

# Kultur dan Potensi *Stem Cells* dari Darah Tali Pusat

Richard Prayogo, Maria Teresa Wijaya

Kalbe Farma Research Center, Jakarta

Semuanya dimulai dari tahun 1988 yaitu saat pertama kali dilakukannya transplantasi *allogeneic* darah tali pusat (*umbilical cord blood*) ke seorang anak penderita anemia Fanconi di Paris<sup>(1)</sup>. Keberhasilan ini membuka horison baru dalam pemanfaatan darah tali pusat yang sebelumnya dianggap tidak berguna dan mulai berkembanglah minat dunia sains untuk meneliti lebih dalam tentang potensi yang terkandung di dalamnya. Saat ini darah tali pusat termasuk salah satu topik yang paling banyak diminati di dunia riset. Hal ini disebabkan oleh banyaknya keuntungan yang ditawarkan, terutama jika dibandingkan dengan transplantasi sumsum tulang yang sebelumnya menjadi primadona. Darah tali pusat memiliki *immunogenicity* yang lebih rendah (untuk review lihat Ryan et al, 2005<sup>(2)</sup>), isolasinya tidak membutuhkan prosedur yang invasif, dan untuk transplantasi tidak membutuhkan 100% ketepatan *HLA* (*human leucocyte antigen*)<sup>(3)</sup>.

Dalam artikel ini akan didiskusikan mengenai darah tali pusat, khususnya mengenai *mesenchymal stem cells* (MSC) yang terkandung di dalamnya. Pembahasan akan meliputi aspek metode isolasi dan ekspansi sel *ex vivo*, aplikasinya dalam terapi untuk *degenerative diseases*, serta rencana pengembangan untuk terapi penuaan di masa depan

## Darah tali pusat: isolasi dan pemrosesan awal

Darah tali pusat dapat diisolasi dengan dua cara, yaitu secara *in utero* (saat plasenta masih di dalam rahim) dan *ex utero* (saat plasenta sudah di luar rahim). Literatur menunjukkan bahwa dengan isolasi secara *in utero*, bisa didapatkan 100ml darah sedangkan dengan isolasi secara *ex utero* hanya bisa didapatkan 80 ml<sup>(4)</sup>. Pada mulanya, transplantasi dilakukan dengan *whole blood* yang berarti bahwa darah tali pusat ditransplantasikan secara utuh, tanpa dipisahkan komponennya terlebih dahulu. Penggunaan *whole blood* untuk transplantasi memiliki risiko timbulnya reaksi *graft vs host disease* (GVHD) yang lebih tinggi, antara lain karena adanya inkompatibilitas yang disebabkan oleh antigen

permukaan sel darah merah yang ikut tertransplantasi (antigen ABO), namun ada juga literatur yang menyatakan bahwa inkompatibilitas ABO tidak menimbulkan reaksi GVHD yang berat<sup>(5)</sup>.

Meskipun demikian, semua hal yang meningkatkan kemungkinan terjadinya *rejection* harus diatasi, salah satunya dengan cara memproses darah tali pusat sebelum transplantasi, sehingga hanya *stem cells* yang bergunalah yang ditransplantasikan ke pasien. Dua proses yang umum dilakukan adalah *red blood cells depletion* dan *volume reduction*. Selain untuk menurunkan kemungkinan timbulnya reaksi inkompatibilitas, kedua proses tersebut juga dilakukan untuk mempermudah penyimpanan jangka panjang. Berbagai macam metode bisa digunakan, contohnya metode Ficoll-Hypaque yang digunakan untuk memisahkan *mononuclear cells* (MNC) yang mengandung sel (*stem cells*) yang dibutuhkan. Sampai saat ini ada dua tipe *stem cells* yang telah ditemukan dalam darah tali pusat, yaitu *hematopoietic stem cells* dan *mesenchymal stem cells*. Sebenarnya masih ada beberapa tipe lain yang juga sudah ditemukan, seperti *neuron-like stem cells*<sup>(6)</sup> namun dua yang disebutkan di atas adalah yang sudah dianalisis secara mendalam dan menyeluruh.

## *Stem cells* dalam darah tali pusat: kultur dan ekspansi

Masalah yang timbul dari pemrosesan darah tali pusat pra-transplantasi adalah berkurangnya kuantitas *stem cells* yang bisa didapatkan. Hal ini diperparah oleh kenyataan bahwa darah tali pusat memang hanya mengandung sedikit *stem cells*. Pada kenyataannya, dari setiap  $1 \times 10^8$  MNC hanya bisa didapatkan 0-2.3 MSC clones (*mean*  $1.1 \pm 0.2$ )<sup>(7)</sup>. Oleh karena itu, untuk bisa memenuhi jumlah sel yang dibutuhkan untuk transplantasi, yang untuk manusia berkisar antara  $10^6$ - $10^8$  sel per kg berat badan, diperlukan teknik untuk memperbanyak jumlah sel secara *ex vivo*. Untuk bisa mendapatkan hasil ekspansi yang cepat dan memuaskan, ada beberapa hal yang sangat penting untuk diperhatikan, yaitu (a) jeda yang tidak

melebihi 15 jam dari waktu pengambilan darah tali pusat dan isolasi MSC (b) volume darah tali pusat harus lebih dari 33ml (c) jumlah MNC yang diisolasi harus melebihi  $1 \times 10^8$  dan (d) tidak boleh ada tanda-tanda hemolisis dan koagulasi<sup>(7)</sup>.

Banyak ilmuwan dari berbagai lembaga telah melakukan kultur MSC, masing-masing dengan metode mereka sendiri. Umumnya, media kultur yang dipergunakan adalah media standar dengan suplemen *fibroblast growth factor (FGF)* untuk menunjang proliferasi sel, antibiotik untuk mengatasi kontaminasi, serta serum dari *bovine (fetal bovine serum, FBS)* ataupun *calf (fetal calf serum, FCS)*. Untuk bisa melangkah maju ke penggunaan MSC sebagai terapi rutin di manusia, penggunaan *animal-derived serum* harus dihilangkan atau dengan kata lain, kultur harus dilakukan secara *xenofree*. Hal ini untuk mencegah kemungkinan transfer patogen dari hewan ke manusia serta untuk mencegah terjadinya kontaminasi protein hewan yang dapat menyebabkan reaksi penolakan.

Ada beberapa alternatif untuk menggantikan penggunaan serum hewan dalam kultur, antara lain adalah penggunaan serum dari manusia, baik yang *autologous* (serum berasal dari pasien sendiri) maupun yang *allogeneic* (serum berasal dari orang lain), dan penggunaan media tanpa serum.

Dalam laporan di jurnal *Experimental Hematology* penggunaan *autologous serum* dan FBS dalam kuantitas yang sama memberikan hasil ekspansi kultur yang sama, ditinjau dari segi morfologi, tingkat proliferasi dan kemampuan diferensiasi. Bahkan penggunaan *autologous serum* dapat meningkatkan kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi sel tulang<sup>(8)</sup>. Walaupun hasil yang ditunjukkan nampak menggembirakan, ada dua hal yang membatasi penggunaan *autologous serum* untuk ekspansi MSC berskala besar, yaitu berbedanya kandungan protein dalam serum tiap-tiap orang sehingga kuantitas *growth factor* yang dibutuhkan juga berbeda dan terbatasnya jumlah serum yang bisa diambil dari satu orang.

Alternatif lain adalah penggunaan *allogeneic serum* seperti yang dilakukan oleh sekelompok ilmuwan dari Norwegia<sup>(9)</sup>. Mereka menggunakan FBS, *allogeneic serum* dan *autologous serum* untuk ekspansi MSC yang diisolasi dari sumsum tulang belakang. Hasilnya adalah bahwa ternyata penggunaan *allogeneic serum* menyebabkan berhentinya metabolisme sel dan apoptosis, sedangkan penggunaan *autologous serum* memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan FBS.

Dengan kurang memuaskannya hasil penggunaan serum manusia serta adanya hambatan-hambatan dalam penggunaannya, alternatif yang tersisa adalah penggunaan *serum-free media*. Ada beberapa pemasok produk bioteknologi yang memproduksi media bebas serum, sebagai gantinya ditambahkan protein-protein komponen serum dengan komposisi yang pasti, dan dengan begitu masalah yang timbul dari ketidakpastian kandungan protein dalam serum dapat dipecahkan. Walaupun demikian, tidak semua *serum-free media* bebas dari produk hewani karena beberapa komponen protein di dalamnya ada yang diproduksi dari hewan juga.

Selain dari upaya menuju kultur *xenofree*, perkembangan lainnya adalah penggunaan bioreaktor untuk ekspansi MSC. Dengan bioreaktor, sistem kultur sel dilakukan tidak secara statis seperti kultur biasa. Sistem kultur yang dinamis dengan

bioreaktor memberikan lingkungan yang lebih kondusif untuk proliferasi sel, meningkatkan *growth rate*, mengurangi kemungkinan kontaminasi, dan dengan demikian menghasilkan ekspansi sel yang lebih efisien. Chen et al dalam percobaan mereka membandingkan hasil ekspansi MSC yang diisolasi dari sumsum tulang belakang dengan dan tanpa menggunakan bioreaktor. Mereka menemukan bahwa penggunaan bioreaktor dapat meningkatkan efisiensi pengembangbiakan sel sambil tetap mempertahankan potensi diferensiasi mereka<sup>(10)</sup>.

### **Stem cells dalam darah tali pusat: sekilas mengenai aplikasi klinis**

Saat ini penggunaan darah tali pusat dalam terapi klinis lebih banyak dilakukan untuk pasien kanker yaitu dengan transplantasi *hematopoietic stem cells*, sementara penggunaan MSC masih relatif lebih sedikit. Secara khusus, dalam terapi untuk penyakit degeneratif, MSC telah digunakan untuk mengobati *stroke* dan *Buerger's disease*. Namun keduanya belum ada yang memasuki tahap *clinical trial*, percobaan masih hanya sampai pada tahap studi di mencit, tikus ataupun *case study* di manusia dengan jumlah pasien yang sangat terbatas.

Untuk terapi *stroke*, telah diteliti kegunaan sel CD34<sup>+</sup> dan CD34<sup>-</sup> untuk me-repopulasi bagian otak tikus yang rusak akibat rusaknya pembuluh darah. Hasilnya menunjukkan bahwa transplantasi sel dari darah tali pusat mendorong mobilisasi sel-sel otak tikus menuju ke daerah lesi dan perbaikan performa tikus percobaan dalam *behavioral test* yang dilakukan. Dari hasil penelitian *post-mortem* nampak bahwa mekanisme perbaikan oleh sel-*stem cells* yang disuntikkan adalah terutama melalui sekresi *neurotrophic factors* dan bukan melalui *neurogenesis*<sup>(11)</sup>.

Dalam percobaan MSC untuk terapi Buerger's disease, sebanyak empat orang pasien menerima transplantasi MSC yang diisolasi dari darah tali pusat dan semuanya menunjukkan perbaikan kondisi penyakit; nekrosis sel-sel kulit berkurang hanya dalam waktu empat minggu. Keberhasilan yang sama juga ditunjukkan dari hasil transplantasi MSC ke mencit sebagai model<sup>(12)</sup>.

### **Darah tali pusat: looking to the future on rejuvenation**

Setelah melihat potensi yang begitu besar dari darah tali pusat dalam terapi berbagai macam penyakit, maka ide berikutnya yang muncul ialah menerapkan darah tali pusat untuk terapi rejuvenasi bagi orang tua. PBB telah mengeluarkan angka statistik per 2006 bahwa penduduk yang berusia 60 tahun ke atas berjumlah 687 juta orang atau 1 dari 10 orang adalah manula<sup>(13)</sup>. Dan angka ini akan terus meningkat di masa mendatang. Melihat fakta bahwa populasi penduduk usia tua dunia semakin meningkat karena membaiknya pelayanan kesehatan masyarakat dan kemajuan dunia kedokteran, potensi sel terapi untuk rejuvenasi amatlah besar nilainya.

Seperti kita ketahui dari berbagai macam teori tentang proses penuaan (*ageing*), tubuh makhluk hidup akan menurun kemampuannya seiring dengan bertambahnya usia karena mengalami banyak hal yang mendukung ke arah tersebut.

Berkurangnya kemampuan memperbaiki mutasi DNA, mempertahankan keseimbangan homeostasis radikal bebas, menjaga ketepatan siklus sel, serta memendeknya ujung telomer kromosom adalah ciri-ciri khas dari sel yang sudah menua<sup>(14)</sup>. Bahkan beberapa jurnal juga menunjukkan bahwa *stem cells* pun mengalami proses degenerasi seiring berjalannya waktu dengan ciri-ciri berkurangnya jumlah *passage* dan *population doubling*, serta memendeknya telomere dari hasil eksperimen *southern blotting*<sup>(15)</sup>. Berkurangnya kemampuan regeneratif *stem cells* pada organisme usia tua merupakan salah satu faktor penunjang melemahnya tubuh di usia tua.

Dengan mengansumsikan bahwa *stem cells* dari darah tali pusat bisa menghasilkan regenerasi sel-sel dan jaringan-jaringan yang rusak seperti pada contoh-contoh sebelumnya, maka kita bisa berhipotesa bahwa *stem cells* dari darah tali pusat bisa mendorong proses regenerasi dari komponen-komponen tubuh yang sudah aus dimakan usia. Salah satu argumen kuat mengapa darah dari tali pusat dengan *stem cells* di dalamnya merupakan kandidat terkuat untuk terapi rejuvenasi ialah bahwa darah tali pusat merupakan sesuatu yang masih segar dan baru. Darah tersebut mempunyai sifat “kemudaan” karena dihasilkan dari bayi yang baru lahir. Kami berharap bahwa sesuatu yang masih baru dan segar ini bisa menggantikan sel-sel yang sudah tua. Hipotesis dan argumen kami pun didukung oleh percobaan dari sekelompok ilmuwan dari Stanford Medical School yang melakukan *isochromatic* dan *heterochromatic parabiosis*<sup>(16)</sup>. Eksperimen ini menggunakan sepasang tikus, masing-masing tua dan muda yang saling berbagi aliran darah. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa sel-sel dari darah muda bisa “menghidupkan kembali” sel-sel dari darah tua, namun tidak sebaliknya. Peningkatan kemampuan regeneratif ini ditandai dengan meningkatnya ekspresi dari ligan Notch, yaitu protein Delta. Aktivasi Delta sendiri adalah salah satu penanda biokimia dari aktivasi sel satelit (*stem cells* untuk sel otot).

Oleh karena itu, kami dari **Kalbe Farma Research Center** tertarik sekali untuk menguji ampuhnya darah tali pusat untuk terapi rejuvenasi. Konsep eksperimen yang akan kami lakukan cukup sederhana, walaupun sebenarnya detailnya cukup rumit. Kami ingin menerapkan darah tali pusat ataupun *mesenchymal stem cells* yang ada di dalam darah tali pusat kepada tikus tua dan mengecek efeknya melalui perbandingan dengan tikus yang masih berusia muda. Untuk menerapkan *mesenchymal stem cell*, kami perlu mengekspansi jumlah sel terlebih dahulu sampai mencapai jutaan sel untuk cukup diinjeksi kepada tikus. Tentunya selama ekspansi, sel-sel tersebut harus kami pertahankan dalam wujud tidak terdiferensiasi alias masih murni *stem cells*. Untuk ekspansinya akan digunakan medium yang tidak menggunakan serum dan tidak mengandung komponen protein dari hewan untuk menunjang impian kami mengejar kultur sel yang *xenofree*.

Selama kultur sel, kami akan juga terus memonitor keadaan tidak terdiferensiasinya *stem cell* dengan teknik yang sudah umum seperti *immunocytochemistry*, *flow cytometry*, dan *reverse transcription PCR assay*. Untuk percobaan di tikus, kami akan menggunakan beberapa parameter kemampuan fisik dan kognitif sebagai pembanding antara tikus yang muda dan tua. Kedua parameter tersebut akan dianalisis melalui berbagai macam *assay*.

Jikalau segala sesuatu pada percobaan di tikus ini sukses, tahap berikutnya tentu saja akan kami lanjutkan pada *clinical trial* di manusia. Kita semua berharap terapi sel benar-benar akan terwujud sebagai obat dan penyembuhan generasi berikutnya.

#### KEPUSTAKAAN

1. Gluckman E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; .321:1174-8.
2. Ryan JM et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflammation*. 2005; .2: 8-18.
3. Bradley MB, Cairo MS. Cord blood immunology and stem cells transplantation. *Human Immunol*. 2005; 66: 431- 46.
4. Craven CM, Ward K. Transfusion of fetal cord blood cells: an improved method of hematopoietic stem cells transplantation? *J Repro Immunol* 1998; 42: 59-77.
5. Wagner JE et al. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346: 214-9.
6. Jurga M, et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res*. 2006; .83: 627-37.
7. Bieback K., et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-34.
8. Stute N et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004; .32:1212-25.
9. Shahdadfar et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005; 23: 1357- 66.
10. Chen et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC). *Stem Cells (August online publication)* 2006.
11. Boltze J et al. Experimental treatment of stroke in spontaneously hypertensive rats by CD34+ and CD34- cord blood cells. *GMS Ger Med Sci*.3: Doc09. 2005.
12. Kim SW et al. Successful stem cells therapy using umbilical cord blood derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* 2006; 24: 1620-1626.
13. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2006. <http://www.un.org/esa/population/unpop.htm>
14. Lou Z. , Chen J. Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res*. 2006; .312: 2641-46.
15. Bonab MM, et al. Aging of mesenchymal stem cells in vitro. *BMC Cell Biology* 2006; 7:14.
16. Conboy IM,et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a youthful systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760- 4.