	Hidup		
Usia				
< 40	2 (33,3%)	4 (66,7%)	43,83	0,650
\geq 40	19 (43,2%)	25 (56,8%)	38,84	
Jenis kelamin				
Laki-laki	13 (43,3%)	17 (56,7%)	39,47	0,967
Perempuan	8 (40%)	12 (60%)	39,40	

Tabel 4. Hasil uji Kaplan-Meier berdasarkan keluaran

Variabel	Keluaran		Estimasi (bulan)	p ^s
	Meninggal	Hidup		
Subtipe				
GCB	8 (42,1%)	11 (57,9%)	40,68	0,822
Non GCB	13 (41,9%)	18 (58,1%)	38,68	
Stadium				
1	5 (26,3%)	14 (73,7%)	49,21	<0,001*
2	7 (43,8%)	9 (56,3%)	38,06	
3	4 (40%)	6 (60%)	39,70	
4	5 (100%)	0 (0%)	6,20	
Gejala B				
0	3 (23,1%)	10 (76,9%)	49,15	<0,001*
1	3 (21,4%)	11 (78,6%)	49,64	
2	3 (37,5%)	5 (62,5%)	45,50	
3	12 (80%)	3 (20%)	18,27	
Skor LMP1	7,33 ± 3,78	2,57 ± 1,71		<0,001 ^{‡*}

Pembahasan

LMP1 merupakan faktor risiko terkuat yang mempengaruhi *survival* pasien limfoma dimana risiko kematian sebesar 2.48 kali lipat lebih besar dibandingkan dengan LMP1 negatif.⁹ Temuan penelitian ini sejalan dengan beberapa literatur yang melaporkan pemendekan *survival* pada pasien-pasien DLBCL yang meng-ekspresikan LMP1.^{2-6,9-11}

Beberapa kemungkinan mekanisme yang mendasari hal ini adalah LMP1 mampu mencetuskan pertumbuhan sel-sel tumor secara keseluruhan, invasif dan kemudahan dalam bermetastasis melalui aktivasi jalur NF-kB, JNK/p38-SAPK, PI3K/AKT, ERK-MAPK dan JAK/STAT. LMP1 mampu menginduksi *Matrix Metallo Proteinase* (MMP) sehingga mencetuskan modulasi interaksi matriks sel dan mengakibatkan mudahnya invasi sel tumor. LMP1 juga berperan dalam *down regulation* dari berbagai gen supresor metastasis sehingga memudahkan metastasis.^{6,9}

LMP1 juga memodulasi gen-gen supresor tumor sehingga mengakibatkan immortalisasi sel limfosit karena sel-sel ini menjadi resisten terhadap apoptosis.

Dengan demikian, overekspresi LMP1 akan meningkatkan agresivitas tumor melalui proliferasi, penghindaran mekanisme apoptosis, invasi dan metastasis.^{6,9}

Sebagian besar pasien DLBCL pada penelitian ini berusia di atas 40 tahun (88%). Hasil uji *survival* menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara usia dengan *overall survival* pasien DLBCL (P 0.650). Temuan ini berbeda dengan literatur yang melaporkan adanya hubungan signifikan antara usia dengan *survival* pasien.¹²⁻¹³

Temuan ini kemungkinan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti distribusi usia pasien yang tidak homogen, respon terhadap kemoterapi yang kurang baik, stadium tumor dan lokasi tumor.

Pada penelitian ini, sebanyak 30% pasien mengeluhkan semua gejala B berupa keringat malam, demam berkepanjangan dan penurunan berat badan. Temuan ini berbeda dengan literatur yang melaporkan sebagian besar pasien DLBCL mengeluh penurunan berat badan (44.7%), diikuti dengan demam (27%).¹ Hasil uji *survival* menunjukkan adanya hubungan bermakna antara gejala B dengan *overall survival* pasien (P< 0.001). Temuan ini sejalan dengan literatur yang melaporkan adanya

hubungan gejala B dengan penurunan *survival* pasien DLBCL.¹⁴ Gejala inflamasi atau gejala B berkaitan dengan peningkatan penanda inflamasi dalam plasma dan memprediksi rendahnya respon terapi dan *overall survival* pasien DLBCL. Inflamasi sistemik berkorelasi dengan penurunan metabolisme obat kemoterapi di hepar dan peningkatan toksisitas kemoterapi.¹⁴

Pada penelitian ini, tidak didapatkan hubungan antara sub tipe molekular dengan *survival* pasien DLBCL (P 0.991), namun ditemukan sedikit perbedaan estimasi *survival* pada pasien GCB dan non GCB, masing-masing 40.68 vs 38.68 bulan, meski perbedaan tersebut tidak bermakna. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan pengujian menjadi tidak bermakna adalah distribusi sampel yang tidak homogen antara non GCB dengan GCB, faktor usia, respon setiap pasien terhadap terapi dan stadium tumor.

Pada penelitian ini sebanyak 38% pasien DLBCL mempunyai tumor stadium I menurut stadium *Ann Arbor*. Sejalan dengan literatur yang melaporkan sekitar 61% pasien berada pada stadium I atau II.¹⁵ Berbeda dengan literatur lainnya yang melaporkan sekitar 34% pasien memiliki tumor dengan stadium IV.¹³ Hasil uji *survival* menunjukkan adanya hubungan bermakna antara stadium tumor dengan *overall survival* pasien DLBCL (P 0.037) bermakna secara statistik yang menunjukkan adanya hubungan antara stadium tumor dengan *survival* pasien, dimana semakin tinggi stadium tumor berhubungan signifikan dengan rendahnya *survival* pasien DLBCL. Hasil penelitian ini didukung literatur yang menyatakan bahwa semakin tinggi stadium tumor, berkorelasi dengan semakin rendahnya *overall survival* pasien DLBCL.^{13,15}

DAFTAR PUSTAKA

1. Reksodiputro AH. Multicentre epidemiology and survival study of b cell non hodgkin lymphoma patients in

indonesia. *J Blood Disorders Transfl*. 2015 Mar; 6(2):1-5.

2. Gao X, Li J, Wang Y, Liu S, Yue B. Clinical characteristics and prognostic significance of eber positivity in diffuse large b-cell lymphoma: a meta-analysis. *PLOS ONE*. 2018 Jun; 13(6):1-13.
3. Keane C, Tobin J, Gunawardana J, Francis S, Gifford G, Gabrielli S, et al. The tumour microenvironment is immuno-tolerogenic and a principal determinant of patient outcome in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2019 Jun;103: 200-7.
4. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. Ebv-positive diffuse large b-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018 Apr;93: 953-962.
5. Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Chan WC, Chan JKC, Rosenwald A, et al. Diffuse large b-cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, editors. *Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC. 2017.p.291-7.
6. Chen YP, Zhang WN, Chen L, Tang LL, Mao YP, Li WF, et al. Effect of latent membrane protein 1 expression on overall survival in epstein-barr virus-associated cancers: a literature-based meta-analysis. *Oncotarget*. 2015 Aug;6(30):29311-23.
7. Wang LW, Jiang S, Gewurz BE. Epstein-barr virus Imp1-mediated oncogenicity. *J Virol*. 2017 Aug; 91 (2):1-11.
8. Rutherford SC dan Leonard JP. DLBCL cell of origin: what role should it play in care today?. *Oncology*. 2018 Sep; 32 (9):445-9.
9. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep; 27 (41):5497-510.

10. Wu X, Wang F, Li Y, Wang X, Liu P, Zhang H, et al. Evaluation of latent membrane protein 1 and micro RNA-155 for the prognostic prediction of diffuse large B cell lymphoma. *Oncology Letters*. 2018 Mar; 15:9725-34.
11. Li XM, Xiao WH, Zhao HX. Prognostic significance of latent membrane protein 1 expression in non-Hodgkin lymphoma a meta-analysis. *Medicine*. 2017 Mar;96:1-7.
12. Yodi AN, Indrawati (2016). Hubungan prevalensi sub tipe molekuler abc/gcb dengan karakteristik klinis pasien diffuse large b-cell lymphoma di rsup sardjito tahun 2012-2014. Available from:http://etd.repository.ugm.ac.id/home/detail_pencarian/96024.
13. Howlader N, Mariotto AB, Besson C, Suneja G, Robien K, Younes N, et al. Cancer-specific mortality, cure fraction, and noncancer causes of death among diffuse large b-cell lymphoma patients in the immunochemotherapy era. *Cancer*. 2017 Feb;123(17):3326-34.
14. Sharma R, Cunningham D, Smith P, Robertson G, Dent O and Clarke SJ. Inflammatory (b) symptoms are independent predictors of myelosuppression from chemotherapy in non-hodgkin lymphoma (nhl) patients—analysis of data from a british national lymphoma investigation phase iii trial comparing chop to pmitcebo. *BMC Cancer*. 2009 May;9(153):1-10
15. Yin X, Xu A, Fan F, Huang Z, Cheng Q, Zhang L, et al. Incidence and mortality trends and risk prediction nomogram for extranodal diffuse large b-cell lymphoma: an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. *Front. Oncol*. 2019 Nov;9(1198):1-18.