

TINJAUAN PUSTAKA

Proses dalam *Umbilical Cord Blood Banking*

Maria Teresa Wijaya, Ferry Sandra

Research Center, PT. Kalbe Farma Tbk., Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Sejak aplikasi pertamanya dalam transplantasi di tahun 1988, sel induk (*stem cells*) dari darah tali pusat (*umbilical cord blood* atau UCB) mulai disebut-sebut sebagai pengganti sel induk dari sumsum tulang belakang. Bahkan, dengan berbagai keuntungan yang ditawarkan, kini UCB perlahan mulai menggantikan posisi sumsum tulang belakang sebagai sumber utama sel induk untuk terapi. Seiring dengan meningkatnya peranan UCB, mulai muncullah UCB *bank* sebagai tempat penyimpanan sel induk untuk digunakan di kemudian hari.

Proses yang dilakukan dalam UCB *banking* secara umum meliputi tiga tahapan, yaitu isolasi, pemrosesan dan *screening*, serta penyimpanan jangka panjang. Dalam ketiga tahapan tersebut, ada banyak faktor yang menentukan tingkat kualitas UCB yang didapatkan. Mengingat pentingnya peranan kualitas UCB (terutama dilihat dari segi kuantitas sel induk yang didapatkan) dalam menentukan keberhasilan transplantasi, amatlah penting untuk memaksimalkan tiap tahap dalam proses UCB *banking*.

INTRODUKSI

Keberadaan *colony-forming cells* dalam UCB pertama kali ditunjukkan oleh Knudtzon (1974)¹. Beberapa tahun kemudian, Nakahata dan Ogawa (1982) menemukan bahwa populasi *colony-forming cells* tersebut mengandung antara lain, sel induk dan *early hematopoietic progenitor cells*². Dan pada tahun 1988 diadakanlah, untuk pertama kalinya di dunia, transplantasi UCB pada seorang pasien anak penderita *Fanconi Anemia*³. Data sampai November 2004 menunjukkan bahwa sudah ± 6000 transplantasi UCB dilakukan di seluruh dunia⁴.

Seiring dengan makin banyaknya riset tentang UCB, popularitas UCB sebagai alternatif sumber sel induk (khususnya sel induk hematopoietik) untuk pengobatan kanker mulai menanjak. Dengan berbagai keuntungan yang ditawarkan oleh penggunaan UCB dalam transplantasi,

muncullah ide-ide untuk mengadakan sebuah sistem penyimpanan UCB atau UCB *banking*, mirip dengan sistem yang sudah ada terlebih dahulu untuk sumsum tulang belakang. Hal ini dimaksudkan untuk memberikan kesempatan yang lebih luas bagi pasien yang membutuhkan transplantasi dengan menyediakan sampel UCB yang terorganisir dalam skala besar. Koike (1983) menemukan bahwa sel-sel yang diisolasi dari UCB dapat tetap bertahan hidup dan masih mempunyai potensi untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel dalam garis hematopoietik *in vitro* setelah *cryopreservation*⁵. Salah satu implikasi temuan Keiko ini adalah bahwa sampel UCB bisa disimpan selama bertahun-tahun dalam nitrogen cair untuk kemudian digunakan dalam transplantasi di masa mendatang; ini merupakan prinsip dasar proses UCB *banking*. Dalam perkembangannya, UCB *bank* dapat digolongkan menjadi dua, yaitu *public bank* yang *non-profit* dan membuka akses bagi siapa saja yang membutuhkan

UCB yang tersimpan di sana, dan *private bank* yang *for-profit*, menarik biaya penyimpanan, dan membatasi akses penggunaan sampel UCB hanya untuk klien dan keluarganya. Saat ini sudah ada beberapa UCB *bank* yang tersebar di seluruh dunia, terutama di Amerika Serikat, di mana terdapat setidaknya 15 *public UCB banks*⁶.

Proses penyimpanan UCB secara umum meliputi tiga tahap: (1) isolasi UCB, (2) pemrosesan dan *screening*, dan (3) *cryopreservation*. Tahap pertama meliputi berbagai macam teknik isolasi UCB, seperti koleksi secara *in-utero* atau *ex-utero* serta berbagai variabel lainnya seperti jarak antara saat kelahiran dan isolasi UCB. Tahap kedua meliputi pilihan penggunaan *open* atau *closed method*, pengambilan sampel untuk *screening* berbagai macam penyakit, serta pemrosesan UCB untuk mempermudah penyimpanan. Tahap ketiga meliputi *controlled-rate freezing* : sampel UCB didinginkan secara bertahap sebagai persiapan untuk penyimpanan jangka panjang di suhu -196°C dalam nitrogen cair yang merupakan tahap terakhir dalam proses penyimpanan UCB.

ISOLASI UCB

Tahap ini memegang peranan penting dalam menentukan kualitas produk UCB yang dihasilkan, seperti volume total UCB, jumlah *total nucleated cell* (TNC), dan total sel CD34⁺. Berdasarkan saat pengambilan, ada dua metode, yaitu *in-utero* dan *ex-utero*. Metode yang pertama berarti isolasi UCB dilakukan saat plasenta masih berada di dalam rahim, sedangkan metode yang kedua berarti isolasi dilakukan saat plasenta sudah berada di luar rahim. Secara umum, masing-masing memiliki keuntungan dan kerugiannya sendiri-sendiri. Metode *in-utero* menghasilkan volume sampel yang lebih besar karena proses isolasi dilakukan segera setelah kelahiran bayi, namun lebih sulit dilakukan dan dapat mengganggu jalannya proses kelahiran. Sebaliknya, isolasi UCB *ex-utero* lebih mudah dan dapat dilakukan oleh staf UCB *bank* yang sudah terlatih; namun biasanya jumlah sel yang bisa diisolasi lebih sedikit dan lebih berisiko terkontaminasi bakteri⁷. Mana yang sebenarnya lebih baik di antara kedua metode ini masih menjadi subyek banyak penelitian hingga saat ini. Beberapa kelompok sudah melakukan analisis statistik mengenai pengaruh metode isolasi terhadap jumlah TNC dan sel CD34⁺ yang merupakan dua parameter penting penentu keberhasilan sebuah transplantasi. Penelitian Surbek dkk. menunjukkan bahwa untuk kasus kelahiran normal, isolasi *in-utero* menghasilkan volume UCB dan jumlah TNC yang lebih banyak⁸. Hasil ini dikonfirmasi lagi oleh temuan Solves *et al.*, yang melakukan analisis statistik retrospektif terhadap unit-unit UCB yang disimpan di Valencia Cord Blood Bank. Selain

itu, mereka juga menunjukkan bahwa tingkat kontaminasi biologi pada sampel yang diisolasi secara *ex-utero* relatif lebih tinggi⁷. Untuk kelahiran dengan operasi caesar, perbandingan kedua metode koleksi juga menunjukkan superioritas metode *in-utero*⁹. Perbedaan hasil kedua metode disebabkan oleh dua hal: adanya jeda waktu yang signifikan antara proses *cord clamping* dan isolasi darah yang terkandung di dalamnya dan terjadinya penggumpalan darah pada kasus isolasi *ex-utero*⁷.

Namun tidak semua hasil penelitian mendukung hipotesis superioritas metode *in-utero*. Sparrow *et al.* menunjukkan tidak ada perbedaan antara kedua metode isolasi UCB pada kasus kelahiran normal¹⁰. Sementara Yamada melaporkan bahwa volume UCB dan total jumlah sel CD 34⁺ yang lebih tinggi dapat dihasilkan dengan metode isolasi *ex-utero* dan kelahiran caesar. Perbedaan hasil berbagai penelitian ini bisa disebabkan oleh bermacam faktor, misalnya faktor jumlah sampel yang dianalisis dan perbedaan kebiasaan praktek di masing-masing rumah sakit tempat isolasi UCB dilakukan¹¹.

Selain faktor pilihan metode yang digunakan, beberapa faktor obstetrik juga dapat mempengaruhi kualitas UCB yang didapatkan. Penelitian menunjukkan bahwa kualitas UCB yang lebih baik berkorelasi dengan: (1) *primigravidae*, yaitu ibu yang melahirkan untuk pertama kalinya (2) bayi berjenis kelamin perempuan (3) keluarnya plasenta tidak lebih dari 10 menit setelah kelahiran bayi (4) isolasi UCB dilakukan tidak lebih dari 5 menit setelah keluarnya plasenta (5) berat plasenta > 600 g., dan (6) usia kehamilan yang lebih dari 39 minggu^{12,13}. Selain itu, satu hal yang cukup menarik adalah stres selama proses kelahiran, misalnya kelahiran yang sulit, berkorelasi dengan kualitas UCB yang lebih baik. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya aktivitas berbagai macam *cytokines* yang mendorong mobilisasi sel induk ke UCB¹⁴.

Mengingat betapa pentingnya mendapatkan jumlah TNC yang sebanyak-banyaknya dalam isolasi UCB, beberapa peneliti telah mengusulkan bermacam cara isolasi baru untuk meningkatkan volume UCB yang bisa diperoleh. Elchalal, *et al.* mengusulkan sebuah metode yang menggunakan *blood bag* dan *syringe* berisi sodium klorida untuk *flushing*. Metode ini dianggap yang paling efektif, namun jarang dipakai karena adanya peningkatan kontaminasi bakteri dan sel-sel ibu¹⁵. Ada juga yang mengusulkan pengambilan UCB bukan hanya dari tali pusat (*cord blood*) tapi juga dari plasenta. Dalam metode ini, UCB dikumpulkan dalam dua fraksi, yang pertama dari *cord blood* melalui *umbilical venipuncture* saat plasenta masih di dalam rahim dan yang kedua dari hasil *flushing* plasenta dengan *saline* yang telah ditambahi heparin. Peningkatan kualitas UCB yang diisolasi terlihat dari lebih tingginya volume total (rata-rata 119.6 ml vs 71-98 ml dengan

metode lain), lebih tingginya jumlah TNC dan *mononuclear cells*, serta tidak adanya peningkatan kontaminasi bakteri dan sel-sel ibu¹⁶.

PEMROSESAN DAN SCREENING

Untuk tahap ini, ada dua pilihan sistem yang bisa digunakan yaitu *closed* dan *open system*. Pemilihan sistem ini juga harus disesuaikan dengan metode isolasi yang digunakan. *Open system* adalah pemrosesan UCB dalam *tube*. Biasanya UCB diisolasi menggunakan *syringe* dan ditransfer ke dalam *tube* untuk disimpan dan diproses lebih lanjut. Sistem ini disebut *open system* karena perpindahan dari satu *tube* ke *tube* lain memberikan ruang terbuka untuk kontak spesimen dengan udara bebas, termasuk kontaminan yang terkandung di dalamnya¹⁵. Sebaliknya, penggunaan *closed system* meniadakan kontak antara spesimen dengan udara bebas karena UCB sampel disimpan dan diproses dalam sebuah *bag system* yang tersambung satu sama lain dan karena itu transfer antar kantong dapat dilakukan tanpa membuka kantong sama sekali¹⁷. Terlihat jelas superioritas *closed system* dalam hal proteksi sampel, walaupun tentu saja hal ini dibarengi dengan lebih mahalnya biaya yang harus dikeluarkan. Saat ini sebagian besar UCB bank sudah menggunakan *closed system* mengingat pentingnya menjaga sterilitas sampel yang akan disimpan¹⁵.

Setelah UCB tersimpan dalam *container*, UCB akan diproses untuk bisa mempermudah penyimpanan jangka panjang. Ada dua jenis proses yang lazim dilakukan, yaitu *volume reduction* dan *red blood cells depletion*. Proses *volume reduction* dilakukan terutama untuk memperkecil ruang yang diperlukan untuk penyimpanan sampel dalam *cryogenic tank* sedangkan *red blood cells depletion* bertujuan untuk menghindari terjadinya reaksi penolakan *graft* akibat *ABO antigen incompatibility*. Dalam *open system*, kedua proses ini bisa dilakukan dengan pemisahan sentrifugasi berdasarkan gradien densitas atau melalui proses seleksi positif sel CD34⁺. Sedangkan untuk *closed system*, adalah para ilmuwan dari New York Blood Center yang mempelopori pengembangan teknik *volume reduction* dan *red blood cells depletion* yang pertama. Teknik yang mereka kembangkan didasarkan pada pembentukan *rouleaux* dengan menggunakan *hydroxyethyl starch* (HES) dan sentrifugasi untuk memisahkan leukosit dalam *supernatant* dengan sel darah merah yang terkumpul di dasar¹⁸. Metode inilah yang menjadi dasar dari perkembangan metode-metode yang sekarang banyak dipakai di laboratorium dan UCB bank.

Selanjutnya adalah proses *screening*, meliputi pencatatan sejarah kesehatan keluarga dan tes terhadap darah ibu serta

sampel UCB yang telah diisolasi. Hal ini dilakukan untuk meyakinkan bahwa UCB unit yang ada pantas untuk disimpan dan mempunyai potensi untuk digunakan dalam transplantasi di kemudian hari. *Foundation for Accreditation of Cellular Therapy (FACT-NETCORD)* dan *American Association of Blood Banks (AABB)* telah mengeluarkan *guidelines* yang mengatur tentang apa saja informasi latar belakang kesehatan keluarga dan ibu yang perlu dikumpulkan. Untuk *disease screening*, FACT-NETCORD mengharuskan UCB bank untuk melakukan tes atas status HIV-1 dan -2, HTLV/II, HCV dan HbsAg, sementara AABB hanya menyarankan untuk tes HIV-1 antigen, anti-HBc, dan sifilis⁶. Semua tes tersebut tidak bisa dilakukan di UCB dan oleh karena itu harus dilakukan dengan menggunakan sampel darah ibu. Sementara itu, sampel UCB akan dites untuk mengecek kontaminasi bakteri dan jamur, golongan darah (ABO) dan rhesus. Selain itu, untuk menjaga kualitas UCB yang akan disimpan, beberapa UCB bank juga melakukan tes untuk menentukan jumlah TNC, jumlah sel CD34⁺ dan jumlah sel yang *viable*. Penghitungan jumlah TNC dilakukan dengan *automated cell counter*, kuantifikasi sel CD34⁺ dilakukan dengan *flow cytometry* sementara tes *viability* dilakukan dengan menggunakan *trypan blue dye* dan hemacytometer.

Untuk *public bank*, dengan target penggunaan UCB untuk *allogeneic transplantation*, biasanya dilakukan tes tambahan untuk menentukan tipe HLA tiap sampel. Ada tiga lokus yang biasanya dites, yaitu lokus HLA-A, HLA-B (MHC tipe I) dan DRB1 (MHC tipe II). Hal ini dilakukan karena *HLA matching* sangat penting untuk mencegah timbulnya *graft vs host disease* (GvHD). Dengan melakukan tes sebelum penyimpanan, proses pencarian donor yang sesuai untuk tiap resipien akan menjadi lebih mudah dan cepat.

CRYOPRESERVATION: PENYIMPANAN JANGKA PANJANG

Untuk penyimpanan jangka panjang, ada tiga hal yang perlu diperhatikan, yaitu *controlled-rate freezing*, penambahan *cryoprotectant* dan penyimpanan dalam tanki nitrogen cair.

Controlled-rate freezing perlu dilakukan untuk mencegah stres yang berlebihan pada sel-sel akibat perubahan suhu yang terlalu mendadak. Tahap ini bisa dilakukan menggunakan *controlled-rate freezer* yang menawarkan kemudahan proses pembekuan secara otomatis. Alternatif lain adalah memasukkan *tube* berisi sel ke dalam sebuah *container* berisi ethanol yang kemudian dipindahkan dari kulkas bersuhu tinggi ke yang lebih rendah secara bertahap dalam jangka waktu tertentu. Ethanol disini berfungsi untuk mengontrol turunnya suhu secara bertahap.

Untuk *cryoprotectant*, ada beberapa jenis yang bisa dipakai, yang paling umum digunakan adalah *dimethyl sulphoxide* (DMSO). Fungsi *cryoprotectant* adalah untuk melindungi sel dari kerusakan akibat suhu nitrogen cair yang terlalu rendah. Untuk penyimpanan *hematopoietic stem* dan *progenitor cells* (HSC dan HPC), penelitian menunjukkan bahwa prosedur yang optimal meliputi penggunaan 10% DMSO sebagai *cryoprotectant* ditambah dengan 2% *human albumin* sebagai suplemen. *Cell recovery* yang lebih baik bisa didapatkan dengan penyimpanan dalam konsentrasi tinggi (5×10^7 MNC/ml) dan penambahan DMSO yang dilakukan dengan cepat dan bukan secara bertahap¹⁹.

Dengan nitrogen cair, sel dapat disimpan selama bertahun-tahun tanpa mengalami perubahan yang signifikan. Sampai saat ini, spesimen UCB paling tua yang pernah diteliti berusia 15 tahun. Kobylka dan rekan menunjukkan bahwa setelah 15 tahun disimpan dalam nitrogen cair dan kemudian dicairkan (*thawed*), 80% *mononuclear cells* bisa didapatkan kembali dan tidak ada kerusakan dilihat dari segi kemampuan berproliferasi dan potensi membentuk koloni²⁰. Untuk penyimpanan dalam tempo yang lebih singkat, spesimen UCB yang telah disimpan selama 5 tahun juga terbukti tidak mengalami perubahan yang signifikan dalam hal potensi pembentukan sel-sel darah²¹. Selain itu, untuk mengurangi jumlah sel yang rusak setelah proses *thawing*, sampel dalam tube dapat ditambah dengan *saline* dalam perbandingan 1:2. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi agregasi sel granulosit²².

PENUTUP

Dengan potensi UCB yang demikian besar untuk digunakan dalam transplantasi, industri UCB *banking* saat ini telah mengalami perkembangan yang cukup pesat. Signifikansi *cord blood banking* terletak pada kemampuan untuk mendapatkan UCB dengan kualitas terbaik dan kemampuan untuk menyimpan dalam jangka waktu lama tanpa perubahan yang berarti dalam hal kualitas sel induk yang disimpan. Dalam artikel ini telah didiskusikan secara umum mengenai dasar-dasar proses yang perlu dilakukan dalam *cord blood banking*.

KEPUSTAKAAN

- Knudtson S. In vitro growth of granulocytes colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43:357-61.
- Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotent hemopoietic progenitors. *J.Clin.Invest.* 1982; 80: 1324-8.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321:1174-8.
- International cord blood society, 2006. (<http://www.cordblood.org>)
- Koike K. Cryopreservation of pluripotent and committed hemopoietic progenitor cells from human bone marrow and cord blood. *Acta Paediatr. Japan* 1983; 25:275-8.
- Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Ann. Rev. Med.* 2006; 57:403-17.
- Solves P, Moraga R, Saucedo E, *et al.* Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31:269-73.
- Surbek DV, Schonfeld B, Tichelli A, *et al.* Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22:311-2.
- Surbek DV, Visca E, Steinmann C, *et al.* Umbilical cord blood collection before placental delivery during caesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183:218-21.
- Sparrow RL, Cauchi JA, Ramadi LT, *et al.* Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfusion* 2002; 42:210-5.
- Yamada T, Okamoto Y, Kasamatu H, *et al.* Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2000; 79: 830-3.
- Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J. Impact of donor- and collection-relater variables on product quality in ex utero cord blood banking. *Transplant. Cell. Eng.* 2005; 45:189-94.
- Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, *et al.* Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant. Proc.* 2006; 38: 1174-6.
- Lim FT, Scherjon SA, Van Beckhoven JM, *et al.* Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183: 1144-52.
- Elchalal U, Fasouliotis SJ, Shtockheim D, *et al.* Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: a comparison of three methods. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 182: 227-32.
- Bornstein R, Flores AI, Montalban MA, *et al.* A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem Cells* 2005; 23:324-34.
- Adami V, Malangone W, Falasca E, *et al.* A closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. *Blood Cells Mol. Dis.* 2005; 35: 389-97.
- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, *et al.* Processing and cryopreservation of placental/ umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:10119-22.
- Meyer TPH, Hofmann B, Zaisserer J, *et al.* Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2006; 8:265-76.
- Kobylka P, Pavol I, Birgitta BV, *et al.* Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation* 1998; 65:1275-8.
- Goodwin HS, Grunzinger LM, Regan DM, McCormick KA, Johnson CE, Oliver DA. Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integral segment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytotherapy* 2003; 5:80-6.
- Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, Spiers ASD, Lowenthal RM, Ruutu T. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *Br. J. Haematol.* 1978; 40:185-95.