

**PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELLS YANG DIINDUKSI
PACLITAXEL TERHADAP EKSPRESI NF-KB (P50/P65) DAN
EKSPRESI P53 PADA SEL PUNCA KANKER PAYUDARA**

(Uji *in-Vitro* pada Sel Kanker Payudara MDA-MB231)

TESIS

Untuk memenuhi sebagai persyaratan mencapai derajat sarjana S-2



Magister Ilmu Biomedik

Fadhli Rizal Makarim
MBK. 1913010142

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2022**

TESIS

**PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELLS YANG DIINDUKSI
PACLITAXEL TERHADAP EKSPRESI NF-KB (P50/P65) DAN
EKSPRESI P53 PADA SEL PUNCA KANKER PAYUDARA**

(Uji In-Vitro pada Sel Kanker Payudara MDA-MB231)

disusun oleh

Fadhli Rizal Makarim
MBK. 1913010142


Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 19 Agustus 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima


Menyetujui,

Pembimbing

Pembimbing I

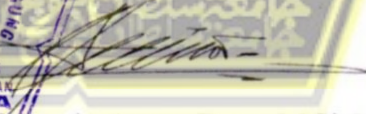
Pembimbing II


Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK 210199050


Dr. dr. Chodijah, M.Kes
NIK 210186023

Mengetahui,

Ketua Program Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Assoc Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK 210199050



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 19 Agustus 2022



Fadhli Rizal Makarim



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Fadhli Rizal Makarim
Tempat/tanggal lahir : Semarang, 10 November 1993
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN SOMPOK Semarang : Lulus tahun 2005
2. SMPN 2 Semarang : Lulus tahun 2007
3. SMAN 3 Semarang : Lulus Tahun 2010
4. FK UNISSULA Semarang : Lulus tahun 2016
5. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula : (2019 - Sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2018 - Sekarang Tutor FK Unissula Semarang

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Gunarto
Ibu : Indra Kertati
2. Nama Istri : Dyflia Irfania
3. Nama Anak : Sharif Azhar Makarim

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan atas berkat-Nya, sehingga tesis dengan judul, **“Pengaruh Mesenchymal Stem Cells yang Diinduksi Paclitaxel terhadap Ekspresi Nf-Kb (P50/P65) dan Ekspresi P53 Pada Sel Punca Kanker Payudara”** (Uji in-Vitro pada Sel Kanker Payudara MDA-MB231) ini dapat terselesaikan.

Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto SH., SE. Akt., M.Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Assoc. Prof. Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si. Med dan Dr. dr. Hj. Chodijah, M.Kes selaku dosen pembimbing I dan II yang selalu sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya tesis ini.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF; Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, MKes; Dr. dr. Dedy Hermansyah, Sp.B (K)Onk, selaku dosen penguji I, II dan III yang telah memberikan masukan untuk mengarahkan agar penelitian ini lebih baik.

6. Seluruh staf dan pengajar di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat.
7. Istri tercinta drg. Dyflia Irfania yang selalu memberikan semangat dan bantuan moral untuk menyelesaikan studi ini. Serta anakku Sharif Azhar Makarim, yang selalu memberikan keceriaan dalam hidup ini.
8. Kedua orang tua saya Bapak Gunarto dan Ibu Indra Kertati untuk dukungan dan doa yang tak kenal lelah. Serta kakak dan adik saya Hizhwati Dalilati H., dan Arifa Kohinoor Jadida.
9. Segenap staff SCCR (Stem Cell Cancer Research) Fakultas Kedokteran Unissula yang telah membantu untuk terlaksananya penelitian ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Semarang, Agustus 2022

Fadhli Rizal Makarim

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
1.5. Orisinalitas Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. NF-kB.....	8

2.2. Gen p53	11
2.3. Kanker Payudara	14
2.3.1. Definisi	14
2.3.2. Epidemiologi	14
2.3.3. Klasifikasi.....	15
2.3.4. Patogenesis	18
2.3.5. Penatalaksanaan	20
2.4. <i>Cell line</i> Kanker Payudara	21
2.4.1. MDA-MB 231 <i>Cell line</i>	21
2.5. Sel Punca Kanker Payudara	24
2.5.1. Jalur Sinyal Sel Punca Kanker Payudara	29
2.6. <i>Mesenchymal Stem Cells</i>	40
2.6.1. Definisi	40
2.6.1. Sumber MSC.....	41
2.6.1. Karakteristik MSC.....	41
2.7. <i>Paclitaxel</i>	42
2.8. Peran induksi Paclitaxel terhadap MSCs	43
2.8.1. Kemampuan MSCs dalam menyerap obat anti kanker	43
2.8.2. Kemampuan MSC dalam melepas Obat Antikanker .	45
2.9. Peran MSCs yang diinduksi Paclitaxel terhadap Sel Kanker.	47
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.	49
3.1. Kerangka Teori	49
3.2. Kerangka Konsep.....	52
3.3. Hipotesis.....	52
BAB IV METODA PENELITIAN	53

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	53
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	54
4.2.1. Populasi Penelitian	54
4.2.2. Sampel Penelitian	54
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	55
4.3.1. Variabel Penelitian	55
4.3.2. Definisi Operasional.....	56
4.4. Bahan/Materi Penelitian.....	57
4.4.1. Bahan.....	57
4.5. Alat Penelitian.....	58
4.5.1. Alat.....	58
4.6. Cara Penelitian dan Alur Penelitian	59
4.6.1. Perolehan <i>Ethical Clearence</i>	59
4.6.2. Prosedur Isolasi <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari <i>Umbilical Cord</i>	59
4.6.3. Pembacaan CD90, CD105, CD73, dan Lin dengan <i>Flow Cytometry</i>	60
4.6.4. Induksi MSCs dengan Paclitaxel.....	61
4.6.5. Isolasi sel punca dari cell line MDA-MB231.....	61
4.6.6. Validasi sel punca kanker payudara dengan CD44+ dan CD24- <i>flowcytometry</i>	62
4.6.7. Validasi sel punca kanker payudara melalui uji mammosphere	62
4.6.8. Pemberian perlakuan MSCs yang diinduksi dengan Paclitaxel pada Sel punca kanker payudara	63
4.6.9. Uji ekspresi NF-kB (p50/p65) dengan qRT-PCR	64
4.6.10. Uji ekspresi p53 dengan qRT-PCR	64
4.6.11. Alur Penelitian.....	66

4.7. Teknik Penumpulan Data.....	67
4.8. Metoda Analisis Data.....	67
4.8.1 Analisis Data	67
4.9. Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	68
4.9.1 Tempat Penelitian.....	68
4.9.2 Waktu Penelitian	68
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	69
5.1. Hasil <i>Sorting Sel</i> Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231	69
5.2. Validasi Sel Punca Kanker Payudara (CD24+/CD24-) MDA-MB231	70
5.3. Isolasi Mesenchymal Stem Cells dan Induksi Paclitaxel.....	71
5.4. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi NF-kB (p50)	72
5.5. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi NF-kB (p65)	74
5.6. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi p53	77
5.7. Pembahasan Hasil	79
5.8. Kelemahan Penelitian	85
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	86
6.1. Kesimpulan	86
6.2. Saran.....	87
DAFTAR PUSTAKA	88
LAMPIRAN.....	95

DAFTAR SINGKATAN

BCL-2	: <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
ABC	: <i>ATP-Binging Cassette</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
CD	: <i>Cluster of Diferentiation</i>
DNA	: <i>Deoksi Nucleoribosa Acid</i>
HIF	: <i>Hypoxia-inducible factors</i>
NIK	: <i>Nuclear Inducing Kinase</i>
IKK	: <i>Inhibitory κB kinase</i>
EMT	: <i>Epitel mesenchymal transition</i>
IAP	: <i>Inhibitory of apoptosis</i>
CSC	: <i>Cancer Stem Cells</i>
PUMA	: <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
Bax	: <i>Bcl-2 associated X protein</i>
DR5	: <i>Death receptor 5</i>
Dral	: <i>Cell-death signaling receptor</i>
PIG3	: <i>p53 - inducible gen3</i>
PIDD	: <i>p53-induced protein with death domain</i>
PERP	: <i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
p53AIP1	: <i>p53-regulated apoptosis- inducing protein 1</i>
TRAIL	: <i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
ROCK	: <i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>
Toca-1	: <i>Transducer of Cdc-42-dependent actin assembly-1</i>
VEGF	: <i>Vascular epithelial growth factor</i>
DCIS	: <i>Ductal carcinoma in situ</i>
LCIS	: <i>Lobular carcinoma in situ</i>
ER	: <i>Estrogen receptor</i>
PR	: <i>Progesteron receptor</i>
HER2	: <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
TNBC	: <i>Triple negative breast cancer</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FACS	: <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
ALDH1	: <i>Aldehyde Dehydrogenase 1</i>
HSA	: <i>Heat Stable Antigen</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	6
Tabel 2. 1. Subtipe Kanker Payudara dan Ekspresi Penanda Biologis 43	16
Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam <i>flow cytometry</i>	61
Tabel 5.1. Nilai rataan ekspresi gen p50 tiap kelompok dan uji kruskal walis.....	74
Tabel 5.2. Nilai signfikansi ekspresi gen p50 antar kelompok perlakuan.....	74
Tabel 5.3. Nilai rataan ekspresi gen p65 tiap kelompok dan uji kruskal walis.	76
Tabel 5.4. Nilai signfikansi eskpresi gen p65 antar kelompok perlakuan.....	76
Tabel 5.5. Tabel nilai rataan ekspresi gen p53 dan uji <i>One Way ANOVA</i>	78



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Generasi Sel Punca Kanker Payudara. ⁴⁵	18
Gambar 2.2.	BRCA sebagai Salah Satu Molekul yang Mengalami Perubahan pada Terjadinya Kanker Payudara	19
Gambar 2. 3.	Mekanisme Estrogen terhadap Kanker Payudara.....	20
Gambar 2.4.	Mekanisme Terjadinya Kanker Payudara. ¹	20
Gambar 2.5.	Jalur Pensinyalan Notch	32
Gambar 2.6.	Hubungan Silang antara Transformasi Jalur Faktor Pertumbuhan Beta (TGF- β) dan Jalur Wnt / β -catenin dalam Induksi Kanker Payudara	36
Gambar 2.7.	Hubungan Silang antara Pensinyalan Hh dan Autofagi berdasarkan Bukti Saat Ini.....	40
Gambar 2.8.	Sumber <i>mesenchymal stem cell</i> (MSC).....	41
Gambar 2.9.	Kemampuan diferensiasi dari MSC	42
Gambar 3.1.	Kerangka teori	51
Gambar 3.2.	Kerangka konsep	52
Gambar 4.1.	Skema rancangan penelitian <i>Post-Test Only Control Group</i> ...	53
Gambar 4.2.	Alur Penelitian.....	66
Gambar 5.1.	Morfologi sel adherent SPK pada passage ke tiga	70
Gambar 5.2.	Validasi karakterisasi klon SPK (A) Deteksi flowcytometry penanda CD44 dan CD24 pada permukaan sel MDA-MB231 dan SPK. (B) Pembentukan mammosphere klon SPK selama 7 hari.	71
Gambar 5.3.	Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD105, CD73, dan Lin.....	72
Gambar 5.4.	Grafik ekspresi gen p50 melalui pemeriksaan qRT-PCR.....	73

Gambar 5.5 Grafik ekspresi gen p65 melalui pemeriksaan qRT-PCR..... 75

Gambar 5.6. Grafik ekspresi gen p53 melalui pemeriksaan qRT-PCR..... 77



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearence</i>	95
Lampiran 2. Analisis Statistik	96



ABSTRAK

**PENGARUH MESENCHYMAL STEM CELLS YANG DIINDUKSI
PACLITAXEL TERHADAP EKSPRESI NF-KB (P50/P65) DAN EKSPRESI
P53 PADA SEL PUNCA KANKER PAYUDARA
(Uji *in-Vitro* Pada Sel Kanker Payudara MDA-MB231)**

Latar belakang: Resistensi pada terapi kanker payudara menjadi salah satu penyebab tingginya rekurensi kanker payudara. Rekurensi ini disebabkan oleh terapi yang tidak menargetkan pada sel punca kanker payudara. Vesikel ekstraseluler mampu menawarkan sistem penghantaran obat secara tertarget pada kemoterapi sehingga dapat mengurangi efek samping kemoterapi. Mesenchymal stem cells (MSCs) mampu menghasilkan vesikel ekstraseluler setelah induksi paclitaxel, sehingga dapat dijadikan agen pembawa kemoterapi. Kemampuan homing MSCs mampu membawa obat kemoterapi masuk ke dalam mikrotubulus sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi co-culture sel punca kanker payudara dengan MSCs yang telah diinduksi paclitaxel untuk melihat ekspresi NF-kB (p50/p65) dan ekspresi gen p53 pada sel punca kanker payudara.

Metode: Penelitian eksperimental dilakukan dengan melakukan co-culture isolasi sel punca kanker payudara dengan mesenchymal stem cells yang telah diinduksi dengan paclitaxel dalam dosis perbandingan P1=4:1; P2=2:1; dan P3=1:1 dibandingkan dengan kelompok kontrol (K). Setelah co-culture selama 24 jam, hasil kultur diperiksa untuk ekspresi NF-kB (p50/p65) dan p53 melalui qRT-PCR.

Hasil: Didapatkan penurunan ekspresi NF-kB (p50/p65) yang bermakna ($P < 0,005$) pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan peningkatan yang bermakna ekspresi gen p53 dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kesimpulan: Pemberian mesenchymal stem cells yang diinduksi paclitaxel pada sel punca kanker payudara berpengaruh terhadap penurunan ekspresi NF-kB dan peningkatan ekspresi gen p53

Kata Kunci: *Sel punca kanker payudara, mesenchymal stem cells, paclitaxel, NF-kB, p53*

ABSTRACT

***EFFECT OF PACLITAXEL-INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS ON
NF-KB (P50/P65) EXPRESSION AND P53 EXPRESSION ON BREAST
CANCER STEM CELLS
(In-Vitro Studies on MDA-MB231 Breast Cancer Cells)***

Background: Breast cancer resistance is one of the causes of the high recurrence of breast cancer. This recurrence is due to therapies that do not target breast cancer stem cells. Extracellular vesicles may offer a targeted drug delivery system in chemotherapy to reduce chemotherapy side effects. Mesenchymal stem cells (MSCs) may produce extracellular vesicles after paclitaxel induction, hence can be used as chemotherapy carriers. The homing ability of MSCs may carry chemotherapy drugs into the microtubules of cancer cells. This study aims to conduct co-culture studies of breast cancer stem cells with paclitaxel-induced MSCs to examine the expression of NF-kB (p50/p65) and the expression of the p53 gene in breast cancer stem cells.

Methods: Experimental research was conducted by co-culture of breast cancer stem cell isolation with mesenchymal stem cells that had been induced with paclitaxel in the ratio P1=4:1; P2=2:1; and P3=1:1 compared to the control group (K). After co-culture for 24 hours, the culture results were examined for NF-kB (p50/p65) and p53 expression by qRT-PCR.

Results: There was a significant decrease in the expression of NF-kB (p50/p65) in the treatment group compared to the control group and a significant increase in the expression of the p53 gene compared to the control group.

Conclusion: The administration of paclitaxel-induced mesenchymal stem cells to breast cancer stem cells decreases NF-kB expression and increases p53 gene expression.

Keywords: Breast cancer stem cells, mesenchymal stem cells, paclitaxel, NF-kB, p53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker payudara adalah tumor ganas yang berasal dari kelenjar payudara dan jaringan penunjangnya.¹ Kanker payudara merupakan kanker dengan insidensi paling banyak di dunia yang mencapai 2.261.419 kasus (24,5% dari seluruh kasus kanker), dengan angka kematian tertinggi sebesar 684.996 kasus (6,9%) pada tahun 2020.² Resistensi pada terapi kanker payudara menjadi salah satu penyebab tingginya rekurensi kanker payudara.³⁻⁶ Rekurensi ini disebabkan oleh terapi yang tidak menargetkan pada sel punca kanker payudara. Sel punca kanker payudara mampu mempertahankan regulasi abnormal dari jalur pensinyalan transduksi sel yang menyebabkan terjadinya pertumbuhan sel kanker yang eksekif dan resistensi apoptosis.^{7,8}

Paclitaxel adalah salah satu agen antitumor yang efektif melawan kanker stadium awal dan lanjut termasuk pada kanker payudara.⁹ Paclitaxel dengan berikatan pada tubulin subunit β , menginduksi polimerisasi tubulin dan menstabilkan mikrotubulus.^{3,10} Mikrotubulus yang dihasilkan dengan kemoterapi golongan taxane resisten terhadap penguraian.^{11,12} Hal ini mengakibatkan gangguan proses mitosis dan mengaktifasi gen p53 untuk dapat diaktifasinya apoptosis melalui jalur intrinsik.¹¹ Paclitaxel mampu memfosforilasi onkoprotein yang menghambat apoptosis yaitu BCL-2.⁹

Efek menguntungkan ini sering dikaitkan dengan efek samping yang parah seperti kardiotoxicitas, myelosupresi, dan neurotoksisitas. Resistensi

multi obat juga sering terjadi akibat pemberian paclitaxel.¹³ Paclitaxel mampu memediasi ekspresi pompa efluks yang berlebihan.¹⁴ P-Glycoprotein sebagai salah satu transporter yang mengikat pada ATP-Binding Cassette (ABC) mampu mengeluarkan obat kemoterapi yang akan memasuki membran sel sehingga terjadi resistensi kemoterapi.¹³

Strategi pemberian obat yang ditargetkan secara khusus untuk kanker dapat meningkatkan hasil terapi dalam hal kelangsungan hidup pasien.¹⁵ Terapi yang mengurangi toksisitas sistemik akan memberikan efektivitas pengobatan yang lebih baik pada pasien kanker payudara.¹⁶ Penelitian terdahulu menggunakan eksosom dan nanovesikel dari sel punca mampu mengenkapsulasi doksorubisin yang berhasil menjadikan sistem transport yang efisien untuk obat sitotoksik pada sel kanker.¹⁷

Vesikel ekstraseluler mampu menjadi sistem transport obat yang lebih tertarget pada kemoterapi sehingga dapat mengurangi efek samping kemoterapi.¹⁸ Penyerapan vesikel ekstraseluler bermuatan kemoterapi oleh sel kanker dan sel punca kanker dapat memicu apoptosis dan penurunan proliferasi sel. Beberapa sel normal pada mamalia mampu melepaskan vesikel namun dalam konsentrasi rendah.¹⁹ Mesenchymal stem cells (MSCs) yang dibuat dan dikultur dalam laboratorium memiliki potensi untuk menghasilkan vesikel ekstraseluler dengan konsentrasi tinggi ketika dicampur dengan paclitaxel. MSCs juga memiliki kemampuan *homing* sehingga mampu membawa obat kemoterapi masuk ke dalam mikrotubulus sel kanker.^{14,17-19}

Mesenchymal stem cells (MSCs) sebagai sel stroma multipotent juga mampu memproduksi faktor tropis sebagai immunomodulator poten yang mampu menghambat jalur NF-kB dan meningkatkan kadar protein caspase 3 sehingga mampu meregulasi apoptosis.^{20,21} MSCs mampu bermigrasi ke jaringan tumor atau kanker pada proses inflamasi dimana terjadi reaksi imunologi dan inflamasi yang membantu dalam proses transport obat kemoterapi.⁹

Penelitian terdahulu menggunakan eksosom MSCs yang sebelumnya telah dipapar paclitaxel menunjukkan penurunan viabilitas sel kanker payudara MDA-MB231 pada konsentrasi MSCs yang semakin meningkat.²² Studi lain dengan menggunakan *stromal cell line* dan hematopoietik *stem cells* yang diinduksi dengan agen kemoterapi doxorubicin menunjukkan adanya penurunan proliferasi *stromal cell line* diikuti dengan penurunan angiogenesis.¹⁷ Studi lain dalam skala yang lebih besar menggunakan Mesenchymal stromal cells yang diinduksi paclitaxel terhadap adenocarcinoma *cell line* menunjukkan adanya penurunan proliferasi sel diikuti dengan peningkatan aktivitas apoptosis.¹⁹

Pemberian paclitaxel sebagai agen kemoterapi melalui MSCs sebagai media transport obat pada sel punca kanker payudara diharapkan mampu menurunkan proliferasi sel punca kanker payudara, namun penelitian yang saat ini berkembang belum ada yang menjelaskan hal tersebut. Peneliti ingin melakukan suatu penelitian dengan melakukan studi co-culture sel punca kanker payudara dengan MSCs yang telah diinduksi paclitaxel pada variasi

dosis 1:1; 1:2; dan 1:4 dibandingkan dengan kontrol untuk melihat ekspresi NF- κ B (p50/p65) dan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara. Penelitian ini diharapkan mampu menjawab pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap proliferasi sel punca kanker payudara.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang sudah diuraikan, maka rumusan masalah penelitian ini adalah:

Apakah terdapat pengaruh Mesenchymal Stem Cells yang diinduksi paclitaxel terhadap ekspresi NF- κ B (p50/p65) dan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap penurunan ekspresi NF- κ B (p50/p65) dan peningkatan ekspresi p53 di sel punca kanker payudara pada variasi dosis dibandingkan dengan kontrol.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap penurunan ekspresi NF- κ B (p50/p65) pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 dengan dosis perbandingan 1:1, 1:2 dan 1:4 dibandingkan kelompok kontrol.

2. Mengetahui pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap peningkatan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 dosis perbandingan 1:1, 1:2 dan 1:4 dibandingkan kelompok kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini dapat memberikan informasi yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya tentang pengaruh *Mesenchymal Stem Cells* yang diinduksi paclitaxel pada berbagai variasi dosis perbandingan terhadap ekspresi NF-KB (p50/p65) dan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 secara *in vitro*.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Hasil penelitian ini dapat dipertimbangkan sebagai penelitian lanjutan secara *in-vivo* untuk mengetahui pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap sel punca kanker payudara.
2. Hasil penelitian ini dapat dipertimbangkan sebagai penelitian lanjutan fase klinis untuk mengetahui pengaruh MSCs yang diinduksi paclitaxel terhadap sel punca kanker payudara.

1.5. Orisinalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil
Hamideh Salehi, Siham Al-Arag, Elodie Middendorp, Csilla Gergely, Frederic Cuisinier, Valerie Orti., 2018 ¹⁷	<i>Dental pulp stem cells used to deliver the anticancer drug paclitaxel</i>	In-Vitro dan In-Vivo dengan MSCs dari pulpa; Populasi MCF-7 Payudara	Menurunkan ukuran sel kanker, meningkatkan apoptosis
A. Bonomi, E. Ghezzi, L. Pascucci, M. Aralla, V. Ceserani, L. Pettinari, V. Cocce`, A. Guercio, G. Alessandri, E. Parati, A.T. Brini, O. Zeira, A. Pessina., 2017 ²³	<i>Effect of canine mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel on growth of canine glioma and human glioblastoma cell lines</i>	In-Vitro dengan MSCs dari kaninus; Populasi Cell line CFPAC-1 Glioblastoma	Menurunkan jumlah sel kanker, meningkatkan apoptosis
Senthilkumar Kalimuthu, Prakash Gangadaran, Ramya Lakshmi Rajendran, Liya Zhu, Ji Min Oh, Ho Won Lee, Arunnehr Gopal, Se Hwan Baek, Shin Young Jeong, Sang-Woo Lee, Jaetae Lee, Byeong-Cheol Ahn., 2018 ¹⁸	<i>A New Approach for Loading Anticancer Drugs Into Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Mimetics for Cancer Therapy</i>	In-Vitro dan In-Vivo dengan MSCs dari Sumsum tulang; Populasi MCF-7 dan MDA-MB231 Kanker payudara	Menurunkan viabilitas sel kanker payudara
Catharina Melzer, Vanessa Rehn, Yuanyuan Yang, Heike Bähre, Juliane von der Ohe, Ralf Hass., 2019 ¹⁵	<i>Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells</i>	In-Vitro dan In-Vivo, Populasi A549 lung cancer, SK-OV-3 ovarian cancer, and MDA-hyb1 breast cancer cells	Menurunkan ukuran kanker, menurunkan metastasis jauh
Xiaoling Wang, Jianqing gao, Xumei Ouyang, Junbo Wang Xiaoyi sun, Yuanyuan., 2018 ²⁴	<i>Mesenchymal stem cells loaded with paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for glioma-targeting therapy</i>	In-Vitro dan In-Vivo, Populasi Glioma	Menurunkan volume tumor, menurunkan viabilitas sel tumor

Penelitian yang dilakukan oleh Salehi et al., menggunakan sumber sel punca dari pulpa gigi. Penelitian dari Bonomi et al., menggunakan caninus sebagai sumber isolasi sel punca untuk kulturnya. Penelitian yang dilakukan oleh Kalimuthu et al., Melzer et al., dan Wang et al., menggunakan berbagai

macam sumber isolasi sel punca seperti dari adiposa dan sumsum tulang. Seluruh penelitian yang ditemukan belum ada yang secara spesifik menargetkan kelompok sel punca kanker payudara. Beberapa penelitian ada yang menggunakan *cell line* yang sama, namun tidak diikuti dengan isolasi kelompok sel punca kanker. Belum ada yang secara spesifik mengukur parameter proliferasi seperti NF-kB dan gen p53 dalam penelitiannya. Atas dasar penemuan tersebut, penelitian yang dilakukan oleh peneliti saat ini masih orisinal.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. NF- κ B

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) atau Faktor nuklir kappa B merupakan molekul protein yang terletak dalam sitoplasma sel dalam bentuk inaktif dan terikat dalam sel.²⁵ Molekul ini menjalankan fungsinya untuk meregulasi inflamasi, respons imunitas, penyembuhan terhadap luka, serta apoptosis dan fungsi sel. NF- κ B merupakan kunci dari terjadinya transkripsi.²⁶ Faktor ini menghubungkan inflamasi dengan kanker yang terlibat dalam tumorigenesis dari kanker payudara dan resistensi terapi endokrin.²⁷ NF- κ B mampu membentuk kompleks faktor transkripsi yang bertindak sebagai integrator utama respon inflamasi pada penyakit malignan dan non-malignan (tumor dan kanker).^{25,26} Ketika NF- κ B teraktivasi maka akan mengikat urutan konsensus DNA (bagian: (5'-GGG[A/G]N[C/T]4CC-3')). Terdapat hubungan antara NF- κ B dan hypoxia-inducible factors (HIFs).²⁵ Fungsi Ekspresi gen NF- κ B proinflamasi akan menghilang karena teraktivasinya fungsi HIF-1 α secara in vitro pada pasien dengan karsinoma payudara invasif, meskipun tidak ada inflamasi sistemik. Sehingga sebaliknya dengan hilangnya fungsi aktivasi NF- κ B akan mengganggu induksi hipoksik sitokin proinflamasi, kadar protein HIF-1 α dan transaktivasi dalam sel dan jaringan tikus yang tidak ganas. Sehingga ini menjadi potensi pengembangan imunoterapi baru pada kanker payudara.^{25,26}

NF- κ B mengatur lebih dari 500 gen yang terlibat dalam inflamasi, perubahan seluler, kelangsungan hidup, proliferasi, angiogenesis, invasi, dan metastasis.^{28,29} Aktivasi NF- κ B telah diamati pada kanker payudara dan beberapa jenis kanker lainnya, dan berhubungan dengan onkogenesis, kelangsungan hidup sel, proliferasi, angiogenesis, metastasis, dan resistensi kemoterapi dan radio terapi. Keluarga NF- κ B termasuk RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 /10, p52/100 dan CD44 telah menjadi garis terdepan dalam penelitian kanker payudara. NF- κ B dapat memasuki nukleus (inti sel), berikatan dengan DNA dan mengaktifkan transkripsi gen targetnya. Aktivasi ekspresi CD44 dan NF- κ B berkorelasi dengan respons radiasi yang buruk dan menurunkan kelangsungan hidup pada pasien glioblastoma.³⁰

NF- κ B mengatur promosi dan progresi dalam siklus sel melalui regulasi gen-gen seperti cyclin D1, D2, D3 dan cyclin E, c-myc dan c-mycb yang berperan dalam siklus sel. Sehingga NF- κ B diduga berhubungan pula dengan aktivitas pRb melalui cyclin D1. Mekanisme anti-apoptosis NF- κ B menimbulkan konsep umum bahwa aktivasi NF κ B berperan terhadap resistensi apoptosis. Persinyalan NF-B digolongkan dalam jalur sel kanonikal (klasik) atau non-kanonikal (alternatif) melalui mobilisasi kedua kompleks heterodimer-homodimer.^{29,31} Aktivasi dan pembebasan protein NF- κ B terjadi secara khas sebagai respons terhadap sejumlah ligan ekstraseluler, serta agen yang menghasilkan respons kerusakan DNA, menghasilkan lokalisasi nuklir dimer protein pengikat DNA setelah disosiasi dari molekul I κ B. Penggambaran skema dari NF- κ B, Nuclear inducing kinase (NIK) dan Inhibitory- κ B kinase

(IKK) α dan pensinyalan sel yang dimediasi IKK β yang mencakup kaskade NF- κ B non-kanonik, kaskade NF- κ B kanonik dan jalur-jalur NF- κ B yang bergantung pada IKK α .³¹

NF- κ B terbukti meningkatkan transkripsi dalam regulasi invasi kanker dan proliferasinya, termasuk sitokin, kemokin, sel molekul adhesi dan enzim pro-inflamasi yang diinduksi.^{8,32} NF- κ B merupakan penanda transformasi epitel-mesenkim (EMT) dan invasi pada kanker payudara. Gangguan pada Apoptosis melibatkan banyak protein, salah satunya adalah molekul protein NF- κ B. NF- κ B termasuk dalam keluarga faktor transkripsi yang memiliki spektrum kerja yang luas, yakni mampu menginduksi pertahanan sel, proliferasi/pertumbuhan sel serta berperan dalam regulasi sistem imunitas dan respons inflamasi. Aktivasinya pada sel normal akan menjalankan aktivitas dalam penghambatan apoptosis sel melalui jalur mitokondria atau reseptor kematian.⁸ NF- κ B menginduksi ekspresi inhibitors of apoptosis (IAPs) dan juga dari keluarga anti-apoptosis BCL-2. NF- κ B pun mampu melakukan interferensi terhadap pada aktivitas transkripsional p53 dengan cara peningkatan gen antiapoptosis dan supresi p53 sehingga menghambat proses apoptosis yang diinduksi oleh p53.²⁵ Strategi dalam pengembangan molekul antiinflamasi ini adalah dengan peningkatan sensitasi CSC (Cancer Stem Cell) terhadap terapi endokrin dengan cara menghambat jalur seperti NF- κ B dan BCL-2 karena keluarga BCL-2 dideregulasi dalam kanker payudara dan dapat meningkatkan resistensi obat. Penargetan resistensi dimaksudkan untuk meningkatkan respons terhadap pengobatan dengan agen penargetan yang

sama (misal HER2). Down-regulasi NF- κ B menghasilkan ekspresi COX-2 yang terhambat, cyclin D1, pro-MMP2, dan MMP9. Sehingga dengan penargetan gen yang diinduksi oleh aktivasi NF- κ B, atau inaktivasi jalur NF- κ B dapat berfungsi sebagai target terapeutik untuk pengobatan Kanker Payudara.³¹

2.2. Gen p53

Gen p53 merupakan nuclear phosphoprotein dengan berat molekul 53 kDa, dikode oleh 20-Kb gen, terdiri atas 11 ekson dan 10 intron, berlokasi pada lengan pendek kromosom 17. Protein p53 terdiri atas 393 asam amino dengan beberapa domain structural dan fungsional.³³ N-terminal domain terdiri atas amino-terminal domain (residu 1-42) dan proline rich region (residu 61-94), central core domain (residu 102-292) dan C-terminal domain (residu 3 393) yang terdiri atas oligomerization domain (residu 324-355) dan carboxyl-terminal regulatory domain (residu 363-393).¹ Amino terminal domain berperan pada proses interaksi dengan faktor transkripsi. Proline-rich region menjaga stabilitas p53, tanpa proline-rich region akan menyebabkan p53 rentan terhadap proses degradasi. Central-core domain adalah region yang sering mengalami mutasi pada sel kanker dan jaringan tumor . C-terminal domain berfungsi dalam induksi kematian sel.³⁴

Banyak penjelasan mengenai fungsi p53 menyatakan bahwa induksi apoptosis adalah mekanisme kunci yang menyebabkan kematian sel kanker. Pada peristiwa apoptosis, PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis)

mediator kunci apoptosis melalui mitochondrial pathway memainkan peran yang sangat penting.³⁵

Sebagai penjaga gerbang sel salah satu peran p53 adalah untuk memonitor stres sel dan menginduksi apoptosis apabila diperlukan. Didalam jaringan dimana stres menghasilkan kerusakan yang luas dan *irreversible*, p53 dapat memulai apoptosis. Produk gen apoptosis yang diinduksi oleh p53 diantaranya adalah Bax (*Bcl-2 associated X protein*), DR5 / KILLER (death receptor 5) , Dral, Fas / CD95 (cell-death signaling receptor), PIG3 (p53 - inducible gen3), Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), Noxa (dari kata Latin untuk " bahaya " atau "kerusakan ") , PIDD (*p53-induced protein with death domain*) , PERP (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*) , Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) , Scotin, p53AIP1 (*p53-regulated apoptosis- inducing protein 1*) dan lain-lain. Gen-gen tersebut akan menginduksi apoptosis dengan intrinsic pathway (mitochondrial pathway) atau dengan extrinsic pathway (death receptor pathway).³⁶

Intrinsic apoptotic pathway berlangsung apabila terjadi stres sel. Gen yang mendominasi adalah kelompok protein Bcl-2 seperti Bax, Bid, Puma, Noxa, and p53AIP1 yang kemudian menempati mitokondria dan menimbulkan hilangnya potensial membran, kemudian sitokrom c, suatu molekul proapoptotic, dilepaskan dan menimbulkan terbentuknya kompleks apoptosom dengan Apaf-1 dan caspase 9. Caspase 9 akan mengaktifkan *downstream procaspase-3*. Protein caspase 3 mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya, seperti procaspase-6 dan procaspase-7 yang memberikan

amplifikasi terhadap kerusakan seluler. Pada extrinsic pathway, p53 menginduksi apoptosis melalui aktivasi death receptor yang terdapat pada plasma membran, diantaranya adalah Fas/CD95, DR4 dan DR5, sehingga menimbulkan hambatan produksi IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Baik DR5 and DR4 dapat memicu atau menginduksi apoptosis melalui TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), Fas ligand dan agen kemoterapi. p53 juga dapat menginduksi *apoptosis via endoplasmic reticulum-dependent mechanism* dengan cara mengaktivasi ekspresi Scotin, protein yang berlokasi di retikulum endoplasma dan membran nukleus.^{33,35,37}

Pada sebagian besar kejadian tumor pada manusia, p53 tidak hilang melainkan mengalami point mutation sehingga menghambat kemampuannya dalam berikatan dengan DNA, sebagai faktor transkripsi dan tumor suppression, mutan p53 yang diekspresikan pada sel kanker juga dikaitkan dengan tumorigenesis, invasi dan metastasis. Mutan p53 dapat mengatur gen yang terlibat dalam migrasi sel baik secara langsung maupun tidak langsung, mutan p53 diperantarai Slug atau Twist, suatu factor transkripsi yang mengatur perkembangan embrionik pada epithelial-mesenchymal transition (EMT) sehingga dapat menginduksi EMT yang bersifat parsial sehingga menyebabkan supresi sintesis E-cadherin, hilangnya E-cadherin sering dikaitkan dengan kejadian metastasis pada kanker. Supresi anti-invasive gene CCN-S/WISP2 juga bisa menimbulkan metastasis, selain itu RhoA / ROCK (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase) signalling dapat menginisiasi amoeboid migratory mode yang menyebabkan sel kanker menginvasi stroma.^{33,34,38}

Pada kanker payudara Transducer of Cdc-42-dependent actin assembly-1 (Toca-1) berfungsi untuk merekrut actin regulatory protein sehingga terjadi invadopodia yang menyebabkan meningkatnya kemampuan metastasis tumor, ketika p53 kehilangan fungsinya dikarenakan beberapa sebab, maka ekspresi Toca-1 meningkat, maka mengembalikan fungsi p53 dapat menekan terjadinya metastasis dan daya invasi tumor. p53 juga dapat menghambat angiogenesis dengan cara menghambat produksi faktor proangiogenesis seperti VEGF dan meningkatkan produksi TSP yang bersifat antiangiogenik. p53 juga menginduksi faktor angiogenik yang berasal dari kolagen yaitu endostatin dan tumstatin, hal ini dapat dibuktikan bahwa mencit yang tidak mengekspresikan prekursor tumstatin, α 3 collagen 4 menunjukkan peningkatan pertumbuhan tumor.^{39,40}

2.3. Kanker Payudara

2.3.1. Definisi

Kanker payudara adalah tumor ganas yang berasal dari kelenjar payudara dan jaringan penunjangnya yang tumbuh infiltratif, destruktif, serta dapat bermetastase.¹

2.3.2. Epidemiologi

Kanker payudara merupakan keganasan paling sering pada wanita di negara maju dan nomor 2 setelah kanker servik di negara berkembang dan merupakan 29% dari seluruh kanker yang di diagnosis setiap tahunnya. Insidensi kanker payudara tertinggi di asia sebesar 43,6% (911.014 kasus baru kanker payudara), 137.514 kasus

diantaranya terjadi di Asia Pasifik dengan angka mortalitas mencapai 50.935 kasus.²

Prevalensi kanker di Indonesia menunjukkan peningkatan dari 1,4 per 1000 penduduk di tahun 2013 menjadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018. Data terbaru yang di lansir Globocan tahun 2020 terdapat 18,1 juta kasus baru dengan angka kematian sebesar 9,6 juta kematian, dimana 1 dari 6 perempuan di dunia mengalami kejadian kanker serta 1 dari 11 perempuan meninggal karena kanker.²

Angka kejadian penyakit kanker di Indonesia (136,2 per 100.000 penduduk berada pada urutan ke 23 di asia dan pada urutan ke 8 di Asia Tenggara. Angka kejadian kanker tertinggi di Indonesia untuk perempuan adalah kanker payudara yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk.²

2.3.3. Klasifikasi

Secara garis besar, klasifikasi kanker payudara berdasarkan analisis histopatologi dikategorikan menjadi karsinoma in situ (non-invasif) dan karsinoma invasif. Tipe kanker payudara in situ selanjutnya dapat dikelompokkan menjadi dua tipe meliputi ductal carcinoma in situ (DCIS) dan lobular carcinoma in situ (LCIS).⁴¹ Tipe DCIS terjadi akibat adanya pertumbuhan abnormal sel epitel pada bagian ductus, sedangkan tipe LCIS terjadi ketika terdapat pembelahan sel tak terkontrol pada bagian lobul. Selanjutnya kedua tipe tersebut dikategorikan kembali berdasarkan bentuk pertumbuhan dan karakter

sitologis untuk membedakan keduanya. Kejadian DCIS lebih banyak dibandingkan LCIS.^{42,43}

Menurut American Cancer Association, saat ini terdapat empat subtipe molekul tumor payudara utama dengan perbedaan prognostik pada hasil pasien berdasarkan pada ekspresi atau tidak dari penanda biologis spesifik yaitu: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), dan *human epidermal growth factor receptor-2* (HER2).⁴³

Tabel 2. 1. Subtipe Kanker Payudara dan Ekspresi Penanda Biologis 43

<i>Breast cancer Subtypes</i>	<i>Immunohistochemical analysis</i>
1 <i>Luminal A</i>	<i>PR (+) and/or ER (+) and HER-2 (-), ↓Ki67</i>
2 <i>Luminal B</i>	<i>PR (+) and/or ER (+) and HER-2 (+/-), ↑Ki67</i>
3 <i>Basal Like</i>	<i>PR (-) and ER (-) and HER-2 (-)</i>
4 <i>HER enriched</i>	<i>PR (-) and/or ER (-) and HER-2 (+)</i>

Luminal A menyumbang sekitar 40% kanker payudara dan mewakili subtipe yang paling umum. Tumor ini memiliki hormon-reseptor positif (ER+ dan/atau PR+) dan HER-2 negatif. Karakteristik klinis subtipe Luminal A menggambarkan tingkat kelangsungan hidup yang tinggi; mereka adalah tumor yang kurang agresif dengan tingkat kekambuhan yang rendah (Ki67 rendah) dibandingkan subtipe lainnya dan memiliki prognosis jangka pendek yang paling baik karena respon yang baik terhadap terapi hormonal.⁴³

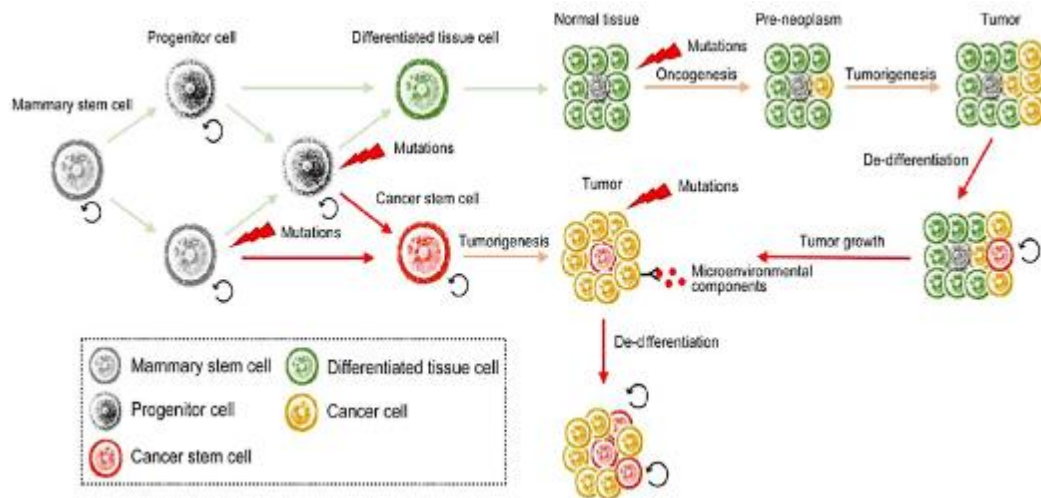
Luminal B juga merupakan hormon-reseptor positif (ER + dan/atau PR +) dan HER-2+/-, dengan prevalensi lebih rendah dari Luminal A tetapi dengan prognosis yang lebih buruk yang mewakili 10-

20% dari kanker payudara. Luminal B memiliki tingkat proliferasi tinggi (Ki 67 tinggi) tetapi masih respon terhadap terapi hormonal.⁴³

Jenis basal-like adalah tumor yang ditentukan oleh tidak adanya semua reseptor hormon (ER-, PR-, dan HER-2-) dan mewakili 10-20% dari kanker payudara. Triple negative breast cancer (TNBC) ini bersifat agresif, tingginya metastasis jauh setelah operasi, dan prognosis jangka pendek yang buruk karena kurangnya terapi target dengan aktivitas spesifik.⁴³

HER-2 yang diperkaya mewakili tumor positif reseptor hormon (ER-, PR-) dan HER-2 positif. Mereka cenderung tingkat tinggi, nodus positif, tumor agresif, dengan tingkat kelangsungan hidup yang buruk dan mewakili 10% dari kanker payudara. Berbeda dengan tumor basal-like, HER2 masih memiliki target terapi.⁴³

Sel punca kanker payudara telah terlibat dalam inisiasi tumor, perkembangan, metastasis, rekurensi, dan resistensi terhadap terapi. Asal-usul sel punca kanker payudara tetap kontroversial karena heterogenitas tumor dan adanya populasi sisi kecil seperti itu untuk studi, tetapi meskipun demikian, penanda permukaan sel dan korelasinya dengan fungsi sel punca kanker payudara terus diidentifikasi. Sel punca kanker payudara didorong oleh aktivasi jalur perkembangan yang persisten, seperti Notch, Wnt, Hippo, dan Hedgehog dan strategi pengobatan baru yang ditujukan untuk jalur ini adalah dalam pengembangan praklinis dan klinis.⁴⁴

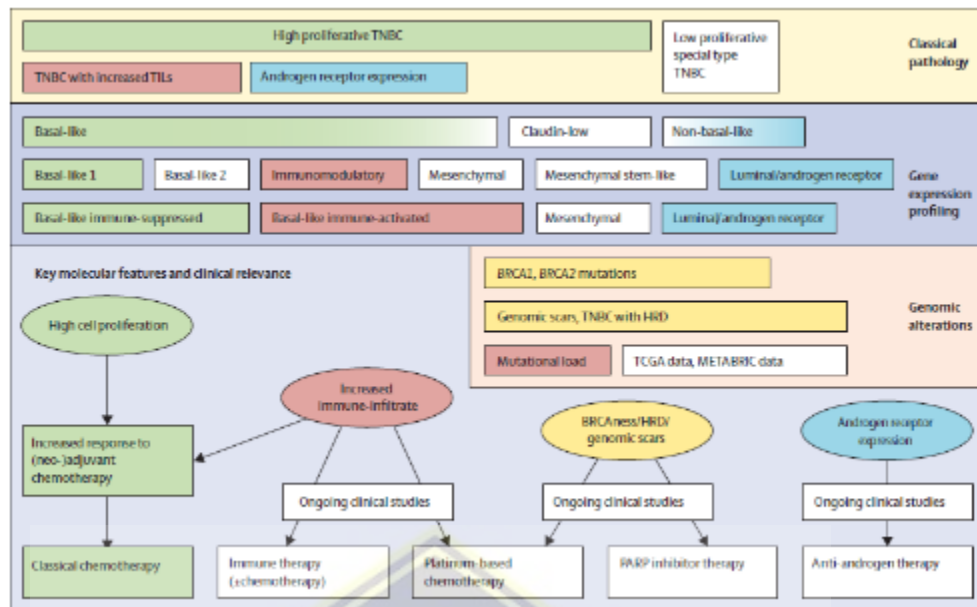


Gambar 2.1. Generasi Sel Punca Kanker Payudara.⁴⁵

2.3.4. Patogenesis

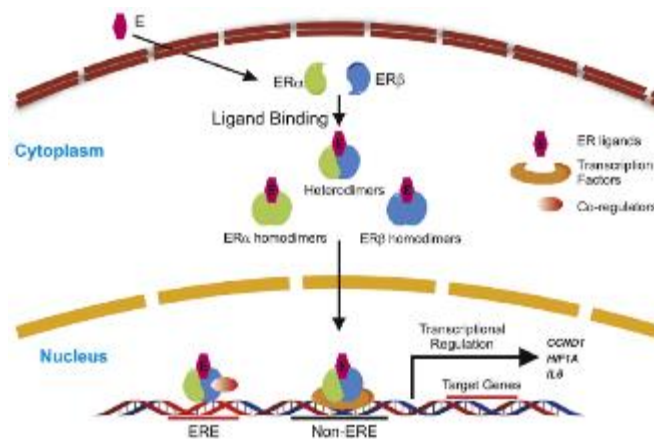
Kanker payudara biasanya terjadi karena adanya interaksi antara faktor lingkungan dan genetik. Jalur PI3K/AKT dan jalur RAS/MEK/ERK melindungi sel-sel normal dari sel apoptosis. Ketika gen-gen yang mengkode jalur-jalur perlindungan ini bermutasi, sel-sel menjadi tidak mampu melakukan apoptosis yang kemudian mengarah pada perkembangan kanker. Mutasi ini terbukti secara eksperimental terkait dengan paparan estrogen.⁴⁶

Lima sampai sepuluh persen dari semua kanker payudara muncul dari mutasi germ-line. Gen BRCA1 terletak di lengan panjang kromosom 17, sementara BRCA2 terletak di lengan panjang kromosom 13. Pasien gen positif memiliki risiko 80% terkena kanker payudara terutama pada kelompok usia pra-menopause.⁴⁷

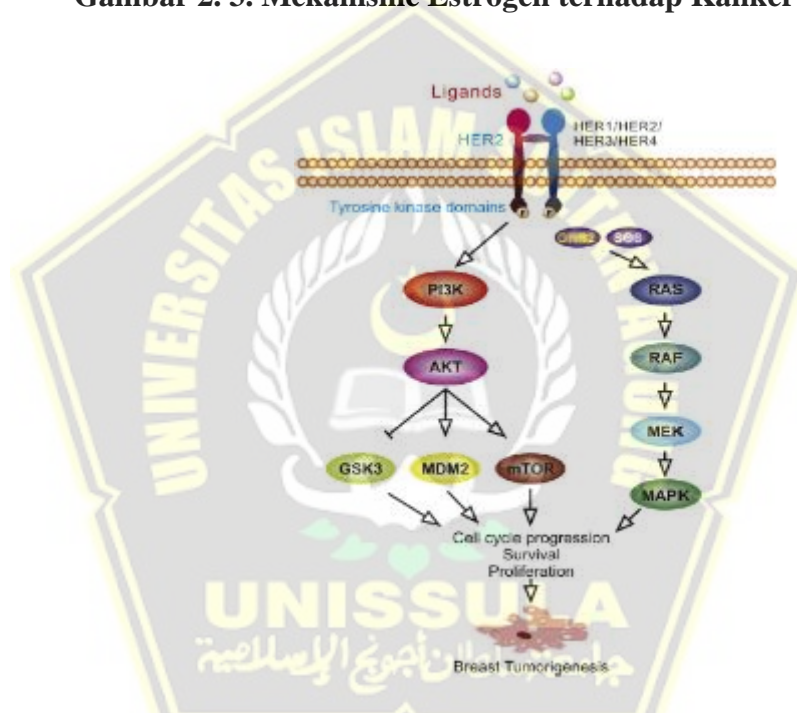


Gambar 2.2. BRCA sebagai Salah Satu Molekul yang Mengalami Perubahan pada Terjadinya Kanker Payudara.⁴⁷

Saat ini, di samping penggunaan grade, histologi, dan imunohistokimia, perubahan ekspresi gen digunakan sebagai instrumen untuk mengklasifikasikan kanker payudara. Berdasarkan metode ini, beberapa subtipe kanker payudara yang berbeda telah diidentifikasi termasuk dua subtipe utama dari ER negatif termasuk basal like dan HER-2, dan dua subtipe ER positif termasuk luminal A dan luminal B. Subtipe ini berbeda nyata dalam prognosis dan target terapeutik yang diekspresikannya.¹



Gambar 2. 3. Mekanisme Estrogen terhadap Kanker Payudara.¹



Gambar 2.4. Mekanisme Terjadinya Kanker Payudara.¹

2.3.5. Penatalaksanaan

Penatalaksanaan kanker payudara terdiri dari pembedahan, radioterapi, kemoterapi, terapi biologis (terapi target molekul/terapi imunologi, dan terapi hormonal). Pembedahan merupakan terapi utama pada kasus-kasus kanker payudara stadium awal. Jenis pembedahan

yang dapat dilakukan adalah *radical mastectomy*, *modified radical mastectomy*, *simple mastectomy*, *lumpectomy* dan *breast conserving surgery*.⁴⁸

Target terapi ditujukan pada kasus dengan ditemukannya ekspresi protein pada jaringan kanker. Terapi hormonal terutama ditujukan pada penderita kanker payudara dengan reseptor hormonal (*steroid reseptor*) yang positif, terutama ER dan PR positif.⁴⁸

2.4. Cell line Kanker Payudara

Cell line sering digunakan sebagai pengganti sel primer untuk mempelajari proses biologis. Perkembangan pengetahuan terkini mengenai kanker payudara berasal dari studi *in vivo* dan *in vitro* yang menggunakan *cell line* kanker payudara tampaknya menjadi elemen kunci untuk diagnosis molekuler pada kanker payudara.⁴⁹

Penamaan *cell line* secara umum bukan mencerminkan asosiasi fenotipnya melainkan bagaimana mereka didirikan seperti dibentuk oleh satu laboratorium yang sama, satu pasien yang sama dan lain-lain. Sebagai contohnya seri HCC *cell line* didirikan oleh Pusat Kanker Hamon, seri MDA didirikan oleh Rumah Sakit dan Institusi Tumor MD Anderson.⁴⁹

2.4.1. MDA-MB 231 Cell line

Cell line MDA-MB 231 adalah sel epitel, *cell line* ini pertama sekali ditemukan dari wanita kaukasian berusia 51 tahun yang menderita efusi pleura akibat metastasis dari adenokarsinoma payudara.⁵⁰

Cell line ini sangat agresif, invasif dan terdiferensiasi buruk pada kanker payudara triple negatif, dikarenakan *cell line* ini memiliki sedikit ekspresi reseptor estrogen dan reseptor progesteron. Sama seperti *cell line* invasif yang lain, invasif *cell line* MDA-MB 231 ini diperantarai degradasi proteolitik dan matriks ekstraseluler. Akibat MDA-MB 231 ini memiliki sedikit reseptor estrogen dan reseptor progesteron serta amplifikasi HER-2, *cell line* ini diklasifikasikan pada *cell line* “basal” pada kanker payudara. Meskipun begitu, saat ini *cell line* ini dikenali pada molekuler subtype claudin-low karena menyebabkan penurunan regulasi claudin-3 dan claudin-4, ekspresi yang rendah dari penanda proliferasi Ki-67. Banyaknya penanda ini dihubungkan dengan transisi epitel mesenkim dan ekspresi yang berhubungan dengan sel punca kanker payudara, seperti CD44⁺ dan CD24⁻.⁵⁰

Pada penanaman 3D, *cell line* ini menunjukkan morfologi yang menyerupai endotel dan ini diganggu oleh fenotif yang invasif, memiliki proyeksi stellate yang sering menjembatani koloni sel multiple. Kanker payudara triple negatif adalah bentuk kanker payudara yang agresif dengan pilihan pengobatan yang terbatas. Memahami dasar molekuler dari kanker payudara triple negatif ini sangat penting untuk perkembangan obat baru oleh karena itu banyak penelitian menggunakan *cell line* MDA-MB 231. *Cell line* MDA-MB 231 dikenal sebagai alat untuk penelitian metastasis ke tulang. Subclone *cell line*

MDA-MB 231 yang cenderung metastasis pada tulang, otak dan paru-paru tikus yang diikuti injeksi intraventrikel yang telah diisolasi, oleh karena itu *cell line* ini digunakan untuk identifikasi gen dan jalur yang berpotensi sebagai mediator metastasis pada tempat yang spesifik.⁵⁰

Sel MDA-MB-231 dikultur pada suhu 37° C dalam medium L-15 Leibovitz yang dilengkapi dengan glutamin 2 mM dan 15% serum fetal bovin. Media ini mendukung pertumbuhan sel di lingkungan tanpa ekuilibrase CO₂. Sel MDA-MB-231 harus dikultur pada kepadatan antara 1-3 x 10⁴ sel / cm² dan disubkultur ketika konfluen 70-80%.⁵⁰

MDAMB-231 *cell line* yang dibeli dari American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) tumbuh dalam medium RPMI 1640 dengan GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, AS) dan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dilengkapi dengan 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom GmbH, Berlin, Jerman) dan antibiotik pada suhu 37°C dalam ruang yang dilembapkan dengan CO₂ 5%. Untuk semua percobaan, media AIM V (Thermo Fisher Scientific) ditambah dengan 10% FBS dan amfoterisin B digunakan biakan menjadi 60-70% pertemuan. Media AIM V meningkatkan proliferasi sel pada kepadatan yang konsisten dan melekat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5%. Sel yang dipertahankan dalam AIM V berkembang biak secara nyata lebih cepat setelah kultur 5 hari dan mencapai

kepadatan tinggi setelah kultur *in vitro* selama 7 hari (masing-masing $2,56 \times 10^5$ dan $7,07 \times 10^5$ sel/ml).⁴⁹

2.5. Sel Punca Kanker Payudara

Sel punca kanker adalah subpopulasi sel yang ada dalam tumor yang memiliki kemampuan untuk memperbarui diri, memulai dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel.⁴⁴ Pada kanker payudara, populasi kecil sel telah diidentifikasi dan disebut sel punca kanker payudara. Tes pembentukan *mammosphere* adalah cara yang populer dan nyaman untuk menilai perilaku sel-sel ini. Sel punca kanker payudara distimulasi untuk berproliferasi dengan penambahan faktor pertumbuhan epidermal dan faktor pertumbuhan fibroblast dasar ke media kultur di piring kultur jaringan kepatuhan rendah.⁵¹ Sel-sel berkembang biak di bawah kondisi kepatuhan rendah ini menimbulkan sferoid, yang umumnya didefinisikan sebagai "mammosphere" dan mengandung berbagai fitur terkait sel punca, termasuk aktivasi jalur pensinyalan terkait sel punca. Lebih lanjut, laju pembentukan mammospheres berkorelasi baik dengan tumorigenisitas jaringan induk. Karena hal ini, jumlah sel pembentuk mammosfer dalam suatu populasi diperkirakan mencerminkan jumlah sel punca kanker payudara, sedangkan ukuran mammosfer dianggap mencerminkan aktivitas proliferasi mereka. Kepadatan plating yang rendah dari strategi ini memungkinkan sel punca kanker payudara untuk berkembang biak dan membentuk bola yang tidak patuh dengan agregasi terbatas, dan lebih mirip dengan struktur tumor tiga dimensi daripada strategi kultur jaringan patuh dua dimensi (2D) klasik. Tes pembentukan mammosphere dapat

digunakan untuk menghitung efisiensi pembentukan bola (% SFE) mammosphere yang berasal dari jaringan primer dan *cell line* kanker payudara.⁴⁴

Penanda permukaan sel, seperti *cluster of differentiation 44* (CD44), *cluster of differentiation 24* (CD24), dan lainnya juga digunakan untuk mengidentifikasi sel punca kanker payudara, dan *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) memungkinkan sel punca kanker payudara untuk diberi label, diurutkan, dan dimanipulasi dalam pengaturan laboratorium. Laporan awal sel punca kanker payudara mengidentifikasi subpopulasi sel CD44+/CD24-/low/ESA+/ Lin- yang mampu secara efisien membentuk tumor pada tikus telanjang dari sangat sedikit sel. Tumor yang dihasilkan mengandung sel-sel punca dan non-punca, menunjukkan bahwa kedua aktivitas pembaruan diri dan diferensiasi hadir dalam populasi seeding. Dalam beberapa tahun terakhir, marker tambahan telah diidentifikasi, termasuk *aldehyde dehydrogenase 1* (ALDH1), *cluster of differentiation 133* (CD133), dan *cluster of differentiation 49f* (CD49f), dan keberadaan marker ini sering dikaitkan dengan resistensi kemoterapi dan radioterapi. Terapi yang menargetkan sel punca kanker payudara dengan fenotipe ini sudah ada di cakrawala dan sejumlah antibodi terapeutik telah diusulkan yang menargetkan biomarker ini untuk menghilangkan sel punca kanker payudara. Juga telah dilaporkan bahwa kanker payudara triple negative memiliki ekspresi tertinggi dari biomarker ini jika dibandingkan dengan subtype kanker payudara lainnya. Tiga kanker

payudara negatif dengan fenotip CD44⁺/CD24^{lo} dikaitkan dengan prognosis yang buruk.⁴⁴

CD44: *cluster of differentiation* 44 (CD44) adalah transmembran glikoprotein permukaan sel yang mengikat hyaluronan dan terlibat dalam banyak fungsi seluler, termasuk adhesi seluler, proliferasi, ketahanan hidup, dan diferensiasi. sel punca kanker payudara menunjukkan ekspresi CD44 yang kuat dan keberadaan glikoprotein ini berperan menjaga multipotensi populasi sel punca kanker payudara. Karena ekspresinya yang tinggi, CD44 telah menjadi target terapi sel induk kanker payudara.⁴⁴

CD24: *cluster of differentiation* 24 (CD24), juga dikenal sebagai heat stable antigen (HSA), adalah sialoprotein yang meningkatkan adhesi seluler, proliferasi, dan metastasis. Ekspresi CD24 biasanya sangat rendah atau tidak ada pada sel punca kanker payudara dan penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa peningkatan regulasi CD24 menghambat pertumbuhan pada sel kanker payudara. Lebih lanjut, CD24 telah terlibat dalam kemoresistensi dalam garis sel kanker payudara, dengan sel CD24⁺ muncul dari sel CD24^{-/low} yang diobati dengan radiasi melalui transmisi ketidakstabilan genom.⁴⁴

ALDH1: *Aldehyde dehydrogenase* 1 (ALDH1) adalah anggota dari keluarga aldehyde dehydrogenase protein yang mengkatalisasi oksidasi aldehida intraseluler dan mungkin memiliki peran dalam diferensiasi awal sel punca kanker payudara melalui perannya dalam mengoksidasi retinol menjadi asam retinoat. Ekspresi ALDH1 yang meningkat mengidentifikasi sel punca kanker payudara dan berkorelasi dengan prognosis kanker payudara yang

buruk pada kanker payudara reseptor negatif. ALDH1 diukur dengan uji enzimatis (ALDEFLUOR) dan aliran cytometry. Inhibitor ALDH1 telah diperiksa sebagai terapi potensial, tetapi upaya terhambat oleh redundansi enzim dehidrogenase aldehida dan kurangnya spesifisitas dalam terapi molekul kecil. Pada kanker payudara, isoform yang diduga diekspresikan secara selektif dalam sel punca kanker payudara termasuk ALDH1A1 dan A3.⁴⁴

CD133: *cluster of differentiation* 133 (CD133), atau prominin, adalah glikoprotein permukaan sel yang terlokalisasi pada tonjolan membran seperti mikrovili dan pada permukaan apikal beberapa sel epitel. CD133+ sel punca kanker payudara terutama terkait dengan kanker payudara triple negatif dan berkorelasi dengan kelangsungan hidup yang buruk.⁴⁴

CD49f: *cluster of differentiation* 49f (CD49f) adalah integrin $\alpha 6$ yang melakukan homodimerisasi dengan integrin lain (CD24 atau (CD104) untuk mengikat laminin dan memfasilitasi adhesi sel epitel ke matriks ekstraseluler. CD49f juga bekerja sama dengan jalur transduksi sinyal untuk memfasilitasi komunikasi antara sel dan ECM. Ekspresi CD49f dikaitkan dengan prognosis yang buruk dan penurunan kelangsungan hidup pada kanker payudara.⁴⁴

CD90: *cluster of differentiation* 90 (CD90) adalah glikoprotein berlabuh GPI yang berinteraksi dengan integrin pada sel yang berdekatan. CD90 diinduksi oleh transisi epithelial-mesenchymal, dan telah diusulkan untuk diinduksi oleh sel-sel imun dalam lingkungan mikro tumor di sel punca kanker payudara. Lu et al. telah menunjukkan bahwa populasi CD90+ pada kanker payudara rangkap tiga mengandung sel punca kanker payudara.⁴⁴

Survivin: adalah anggota terkecil *dari inhibitor of apoptosis* (IAP), yang memiliki peran kunci dalam mengatur pembelahan sel dan menghambat apoptosis dengan menghalangi aktivasi caspase. Ekspresi yang menyimpang dikaitkan dengan proliferasi sel tumor, perkembangan, angiogenesis, resistensi terapeutik, dan prognosis yang buruk. Studi tentang mekanisme molekuler yang mendasarinya menunjukkan bahwa survivin terlibat dalam regulasi sitokinesis dan perkembangan siklus sel, serta berpartisipasi dalam berbagai jalur pensinyalan seperti p53, Wnt, hipoksia, transformasi faktor pertumbuhan, dan jalur pensinyalan Notch.⁵²

Kombinasi penanda ini telah digunakan untuk meningkatkan nilai prognostik di klinik. Studi klinis baru-baru ini telah menunjukkan korelasi antara keagresifan kanker payudara triple negative dan fenotip CD44+ / CD24-/low. Pada hakekatnya bentuk kanker payudara itu berbeda-beda, dengan subkategori klinis-patologis berdasarkan pewarnaan imunohistokimiawi berupa reseptor estrogen, reseptor progesteron, atau HER2. Baru-baru ini, kanker payudara telah dikategorikan pada tingkat molekuler menggunakan profil ekspresi gen ke dalam kategori tambahan luminal A, luminal B, basal-like, diperkaya HER2, dan claudin-low. Kanker payudara triple-negatif mencakup setidaknya 4 subtipe molekuler. Pertanyaan yang tersisa adalah apakah subkategori kanker payudara ini muncul dari garis keturunan sel induk yang sama atau berbeda. Sel-sel progenitor yang berbeda dapat menimbulkan berbagai subtipe kanker payudara dan studi awal penanda permukaan sel dalam *cell line* kanker payudara menunjukkan bahwa leukemia dan sel punca kanker

payudara mungkin memiliki beberapa garis keturunan. Menariknya, studi ekspresi gen telah menunjukkan bahwa berbagai subtipe kanker payudara dapat muncul dari garis keturunan nenek moyang yang berbeda, tetapi mungkin tidak dengan cara yang dapat diprediksi. Sebagai contoh, basal-like cancer yang timbul pada wanita yang positif untuk BRCA1 cenderung timbul dari sel-sel progenitor luminal. Lebih lanjut, ada bukti yang menunjukkan bahwa sel punca kanker payudara menampilkan plastisitas seluler di mana sel-sel ini dapat bertransisi dari epithelial to mesenchymal (EMT) atau mesenchymal to epithelial (MET) berdasarkan sinyal dari lingkungan mikro tumor.⁴⁴

Survivin telah terbukti berhubungan dengan angiogenesis dengan berinteraksi dengan faktor pertumbuhan endotel vaskular, angiopoietin, dan faktor pertumbuhan fibroblast dasar, serta mengatur perilaku metastatik pada tikus dan manusia dengan mengaktifkan berbagai sinyal. Mekanisme ini menunjukkan bahwa survivin memiliki kemampuan invasif pembuluh darah dan metastatik dalam perkembangan tumor.^{7,53}

2.5.1. Jalur Sinyal Sel Punca Kanker Payudara

Banyak jalur pensinyalan terlibat dalam regulasi sel induk mammae normal, termasuk Notch, Hedgehog, Wnt, dan Hippo. Pada sel punca kanker payudara, jalur ini dideregulasi dan mungkin merupakan mekanisme resistensi tumor, rekurensi, dan metastasis. Ada banyak terapi dalam pengembangan praklinis atau dalam uji klinis yang menargetkan jalur ini baik sendiri atau dalam kombinasi dengan standar

perawatan, kemoterapi sistemik untuk berbagai tumor, termasuk payudara.⁴⁴

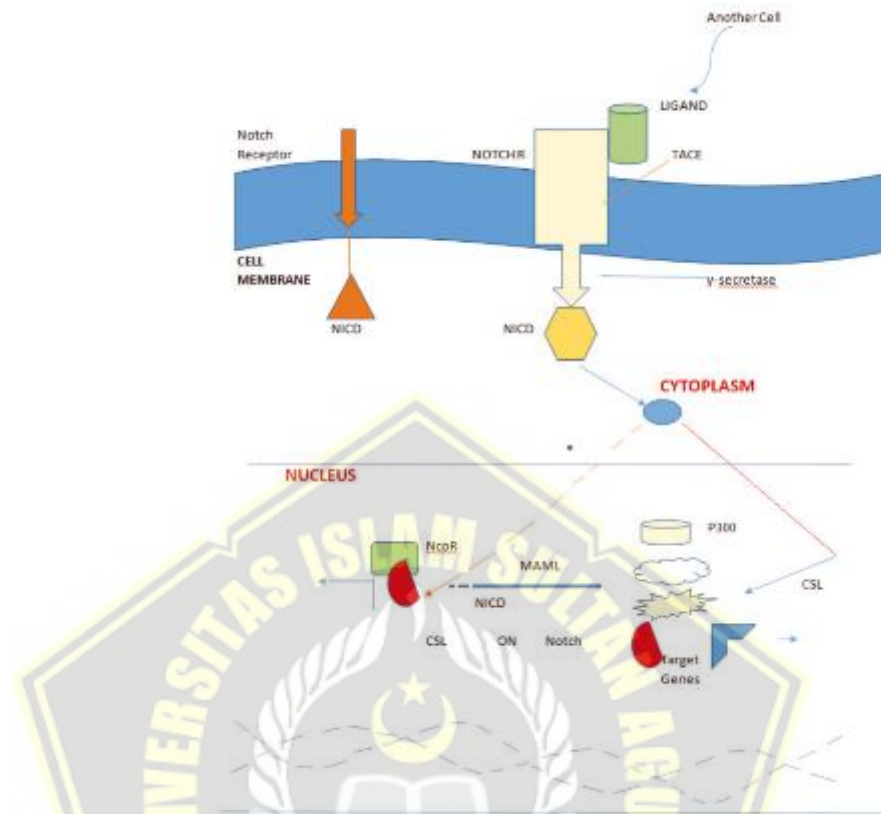
1. Jalur Sinyal Notch

Pensinyalan notch adalah jalur kompleks yang dipreservasi yang terlibat dalam embriogenesis, diferensiasi, penentuan nasib sel, proliferasi, dan pemeliharaan sel punca. Dalam mamalia, ada empat reseptor notch, notch1-4, dan lima ligan yang diketahui Jagged1 dan 2, dan delta-like1, 3 dan 4. Pensinyalan canonical notch diaktifkan melalui interaksi antara ligan transmembran dan reseptor pada sel tetangga. Reseptor notch mengalami pembelahan oleh ADAM10 atau ADAM17/TACE, yang diikuti oleh pembelahan proteolitik akhir oleh -secretase untuk melepaskan notch intracellular domain (NICD). NICD mentranslokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan kompleks transkripsional notch yang mencakup mastermind-like (MAML) dan CSL. Kompleks ini mengaktifkan transkripsi gen target notch, seperti keluarga gen HES dan HEY, CYCLIN D1, dan C-MYC. Pensinyalan Non-kanonik telah ditunjukkan dalam beberapa tipe sel, termasuk sel imun, dan penelitian terbaru tentang infiltrasi kekebalan dan penghindaran kekebalan sel kanker membuat area yang tidak diketahui ini kedepan.⁴⁴

Pensinyalan notch melalui notch4 sangat penting untuk perkembangan kelenjar susu normal, dan ekspresi notch hadir

dalam MaSC normal. Studi-studi awal ini menunjukkan bahwa pensinyalan notch yang menyimpang dapat terlibat dalam pembentukan tumor melalui pembaharuan diri sel induk kelenjar susu yang dideregulasi. Penghambatan pensinyalan notch menggunakan pendekatan farmakologis dan genomik mengurangi populasi sel punca kanker payudara dan mengurangi pembentukan mammosphere dalam *cell line* kanker payudara, sel primer, dan model tikus dari kanker payudara. Studi klinis menunjukkan bahwa ekspresi Notch1 adalah penanda prognostik yang buruk untuk kanker payudara dan berkorelasi dengan penanda sel punca kanker payudara, stadium TNM lanjut, dan kelangsungan hidup bebas penyakit yang lebih pendek. Resistensi terhadap terapi dianggap didorong oleh sel punca kanker payudara dan interaksi Jagged1-notch4 terbukti menjadi pemain kunci dalam kanker payudara yang resisten ER+ melalui aktivitas sel punca kanker payudara. Lebih lanjut, terapi endokrin pada kanker payudara luminal mempromosikan pembaharuan diri CD133+ sel punca kanker payudara dengan menginduksi peralihan dari mekanisme yang bergantung pada ER ke pensinyalan IL6 / notch3. Notch juga menjadi perantara EMT dengan mengatur produksi faktor-faktor, seperti Twist, Snail, Slug, dan E-cadherin. Pensinyalan notch sering secara tidak sengaja diaktifkan oleh hipoksia, seperti dalam lingkungan mikro tumor atau dalam ceruk sel induk, menyiratkan

peran Notch dalam pembaruan diri sel punca kanker payudara dan EMT.⁴⁴



Gambar 2.5. Jalur Pensinyalan Notch⁴³

Sistem pensinyalan notch adalah pengatur utama tujuan dan diferensiasi sel. Ekspresi notch diatur oleh hipoksia dan sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, dan leptin) dan diaktifkan oleh pengikatan ligan. Setiap jenis sinyal proangiogenik dapat memengaruhi sel endotel untuk berevolusi menjadi ujung atau norma sel induk. Pensinyalan ini diidentifikasi oleh empat reseptor notch, notch-1, notch-2, notch-3, dan notch-4; ada lima ligan terkait, Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1 (Dll-1), Dll-3, dan Dll-4; semua molekul protein ini terikat pada membran, melakukan sinyal parakrin dan

ada pada pembuluh arteri dan bukan pembuluh darah. Pensinyalan notch semata-mata bergantung pada pengikatan reseptor notch dan ligan delta/serrate melalui endositosis dan proses komunikasi sel ke sel. Tumor yang memperoleh profil ekspresi tinggi dari ligan notch adalah fakta yang tak terbantahkan yang mengaitkannya dengan perilaku klinis agresif mereka. Molekul protein Dll-4 ditemukan dalam angiogenesis fisiologis dan patologis. Protein Dll-4 berfungsi sebagai regulator negatif dalam tumorigenesis dan sebagai regulator positif dalam perkembangan tumor. Kehadiran dan ekspresi Dll-4 dalam sel neoplastik menghasilkan pembatasan perkembangan pembuluh darah baru, sementara mereka secara bersamaan memicu pembentukan pembuluh darah berdiameter besar dengan kemampuan perfusi dan oksigenasi yang memadai.⁴³

Titik awal untuk upregulasi Dll-4 adalah regio luminal endotel arteri. Peningkatan regulasi ligan Dll-4 dalam sistem kardiovaskular memandu sprouting pembuluh darah baru. Deregulasi ligan Dll-4 memiliki dampak negatif pada pembentukan pembuluh darah. Pembuluh baru memang sedang dibangun tetapi kemampuan fungsionalnya dibatasi, fakta ini menyebabkan pertumbuhan tumor terganggu. Penurunan regulasi ligan Dll-4 menghasilkan penampilan pembuluh darah nonfungsional baru dalam neoplasma. Pembuluh darah

nonfungsional ini benar-benar tidak mampu membawa darah ke neoplasma dan menghasilkan pertumbuhan tumor minor.⁴³

Blokade jalur notch dapat menunjukkan perbaikan dalam menangani kanker payudara berulang. Hal tersebut dikarenakan blokade tidak hanya dapat menurunkan populasi sel punca kanker payudara pada tumor tetapi juga mencegah aktivasi notch yang disebabkan oleh terapi. Misalnya, pensinyalan Notch berada dalam loop umpan balik dengan pensinyalan VEGFR-1 dan VEGFR-2, yang mengatur angiogenesis tumor. Inhibitor VEGF antiangiogenik dapat mengaktifkan pensinyalan notch, yang mengarah ke pertumbuhan tumor. Selain itu, pengobatan trastuzumab atau tamoxifen juga dapat secara tak terduga memicu aktivasi Notch. Ini menyarankan obat konvensional dalam kombinasi dengan Notch inhibitor dapat membantu mencapai respon yang lebih baik terhadap terapi antikanker dan meminimalkan risiko kekambuhan.⁴⁵

2. Jalur Sinyal Wnt

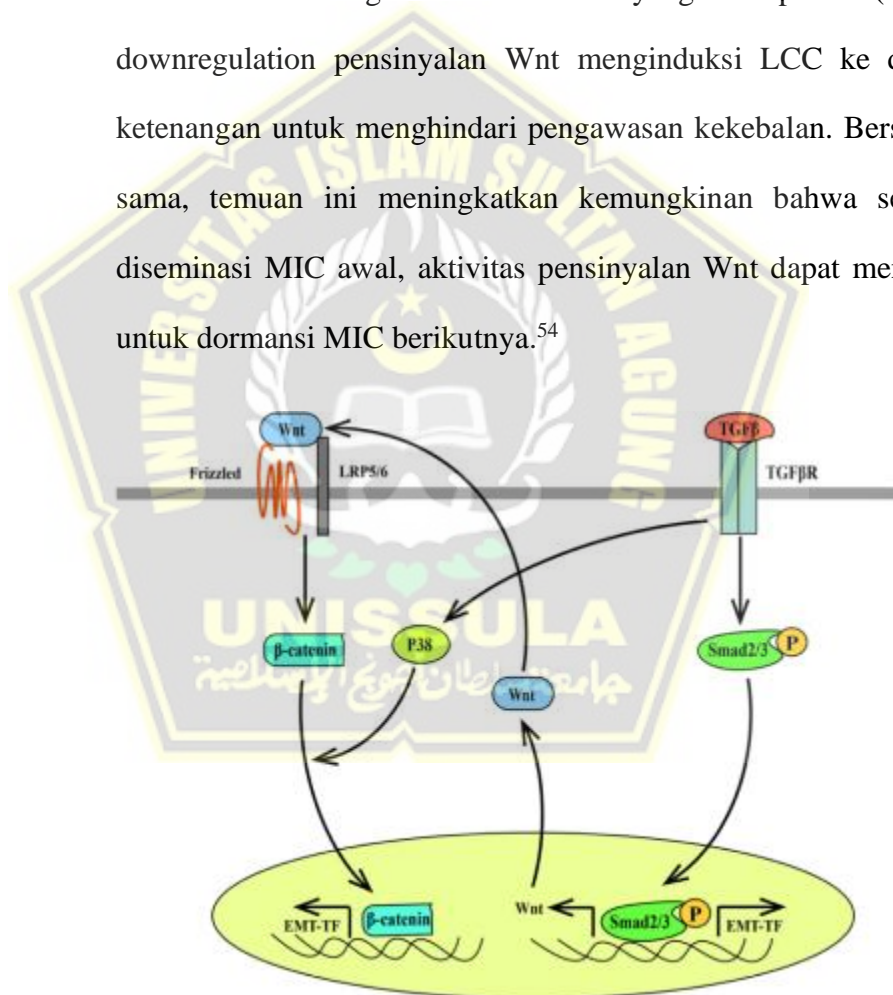
Sejak ditemukannya gen wnt pertama, wnt1 (awalnya bernama int-1), 19 gen Wnt manusia telah diidentifikasi. Gen-gen ini menyandikan sekelompok glikoprotein tersekresi yang sangat terkonservasi, yang sangat penting untuk perkembangan embrio dan homeostasis jaringan dewasa. Protein FZD adalah tujuh reseptor transmembran untuk ligan Wnt. Ada 10 anggota dalam

keluarga FZD, berbagi CRD ekstraseluler yang dikonservasi dimana ligand Wnt mengikat. LRP5 dan LRP6 adalah koreptor untuk ligan Wnt. Baik FZD dan LRP5/6 diperlukan untuk jalur wnt/ β -catenin.⁵⁴

Secara konvensional, jalur wnt didefinisikan sebagai kanonik dan nonkanonik sesuai dengan keterlibatan pensinyalan β -catenin. Beberapa anggota dalam keluarga Wnt seperti Wnt1 dan Wnt3a berikatan dengan FZD dan LRP5/6, yang mengarah ke pemisahan kompleks pendegradasi β -catenin di mana β -catenin difosforilasi oleh GSK3 β . Akibatnya, β -catenin dalam sitoplasma lolos dari fosforilasi dan degradasi berikutnya dan mentranslokasi ke nukleus, di mana ia bergabung dengan TCF/LEF, sehingga mempromosikan transkripsi beberapa gen target. Jalur nonkanonik Wnt tidak tergantung pada β -catenin, dan biasanya diprakarsai oleh Wnt5a dan Wnt11. Sampai sekarang, beberapa protein yang disekresikan telah ditemukan bersifat antagonis terhadap pensinyalan Wnt, termasuk SFRP, DKK dan WIF-1.⁵⁴

Telah diterima secara luas bahwa metastasis adalah peristiwa awal dalam perkembangan kanker. Menggunakan tikus transgenik HER2, penelitian telah menunjukkan bahwa sel-sel kanker payudara dapat menyebar pada stadium tumor awal, dan EMT yang diinduksi oleh pensinyalan Wnt kanonik dan nonkanonik berkontribusi pada penyebaran awal. Sel-sel awal yang disebarluaskan ini menunjukkan karakteristik seperti batang dan

memiliki kemampuan mengawali tumor.⁵⁵ Mereka diam, tetapi mereka dapat melepaskan dari dormansi yang mengarah ke metastasis jauh. Oleh karena itu, mereka juga didefinisikan sebagai MIC yang mungkin bertanggung jawab untuk metastasis tumor bahkan bertahun-tahun setelah pengangkatan tumor primer. Khususnya, satu studi baru-baru ini menunjukkan bahwa selama dormansi, DKK1 menekan pensinyalan Wnt dalam MIC yang didefinisikan sebagai kanker laten yang kompeten (LCC); downregulation pensinyalan Wnt menginduksi LCC ke dalam ketenangan untuk menghindari pengawasan kekebalan. Bersamaan, temuan ini meningkatkan kemungkinan bahwa setelah diseminasi MIC awal, aktivitas pensinyalan Wnt dapat menurun untuk dormansi MIC berikutnya.⁵⁴



Gambar 2. 6. Hubungan Silang antara Transformasi Jalur Faktor Pertumbuhan Beta (TGF-β) dan Jalur Wnt / β-catenin dalam Induksi Kanker Payudara.⁵⁴

Pensinyalan Wnt/Frizzled/ β -catenin mempertahankan pertumbuhan payudara yang biasa serta terlibat dalam perkembangan kanker dan ditemukan menjadi terlalu aktif pada 50% pasien kanker payudara yang menyertai kelangsungan hidup yang buruk. Ini mengontrol masa depan sel selama perkembangan embrio dan dalam pembaruan sel-sel usia dewasa. Protein dari keluarga Wnt memicu transfer β -catenin ke nukleus dan memulai transkripsi gen yang terlibat dalam menentukan diferensiasi sel, pembelahan asimetris, migrasi dan polaritas sel.⁵¹

Penghambatan pensinyalan ini menghambat pertumbuhan susu dan mengubah proliferasi yang disebabkan oleh kehamilan. Bahkan pensinyalan Wnt yang diregulasi meningkatkan ekspansi sel-sel progenitor preneoplastik dalam kelenjar susu tikus yang dimodifikasi secara genetik. Dibandingkan dengan sel-sel induk normal, sel punca kanker payudara menunjukkan aktivasi lebih dari pensinyalan Wnt, dan penghambatannya menurunkan mammosphere dengan cara yang bergantung pada estrogen receptor. Baru-baru ini, penulis menemukan bahwa sinyal β -catenin dan PI3K/Akt dikendalikan oleh pensinyalan AhR yang menyebabkan resistensi terhadap kemoterapi dan pembaruan sel punca kanker payudara. Bahkan, overekspresi neuropilin 1 (NRP-1), yang merupakan aktivator jalur Wnt/ β -catenin menghasilkan sel

punca seperti ciri-ciri dalam sel kanker payudara dan pembentukan tumor.⁵¹

Karena itu, obat-obatan yang mengintervensi jalur pensinyalan Wnt mungkin memberikan hasil klinis yang lebih baik dengan menargetkan pengembangan sel punca kanker payudara. Sebagai contoh, sulforaphane memuat nanopartikel dalam kombinasi dengan docetaxel (Huang, J. et al., 2016), pyrvinium pamoate, dan pengobatan phosphosulindac (OXT-328) yang sangat menghambat pembaruan diri dari sel punca kanker payudara dengan menurunkan regulasi β -catenin yang menekan sel punca kanker payudara, EMT dan resistensi terapeutik.⁵¹

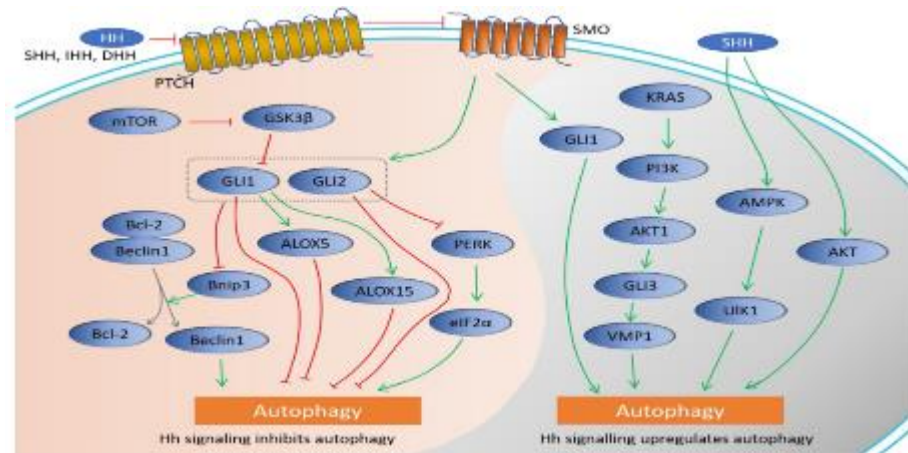
3. Jalur Sinyal Hedgehog (Hh)

Jalur pensinyalan hedgehog (Hh) mengatur berbagai proses perkembangan, termasuk embriogenesis, proliferasi sel, masa depan sel, dan pola jaringan pada vertebrata. Pada orang dewasa, aktivitas pensinyalan Hh yang terkontrol sangat penting untuk penyembuhan luka, regenerasi jaringan, dan pemeliharaan homeostasis. Namun, aktivasi jalur ektopik Hh telah didokumentasikan bertanggung jawab untuk tumorigenesis, perkembangan, metastasis, dan resistensi obat dari berbagai kanker, termasuk basal cell carcinoma (BCC), medulloblastoma (MB), dan banyak tumor padat dan hematologis lainnya. Karena keterlibatan yang luas ini pada kanker, jalur Hh telah muncul

sebagai target yang menarik untuk terapi kanker. Selama dua dekade terakhir, rangkaian upaya telah didedikasikan untuk pemahaman mendasar tentang jalur Hh, serta pengembangan modulator jalur Hh tingkat klinis.⁵⁶

Jalur Hedgehog (Hh) mengontrol proses perkembangan yang kompleks dalam vertebrata. Aktivasi abnormal jalur Hh bertanggung jawab untuk tumorigenesis dan pemeliharaan beberapa kanker, dan dengan demikian mengatasi ini merupakan peluang terapeutik yang menjanjikan. Dalam beberapa tahun terakhir, dua inhibitor Hh telah disetujui untuk pengobatan basal cell carcinoma (BCC) dan menunjukkan hasil klinis yang baik.⁵⁶

Sebagai salah satu pemain utama dalam sistem pensinyalan sel, jalur Hh berinterplays dengan beberapa jalur onkogenik, seperti PI3K/AKT/mTOR, RAF/MAPK/ERK, dan jalur KRAS. Meskipun peran dan mekanisme autophagy atau pensinyalan Hh sendirian dalam kesehatan manusia dan penyakit telah dipelajari secara intensif sejak beberapa dekade yang lalu, hubungan silang di antara mereka belum terungkap sampai beberapa tahun terakhir. Pada gambar 2.8 menunjukkan hubungan silang antara jalur Hh dan autophagy berdasarkan dua kategori: pensinyalan Hh menghambat autophagy dan pensinyalan Hh mempromosikan autophagy.⁵⁶



Gambar 2.7. Hubungan Silang antara Pensinyalan Hh dan Autofagi berdasarkan Bukti Saat Ini.⁵⁶

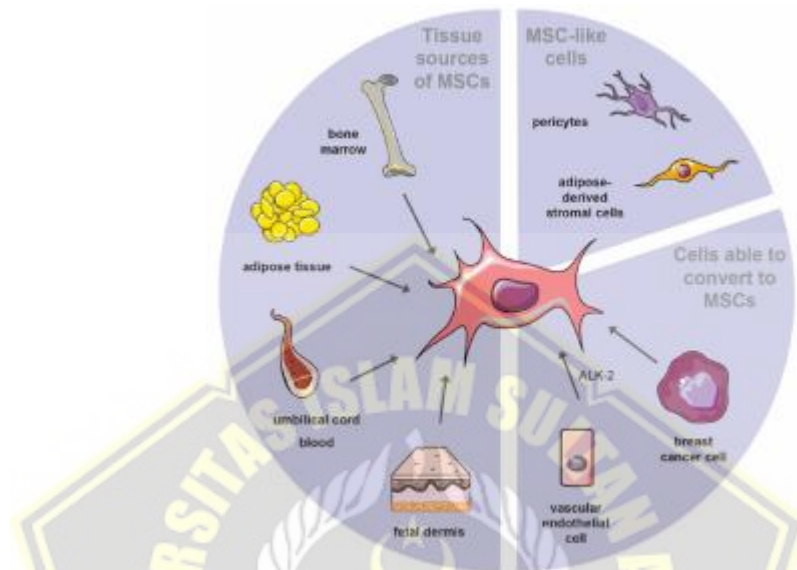
2.6. Mesenchymal Stem Cells

2.6.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel yang bersifat multipotensi sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel dewasa lain seperti osteosit, adipositas, dan neurosit. Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari beberapa jaringan antara lain jaringan adipose, folikel rambut, hingga *Wharton Jelly* dari tali pusat.⁵⁷ Secara umum, MSC diidentifikasi sebagai sel yang dapat menempel pada permukaan plastik dan bentuk menyerupai sel fibroblast atau jarum. Secara fenotipe, MSC yang diisolasi dari tikus, dimana MSC tikus tidak mengekspresikan beberapa marker spesifik antara lain CD44 dan CD29, namun mengekspresikan marker spesifik CD45 dan CD31 dan bersifat osteogenic⁵⁸.

2.6.1. Sumber MSC

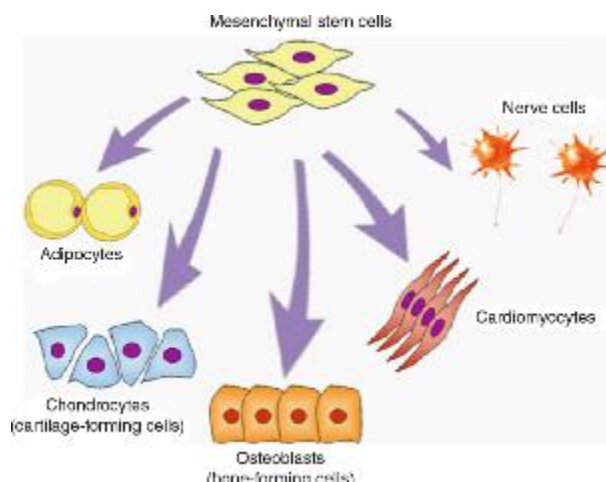
MSC dapat diperoleh dari beberapa jaringan antara lain sumsum tulang, jaringan adiposa, folikel rambut, *warthonjelly* dari tali pusat, dan plasenta⁵⁷.



Gambar 2.8. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSC)⁵⁹

2.6.1. Karakteristik MSC

MSC memiliki beberapa karakteristik antara lain memiliki kemampuan *self renewal*, mampu berdiferensiasi menjadi beberapa sel dewasa seperti, seperti osteoblas, adiposit, kondrosit, tenosit, dan miosit⁶⁰. Selain itu MSC juga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena mampu mengekspresi beberapa sitokin baik pro atau pun anti inflamasi.⁶¹



Gambar 2.9. Kemampuan diferensiasi dari MSC ⁶²

2.7. Paclitaxel

Paclitaxel merupakan obat kemoterapi golongan taxane yang telah digunakan sejak 2 dekade terakhir sebagai anti-tumor yang efektif untuk berbagai keganasan, misalnya kanker ovarium, paru, payudara, kepala dan leher, dan sebagainya. Obat tersebut telah banyak diteliti dan memiliki aktivitas praklinik, mekanisme kerja, dan spektrum aktivitas klinik yang serupa.¹¹

Kemoterapi golongan taxane bekerja dengan berikatan pada tubulin subunit β , menginduksi polimerisasi tubulin dan menstabilkan mikrotubulus. Mikrotubulus yang dihasilkan dengan kemoterapi golongan taxane resisten terhadap penguraian. Hal ini mengakibatkan gangguan proses mitosis dan akhirnya mengakibatkan apoptosis atau kematian sel.¹² Kemoterapi golongan taxane bekerja pada siklus sel fase G2-M. Selain berikatan dengan tubulin, kemoterapi golongan taxane juga memiliki aktivitas fosforilasi onkoprotein yang menghambat apoptosis yaitu BCL-2. Diperkirakan bahwa fosforilasi BCL-2 menginaktivasi onkoprotein dan memicu terjadinya apoptosis.⁹

Pada penelitian awal, paclitaxel yang diberikan secara infus menunjukkan farmakokinetik yang bersifat linear, namun penelitian-penelitian berikutnya menunjukkan bahwa farmakokinetik paclitaxel bersifat non-linear disebabkan kejenuhan distribusi, metabolisme, dan eliminasinya. Farmakokinetik bersifat non-linear ini terutama terlihat pada infus selama 3 jam. Karena sifatnya yang non-linear, tidak terdapat kaitan proporsional antara dosis dan AUC. Paclitaxel berikatan dengan protein plasma (95%).¹¹

Paclitaxel mengalami metabolisme di hati, yang diperantarai oleh cytochrome P450 isoform CYP2C8 dan CYP3A4 yang berperan minor. Sebagian besar dosis paclitaxel diekskresi melalui empedu, hanya sekitar 1-12% diekskresi melalui urin dalam bentuk utuh. Rerata waktu paruh eliminasi terminal paclitaxel sekitar 3-50 jam.⁹

2.8. Peran induksi Paclitaxel terhadap MSCs

2.8.1. Kemampuan MSCs dalam menyerap obat anti kanker

Sel punca mesenkimal dapat menyerap sebagian besar obat antikanker dari lingkungan kultur. Mempertimbangkan kemampuan ini, metode sederhana telah digunakan untuk memasukkan human Bone Marrow-MSCs (hBM-MSCs) dengan obat-obatan. Inkubasi hBM-MSC dengan paclitaxel, gemcitabine dan sorafenib memberikan hasil penyerapan obat yang efektif.¹⁵ Sebaliknya, hBM-MSC yang diinkubasi dengan pemetrexed tidak dapat menginternalisasi obat yang cukup untuk mempengaruhi mesothelioma.¹⁸ Melalui metode paparan sederhana, human Adiposa Derived-MSCs (hAD-MSCs) mampu

menyerap cisplatin, kationik platinum (II)-kompleks, dan paclitaxel. MSC yang berasal dari pulpa memiliki kemampuan untuk menyerap paclitaxel, doxorubicin, dan gemcitabine. Jumlah obat yang dapat masuk per sel tergantung pada jenis sumber MSCs. Setiap hBM-MSc dapat menyerap sekitar 2,7 pg paclitaxel per sel, yang setara dengan 8% dari total obat dalam media kultur paclitaxel (Pessina et al., 2011), sedangkan Human-Olfactory Bulb Neural Stem Cells (Hu-OBNCs) mampu menginternalisasi 0,19 pg/sel dari paclitaxel.^{17-19,23}

Berdasarkan jenis obat, ada tiga mekanisme penyerapan obat antikanker ke dalam MSCs yaitu transport aktif, difusi sederhana, dan endositosis. Gemcitabine sebagai analog nukleosida hidrofilik memasuki sel dengan pengangkut nukleosida. Human Concentrative Nucleoside Transporter 1 (hCNT1) dan human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) adalah pengangkut utama gemcitabine. Tingkat ekspresi hCNT1 dan hENT1 yang tinggi dalam MSCs, yang menghasilkan efek antiproliferatif yang lebih tinggi dari gemcitabine yang diinternalisasi, hal ini menunjukkan bahwa kapasitas serapan mungkin dikaitkan dengan ekspresi beberapa pengangkut.²² Sebagai mekanisme internalisasi obat selanjutnya, difusi sederhana dapat dipertimbangkan menurut sifat lipofilik paclitaxel, docetaxel, camptothecin, dan etoposida. Proses endositosis seperti pinositosis, fagositosis, dan endositosis yang dimediasi reseptor adalah mekanisme selanjutnya dari penyerapan obat. Keberadaan struktur pinositotik

dalam sitoplasma GinPa-MSC menyiratkan bahwa paclitaxel dapat diinternalisasi oleh GinPa-MSC melalui pinositosis. CD14 terutama diekspresikan dalam sel, yang memainkan peran penting dalam aksi fagositosis. Pengamatan ekspresinya menunjukkan fungsi fagositik GinPa-MSCs untuk menggabungkan obat-obatan. Tingkat ekspresi yang tinggi dari endositosis mediator clathrin dalam hAD-MSCs menunjukkan bahwa obat mungkin menginternalisasi melalui endositosis yang dimediasi reseptor.^{14,63,64}

2.8.2. Kemampuan MSC dalam melepas Obat Antikanker

MSCs yang diinduksi agen anti kanker mampu menghasilkan sistem penghantaran obat kemoterapi yang mampu melepaskan obat secara lokal dan perlahan untuk memberikan konsentrasi yang efisien dalam lingkungan mikro tumor dan mengurangi toksisitas sistemik obat. MSC dapat melepaskan obat antineoplastik dengan cara yang bergantung pada waktu yang menjadikannya sistem penghantaran obat yang diinginkan. Kemanjuran pelepasan obat tergantung pada sel dan jenis obat.^{17,65} Misalnya, hBM-MSC yang telah mengandung obat mulai melepaskan 1 pg/sel paclitaxel setelah 2 jam, yang meningkat menjadi 1,7-2,0 pg/sel pada 144 jam. Sekitar 20% sorafenib yang terinternalisasi dilepaskan selama 4 jam pertama, dan 60% obat dilepaskan dalam 48 jam, yang menunjukkan pola bifasik dalam hBM-MSC. hBM-MSC memiliki kemampuan lebih dari hAD-MSC untuk melepaskan paclitaxel, tetapi kedua sel tersebut mampu melepaskan

paclitaxel dengan cara yang bergantung pada waktu. Selama 24 jam pertama, hAD-MSCs melepaskan sebagian besar paclitaxel yang terkandung, dan hanya sejumlah kecil obat yang dilepaskan dalam 48 dan 144 jam berikutnya. Sekitar 52% paclitaxel yang diinternalisasi dilepaskan dari Hu-OBNSCs 24 jam setelah priming. Evaluasi kapasitas pelepasan hAM-MSCs yang diberi paclitaxel mengungkapkan bahwa 59% dari total obat yang diinternalisasi dilepaskan setelah 48 jam; namun, pelepasan obat tetap dilanjutkan selama 120 jam. Perbedaan antara kapasitas pelepasan mungkin mencerminkan hidroliposolubilitas obat yang berbeda. Misalnya, GinPa-MSCs melepaskan 62,6% dari paclitaxel, 91,8% dari gemcitabine, dan 100% dari doxorubicin. Paclitaxel memiliki lipofilisitas yang lebih tinggi, yang dilepaskan dalam jumlah yang lebih rendah, sedangkan kelarutan dalam air menghasilkan pelepasan gemcitabine dan doxorubicin yang lebih tinggi.¹⁹

Untuk menemukan kompartemen seluler, yang bertanggung jawab untuk penyimpanan obat, perlu untuk melacak obat antikanker di membran dan sitoplasma MSCs. Paclitaxel dapat ditemukan bersama dengan jaringan mikrotubulus, di aparatus Golgi dan vesikel hBM-MSC yang diturunkan dari Golgi. Vesikel ini ditemukan dekat dengan membran sel yang menjelaskan kemungkinan kapasitas pelepasan obat. Vesikel yang disekresikan dari MSCs mengandung paclitaxel yang telah diinternalisasi, yang secara signifikan menginduksi efek

antineoplastik terhadap sel adenokarsinoma pankreas duktal. Tidak ada interaksi membran plasma seperti gap junction atau struktur junctional antara sel tumor dan MSCs. Studi menunjukkan bahwa MSC dan sel kanker berkomunikasi melalui vesikel ekstraseluler yang memainkan peran penting baik sebagai kendaraan biologis untuk obat dan/atau partikel endogen.^{14,23,24,66}

2.9. Peran MSCs yang diinduksi Paclitaxel terhadap Sel Kanker

MSC yang mengandung obat diterapkan dalam dua cara berbeda: media kondisi (CM) dan sel pembawa obat. Media kondisi MSC yang mengandung obat mengandung secretome, yang didefinisikan sebagai sekumpulan faktor yang disekresikan ke ruang ekstraseluler. Faktor-faktor ini terutama terdiri dari lipid, protein, asam nukleat bebas, dan vesikel ekstraseluler. Media kondisi MSC yang mengandung obat menghasilkan efek antikanker yang lebih bertarget daripada obat kemoterapi murni. Sistem pelepasan obat MSC meningkatkan kemanjuran obat yang dimuat melalui pelepasan vesikel ekstraseluler.¹⁹ Penerapan CM yang bersumber dari MSC memberikan keuntungan termasuk evaluasi dosis dan potensi, menyediakan sumber yang dapat disimpan, pengurangan prosedur biopsi sel invasif, dan masalah keamanan terkait. Injeksi MSC yang mengandung obat, yang mengarah ke komunikasi sel-sel langsung, adalah cara lain yang menyebabkan transportasi obat langsung antara MSC dan sel kanker. Penerapan MSC sebagai pembawa obat sederhana dan menyediakan sistem pelepasan berkelanjutan biologis untuk memberikan obat kemoterapi selama periode tertentu. MSC yang

mengandung obat menginduksi efek antineoplastik melalui penghambatan proliferasi, menginduksi sitotoksitas terhadap sel tumor, penghambatan angiogenesis dan metastasis, dan perubahan sekresi sitokin MSCs.^{14,18,19}

Kokultur sel kanker dengan MSCs yang mengandung obat digunakan untuk mengevaluasi efek antitumor langsung dari MSCs yang mengandung obat. hBM-MSCs yang diinduksi paclitaxel memiliki kemampuan untuk mengurangi proliferasi leukemia limfoblastik akut, glioblastoma, melanoma, dan sel kanker prostat manusia. Kokultur GinPa-MSCs yang mengandung paclitaxel menghasilkan penghambatan yang signifikan dari adenokarsinoma pankreas duktal dan karsinoma sel skuamosa dari sel lidah, sedangkan GinPa-MSCs yang tidak diinduksi tidak mempengaruhi pertumbuhan sel kanker. MSCs yang mengandung obat juga mampu memainkan peran antikanker pada model hewan. Pemberian hBM-MSCs yang diinduksi paclitaxel pada leukemia limfoblastik akut dapat menghambat pembentukan tumor pada tikus yang mengalami defisiensi sistem imun. Pemberian paclitaxel murni atau MSCs tanpa induksi tidak sepenuhnya menghambat tumorigenesis subkutan dari leukemia limfoblastik akut, sedangkan injeksi intratumoral MSCs yang mengandung paclitaxel sangat mengurangi ukuran dan berat tumor. Injeksi intraperitoneal MSC yang mengandung paclitaxel meningkatkan kelangsungan hidup tikus dengan leukemia limfositik sedangkan pemberian paclitaxel murni tidak mempengaruhi prognosis.^{13,22,63}

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

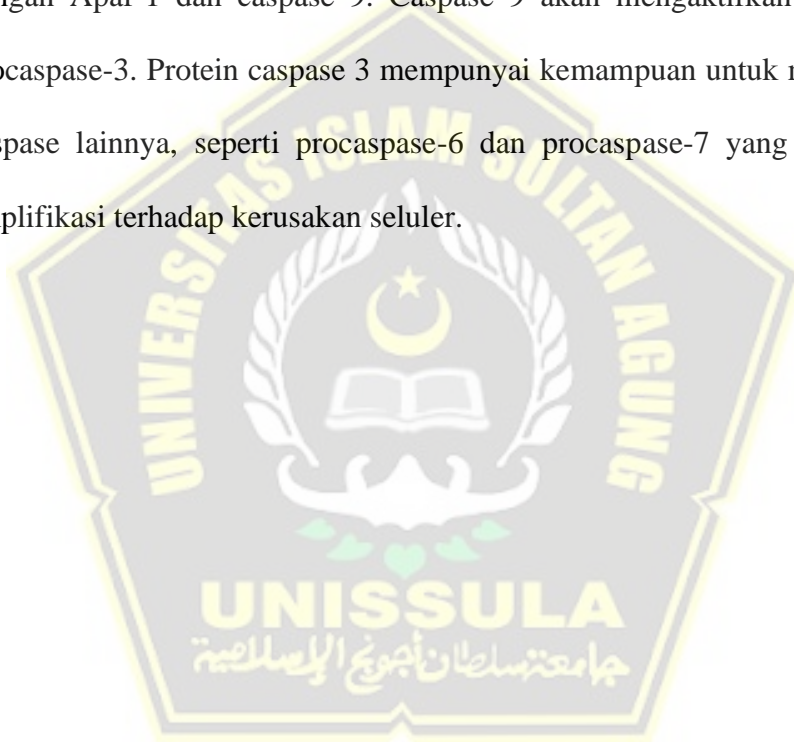
MSCs yang diinduksi dengan obat antikanker paclitaxel mampu melakukan endositosis dan memasukkan paclitaxel melalui fagositosis. Kemampuan paclitaxel dalam membentuk mikrotubul pada membran seluler membantu proses internalisasi paclitaxel kedalam MSCs. MSCs mampu bertahan dalam menghadapi zat toksik eksternal seperti obat antikanker melalui kelompok protein heat shock protein (HSP). HSP mampu melindungi MSCs dari stress fisik dan zat toksik serta menghindari apoptosis. Sehingga, MSCs masih dapat digunakan sebagai transport untuk agen kemoterapi.

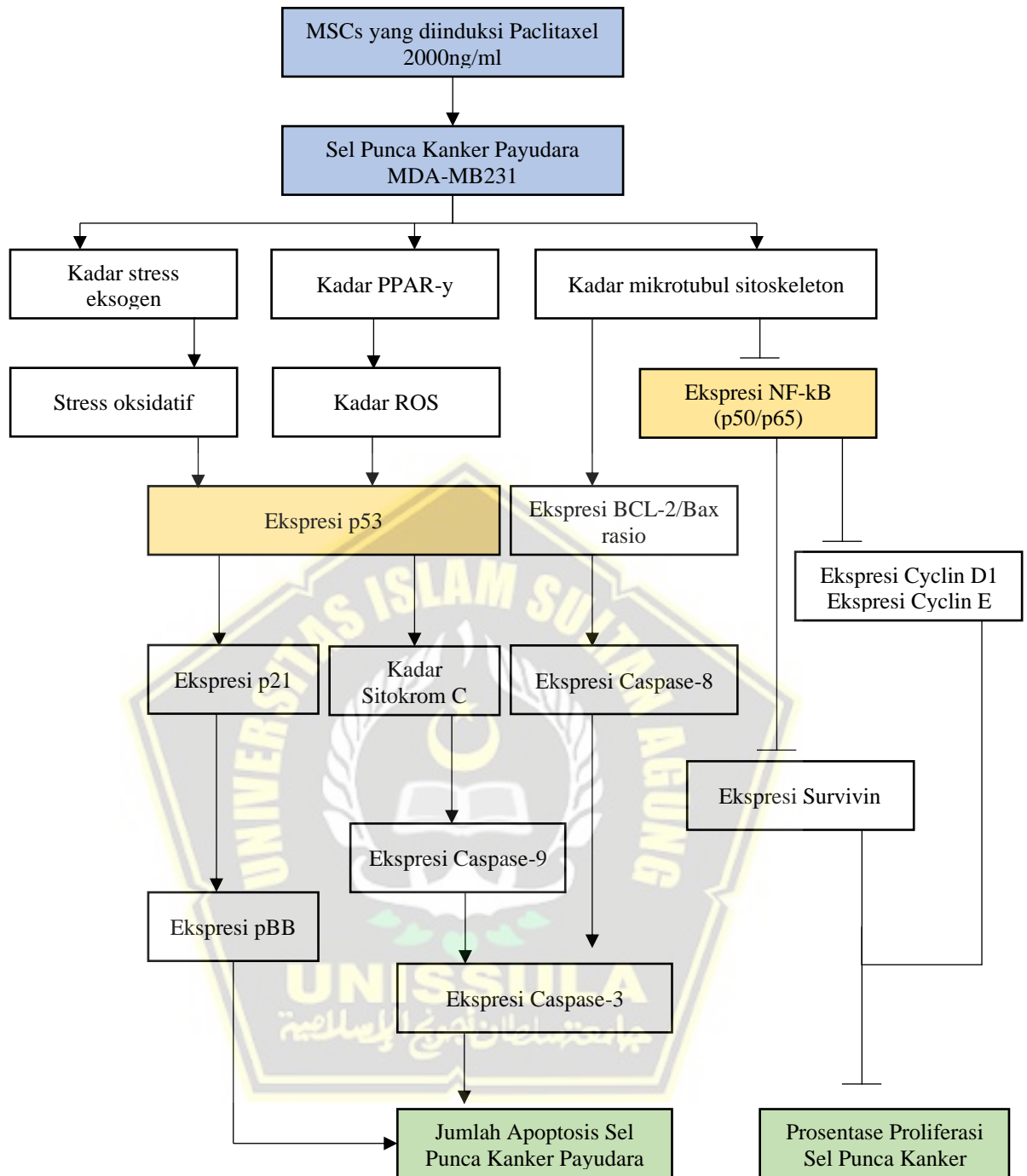
Paclitaxel yang telah diinternalisasi oleh MSCs mampu dilepaskan secara perlahan dimana sebagian besar dilepaskan dalam 24 jam pertama. Kemampuan MSCs dalam melakukan homing dan mensekresi vesikel ekstraseluler membantu paclitaxel untuk dapat dilepaskan sesuai target lokasi sel kanker dan terlokalisir.

Paclitaxel mampu berikatan dengan tubulin subunit β kemudian menginduksi polimerisasi tubulin dan menstabilkan mikrotubulus. Mikrotubulus yang resisten terhadap penguraian sehingga menurunkan ekspresi NF- κ B. Hambatan pada gen NF- κ B dapat menurunkan gen antiapoptosis dan meningkatkan ekspresi p53 sehingga mengaktifasi proses apoptosis yang diinduksi oleh p53. Down-regulasi NF- κ B menghasilkan ekspresi COX-2 yang terhambat, cyclin D1, pro-MMP2, dan MMP9. Sehingga

dengan penargetan gen yang diinduksi oleh aktivasi NF- κ B, atau inaktivasi jalur NF- κ B dapat berfungsi sebagai target terapeutik untuk pengobatan Kanker Payudara.

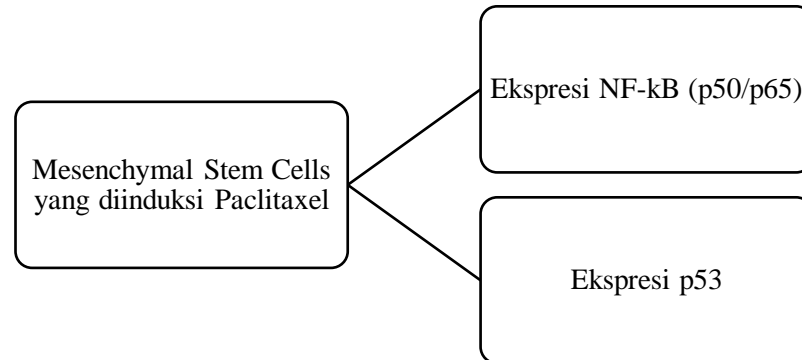
Paclitaxel juga mampu memfosforilasi onkoprotein gen penghambat apoptosis yaitu BCL-2 kemudian menempati mitokondria dan menimbulkan hilangnya potensial membran, kemudian sitokrom c, suatu molekul proapoptotic, dilepaskan dan menimbulkan terbentuknya kompleks apoptosom dengan Apaf-1 dan caspase 9. Caspase 9 akan mengaktifkan downstream procaspase-3. Protein caspase 3 mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya, seperti procaspase-6 dan procaspase-7 yang memberikan amplifikasi terhadap kerusakan seluler.





Gambar 3.1. Kerangka teori

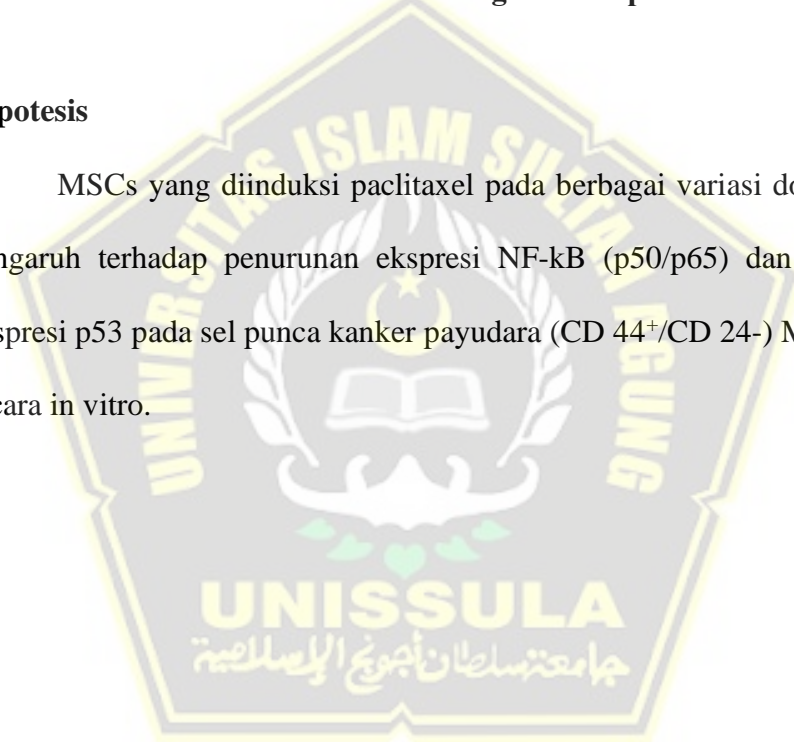
3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka konsep

3.3. Hipotesis

MSCs yang diinduksi paclitaxel pada berbagai variasi dosis memiliki pengaruh terhadap penurunan ekspresi NF-kB (p50/p65) dan peningkatan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 secara in vitro.



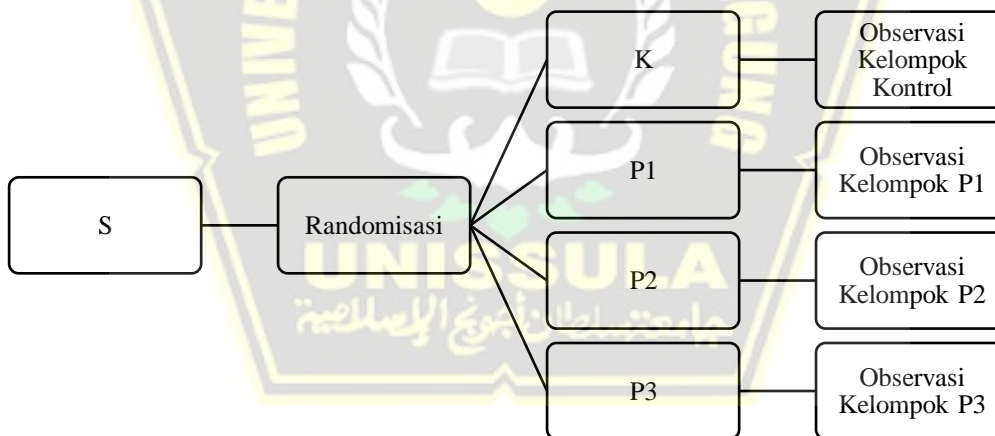
BAB IV

METODA PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik in vitro menggunakan post-test dengan kelompok kontrol (post-test only control group design). Rancangan ini digunakan untuk menganalisis pengaruh Mesenchymal Stem Cells (MSCs) yang telah diinduksi paclitaxel pada kelompok penelitian dengan cara membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kontrol.

Kelompok penelitian ini terdiri dari 4 kelompok penelitian dengan 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Masing masing kelompok terdiri dari 3 pengulangan sesuai dengan rincian dibawah ini:



Gambar 4.1. Skema rancangan penelitian *Post-Test Only Control Group*

Keterangan gambar 4.1

S : Subyek penelitian: Sel punca kanker payudara
CD44+/CD24-

Kelompok K (*Kontrol*) : Kelompok sel punca kanker payudara yang tidak mendapatkan perlakuan

Kelompok P1 (4:1) : Kelompok sel punca kanker payudara yang mendapatkan perlakuan MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan perbandingan sel 4:1 selama 24 jam.

Kelompok T2 (2:1) : Kelompok sel punca kanker payudara yang mendapatkan perlakuan MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan perbandingan sel 2:1 selama 24 jam.

Kelompok T3 (1:1) : Kelompok sel punca kanker payudara yang mendapatkan perlakuan MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan perbandingan sel 1:1 selama 24 jam.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah sel punca kanker payudara. Klon sel punca kanker payudara didapatkan melalui proses gradual-sorting pada sel MDA-MB231 (*European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC)).

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah sel punca kanker payudara yang diisolasi dari sel MDA-MB231 menggunakan teknik *Magnetic*

Activated Cell Sorting (MACS) dengan microbead CD44 dan CD24 yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.2.1. Kriteria Inklusi

Sel kanker payudara dengan karakteristik sebagai berikut:

1. Mengekspresikan CD44+/CD24-
2. Mampu membentuk mammosphere dalam biakan sel
3. Sel dalam keadaan viabel dan mampu proliferasi

4.2.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Sel punca kanker payudara *passage* lebih dari 10.
2. Sel punca kanker payudara yang tidak *adherent*

4.2.2.3. Kriteria *drop out*

1. Terjadi kontaminasi pada biakan sel punca kanker payudara
2. Terjadi pelepasan koloni sel dalam biakan sel punca kanker payudara

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel Penelitian

4.3.1.1 Variabel Bebas

Populasi sel punca kanker payudara (CD 44+/CD 24-) MDA-MB231 dan Mesenchymal Stem Cells.

4.3.1.2 Variabel Terikat

Ekspresi NF-KB (p50/p65) dan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44+/CD 24-) MDA-MB231.

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. Variabel Bebas

4.3.2.1.1 Sel punca Kanker Payudara

Sel punca kanker payudara adalah sel yang mengekspresikan CD44⁺/CD24⁻ dengan *flowcytometry* dan dapat membentuk *mamosphere*. Sel punca kanker payudara didapatkan dari hasil sorting hasil *sorting* dengan MACS CD44/CD24 *microbeads* pada *cell line* MDA-MB231 dan dikultur menunjukkan morfologi *adherent*.

Skala: Nominal

4.3.2.1.2 Mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells adalah sel yang mengekspresikan marker spesifik CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺ dan negatif marker Lin⁻ pada pemeriksaan *flowcytometry*, memiliki bentuk menyerupai sel fibroblas (fibroblast-shaped), dapat melakat pada permukaan plastik dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sel dewasa.

Skala: Nominal

4.3.2.2. Variabel terikat

4.3.2.2.1 Ekspresi NF-KB (p50/p65)

NF-kB adalah protein yang mengatur transkripsi gen target yang meningkatkan kelangsungan hidup dan proliferasi sel, menghambat apoptosis, dan berperan dalam invasi dan metastasis. Protein ini dikode oleh beberapa kelompok gen salah satunya gen p50 dan p65. Gen

p50/p65 diukur dengan menggunakan qRT-PCR. Hasil yang didapatkan berupa angka *fold change*.

Skala: Rasio

4.3.2.2.2 Ekspresi p53

p53 adalah salah satu protein pro-apoptosis yang dikode oleh gen p53. Protein ini diukur dengan menggunakan qRT-PCR. Hasil yang didapatkan berupa angka *fold change*.

Skala: Rasio

4.4. Bahan/Materi Penelitian

4.4.1 Bahan

1. Sel punca kanker payudara MDA-MB231
2. Mesenchymal Stem Cells
3. DMSO 1% dalam HCl 0,1 N
4. Aquades
5. SDS 10% dalam 0,1 N HCl
6. Etanol 96%
7. Media DMEM
8. FBS 10%
9. Penislin-streptomisin
10. PBS (*phosphate buffer salin*)
11. *Tripsin-EDTA* (*trypsin* 0.25%)
12. KAPA *sybr fast* PCR kit
13. Paclitaxe

14. Primer PCR
15. Extraction RNA kit
16. CDNA synthesis kit
17. KAPA sybr fast PCR kit

4.5. Alat Penelitian

4.5.1 Alat

1. 96-well plate (Iwaki)
2. Mikropipet 200 μ L, 1000 μ L
3. Blue tip dan yellow tip
4. Neraca analitik (Santorius),
5. *Waterbath* (Heidolp)
6. Mikroskop
7. Inkubator CO2 (Binder)
8. *Flowcytometer*
9. *Biological safety cabinet*
10. Oven
11. Autoklaf
12. Alat-alat gelas (Pyrex)
13. *Tissue culture flask*
14. 96-well plate (Iwaki)
15. Mikroskop
16. Mikropipet
17. *Laminar air flow* (LAF) (IsocideTM)

18. *Conical tube*
19. Silika gel GF254
20. Pipa kapiler

4.6. Cara Penelitian dan Alur Penelitian

4.6.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.6.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari *Umbilical Cord*

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety* cabinet class 2, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. *Umbilical cord* dikumpulkan dan ditaruh dalam wadah steril yang mengandung NaCl 0.9%
2. Dengan menggunakan pinset, *umbilical cord* diletakkan ke petri dish, *umbilical cord* dicuci sampai bersih menggunakan PBS
3. *Umbilical cord* dipisahkan dari janin tikus dan pembuluh darah dibuang.
4. *Umbilical cord* dicacah hingga halus dan diletakkan pada flask 25T secara merata dan diamkan selama 3 menit hingga jaringan melekat pada permukaan flask.
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.

6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplet baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfluensi 80%.

4.6.3. Pembacaan CD90, CD105, CD73, dan Lin dengan *Flow Cytometry*

1. Lepaskan sel dari *flask* dengan menggunakan BD™ accutase™ *cell detachment solution* (cat No. 561527) atau larutan *detachment solution* yang lain, cuci sel dan lakukan resuspensi dengan konsentrasi 1×10^7 sel/ml di dalam BD Pharmingen™ Stain Buffer (cat. No. 554656) atau *Phospat Buffer Saline (PBS) buffer*. Sel dapat diresuspensi pada konsentrasi 5×10^6 sel/ml jika jumlah sel terbatas.
2. Siapkan tabung *falcon* 5ml yang berisi reagen flowcytometry (Tabel 4.1).
3. Ulangi tabung 5 sampai 7 untuk setiap penambahan sampel yang dianalisis.
4. Ambil 100 µl sampel ke dalam masing masing tabung.
5. *Vortex* atau *tapping*.
6. Inkubasi 30 menit suhu kamar, dalam ruang gelap.

Tabel 4.1. Reagen yang digunakan dalam *flow cytometry*

Tabung	Reagen	Volume yang dimasukkan
1	FITC <i>mouse anti-human</i> CD105	5µl
2	PE <i>mouse anti-human</i> CD90	5µl
3	PerCP-CyTm 5.5 <i>mouse anti-human</i> CD73	5µl
4	APC <i>Mouse anti-human</i> Lin	5µl
5	Kosong	-
6	hMSC <i>positive isotype control cocktail</i>	20µl
	hMSC <i>negative isotype control cocktail</i>	20µl
7	hMSC <i>positive cocktail</i>	20µl
	PE hMSC <i>negative cocktail</i>	20µl

7. Cuci sebanyak 2 kali dengan *stain buffer* (PBS) dan resuspensi dengan 300-500µl *stain bufer* (PBS) atau 1 kali *washing buffer* (FBS).
8. Baca di *flow cytometry* gunakan tabung 1-5 sebagai kontrol untuk *set up cytometry* (sebagai kompensasi).

4.6.4. Induksi MSCs dengan Paclitaxel

Setelah MSCs 70% konfluens, MSCs diberi paclitaxel sebanyak 2000 ng/ml kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, medium dibuang kemudian diganti dengan medium MSCs yang baru.

4.6.5. Isolasi sel punca dari cell line MDA-MB231

Sel dikultur dalam kondisi berbeda dalam *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)* dengan 10% *Fetal Bovine Serum (FBS)*. Setelah tiga hari, saat sel tersebut menutupi 90% dari plat nya, sel yang menempel dipisahkan dengan inkubasi dalam 0.25% larutan

trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid selama 1 menit pada suhu 37°C. Sel MDA-MB-231 dalam *logarithmic growth phase* disusun 10^6 , 10^5 , 10^4 dan 10^3 sel/ml dalam DMEM *low glucose/mamocults medium* (3:1) medium bebas serum mengandung 2% B27 (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA), 20 ng/ml *epidermal growth factor* (EGF; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dan 20 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF; Sigma-Aldrich) (Medium SPK). Sel dikultur dalam kondisi bebas serum sebagai kluster *mammosphere* yang tidak menempel. Diferensiasi diinduksi dengan mengkultur sel *mammosphere* selama 12 jam dalam DMEM yang diberikan 10% FBS.

4.6.6. Validasi sel punca kanker payudara dengan CD44+ dan CD24- *flowcytometry*

Sel hasil *sorting* di hitung sebanyak 1×10^5 cell/ml dalam PBS diinkubasi dengan menggunakan antibodi CD44 5 μ l dan CD24 5 μ l selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah inkubasi dicuci sel dengan PBS 500 μ l dan disentrifugasi 300g selama 5 menit. Sel diresuspensikan kembali dalam 300 μ l PBS dan di baca dengan menggunakan *flowcytometry*.

4.6.7. Validasi sel punca kanker payudara melalui uji mammosphere

Mammosphere dari hasil *sorting* sel MDA-MB231 sebanyak 1×10^5 sel/mL ditanam pada *ultralow attachment well plate*. Jumlah kumpulan sel (diameter > 50 μ m) untuk setiap *well* dievaluasi

morfologinya di bawah mikroskop masing-masing pada hari ke 0, 3 dan 7.

4.6.8. Pemberian perlakuan MSCs yang diinduksi dengan Paclitaxel pada Sel punca kanker payudara

Setelah sel punca kanker payudara konfluens, sel punca kanker payudara dipindah ke bagian bawah transwell berjumlah 100.000 sel/cm² pada 4 x 5 sumuran dengan konfigurasi sebagai berikut:

1. Pada sumuran pertama yaitu kelompok kontrol, diberikan 100.000 sel/cm² pada bagian bawah sumuran dan medium MSCs. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
2. Pada sumuran kedua yaitu kelompok P1 (4:1), diberikan sel punca kanker sebanyak 100.000 sel/cm² pada bagian bawah sumuran dan 25.000 sel/cm² MSCs yang telah diinduksi dengan paclitaxel. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
3. Pada sumuran kedua yaitu kelompok P2 (2:1), diberikan sel punca kanker sebanyak 100.000 sel/cm² pada bagian bawah sumuran dan 50.000 sel/cm² MSCs yang telah diinduksi dengan paclitaxel. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.
4. Pada sumuran kedua yaitu kelompok P3 (1:1), diberikan sel punca kanker sebanyak 100.000 sel/cm² pada bagian bawah sumuran dan

100.000 sel/cm² MSCs yang telah diinduksi dengan paclitaxel. Sumuran tersebut diduplikasi sebanyak 5 sumuran. Kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi normal.

4.6.9. Uji ekspresi NF-kB (p50/p65) dengan qRT-PCR

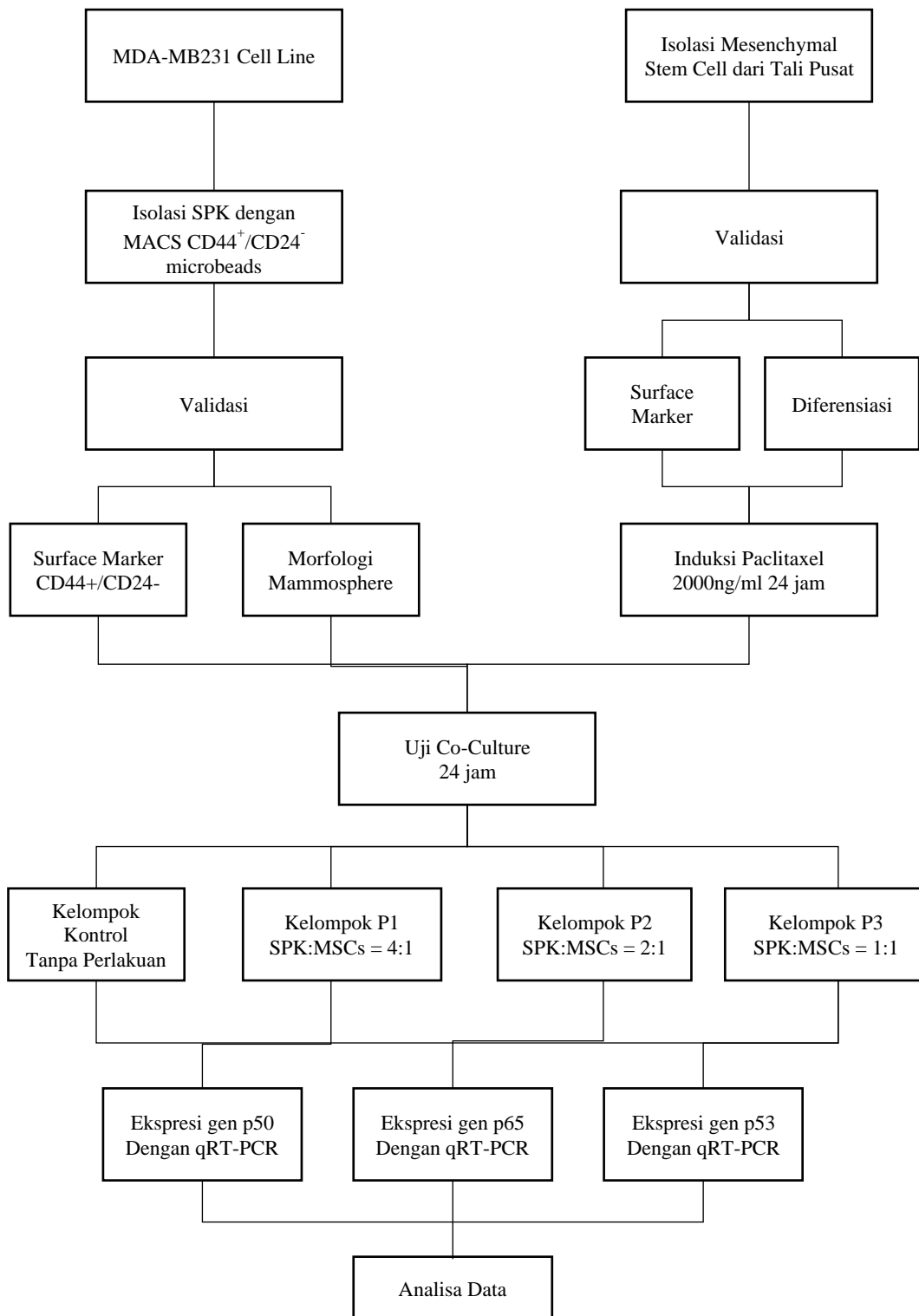
Total RNA diekstraksi dari sel yang diberi perlakuan CL, PN, dan kombinasinya dengan menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.) sesuai dengan protokol pabrik. Selanjutnya RNA ditranskripsikan secara terbalik menjadi cDNA. 25µl volume reaksi yang terdiri dari 12,5µl PCR buffer 2x untuk KOD FX (PCR amplification enzyme), 5µl 2 mM dNTPs, 2µl primer, 0,1µl KOD, 2,4µl air dan 1µl DNA. Kondisi standar untuk PCR adalah sebagai berikut: 95°C selama 2 menit, diikuti 40 siklus pada 95°C selama 30 detik, 62°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Metode 2- $\Delta\Delta C_t$ digunakan untuk menunjukkan hubungan antara ekspresi gen target pada kelompok eksperimen dan ekspresi gen target pada kelompok kontrol. Urutan primer gen p65 yang digunakan forward primer, 5'-CTTCCTCAGCCATGGTACCTCT-3', dan reverse primer 5'-CAAGTCTTCATCAGCATCAAAGT-3' (Yamamoto et al., 2019). Efek perlakuan direpresentasikan sebagai relative quantity terhadap kontrol stimulasi. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga.

4.6.10. Uji ekspresi p53 dengan qRT-PCR

Total RNA diekstraksi dari sel yang diberi perlakuan CL, PN, dan kombinasinya dengan menggunakan reagen TRIzol (Invitrogen,

Thermo Fisher Scientific, Inc.) sesuai dengan protokol pabrik. Selanjutnya RNA ditranskripsikan secara terbalik menjadi cDNA. 25µl volume reaksi yang terdiri dari 12,5µl PCR buffer 2x untuk KOD FX (PCR amplification enzyme), 5µl 2 mM dNTPs, 2µl primer, 0,1µl KOD, 2,4µl air dan 1µl DNA. Kondisi standar untuk PCR adalah sebagai berikut: 95°C selama 2 menit, diikuti 40 siklus pada 95°C selama 30 detik, 62°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ digunakan untuk menunjukkan hubungan antara ekspresi gen target pada kelompok eksperimen dan ekspresi gen target pada kelompok kontrol. Urutan primer gen p53 yang digunakan forward primer 5'-CCACCATCCACTACAACACTACAT-3' dan reverse primer 5' AAACACGCACCTCAAAGC-3'. Efek perlakuan direpresentasikan sebagai relative quantity terhadap kontrol stimulasi. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga.

4.6.11. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.7. Teknik Penumpulan Data

Hasil qRT-PCR untuk ekspresi gen p50, p65, dan p53 pada seluruh kelompok dikumpulkan dan ditabulasi dalam sebuah tabel untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

4.8. Metoda Analisis Data

4.8.1 Analisis Data

Data yang sudah diproses, kemudian dilakukan analisis deskriptif untuk mengetahui gambaran variabel dependen, variabel independen serta variabel antara. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan Shapiro Wilk untuk mengetahui sebaran distribusi data. Jika sebaran data normal maka dilakukan uji beda parametrik dengan menggunakan *One Way* ANOVA bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata untuk lebih dari dua kelompok sampel yang tidak berhubungan. Apabila sebaran data tidak normal, dilakukan normalisasi data dengan transformasi logaritma, jika data berdistribusi normal maka uji beda dilakukan dengan menggunakan *One Way* ANOVA. Apabila setelah transformasi sebaran data masih tidak normal maka kami gunakan uji Kruskal-Wallis. Apabila sebaran data normal dan homogen kami lakukan analisis lanjutan dengan uji *post hoc* LSD. Apabila sebaran data normal namun tidak homogen maka analisis lanjutan dilakukan dengan uji *post hoc* Tukey. Nilai p dianggap signifikan apabila $p < 0,05$. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *SPSS For Mac versi 23*.

4.9. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

4.9.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research Laboratory* Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.9.2 Waktu Penelitian

Penelitian, pengumpulan data dan penyusunan laporan dilakukan pada Bulan Juni-Juli 2022.

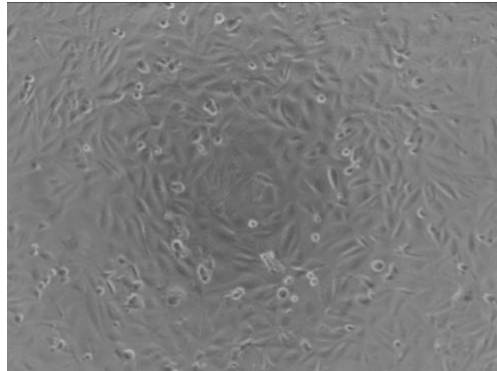
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan selama bulan Juni 2022 hingga Juli 2022 di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR), Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Sampel penelitian ini adalah sel punca kanker payudara yang berasal dari sel line kanker payudara manusia MDA-MB231 dan telah divalidasi hanya klon sel yang mengekspresikan CD44+/CD24- serta dapat membentuk morfologi mammosphere yang selanjutnya disebut sebagai SPK. MSCs yang telah dikultur dan divalidasi kemudian diberi Paclitaxel sebanyak 2000ng/ml diinkubasi selama 24 jam. Penelitian ini terdiri dari kelompok kontrol, kelompok perlakuan pertama atau P1 yaitu $2,5 \times 10^4$ sel MSCs yang telah diinduksi paciltaxel, kelompok perlakuan kedua atau P2 yaitu 5×10^4 sel MSCs yang telah diinduksi paciltaxel, dan kelompok perlakuan ketiga atau P3 yaitu 1×10^5 sel MSCs yang telah diinduksi paciltaxel.

5.1. Hasil *Sorting Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-)* MDA-MB231

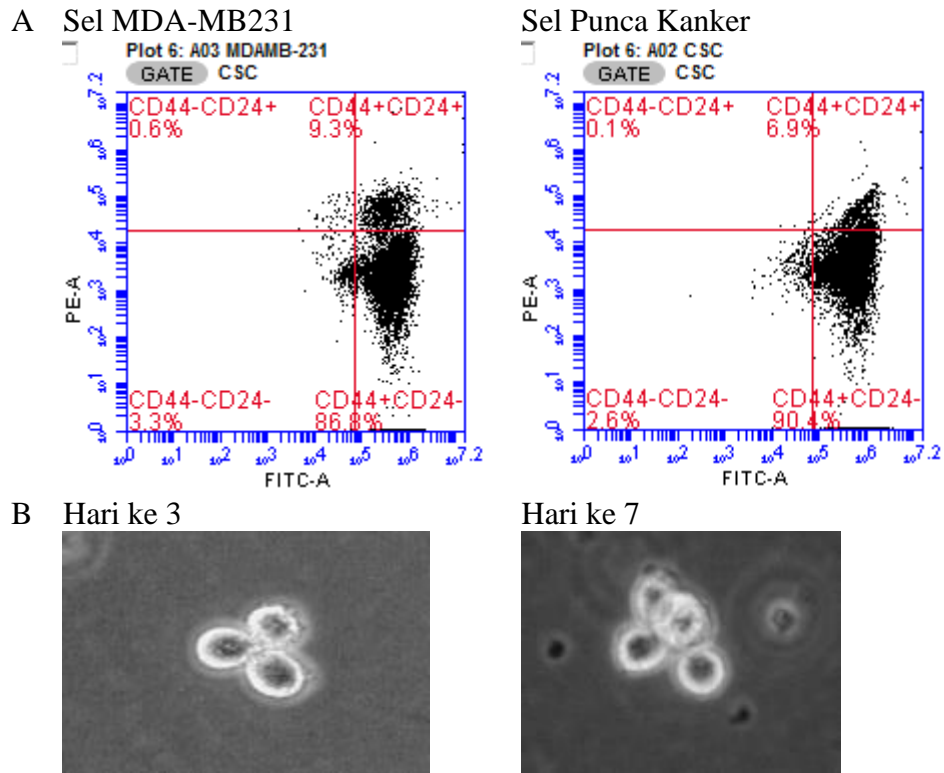
Klon SPK diisolasi dari populasi sel kanker payudara MDA-MB231 yang mengekspresikan CD44+/CD24- dengan menggunakan MACS CD44/CD24 microbeads. Klon SPK hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask T75 dengan medium khusus sel punca kanker payudara yaitu DMEM low glucose: mamocults medium (3:1). Hasil kultur SPK setelah passage ke 3 didapatkan gambaran sel adherent pada dasar flask dengan morfologi spindle like cell dan menunjukkan pemanjangan fillamen aktin.



Gambar 5.1. Morfologi sel adherent SPK pada passage ke tiga

5.2. Validasi Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231

Validasi klon SPK bertujuan untuk mendeteksi penanda CD44+/CD24- yang berada pada permukaan sel. Setelah dilakukan isolasi pada *cell line* MDA-MB231, didapatkan sel klon hasil isolasi mengekspresikan CD44+/CD24- sebanyak 90,4%. Sel isolasi MDA-MB231 yang mengekspresikan CD44+/CD24- tinggi menunjukkan aktivitas stemness, self-renewal dan kemampuan diferensiasi tinggi yang menunjukkan sifat sel punca kanker. Validasi yang kedua dilakukan dengan cara melihat kemampuan klon SPK membentuk mammosphere yang dikultur dalam ultralow attachment 6-well plate pada medium mamocult. Mamosphere dengan ukuran diameter lebih dari 60µm terbentuk mulai hari ke 3 dan mengalami perkembangan ukuran hingga hari ke 7 pengamatan. Sistem kultur mammosphere digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan SPK dari *cell line* maupun sel tumor primer.



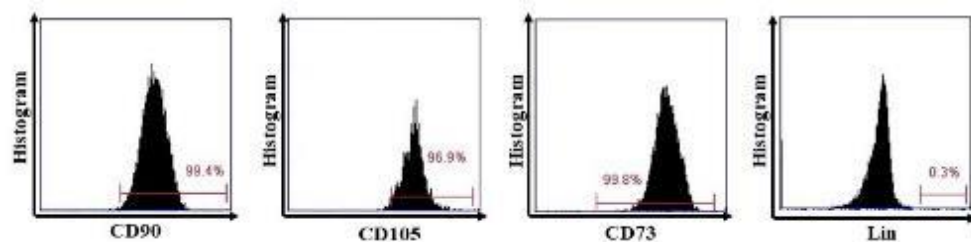
Gambar 5.2. Validasi karakterisasi klon SPK (A) Deteksi flowcytometry penanda CD44 dan CD24 pada permukaan sel MDA-MB231 dan SPK. (B) Pembentukan mammosphere klon SPK selama 7 hari.

5.3. Isolasi Mesenchymal Stem Cells dan Induksi Paclitaxel

Isolasi MSCs dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Research (SCCR) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, menggunakan tali pusat. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask plastik dengan medium khusus. Hasil kultur MSC setelah pasase ke-4 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi spindle-like cell dalam pengamatan mikroskopis.

Isolasi MSC divalidasi dengan deteksi surface marker CD90⁺, CD105⁺ dan CD73⁺, CD31⁻ menggunakan *flow cytometry*. Dari hasil isolasi yang

dilakukan MSC mampu mengekspresikan CD90 (99,4%), CD105 (96,9%), CD73 (99,8%) dan tidak mengekspresikan Lin (0,3%). Sejalan dengan analisis flowcytometry, pada penelitian ini juga memeriksa kemampuan osteogenik dari MSCs. MSC mampu diferensiasi menjadi osteogenik yang diindikasikan oleh endapan kalsium berupa penampakan merah menggunakan metode pewarnaan Alizarin red dye.



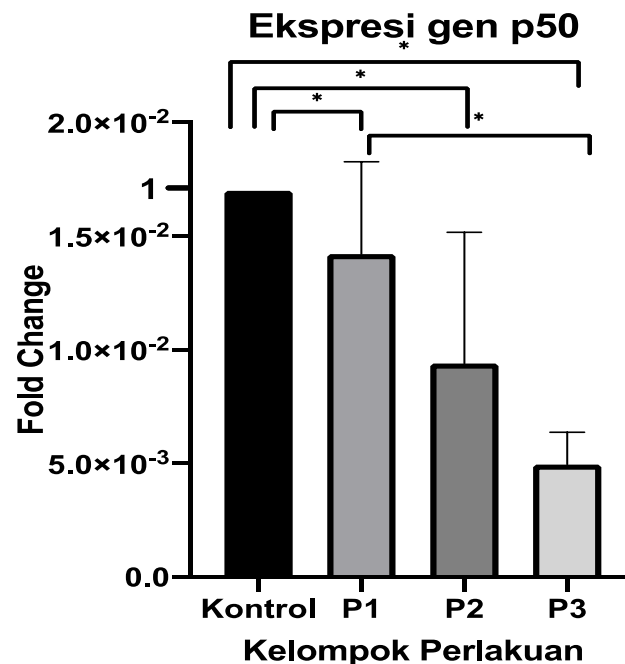
Gambar 5.3. Analisis flow cytometry terhadap ekspresi CD90, CD105, CD73, dan Lin

Setelah isolasi MSCs divalidasi, MSCs kemudian diberikan paclitaxel 2000ng/ml selama 24 jam. Setelah diinduksi, medium MSCs dibuang dan dikultur pada medium baru sebelum diberikan pada isolasi kultur SPK.

5.4. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi NF-kB (p50)

p50 merupakan subunit dari keluarga NF-kB (NF-kB1). Subunit p50 berperan penting dalam karsinogenesis yang dipengaruhi oleh inflamasi. Inhibisi p50 dapat memengaruhi aktivasi Tumor Associated Macrophage (TAM) dimana dapat memolarisasi TAM menjadi M2 TAM yang berfungsi untuk menurunkan aktivitas pertumbuhan kanker. Pada penelitian kali ini didapatkan penurunan p50 pada seluruh kelompok perlakuan yang sejalan

dengan peningkatan dosis MSCs. Rata rata p50 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan P3 dengan jumlah $4,9 \times 10^{-3}$ dibandingkan dengan $14,2 \times 10^{-3}$ dan $9,3 \times 10^{-3}$ pada kelompok P1 dan P2 secara berurutan seperti terlihat pada grafik dibawah.



Gambar 5.4. Grafik ekspresi gen p50 melalui pemeriksaan qRT-PCR

Analisis statistik didapatkan abnormalitas dalam sebaran data pada seluruh kelompok perlakuan. Upaya normalisasi dengan transformasi aritmatika data masih didapatkan sebaran data yang tidak normal, sehingga uji bivariat dilakukan dengan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan beda signifikan pada kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan.

Tabel 5.1. Nilai rata-rata ekspresi gen p50 tiap kelompok dan uji kruskal walis

Kelompok	Nilai <i>Mean</i> (<i>Fold Change</i>)	<i>Normalitas Saphiro</i> <i>Wilk</i>	Uji beda Kruskal Walis
Kontrol	1	0,000	0,002*
P1	0,0142 ± 0,004		
P2	0,0093 ± 0,0057		
P3	0,0049 ± 0,0014		

*Berbeda signifikan

Hasil uji lanjutan beda antar kelompok menunjukkan terdapat beda signifikan antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 3. Hasil signifikansi dapat dilihat dalam tabel 5.2. Hasil tersebut menunjukkan dosis MSCs yang paling berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p50 yaitu pada kelompok yang menerima dosis terbesar.

Tabel 5.2. Nilai signifikansi ekspresi gen p50 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Kontrol	P1	0,000*
	P2	0,000*
	P3	0,000*
P1	P2	0,164
	P3	0,007*
P2	P3	0,454

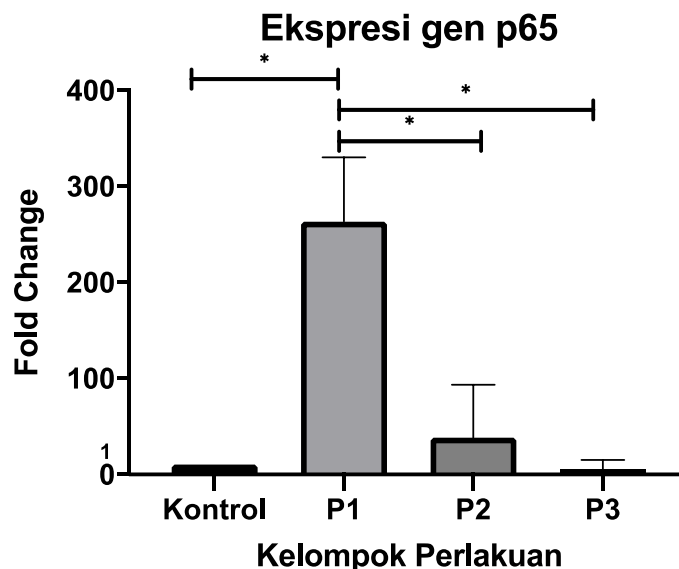
* Berbeda signifikan

5.5. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi NF-kB (p65)

Kelompok faktor transkripsi NF-kB terdiri dari lima protein yang mengandung domain Rel: p65/RelA, RelB, c-rel, p50/NFkB1 dan p52/NFkB2. Pada sebagian besar sel, bentuk dominan NF-kB aktif terdiri dari heterodimer p65/p50.

Subunit p65 dari NF- κ B dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan menginduksi penghentian pertumbuhan dan DNA damage-inducing gene beta (GADD45b) atau X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) yang mengarah ke penghambatan aktivitas c-jun N-terminal kinase (JNK). Ketika p65 dihambat, sel menunjukkan aktivasi JNK yang berkelanjutan sebagai respons terhadap rangsangan seperti tumor necrosis factor (TNF α) dan akan mengalami apoptosis. Penghambatan NF- κ B juga dapat meningkatkan GADD45a, dan dapat mengaktifkan JNK.

Hasil penelitian penelitian kali ini didapatkan tren penurunan p65 pada kelompok perlakuan yang diberi MSCs. Rata rata p65 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan P3 dengan jumlah $4,904 \pm 10,207$ dibandingkan dengan $263,5 \pm 150,0$ dan $38,43 \pm 54,97$ pada kelompok P1 dan P2 secara berurutan seperti terlihat pada grafik dibawah.



Gambar 5.5 Grafik ekspresi gen p65 melalui pemeriksaan qRT-PCR

Analisis statistik didapatkan abnormalitas dalam sebaran data pada seluruh kelompok perlakuan. Upaya normalisasi dengan transformasi aritmatika data masih didapatkan sebaran data yang tidak normal, sehingga uji bivariat dilakukan dengan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan beda signifikan pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Nilai rata-rata ekspresi gen p65 tiap kelompok dan uji kruskal walis

Kelompok	Nilai Mean (Fold Change)	Normalitas Saphiro Wilk	Uji beda Kruskal Walis
Kontrol	1	0,000	0,011*
P1	4,904 ± 10,207		
P2	263,5 ± 150,0		
P3	38,43 ± 54,97		

*Berbeda signifikan

Hasil uji lanjutan beda antar kelompok menunjukkan terdapat beda signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3. Hasil signifikansi dapat dilihat dalam tabel 5.4. Hasil tersebut menunjukkan dosis MSCs yang paling berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p65 yaitu pada kelompok yang menerima dosis terbesar pada P3.

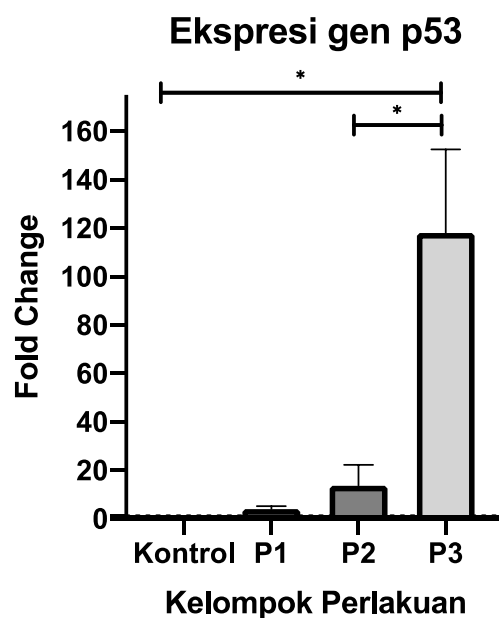
Tabel 5.4. Nilai signifikansi ekspresi gen p65 antar kelompok perlakuan

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Kontrol	P1	0,005*
	P2	0,572
	P3	0,095
P1	P2	0,015*
	P3	0,009*
P2	P3	0,597

* Berbeda signifikan

5.6. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells pada Sel Punca Kanker Payudara (CD44+/CD24-) MDA-MB231 terhadap Ekspresi p53

Gen p53 adalah tumor suppressor gene yang mengkode nuclear protein untuk menginduksi penghentian pertumbuhan atau apoptosis sebagai respons terhadap stres seluler. Ketika jalur p53 dihambat, perkembangan kanker meningkat dan resistensi terhadap kemoterapi berkembang. Sehingga pengamatan fungsi p53 penting dalam pengembangan terapi kanker pada manusia. Hasil qRT-PCR menunjukkan peningkatan ekspresi gen p53 pada seluruh kelompok perlakuan dengan kecenderungan mengikuti dosis. Ekspresi rata-rata gen p53 tertinggi didapatkan pada P3 dengan rata-rata $118,1 \pm 77,13$ diikuti P2 dengan $13,68 \pm 19,24$ dan P1 dengan $4,155 \pm 2,593$ seperti terlihat pada grafik dibawah.



Gambar 5.6. Grafik ekspresi gen p53 melalui pemeriksaan qRT-PCR

Analisis statistik didapatkan abnormalitas dalam sebaran data pada seluruh kelompok perlakuan. Upaya normalisasi dengan transformasi aritmatika log10 didapatkan sebaran data menjadi normal, sehingga uji bivariat *One Way ANOVA* dapat dilakukan. Hasil uji homogenitas didapatkan data tidak homogen sehingga uji *Post Hoc* dilakukan dengan menggunakan uji *Tukey*.

Tabel 5.5. Tabel nilai rata-rata ekspresi gen p53 dan uji *One Way ANOVA*

Kelompok	Nilai Mean (Fold Change)	Normalitas Saphiro Wilk setelah normalisasi	Uji beda <i>One Way ANOVA</i>
Kontrol	1	0,056	0,004*
P1	4,155 + 2,593		
P2	13,68 + 19,24		
P3	118,1 ± 77,13		

Hasil uji *Post Hoc* beda antar kelompok dengan uji *Tukey* menunjukkan terdapat beda signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 3 dan kelompok perlakuan 3 dengan kelompok perlakuan 2. Hasil signifikansi dapat dilihat dalam tabel 5.6. Hasil tersebut menunjukkan dosis MSCs yang paling berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p53 yaitu pada kelompok yang menerima dosis terbesar pada P3.

Tabel 5.6 Tabel uji *Post Hoc Tukey* ekspresi gen p53

Kelompok	Kelompok Perbandingan	Signifikansi
Kontrol	P1	0,793
	P2	0,830
	P3	0,019*
P1	P2	0,321
	P3	0,112
P2	P3	0,003*

* Berbeda signifikan

5.7. Pembahasan Hasil

Sel punca kanker payudara (SPK) adalah sub populasi sel kanker payudara dengan karakteristik anti apoptosis, self renewal, stemness, dan berproliferasi tidak terbatas yang mengakibatkan resisten terhadap terapi. Klon SPK memiliki kemampuan memproteksi diri dari program apoptosis dengan meningkatkan ekspresi protein anti-apoptosis terutama survivin, menekan ekspresi protein pro-apoptosis seperti tumor suppressor gen p53. Resistensi SPK diperkuat dengan kemampuannya dalam meningkatkan aktivasi faktor transkripsi NF-kB sehingga klon SPK selalu berproliferasi.⁴⁵

Sel induk memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel tertentu. Dua karakteristik yang menentukan sel punca adalah pembaruan diri yang terus-menerus dan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel khusus dewasa. Terapi targetting terhadap sel punca kanker yang dapat menekan seluruh karakteristik yang dimiliki sel punca kanker bisa menjadi pilihan terapi yang memberikan harapan pada penanganan kanker. Hal ini dapat meningkatkan manfaat terapeutik dari terapi lain karena peningkatan targetnya pada tumor, sehingga mengurangi kejadian di luar target (sel normal). Berbagai strategi berbasis sel punca kini telah diselidiki dalam uji praklinis, dan menunjukkan efek dan tantangan besar untuk pengobatan kanker.^{44,47,67}

Validasi klon SPK dapat ditentukan melalui uji Mammosphere assay dan labelling dengan CD44+/CD24- yang kemudian digunakan untuk mengukur aktivitas sel punca/progenitor awal dan pembaharuan diri sel punca

di jaringan payudara normal, karsinoma duktal in situ, dan di karsinoma duktal invasif payudara.

SPK pada penelitian kami berasal dari sel kanker payudara MDA-MB231 yang di sorting dengan MACS CD44/CD24 microbeads dan divalidasi keberadaannya melalui kemampuannya dalam membentuk mammosphere dan mengekspresikan CD44+/CD24-.⁵¹

Uji mammosphere assay dapat digunakan sebagai marker klon SPK dikarenakan hanya klon SPK yang dapat bertahan hidup dalam medium mammosphere. Selain mammosphere assay, CD44 yang merupakan reseptor asam hialuronat adalah salah satu penanda permukaan yang paling umum dari sel punca, yang diekspresikan oleh hampir setiap sel tumor. CD24 adalah antigen yang stabil terhadap panas, penanda permukaan lain yang diekspresikan dalam banyak jenis tumor. Namun, ekspresi dan nilai prognostik mereka dalam mengisolasi SPK masih merupakan ambiguitas yang bertahan lama. Ada beberapa penanda sel induk yang digunakan untuk identifikasi dan isolasi SPK dari tumor padat yang berbeda. CD44 dianggap sebagai penanda SPK potensial pada sebagian besar kanker. CD24 adalah penanda penting lainnya.^{44,47,47}

CD24 telah diteliti dalam kombinasi dengan CD44 dan penanda lain pada berbagai kanker. Setelah identifikasi SPK pada kanker payudara, kedua penanda ini dapat dijadikan marker klon SPK yang signifikansinya sudah diteliti dan diuji validasinya oleh penelitian-penelitian terdahulu. Meskipun penanda yang tersedia saat ini tampak menjanjikan, namun tidak spesifik untuk

semua kanker dan subtipe kanker. Penanda ini dapat bekerja secara efisien dalam kombinasi dengan penanda yang berbeda tetapi penanda yang sesuai belum dikonfirmasi.²⁹

Hasil sorting SPK diperoleh klon SPK yang memiliki morfologi adheren, mengekspresikan CD44+/CD24- sebesar 96,7%, dan dapat membentuk mammosphere dengan diameter lebih dari 60 μ m mulai dari hari ke-3 sampai hari ke-7 pengamatan. Hasil ini sesuai dengan standard karakteristik SPK payudara yang mengekspresikan surface marker CD44+/CD24- dan kemampuan membentuk koloni mammosphere. Dengan hasil ini kami meyakini bahwa klon yang kami sorting adalah klon SPK yang sesuai dengan validasi standar internasional.

Hasil penelitian kami menunjukkan terjadinya penurunan yang signifikan ekspresi NF-kB subunit p50 dan p65 pada sel punca kanker payudara setelah pemberian MSCs yang diinduksi dengan Paclitaxel. Penurunan paling signifikan terlihat pada pemberian dosis MSCs terbanyak atau pada perbandingan MSCs dan SPK 1:1.

Tingkat aktivasi NFkB pada suatu sel juga dipengaruhi oleh faktor lain yang menghambat, menstimulasi serta jalur turunan yang diperantara oleh NFkB itu sendiri. Tanpa stimulasi, dimer protein NFkB predominan berada di sitoplasma. Dimer tersebut berinteraksi dengan inhibitor NFkB (IkB) sehingga bersifat inaktif. Berbagai stimuli, termasuk kemoterapi dan radikal bebas dapat menyebabkan degradasi IkB dan translokasi NFkB ke dalam nukleus. Translokasi NFkB menyebabkan aktivasi beberapa gen yang terlibat dalam

supresi kematian sel melalui jalur mitokondria (intrinsik) maupun reseptor kematian (ekstrinsik). NF- κ B menginduksi ekspresi inhibitors of apoptosis (IAPs) dan beberapa anggota famili anti- apoptosis Bcl-2. NF κ B juga melakukan interferensi terhadap aktivitas transkripsional p53 melalui peningkatan gen antiapoptosis dan penekanan p53 sehingga menghambat proses apoptosis yang diinduksi oleh p53.⁶⁸

Paclitaxel memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap berbagai sel kultur serta aktivitas antineoplastik pada sel tumor. Paclitaxel memiliki kemampuan untuk mengikat tubulin, kemudian memunculkan perakitan mikrotubulus, dan menstabilkan mikrotubulus dengan pembentukan ikatan tubulus. Paclitaxel mampu menunjukkan siklus sel secara mandiri seperti endotoksin pada makrofag murine. Paclitaxel menyebabkan makrofag murine menurunkan regulasi reseptor TNF dan memulai sintesis dan sekresi TNF. Paclitaxel dapat menginduksi ekspresi IL-1a dan IL-1b. Paclitaxel juga menginduksi fosforilasi tirosin dari mikrotubulus terkait protein kinase. Paclitaxel meningkatkan induksi -interferon sintase oksida nitrat dan sekresi oksida nitrat, faktor tumorisidal makrofag. Jalur yang menghubungkan respons ini dengan paclitaxel diyakini mirip dengan yang menyebabkan respons tersebut terhadap LPS. Dengan demikian, target intraseluler yang dipengaruhi oleh paclitaxel dapat terlibat dalam aksi LPS di makrofag dan sel lain. Salah satu target intraseluler potensial dari senyawa ini adalah faktor transkripsi NF- κ B.^{32,69,70}

MSCs yang diisolasi dari berbagai jaringan seperti jaringan adiposa dan sumsum tulang menunjukkan kemampuan untuk mengenkapsulasi dan melepaskan obat antikanker tanpa perubahan genetik sehingga menghasilkan penghambatan pertumbuhan kanker baik *in vitro* maupun *in vivo*.^{5,70}

MSCs yang menghasilkan ekstra vesikel memberikan beberapa keuntungan dibandingkan MSCs saja dan memiliki aplikasi potensial sebagai kendaraan penghantaran obat. Untuk terapi yang dimediasi ekstra vesikel, MSC adalah jenis sel donor yang paling baik, karena efisiensi produksinya, tingkat kekebalan sel, dan penerapan klinisnya. Ekstra vesikel yang berasal dari sel punca bersifat non-imunogenik sehingga tidak dikenali sebagai musuh oleh sistem imun tubuh dan meningkatkan efisiensi penghantaran obat ke jaringan target. Namun, sel mamalia melepaskan eksosom ekstra vesikel dalam jumlah yang minimum. Keberhasilan penggunaan eksosom sebagai transporter obat memerlukan produksi skala besar melalui rekayasa di laboratorium.^{14,23}

Penelitian terdahulu menunjukkan mikrovesikel dan eksosom yang dilepaskan dari MSC memiliki mekanisme tertentu untuk memasukan komponen obat ke dalam lingkungan mikro tumor dan mengatur perkembangan tumor. Mikrovesikel yang diisolasi dari MSC telah terbukti secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker. Dalam penelitian MSCs yang diinduksi paclitaxel menginduksi kematian dalam sel MDA-MB-231 dan sitotoksitas meningkat dengan meningkatkan konsentrasi paclitaxel intraseluler. Hal ini sejalan dengan penelitian kami yang menunjukan

penurunan ekspresi gen NF- κ B dan peningkatan ekspresi gen p53 pada SPK setelah mendapatkan MSCs yang diinduksi paclitaxel.^{9,10,15,67}

Hasil ini menunjukkan bahwa MSCs dapat membawa dan mengantarkan kemoterapi ke sel punca kanker. Penelitian lain dengan induksi agen kemoterapi doksorubisin yang diisolasi dari sel Raw264.7 menunjukkan peningkatan apoptosis sel di sekitar tumor dan mengurangi proliferasi sel kanker usus besar. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstra vesikel yang mengandung obat mungkin menjadi salah satu terapi yang menjanjikan untuk kanker kedepannya.^{71,72}

Mekanisme penyerapan paclitaxel oleh sel dan pengikatannya ke mikrotubulus telah diteliti secara luas. Dalam penelitian ini kami mengamati bahwa paclitaxel, setelah memasuki sel, berada dalam vesikel yang berasal dari aparatus Golgi. Namun, sangat sedikit yang diketahui tentang kapasitas sel untuk melepaskan paclitaxel. Sebuah laporan menunjukkan bahwa pompa pengeluaran obat (*multidrug efflux pump*) dalam MSCs melibatkan P-glikoprotein (P-gp), yang merupakan mekanisme resistensi multi obat pada dalam sel kanker. P-gp adalah molekul membran 170 Kd yang berada dalam sel tumor, di mana ia berkontribusi pada fenomena resistensi multiobat dengan meningkatkan pengeluaran beberapa obat antikanker yang tidak memasukin struktur sitoskeleton sel kanker. P-gp sangat sensitif terhadap Verapamil yang merupakan penghambat pompa sekresi generasi pertama. Penelitian lain menunjukkan bahwa PTX, serta obat sitotoksik lypophilic lainnya yang

mengikat tubulin, seperti colchicine, colcemid, vinblastine dan vincristine, dapat disekresikan melalui sistem P-gp.^{14,17-19,23}

Dalam penelitian ini, kami berhasil memasukkan paclitaxel kedalam MSCs melalui cara induksi yang sederhana dan memiliki efek terhadap proliferasi sel punca kanker payudara.

5.8. Kelemahan Penelitian

Penelitian kami memiliki sejumlah kekurangan yaitu kami hanya melakukan percobaan untuk mengetahui parameter pertumbuhan atau proliferasi kanker saja. Parameter lain seperti jalur kematian dan apoptosis kanker dapat diuji untuk mengetahui secara keseluruhan efek obat kemoterapi terhadap kematian kanker. Mekanisme penyerapan dan sekresi paclitaxel sebagai obat kemoterapi masih belum dapat dijelaskan dalam penelitian ini, diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk mengetahui indikator masuknya paclitaxel kedalam sel MSCs. Diperlukan dosis MSCs yang lebih besar dan sitotoksitasnya terhadap sel kanker untuk mengetahui berapa dosis yang optimal pada penelitian ini.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat penurunan ekspresi NF-KB (p50/p65) pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:1 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Terdapat penurunan ekspresi NF-KB (p50/p65) pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:2 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Terdapat penurunan ekspresi NF-KB (p50/p65) pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:4 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
4. Terdapat peningkatan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:1 dibandingkan dengan kelompok kontrol.
5. Terdapat peningkatan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi

paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:2 dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6. Terdapat peningkatan ekspresi p53 pada sel punca kanker payudara (CD 44⁺/CD 24⁻) MDA-MB231 setelah pemberian MSCs yang diinduksi paclitaxel dengan dosis perbandingan 1:4 dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

Sebagai saran untuk penelitian ini adalah

1. Melakukan uji jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik untuk melihat keterlibatan dan terjadinya apoptosis pada sel punca kanker payudara.
2. Melakukan uji pencitraan tambahan untuk mengetahui jumlah penyerapan paclitaxel ke dalam MSCs untuk dapat menjelaskan mekanisme enkapsulasi dan sekresi paclitaxel ke sel punca kanker payudara.
3. Menambah kelompok perlakuan dimana jumlah MSCs yang diinduksi paclitaxel lebih besar daripada jumlah sel punca kanker payudara untuk melihat dosis paling optimal pada proliferasi sel punca kanker payudara.

DAFTAR PUSTAKA

1. Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases* **5**, 77–106 (2018).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer* **149**, 778–789 (2021).
3. Bhattacharya, S. & Puhalla, S. L. Treatment of Metastatic Breast Cancer: Chemotherapy. in *Breast Disease* (eds. Aydiner, A., İgci, A. & Soran, A.) 523–534 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-26012-9_32.
4. Colleoni, M. *et al.* Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 927–935 (2016).
5. Jeong, Y. *et al.* Treatment results of breast cancer patients with locoregional recurrence after mastectomy. *Radiation Oncology Journal* **31**, 138 (2013).
6. van Maaren, M. C. *et al.* Ten-year recurrence rates for breast cancer subtypes in the Netherlands: A large population-based study: Ten-year recurrence rates for breast cancer subtypes. *International Journal of Cancer* **144**, 263–272 (2019).
7. Lin, S., Gan, Z., Han, K., Yao, Y. & Min, D. Interleukin-6 as a Prognostic Marker for Breast Cancer: A Meta-analysis. *Tumori Journal* **101**, 535–541 (2015).
8. Xia, L. *et al.* Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *OTT Volume* **11**, 2063–2073 (2018).
9. Fukuda, K. *et al.* Peptide-pulsed dendritic cell vaccine in combination with carboplatin and paclitaxel chemotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Research* **27**, 326–334 (2017).
10. Jamal, R. *et al.* Peripheral and local predictive immune signatures identified in a phase II trial of ipilimumab with carboplatin/paclitaxel in unresectable stage III or stage IV melanoma. *j. immunotherapy cancer* **5**, 83 (2017).
11. Chen, G., Sheng, L. & Du, X. Efficacy and safety of liposome-paclitaxel and carboplatin based concurrent chemoradiotherapy for locally advanced lung squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **82**, 505–510 (2018).

12. Wang, X. *et al.* Nanoformulated paclitaxel and AZD9291 synergistically eradicate non-small-cell lung cancers *in vivo*. *Nanomedicine* **13**, 1107–1120 (2018).
13. Pacioni, S. *et al.* Mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel induce cytotoxic damage in glioblastoma brain xenografts. *Stem Cell Res Ther* **6**, 194 (2015).
14. Bosco, D. B., Kenworthy, R., Zorio, D. A. R. & Sang, Q.-X. A. Human Mesenchymal Stem Cells Are Resistant to Paclitaxel by Adopting a Non-Proliferative Fibroblastic State. *PLoS ONE* **10**, e0128511 (2015).
15. Melzer, C. *et al.* Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells. *Cancers* **11**, 798 (2019).
16. Zou, D. *et al.* MiR-197 induces Taxol resistance in human ovarian cancer cells by regulating NLK. *Tumor Biol.* **36**, 6725–6732 (2015).
17. Salehi, H. *et al.* Dental pulp stem cells used to deliver the anticancer drug paclitaxel. *Stem Cell Res Ther* **9**, 103 (2018).
18. Kalimuthu, S. *et al.* A New Approach for Loading Anticancer Drugs Into Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Mimetics for Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **9**, 1116 (2018).
19. Lisini, D. *et al.* Automated Large-Scale Production of Paclitaxel Loaded Mesenchymal Stromal Cells for Cell Therapy Applications. *Pharmaceutics* **12**, 411 (2020).
20. Su, V. Y.-F., Lin, C.-S., Hung, S.-C. & Yang, K.-Y. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Induces Neutrophil Apoptosis Associated with Inhibition of the NF- κ B Pathway in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *IJMS* **20**, 2208 (2019).
21. Sobacchi, C., Palagano, E., Villa, A. & Menale, C. Soluble Factors on Stage to Direct Mesenchymal Stem Cells Fate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **5**, (2017).
22. Pascucci, L. *et al.* Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit *in vitro* tumor growth: A new approach for drug delivery. *Journal of Controlled Release* **192**, 262–270 (2014).
23. Bonomi, A. *et al.* Effect of canine mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel on growth of canine glioma and human glioblastoma cell lines. *The Veterinary Journal* **223**, 41–47 (2017).

24. Wang, X. *et al.* Mesenchymal stem cells loaded with paclitaxel–poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for glioma-targeting therapy. *IJN* **Volume 13**, 5231–5248 (2018).
25. Lee, K. J. *et al.* Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via ERK and NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **495**, 2195–2201 (2018).
26. Ghali, R. M. *et al.* Association of Genetic Variants in NF- κ B with Susceptibility to Breast Cancer: a Case Control Study. *Pathol. Oncol. Res.* **25**, 1395–1400 (2019).
27. Patwardhan, R. S., Sharma, D., Thoh, M., Checker, R. & Sandur, S. K. Baicalein exhibits anti-inflammatory effects via inhibition of NF- κ B transactivation. *Biochemical Pharmacology* **108**, 75–89 (2016).
28. Scimeca, M. *et al.* Breast Osteoblast-like Cells: A Reliable Early Marker for Bone Metastases From Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **18**, e659–e669 (2018).
29. Schito, L. & Rey, S. Hypoxic pathobiology of breast cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1868**, 239–245 (2017).
30. Tyagi, M. & Patro, B. S. Salinomycin reduces growth, proliferation and metastasis of cisplatin resistant breast cancer cells via NF- κ B deregulation. *Toxicology in Vitro* **60**, 125–133 (2019).
31. Paul, A., Edwards, J., Pepper, C. & Mackay, S. Inhibitory- κ B Kinase (IKK) α and Nuclear Factor- κ B (NF κ B)-Inducing Kinase (NIK) as Anti-Cancer Drug Targets. *Cells* **7**, 176 (2018).
32. Wang, W., Nag, S. & Zhang, R. Targeting the NFκB Signaling Pathways for Breast Cancer Prevention and Therapy. *CMC* **22**, 264–289 (2014).
33. Amelio, I. & Melino, G. Context is everything: extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants. *Cell Death Discov.* **6**, 16 (2020).
34. D’Orazi, G. & Cirone, M. Mutant p53 and Cellular Stress Pathways: A Criminal Alliance That Promotes Cancer Progression. *Cancers* **11**, 614 (2019).
35. Basu, S. *et al.* Mutant p53 controls tumor metabolism and metastasis by regulating PGC-1 α . *Genes Dev.* **32**, 230–243 (2018).
36. Singh, S. *et al.* Mutant p53 establishes targetable tumor dependency by promoting unscheduled replication. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 1839–1855 (2017).

37. Zhang, S. *et al.* Mutant p53 Drives Cancer Metastasis via RCP-Mediated Hsp90 α Secretion. *Cell Reports* **32**, 107879 (2020).
38. Eriksson, M. *et al.* Effect of Mutant p53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol Cell Biol* **37**, e00328-17 (2017).
39. Liu, J., Zhang, C., Hu, W. & Feng, Z. Tumor suppressor p53 and metabolism. *Journal of Molecular Cell Biology* **11**, 284–292 (2019).
40. Raj, N. & Attardi, L. D. The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a026047 (2017).
41. Makki, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology* **8**, CPath.S31563 (2015).
42. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy* **10**, 955–960 (2010).
43. Kontomanolis, E. N. *et al.* The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. *The Scientific World Journal* **2018**, 1–11 (2018).
44. Choi, D. S., Rosato, R. R. & Chang, J. C. Breast Cancer Stem Cells. in *Molecular Pathology of Breast Cancer* (eds. Badve, S. & Gökmen-Polar, Y.) 133–151 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-41761-5_10.
45. Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P. & Li, Y. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treatment Reviews* **69**, 152–163 (2018).
46. Kabel, A. M. & Baali, F. H. Breast Cancer: Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Journal of Cancer Research and Treatment* **6**.
47. Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A. & von Minckwitz, G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet* **389**, 2430–2442 (2017).
48. Leclerc, A.-F., Jerusalem, G., Devos, M., Crielaard, J.-M. & Maquet, D. Multidisciplinary management of breast cancer. *Archives of Public Health* **74**, (2016).
49. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. & Li, J. Breast Cancer *Cell line* Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer* **8**, 3131–3141 (2017).
50. EACC, E. C. of A. C. C. MDA-MB-231 *Cell line* profile. (2017).

51. Nalla, L. V., Kalia, K. & Khairnar, A. Self-renewal signaling pathways in breast cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **107**, 140–153 (2019).
52. Chen, X., Wang, S. & Cao, W. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cellular Immunology* **326**, 8–14 (2018).
53. Li, Y., Ma, X., Wu, X., Liu, X. & Liu, L. Prognostic Significance of Survivin in Breast Cancer: Meta-analysis. *The Breast Journal* **20**, 514–524 (2014).
54. Yin, P. *et al.* Wnt signaling in human and mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists. *Cancer Science* **109**, 3368–3375 (2018).
55. Braune, E.-B., Seshire, A. & Lendahl, U. Notch and Wnt Dysregulation and Its Relevance for Breast Cancer and Tumor Initiation. *Biomedicines* **6**, 101 (2018).
56. Zeng, X. & Ju, D. Hedgehog Signaling Pathway and Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2279 (2018).
57. Marino, L. *et al.* Mesenchymal stem cells from the Wharton’s jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *International Journal of Stem Cells* **12**, 218–226 (2019).
58. Schachtele, S., Clouser, C. & Aho, J. Methods to Validate Mesenchymal Stem Cell Identity, Potency, and Quality. *R&D systems* (2018).
59. Dittmer, J., Oerlecke, I. & Leyh, B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* (2011) doi:10.5772/21325.
60. Yustianingsih, V., Sumarawati, T. & Putra, A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. *Universa Medicina* **38**, 164 (2019).
61. Weiss, A. R. R. & Dahlke, M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Frontiers in Immunology* **10**, 1–10 (2019).
62. Naguib, Y. W. & Cui, Z. Nanomedicine: The Promise. 135–156 (2014) doi:10.1007/978-94-017-8739-0.
63. Babajani, A., Soltani, P., Jamshidi, E., Farjoo, M. H. & Niknejad, H. Recent Advances on Drug-Loaded Mesenchymal Stem Cells With Anti-neoplastic Agents for Targeted Treatment of Cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 748 (2020).

64. Sun, Z. *et al.* Roles of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Cancer Development and Targeted Therapy. *Stem Cells International* **2021**, 1–10 (2021).
65. Amara, I., Touati, W., Beaune, P. & de Waziers, I. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors. *Biochimie* **105**, 4–11 (2014).
66. Zhang, F. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosome: A tumor regulator and carrier for targeted tumor therapy. *Cancer Letters* **526**, 29–40 (2022).
67. Hong, I.-S., Lee, H.-Y. & Kang, K.-S. Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **768**, 98–106 (2014).
68. Liao, P. *et al.* Mutant p53 Gains Its Function via c-Myc Activation upon CDK4 Phosphorylation at Serine 249 and Consequent PIN1 Binding. *Molecular Cell* **68**, 1134-1146.e6 (2017).
69. Tang, Q., Su, Z., Gu, W. & Rustgi, A. K. Mutant p53 on the Path to Metastasis. *Trends in Cancer* **6**, 62–73 (2020).
70. Gilardini Montani, M. S. *et al.* Mutant p53, Stabilized by Its Interplay with HSP90, Activates a Positive Feed-Back Loop Between NRF2 and p62 that Induces Chemo-Resistance to Apigenin in Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* **11**, 703 (2019).
71. Verduci, L. *et al.* The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex. *Genome Biol* **18**, 237 (2017).
72. Levine, A. J., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. The Roles of Initiating Truncal Mutations in Human Cancers: The Order of Mutations and Tumor Cell Type Matters. *Cancer Cell* **35**, 10–15 (2019).

