

ARTIKEL PENELITIAN

EKSPRESI GEN MIRO1 DAN P53 PADA *CO-CULTURE WHARTON'S JELLY-MESENCHYMAL STEM CELL*
DAN JANTUNG TIKUS NEONATUS DIINDUKSI DOXORUBICINZikril Ariliusra¹; Hirowati Ali^{2,3,4} Tjong Hon Djong^{5,1}; Sisca Dwi Yarni²

1. Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Andalas; 2. Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas; 3. Laboratorium Biomedik, Pusat Penelitian Biomedik Terintegrasi, Universitas Andalas; 4. Pascasarjana Ilmu Biomedis, Universitas Andalas; 5. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

Korespondensi: Zikril Ariliusra; Email: zariliusra@gmail.com; Hp: 081268333684

Abstrak

Transfer mitokondria interseluler diduga dapat menjadi mekanisme terapi *mesenchymal stem cell* (MSC) terhadap berbagai penyakit yang diakibatkan oleh gangguan atau kerusakan pada mitokondria, salah satunya kardiomiopati akibat doxorubicin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran transfer mitokondria interseluler sebagai mekanisme protektif MSC. Penelitian *ex vivo* ini menggunakan jantung tikus neonatus yang diberikan doxorubicin dan MSC dengan metode *whole organ culture*. Pengukuran ekspresi gen Miro1 digunakan sebagai indikator aktivitas transfer mitokondria interseluler dan ekspresi gen p53 sebagai indikator stres sel. Ekspresi gen p53 pada kelompok yang diberikan doxorubicin 20 μ M selama 30 menit meningkat signifikan ($p < 0,05$) dibanding kelompok kontrol. Penambahan *wharthon's jelly*(WJ)-MSC sebanyak 1×10^5 atau 1×10^6 pada menit ke-10 menyebabkan ekspresi gen p53 pada menit ke-30 lebih rendah signifikan ($p < 0,05$) dibanding kelompok perlakuan tanpa penambahan WJ-MSC. Tidak ditemukan korelasi yang signifikan antara ekspresi gen Miro1 dan gen p53 pada kelompok yang mendapatkan WJ-MSC. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa transfer mitokondria interseluler tidak berperan signifikan dalam mekanisme terapi WJ-MSC tanpa rekayasa genetik.

Kata kunci: transfer mitokondria; *whole organ culture*; Miro1; TNT;

Abstract

Intercellular mitochondrial transfer assumed as one of therapeutic mechanism of mesenchymal stem cells (MSC) against diseases caused by mitochondrial damage, one of which is cardiomyopathy induced doxorubicin. The aim of this study is to determine the role of intercellular mitochondrial transfer as protective mechanism of MSC. This *ex vivo* study used neonatal rat cardiac given doxorubicin and MSC by using whole organ culture method. Miro1 gene expression measured as indicator of mitochondrial intercellular transfer activity and p53 gene expression as indicator of cellular stress. The expression of p53 gene in the group given doxorubicin 20 μ M for 30 minutes increased significantly ($p < 0.05$) compared to the control group. The addition of 1×10^5 or 1×10^6 wharthon's jelly (WJ)-MSC at the 10th minute of culture caused the p53 gene expression to be significantly lower ($p < 0.05$) than the treatment group without addition of WJ-MSC. No significant correlation between Miro1 gene expression and p53 gene was found in the WJ-MSC group. The conclusion of this study is intercellular mitochondrial transfer has no significant role in the therapy mechanism of WJ-MSC without genetic engineering.

Keywords: mitochondrial transfer; whole organ culture; Miro1; tunneling nano tube; TNT

PENDAHULUAN

Kardiomiopati merupakan kelainan pada otot jantung yang menyebabkan disfungsi mekanik dan/atau elektrik yang mengakibatkan patofisiologi dilatasi, hipertrofi, atau restriktif (1). Kardiomiopati memiliki fenotipe yang bervariasi yaitu; dilatasi, hipertrofik, dan restriktif (2). Prevalensi kardiomiopati dilatasi merupakan yang tertinggi, yaitu sekitar 1:250 (3), diikuti oleh kardiomiopati hipertrofi dengan prevalensi 1:500 (4), dan kardiomiopati aritmogenik 1:2000 sampai 1:5000 (5).

Kardiomiopati dilatasi/*dilated cardiomyopathy* (DCM) adalah diagnosis klinis yang ditandai dengan dilatasi ventrikel kiri atau biventrikular dan gangguan kontraksi yang tidak dapat dijelaskan oleh kondisi pembebanan abnormal (misalnya, hipertensi dan penyakit katup jantung) atau penyakit arteri koroner. DCM dapat disebabkan oleh faktor genetik dan nongenetik. DCM nongenetik dapat disebabkan beberapa etiologi, yaitu peradangan miokardium akibat infeksi; paparan obat-obatan; racun atau alergen; dan penyakit endokrin atau autoimun sistemik (Schultheiss *et al.*, 2019). Obat-obatan yang sering menyebabkan terjadinya DCM adalah dari agen kemoterapi kanker seperti golongan anthracyclines, salah satunya yaitu doxorubicin (DOX) (6,7).

Aktivasi gen supresor tumor p53 merupakan pemrakarsa apoptosis pada sel kardiomyosit diinduksi DOX, terjadi melalui jalur apoptosis intrinsik (8). Ketika stres terjadi, p53 sitoplasma dengan cepat mengalami translokasi ke permukaan mitokondria, kemudian berinteraksi secara fisik dengan anggota keluarga Bcl-2 anti- dan pro-apoptosis untuk menghambat atau mengaktifkan fungsi masing-masing, yang mengarah ke MOMP dan apoptosis. Dalam peran ini, p53 bertindak seperti protein *BH3-only*, baik sebagai aktivator langsung dari efektor Bax/Bak, atau sebagai sensitizer/derepresor Bcl-xL/2 dan Mcl1 (9).

Salah satu terapi untuk penyakit kardiovaskular yang sedang dikembangkan saat ini adalah penggunaan sel punca mesenkim (MSC). Potensi sel punca mesenkim sebagai salah satu terapi penyakit kardiovaskular telah ditunjukkan melalui beberapa uji klinis (10). Penelitian (11) menunjukkan bahwa pemberian WJ-MSC (*wharton's jelly mesenchymal stem cell*) intrakoroner pada pasien pasca infark miokard meningkatkan LVEF (*left ventricular ejection fraction*) dan menurunkan LV *end-systolic volumes* dan *end-diastolic volumes* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (11). Dahulu mekanisme terapi MSC pada DCM dianggap terjadi hanya melalui mekanisme efek parakrin (12) dan diferensiasi sel (13). Namun, baru-baru ini

transfer mitokondria interseluler juga ditunjukkan sebagai salah satu mekanisme terapi MSC terhadap DCM (14).

Transfer mitokondria interseluler merupakan pergerakan mitokondria dari satu sel menuju sel lain melalui *tunnel* yang menghubungkan sitoplasma kedua sel tersebut. Transfer mitokondria interseluler ini dianggap sebagai salah satu mekanisme protektif dari stem sel terhadap stres yang dialami sel di sekitarnya, hal ini dapat dilihat dari peningkatan signifikan jumlah transfer mitokondria interseluler yang terjadi pada MSC yang dikultur bersama sel yang mengalami stres dibandingkan dengan monokultur MSC ataupun kultur bersama MSC dengan sel yang tidak mengalami stres (15). Transfer mitokondria dapat terjadi dua arah, mitokondria normal dari sel sehat ke sel yang mengalami stres dan mitokondria yang mengalami kerusakan dari sel yang mengalami stres ke sel sehat (16).

Salah satu gen yang berperan dalam transfer mitokondria interseluler adalah Miro1. Miro1 merupakan protein adaptor sensitif Ca^{2+} pada membran luar mitokondria yang membentuk kompleks transport dengan protein TRAK dan protein motor dynein/kinesin yang berperan dalam pergerakan mitokondria *microtubule-dependent* (17–19). Peningkatan ekspresi gen ini pada MSC berhubungan dengan jumlah

transfer mitokondria antar sel dan meningkatkan efek protektifnya (20).

Pemahaman tentang hubungan ekspresi gen Miro1 sebagai salah satu faktor yang berperan dalam mekanisme terapi WJ- MSC dengan ekspresi gen p53 sangat penting karena dapat menjadi landasan untuk mengembangkan potensi WJ- MSC.

METODE

Thawing Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells

WJ- MSC yang digunakan pada penelitian ini berasal dari IMERI Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Thawing* dilakukan menggunakan metode yang dideskripsikan oleh (21)

Isolasi Organ Jantung Tikus

Jantung yang digunakan berasal dari tikus neonatus galur wistar usia 12-18 jam. Tikus diberikan heparin 50 IU secara subkutis 1 jam sebelum tindakan. Kemudian tikus dieutanasia dengan dislokasi serviks. Sternotomi dilakukan menggunakan gunting kecil di garis tengah thorak. Klem digunakan untuk menarik tulang rusuk dan mengekspos jantung dan paru-paru.

Jantung dan paru yang sudah diekspos dilepaskan dari jaringan sekitarnya. Aorta dan vena cava di potong kurang lebih 2 mm dari pangkalnya. Kemudian jantung dan paru dikeluarkan dari rongga thorak dan

dimasukan ke dalam plate disc 30 mm yang mengandung 3 ml DMEM + 10% FBS. Jantung dan paru dipisahkan dengan memotong pembuluh darah pulmonal 2 mm dari pangkalnya.

Prosedur dari sternotomi hingga pemotongan pembuluh pulmonal diselesaikan dalam 2 menit. Sebelum dipindahkan ke dalam plate 96 well, jantung dipastikan berdetak ritmik dan tidak memiliki jejas pada permukaannya. Jantung dipindahkan dengan menjepit ujung aorta yang tersisa menggunakan pinset tanpa gerigi.

Whole Organ Culture

Kultur dilakukan dalam plate 96 well yang mengandung 300µl DMEM + 10% FBS. Organ jantung yang sudah diisolasi dipindahkan ke dalam well sesuai kelompok perlakuan.

Pemberian WJ-MSC

WJ-MSC sebanyak 1×10^5 atau 1×10^6 diberikan menggunakan mikro pipet dalam 25 µl DMEM + 10% FBS. Pemberian dilakukan 10 menit setelah jantung dimasukan ke dalam well, bersamaan dengan itu dilakukan pemberian 25µl DMEM + 10% FBS + 40µM doxorubicin agar konsentrasi doxorubicin tetap 20 µM.

Realtime PCR (RT-PCR)

Setelah sintesis cDNA selesai, selanjutnya yaitu RT-PCR menggunakan

primer gen yang akan digunakan sesuai dengan desain dan optimasi suhu yang telah dilakukan (Kil *et al.*, 2016). Primer gen yang digunakan untuk analisis ekspresi gen dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer Miro1, p53, dan Gapdh

no	Gen	Forward	Reverse
1.	Miro1	5'-gacaagacagcaggctgcctt-3'	5'-tcgctgaacctccacacaggt-3'
2.	p53	5'-cctatccggtcagttgttga-3'	5' ttgagagtgaggaaatgg-3'
3.	GAPDH tikus	5'-acacattggggtaggaaca-3'	5'-aaggctcatgaccacagtc-3'
4.	GAPDH manusia	5'-Gtctcctctgacttcaacagcg-3'	5'-accaccctgttctgttagccaa-3'

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekspresi gen p53 dari percobaan ini memberikan data dengan sebaran normal dan homogen sehingga uji statistik dilakukan menggunakan uji One-Way ANOVA. Uji One-Way ANOVA memberikan hasil $p < 0,005$ sehingga H_0 (tidak terdapat perbedaan ekspresi gen p53 antara kelompok perlakuan) ditolak. Data tersebut menunjukkan bahwa jantung tikus neonatus yang diisolasi di dalam media kultur yang mengandung 20µM doxorubicin selama 30 menit mengalami peningkatan gen p53 yang signifikan ($p < 0,005$) dibandingkan kelompok kontrol negatif (K(-)) yang ditempatkan dalam kultur media tanpa doxorubicin. Pemberian WJ-MSC sebanyak 1×10^5 pada menit ke-10 (kelompok P1) menyebabkan perbedaan ekspresi gen p53 dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Pemberian WJ-MSC sebanyak 1×10^6 pada menit ke-10 (kelompok P2) menyebabkan ekspresi gen p53 lebih rendah secara

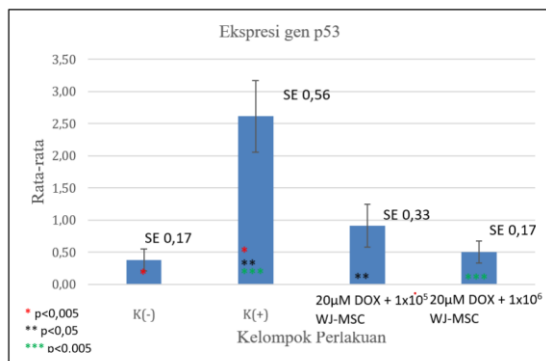
signifikan ($p < 0,005$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K(+)) (Tabel 2 dan Gambar 1).

Tabel 2. Uji Post Hoc Tukey HSD ekspresi gen p53

Kelompok 1	Kelompok 2	Ekspresi gen p53
		p
K(-)	K(+)	*0,002
	P1	0,713
	P2	0,995
K(+)	K(-)	*0,002
	P1	**0,016
	P2	*0,003
P1	K(-)	0,713
	K(+)	**0,016
	P2	0,841
P2	K(-)	0,995
	K(+)	*0,003
	K(+)	0,841

* $p < 0,005$

** $p < 0,05$



Gambar 1. Grafik rata-rata ekspresi gen p53

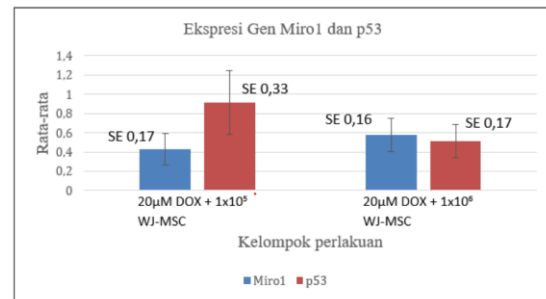
SE 0,33

Pada uji t-tidak berpasangan, tidak terdapat perbedaan ekspresi gen Miro1 yang signifikan ($p > 0,05$) antara kelompok P1 (20µM DOX + 1x10⁵ WJ-MSC) dan kelompok P2 (20µM DOX + 1x10⁶ WJ-MSC) (Tabel 3 dan Gambar 2) sehingga H₀ (tidak terdapat perbedaan ekspresi gen Miro1 pada kelompok perlakuan) tidak dapat ditolak. Uji korelasi Pearson antara ekspresi gen p53 dan Miro1 pada kedua kelompok perlakuan juga

menunjukkan hasil yang tidak signifikan ($p > 0,05$).

Tabel 3. Uji t-tidak berpasangan ekspresi gen Miro1

Kelompok	Rata-rata ekspresi gen Miro1	p
P1	0,428	0,556
P2	0,578	



Gambar 2. Grafik rata-rata gen Miro1 dan p53 kelompok P1 (20µM DOX + 1x10⁵ WJ-MSC) dan P2 (20µM DOX + 1x10⁶ WJ-MSC)

Peningkatan signifikan ekspresi gen p53 yang terjadi pada kelompok kontrol negatif menunjukkan kardiotoxicitas doxorubicin. Lalu, tidak terjadinya peningkatan ekspresi gen p53 pada kelompok yang diberikan stem sel menunjukkan mekanisme protektif stem sel terhadap kardiotoxicitas doxorubicin.

Tidak terjadinya perbedaan signifikan ekspresi gen Miro1 antara kelompok P1 dan P2 dapat terjadi melalui dua kemungkinan. Pertama, pemberian WJ-MSC sebanyak 1x10⁵ telah cukup untuk melindungi kardiomyosit dari kardiotoxicitas doxorubicin hingga menit ke-30 perlakuan sehingga pemberian WJ-MSC yang lebih banyak (1x10⁶) tidak berarti signifikan. Kedua, efek parakrin WJ-MSC telah terlebih dahulu melindungi kardiomyosit dari keadaan stres oksidatif sehingga tidak terjadi peningkatan ekspresi gen p53 yang berperan

dalam pembentukan *tunneling nano tube* (TNT) untuk transfer mitokondria interseluler.

Peningkatan gen Miro1 baru terjadi ketika sel donor mendapatkan sinyal bahaya dari sel resipien yang mengalami stres. Distribusi sinyal tersebut baru dapat terjadi jika telah terbentuk TNT yang menghubungkan sel resipien dan sel donor. (16)

Menurut Zhang *et al* (2016), mekanisme protektif stem sel melalui efek parakrin dan transfer mitokondria interseluler terjadi secara independen(14). Namun, pada penelitian ini didapatkan bahwa mekanisme protektif stem sel melalui efek parakrin dan transfer mitokondria kemungkinan juga dapat memberikan *feedback* negatif satu sama lain. Kemungkinan pada kondisi ketika sel telah memasuki tahapan awal apoptosis, dimana telah terbentuknya TNT, transfer mitokondria dapat mengambil peran utama untuk menyelamatkan sel dari apoptosis, sedangkan pada keadaan sebelum terbentuknya TNT maka efek parakrin menjadi mekanisme protektif utama stem sel. Jika efek parakrin berhasil melindungi sel dari keadaan stres maka potensi untuk terjadinya mekanisme transfer mitokondria interseluler pun berkurang, hal ini dikarenakan pembentukan TNT untuk jalur akses transfer mitokondria interseluler baru terjadi ketika sel telah mengalami stres dan memasuki tahap awal apoptosis (22). Namun, jika stres seluler yang

dialami oleh sel berlanjut hingga ke tahap awal apoptosis dan terjadi pembentukan TNT, mekanisme transfer mitokondria interseluler baru dapat ikut berkontribusi.

Walaupun ekspresi gen Miro1, indikator yang digunakan untuk menilai transfer mitokondria intersel pada penelitian ini, tidak mengalami peningkatan ekspresi dan tidak memiliki korelasi yang signifikan terhadap gen p53 pada uji korelasi Pearson, bukan berarti mekanisme transfer mitokondria tidak dapat berperan sebagai salah satu mekanisme protektif stem sel pada jantung yang diinduksi doxorubicin. Pemberian stem sel pada waktu yang tepat, pada tahap apoptosis yang sangat awal sebelum aktivasi caspase-3, merupakan komponen penting dalam pembuktian peran mekanisme transfer mitokondria interseluler (22).

Pengaruh doxorubicin terhadap gen p53 dilaporkan memiliki peran yang berbeda pada beberapa penelitian. Jalur kematian sel yang diatur p53 telah diketahui memediasi sifat kardiotoxik doxorubicin secara akut pada tikus yang diinjeksi bolus doxorubicin dosis tinggi (23), hasil tersebut sesuai dengan peningkatan ekspresi p53 yang ditemukan pada penelitian ini. (9) melaporkan bahwa mekanisme induksi apoptosis dari doxorubicin tidak bergantung pada p53 inti, melainkan terjadi utamanya melalui pool protein p53 yang bertranslokasi secara cepat ke membran

luar mitokondria, berperan seperti protein BH3-only. Li *et al* (2019) melaporkan bahwa p53 dapat mencegah pengaruh kardiotoxik doxorubicin yang diberikan dalam dosis rendah dalam jangka panjang.

Ekspresi gen p53 berasosiasi erat dengan ROS. Aktivasinya juga dapat dipicu oleh ROS dan stres oksidatif (24,25). Protein p53 juga menekan ekspresi *superoxide dismutase 2* (SOD2/MnSOD) melalui interaksinya dengan Sp1 pada regio promotor gen SOD2 (26).

Protein p53 memiliki peran yang penting dalam pembentukan TNT. TNT merupakan saluran yang menghubungkan dua sel atau lebih yang dapat digunakan oleh sel untuk melakukan transfer organel antar sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, badan golgi dan sebagainya. Pembentukan TNT dilakukan oleh sel yang mengalami stres, ketika dua populasi sel di *co-culture* maka sel yang mengalami stres yang melakukan inisiasi pembentukan TNT menuju sel yang tidak mengalami stres (16,22). Penelitian yang dilakukan oleh (22) menunjukkan bahwa over ekspresi gen p53 dapat menyebabkan pembentukan TNT tanpa induksi stress dari luar sel. Penelitian tersebut juga menunjukkan pada sel mutan yang mengekspresikan lebih sedikit gen p53 terjadi hambatan dalam pembentukan TNT. Wang *et al* (2015) melaporkan bahwa hanya sel yang mengandung mitokondria rusak pada tahap

apoptosis yang sangat awal, sebelum aktivasi caspase-3, yang membentuk TNT untuk transfer mitokondria. Namun, pembentukan TNT ini tidak dipengaruhi oleh caspase-3.

Aktivasi protein p53 juga meningkatkan aktivitas caspase-3, yang telah diketahui dapat membelah S100A4 intraseluler, anggota kelompok protein S100 yang mengikat kalsium (27). S100A4 ini juga dilaporkan berperan terhadap pembentukan TNT dari sel dengan kadar S100 rendah ke sel yang memiliki kadar S100 lebih tinggi (28).

Kecepatan pembentukan TNT tentu menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi peran transfer mitokondria interseluler sebagai mekanisme penyelamatan sel dari keadaan stres. TNT telah dilaporkan dapat terbentuk dan berakhir dalam beberapa menit (29). (30) melaporkan bahwa dalam waktu 5 menit telah dapat terbentuk TNT yang menghubungkan dua sel yang berdekatan.

Dupon *et al* (2018) mengemukakan dua mekanisme awal terbentuknya TNT: mekanisme *protrusion elongation*, yaitu pembentukan TNT berawal dari sel yang mengekstensikan tonjolan menyerupai filopodia menuju sel lain; dan mekanisme *cell dislodgement*, yaitu diawali dengan dua sel mengalami kontak langsung kemudian bagian yang berkontak tersebut membentuk saluran membran yang menjadi TNT ketika kedua sel tersebut bergerak menjauh satu sama lain. Hal ini berarti sel dengan jarak yang berdekatan

atau mengalami kontak langsung membutuhkan waktu yang lebih sedikit dalam pembentukan TNT dibandingkan dengan sel yang memiliki jarak lebih jauh satu sama lain.

Jumlah TNT bervariasi dari 1 hingga mencapai 75 TNT per sel. Jumlah ini dipengaruhi juga oleh jarak antar sel, semakin dekat jarak antara sel donor dan sel resipien semakin banyak TNT yang dapat terbentuk (29)

(31) berhasil menunjukkan bahwa pada pemberian MSC secara sistemik dapat terjadi transfer mitokondria dari MSC ke sel resipien, ditandai dengan ditemukannya mitokondria MSC yang telah diberikan label pada sel resipien, namun penelitian tersebut tidak menunjukkan bukti transfer mitokondria pada penelitian itu terjadi melalui TNT atau tidak. Penelitian tersebut berhasil menunjukkan bahwa pemberian mitokondria yang diisolasi dari MSC secara langsung ke jaringan yang mengalami stres seluler dapat memperbaiki struktur dan fungsi jaringan. Keberhasilan pemberian langsung mitokondria ke jaringan pada penelitian itu menunjukkan bahwa mitokondria hasil isolasi yang ditemukan pada sel resipien terjadi tanpa perantara TNT, melainkan melalui mekanisme *intrusion* langsung oleh sel resipien, hal ini juga berarti tidak melibatkan berbagai molekul yang berperan dalam pergerakan mitokondria melalui mikrotubulus seperti protein motor

dynein dan kinesin, dan protein adaptor seperti Miro1.

Pergerakan mitokondria melalui TNT terjadi menggunakan protein motor dynein atau kinesin yang kemudian bergerak sepanjang mikrotubulus. Kinesin merupakan protein motor bergantung ATP yang memiliki dua kepala dan dapat bergerak sepanjang mikrotubulus dengan jarak setiap langkahnya sebesar 8nm, dan dapat bergerak hingga kecepatan 1 $\mu\text{m/s}$ (32,33), sedangkan dynein dapat bergerak hingga kecepatan 0,8-0,9 $\mu\text{m/s}$, dipengaruhi oleh besarnya gaya dari beban muatan dan konsentrasi ATP di sitosol (33,34). melaporkan bahwa kecepatan dynein sekitar 0,4 $\mu\text{m/s}$ pada konsentrasi ATP 10 μM , 0,8 $\mu\text{m/s}$ pada konsentrasi ATP 100 μM , dan dapat mencapai 1,2 $\mu\text{m/s}$ pada konsentrasi ATP 1mM(35).

Miro1 menambatkan membran luar mitokondria ke kompleks protein motor dynein atau kinesin. Over ekspresi gen Miro1 diketahui dapat meningkatkan efek protektif MSC terhadap sel yang mengalami stres. Over ekspresi gen Miro1 diketahui dapat meningkatkan jumlah mitokondria yang bergerak dari sel donor ke sel resipien namun tidak mempengaruhi kecepatan pergerakan mitokondria dari sel donor menuju sel resipien (18). Kecepatan mitokondria yang mengalami transfer melalui TNT dapat mencapai 0,17 $\mu\text{m/s}$ (18), hal ini berarti transfer mitokondria

melalui TNT sepanjang 100 μm akan membutuhkan waktu 9,8 menit.

Dugaan mengenai efek parakrin telah terlebih dahulu melindungi sel dari keadaan stres oksidatif didasari oleh penemuan bahwa efek parakrin dapat menjadi mekanisme protektif tunggal dari stem sel terhadap sel kardiomyosit yang mengalami stres akibat induksi doxorubicin. Hal tersebut dibuktikan melalui *co-culture* stem sel dan kardiomyosit yang dipisahkan dengan menggunakan sekat yang meniadakan kontak langsung antar sel (Zhang *et al* 2015).

Metode *whole organ culture* yang digunakan pada penelitian ini terbukti dapat dipakai untuk menilai efek protektif stem sel terhadap jantung tikus neonatus yang diinduksi doxorubicin, ditandai dengan berkurangnya ekspresi gen p53 pada kelompok perlakuan yang diberikan WJ-MSC. Namun untuk dapat membuktikan dan menilai seberapa jauh peran transfer mitokondria interseluler dibanding efek parakrin masih membutuhkan eksplorasi lebih lanjut.

Penggunaan metode *whole organ culture* ini memungkinkan terjadinya dua mekanisme *homing* sekaligus. *Systemic homing* pada MSC yang masuk ke pembuluh darah ketika jantung berdetak dan *non-systemic homing* pada MSC yang langsung berinteraksi dengan jaringan terluar organ jantung(36).

Secara alami, efisiensi *homing* MSC relatif rendah. Berbagai penelitian menggunakan pencitraan *postiron emission tomography* (PET) dengan MSC yang diberikan label radiografi menunjukkan bahwa efisiensi *homing* MSC <10% dari total MSC yang diberikan melalui intravena (37). Penggunaan metode *whole organ culture* mungkin menyebabkan angka efisiensi *homing* yang lebih besar dan membutuhkan waktu yang lebih singkat untuk terjadinya proses *homing*, sehingga dapat memudahkan untuk menilai pengaruh pemberian MSC terhadap suatu jaringan.

Berdasarkan telaah mengenai kecepatan pembentukan TNT, kecepatan pergerakan mitokondria melalui TNT, dan penggunaan metode *whole organ culture* untuk memperbesar peluang MSC ke jaringan pada penelitian ini, seharusnya transfer mitokondria melalui TNT dapat terjadi dalam kurun waktu 20 menit setelah penambahan MSC pada *whole organ culture* jantung dalam medium yang mengandung 20 μM doxorubisin. Namun efek parakrin dari MSC tampaknya telah terlebih dahulu melindungi sel dari keadaan stres oksidatif dan menghambat terjadinya transfer mitokondria interseluler melalui TNT. Pada akhirnya dapat disimpulkan bahwa transfer mitokondria interseluler melalui TNT kemungkinan tidak berperan signifikan pada mekanisme perlindungan MSC biasa (tanpa rekayasa

molekuler), dibutuhkan rekayasa pada MSC untuk mengoptimalkan mekanisme tersebut seperti yang sudah ditunjukkan pada penelitian *in vitro* (20,38).

SIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa co-culture WJ-MSC dapat mencegah peningkatan ekspresi gen p53 pada jantung yang diinduksi doxorubicin dengan metode *whole organ culture*. Jumlah WJ-MSC tidak berpengaruh signifikan terhadap ekspresi gen Miro1 pada penelitian ini. Tidak terdapat

hubungan yang bermakna antara ekspresi gen p53 dan Miro1 pada penelitian ini.

DUKUNGAN FINANSIAL (jika ada)

Tidak ada

UCAPAN TERIMA KASIH (jika ada)

Peneliti ingin mengucapkan terimakasih kepada laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas atas segala dukungan selama penelitian ini berlangsung.

KONFLIK KEPENTINGAN (jika ada)

Tidak ada

DAFTAR PUSTAKA

1. Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2010 Nov;12(11):655–67.
2. Brieler JAY, Breeden MA, Tucker J, Louis S. *Cardiomyopathy: An Overview*. 2017;
3. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Publ Group*. 2013;1–17.
4. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(12):1249–54.
5. McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circ Res*. 2017;121(7):722–30.
6. Moslehi JJ. Cardiovascular Toxic Effects of Targeted Cancer Therapies. *N Engl J Med*. 2016 Oct;375(15):1457–67.
7. Moslehi J, Amgala D, Kitsis RN. Grounding Cardio-Oncology in Basic and Clinical Science. *Circulation*. 2017;136(1):3–5.
8. Mantawy EM, Esmat A, El-bakly WM, Eldin RAS. Mechanistic clues to the protective effect of chrysin against doxorubicin-induced cardiomyopathy: Plausible roles of p53, MAPK and AKT pathways. 2017;(January):1–13.
9. Vaseva A V., Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012;149(7):1536–48.
10. Guo Y, Yu Y, Hu S, Chen Y, Shen Z. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis*. 2020;

11. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015;13(1):162.
12. Zhang Y, Liang X, Liao S, Wang W, Wang J, Li X, et al. Potent Paracrine Effects of human induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2015 Jun;5:11235.
13. Gopinath S, Vanamala SK, Gondi CS, Rao JS. Human umbilical cord blood derived stem cells repair doxorubicin-induced pathological cardiac hypertrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May;395(3):367–72.
14. Zhang Y, Yu Z, Jiang D, Liang X, Liao S, Zhang Z, et al. iPSC-MSCs with High Intrinsic MIRO1 and Sensitivity to TNF- α Yield Efficacious Mitochondrial Transfer to Rescue Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Stem Cell Rep.* 2016;7(4):749–63.
15. Babenko VA, Silachev DN, Popkov VA, Zorova LD, Pevzner IB, Plotnikov EY, et al. Miro1 Enhances Mitochondria Transfer from Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MMSC) to Neural Cells and Improves the Efficacy of Cell Recovery. *Mol Basel Switz.* 2018 Mar;23(3).
16. Mahrouf-yorgov M, Augeul L, Crola C, Silva D, Jourdan M, Rigolet M, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. 2017;1224–38.
17. Modi S, López-doménech G, Halff EF, Covill-cooke C, Ivankovic D, Melandri D, et al. sites and link cristae organization to the mitochondrial transport machinery. *Nat Commun.* 2019;17–9.
18. Kontou G, Antonoudiou P, Podpolny M, Szulc BR, Arancibia-carcamo IL, Higgs NF, et al. Miro1-dependent mitochondrial dynamics in parvalbumin interneurons. 2021;1–28.
19. Alshaabi H, Shannon N, Gravelle R, Milczarek S, Messier T, Cunniff B. Redox Biology Miro1-mediated mitochondrial positioning supports subcellular redox status. *Redox Biol.* 2021;38(November 2020):101818.
20. Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, Kumar M, Singh S, Rehman R, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 2014;33(9):994–1010.
21. Yarni SD, Ali H, Tjong DH. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Wharton Jelly on Alzheimer ' s Rat with Y-Maze Test Method. 2021;44(2):112–6.
22. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):732–42.
23. Lin RW, Ho CJ, Chen HW, Pao YH, Chen LE, Yang MC, et al. P53 enhances apoptosis induced by doxorubicin only under conditions of severe DNA damage. *Cell Cycle Georget Tex.* 2018;17(17):2175–86.
24. Chen Y, Liu K, Shi Y, Shao C. The tango of ROS and p53 in tissue stem cells. Vol. 25, *Cell death and differentiation.* 2018. p. 639–41.
25. Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr;44(8):1529–35.
26. Dhar SK, Xu Y, Chen Y, St Clair DK. Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *J Biol Chem.* 2006 Aug;281(31):21698–709.
27. Cardaci S, Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species mediate p53

activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*. 2008 Nov;74(5):1234–45.

28. Sun X, Wang Y, Zhang J, Tu J, Wang XJ, Su XD, et al. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death Dis*. 2012 Dec;3(12):e438.

29. Watkins SC, Salter RD. Functional Connectivity between Immune Cells Mediated by Tunneling Nanotubules. *Immunity*. 2005 Sep 1;23(3):309–18.

30. Shen J, Wu JM, Hu GM, Li MZ, Cong WW, Feng YN, et al. Membrane nanotubes facilitate the propagation of inflammatory injury in the heart upon overactivation of the β -adrenergic receptor. *Cell Death Dis*. 2020;11(11):958.

31. Konari N, Nagaishi K, Kikuchi S, Fujimiya M. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.

32. Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 May;10(5).

33. King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol*. 2000;2(1):20–4.

34. Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, Higuchi H. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(15):5741–5.

35. Ando J, Shima T, Kanazawa R, Shimo-Kon R, Nakamura A, Yamamoto M, et al. Small stepping motion of processive dynein revealed by load-free high-speed single-particle tracking. *Sci Rep*. 2020;10(1):1080.

36. Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2017 Jun;35(6):1446–60.

37. Liesveld JL, Sharma N, Aljitawi OS. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells*. 2020 Oct 1;38(10):1241–53.

38. Kontou G, Antonoudiou P, Podpolny M, Szulc BR, Arancibia-Carcamo IL, Higgs NF, et al. Miro1-dependent mitochondrial dynamics in parvalbumin interneurons. *eLife*. 2021 Jun;10.