

Kri iz epruvete – gojenje eritrocitov *in vitro*

Blood from the tube –cultivation of red cells *in vitro*

Primož Požnenel, Primož Rožman

Zavod RS za
transfuzijsko medicino,
Štajmerjeva 6, Ljubljana

Korespondenca/

Correspondence:

dr. med. Primož Požnenel,
e: primoz.poznenel@ztm.si

Ključne besede:

eritropoeza *in vitro*;
popkovnična kri;
embrionalne matične
celice; inducirane
pluripotentne matične
celice; enukleacija

Key words:

in vitro erythropoiesis;
umbilical cord blood;
embryonic stem cells;
induced pluripotent stem
cells; enucleation

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 616–28

Prispelo: 27. jul. 2013,
Sprejeto: 3. jul. 2014

Izvleček

Transfuzija krvi je uveljavljena terapevtska metoda, ki je še vedno v porastu. Naraščajoče potrebe po koncentriranih eritrocitih zaradi starajočega se prebivalstva bodo v naslednjih desetletjih zahtevale nove pristope pri preskrbi s krvjo. Eden od njih je tudi gojenje eritrocitov *in vitro*. Tehnologija omogoča pridobivanje eritrocitov iz matičnih celic. Cilj je pridobivanje velikih količin zrelih enukleiranih eritrocitov z odraslim hemoglobinom, ki imajo »univerzalno krvno skupino« 0, RhD-negativno. Trenutno je že na voljo ustrezna tehnologija, ki pa še ne omogoča ustvarjanja velikih količin eritrocitov, primerljivih z učinkom koncentriranih eritrocitov krvodajalcev.

Največ protokolov uporablja matične celice iz popkovnične krvi. Obetavna vira matičnih celic so tudi inducirane pluripotentne matične celice in humane embrionalne matične celice, ki pa še niso uporabne zaradi neobvladane tumorigenosti. Prva transfuzija majhnega volumna umetno izdelanih avtolognih eritrocitov človeku je že bila opravljena. Kljub določenim pomanjkljivostim modelov eritropoeze *in vitro* nismo več daleč od množične uporabe eritrocitov, izdelanih iz krvotvornih matičnih celic v laboratoriju.

Abstract

Red cell transfusion is an established mode of therapy. Growing demand for red cell concentrates due to ageing population will in the next decades drive the introduction of new approaches in blood supply. *In vitro* red cell culturing is one of them. This technology enables us to yield red cells from various hematopoietic stem cells. The main goal is to gain large quantities of mature enucleated red cells expressing adult hemoglobin that are of »universal blood group« 0 RhD- negative and compatible with respect to the other blood group systems. At the moment, the technology efficiency does not allow the production of large amounts of red cells that could be comparable to blood donation gains.

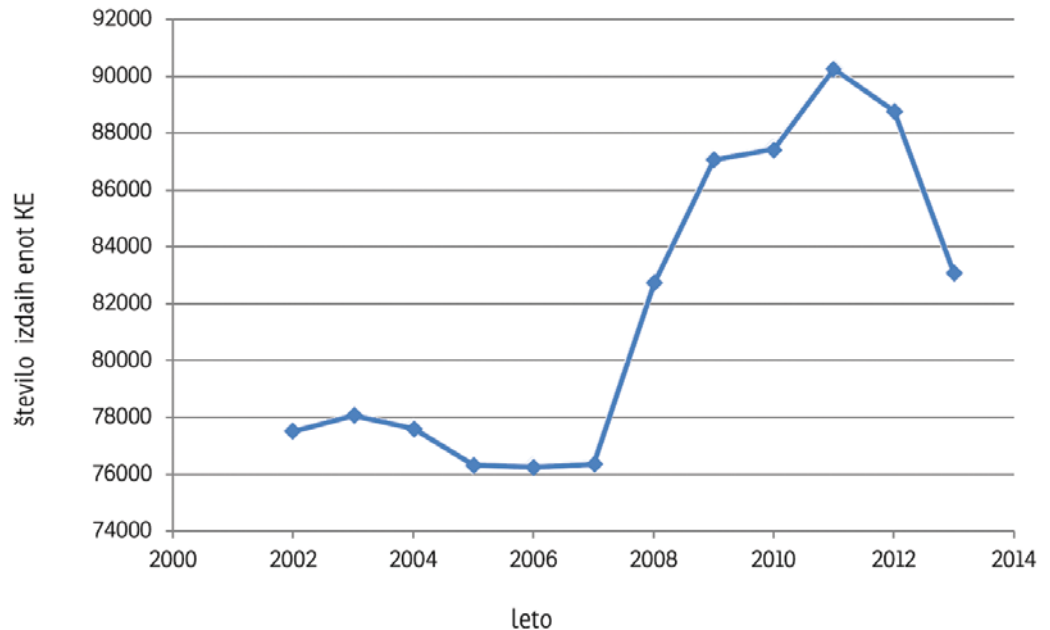
The majority of *in vitro* protocols is based on expansion from umbilical cord blood. Promising sources of stem cells are induced pluripotent stem cells (iPSCs) and human embryonic stem cells, which are still questionable due to their tumorigenicity. The first transfusion of a small volume of *in vitro* autologous red cells has already been performed. Despite certain shortcomings of *in vitro* erythropoiesis, we are not far from routine use of red cells that are produced in a laboratory.

Uvod

Transfuzija eritrocitov je uveljavljena terapevtska metoda. Za njo uporabljamo alogensko kri oz. eritrocite človeškega izvora, ki jih dobimo od prostovoljnih krvodajalcev. Programi za omejevanje transfuzije so marsikje zaježili naraščanje števila transfuzij (Nizozemska, VB, Švica in Finska).¹ V Sloveniji se je trend naraščanja ustavil nekoliko kasneje, v zadnjih 2 letih pa vendarle beleži-

mo upad števila transfuzij (Slika 1).^{2,3} Osrednji problem demografske situacije v zahodnem svetu je starajoče se prebivalstvo, kar bo v naslednjih desetletjih pomembno vplivalo na preskrbo s krvjo. Projekcije za leto 2020 nemški deželi Mecklenburg-Pomerania napovedujejo, da bo prišlo do zmanjšanja možne krvodajalske populacije za 16 % in do padca števila odvzemov krvi za pribli-

Slika 1: Izdaja koncentriranih eritrocitov (KE) v Sloveniji od leta 2002 do 2013.^{2,3}



žno 27 %. Ker se bodo večale potrebe po krvi zaradi staranja populacije (zdravljenje starejših bolnikov z malignomi in drugimi kroničnimi boleznimi zahteva večjo pogostost transfuzij) ter se bo znižalo število darovane krvi, bo po predvidevanjih leta 2020 prišlo do velikega pomanjkanja koncentriranih eritrocitov; prevedeno v slovenske razmere bi to pomenilo letni primanjkljaj 39.000 enot.⁴ Zato že leta 2020 v Evropi samo z darovanjem krvi verjetno ne bo mogoče zadostiti potrebam po koncentriranih eritrocitih.

Skupna rešitev vseh omenjenih težav bi bila »umetna kri« oziroma nadomestki hemoglobina, ki jih neuspešno poskušajo izdelati že 50 let. V zadnjem času pa zbuja veliko upanje nova tehnologija – gojenje eritrocitov *in vitro*. Izdelali so že več protokolov, s katerimi uspejo proizvajati zrele enukleirane eritrocite, ki imajo potencial za uporabo v transfuziji.^{5,6} Z uporabo gojenih eritrocitov bi se lahko izognili tveganju imunskih potransfuzijskih zapletov ter alergijskih reakcij, kajti tak izdelek ne bi vseboval levkocitov, levkocitnih protiteles ter plazemskih beljakovin krvodajalca. Izognili bi se tudi nevarnosti prenosa virusov, bakterij, zajedalcev ter novo porajajočih se okužb, ki se pojavljajo zaradi globalizacije ter sprememb podnebja (malarija, denga, čikungunja, WNV, itd.), čemur so najbolj izpostavljeni bolniki s hemoglobinopatijami (talasemija in srpastocelična anemija).^{7,8} Ti bolniki do-

bivajo mnogo transfuzij in zato pogosto razvijajo protitelesa. Zagotavljanje fenotipsko skladnih eritrocitov za to skupino imuniziranih bolnikov je zelo težavno. Z gojenimi eritrociti bi lažje zagotovili antigensko skladno kri, saj bi jo pridobili iz skladnih krvotvornih matičnih celic.

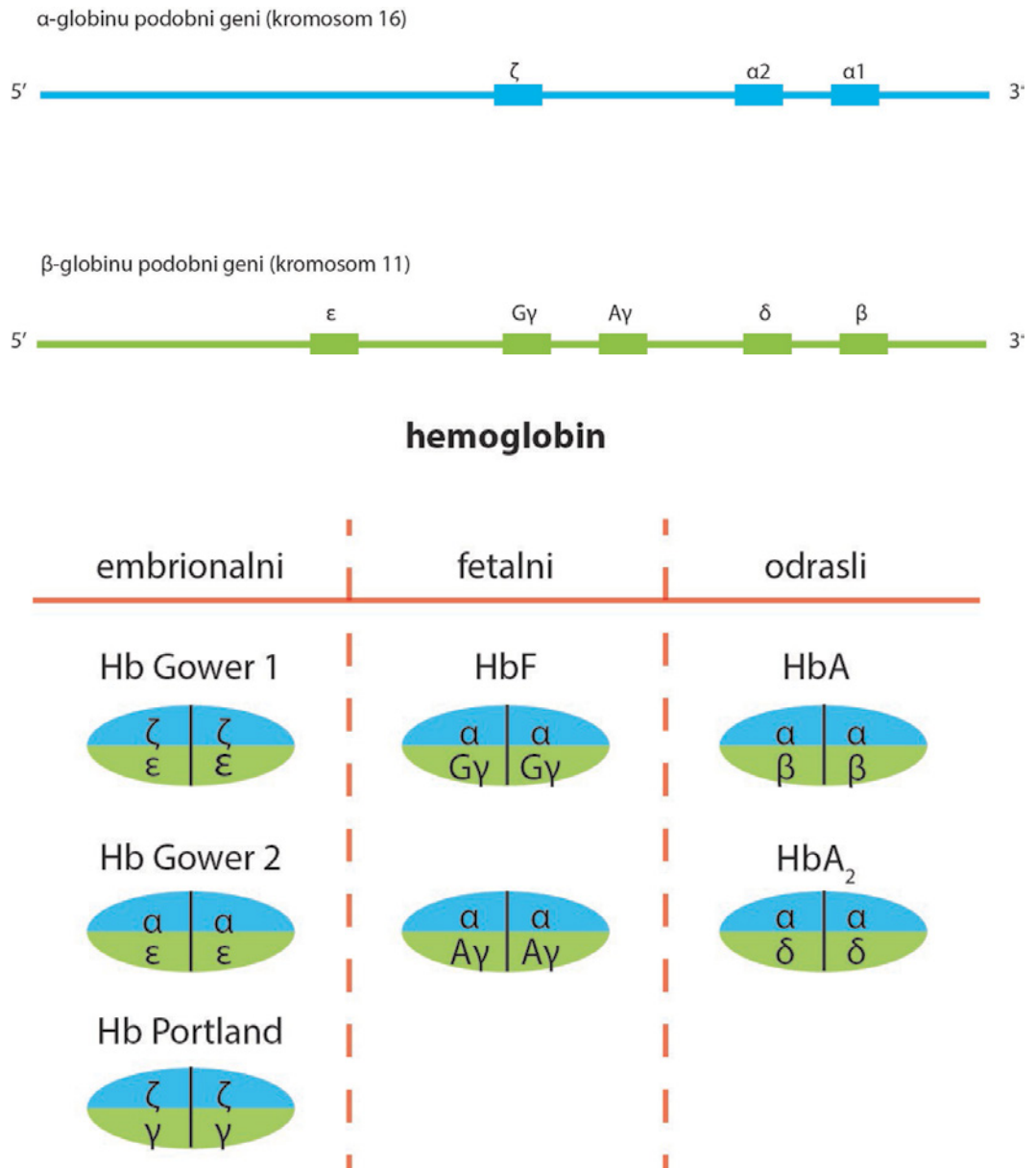
V zadnjem času se pojavljajo pobude, ki imajo za cilj velikoserijsko produkcijo eritrocitov za klinično uporabo, t. i. »blood pharming«. Ameriško podjetje Arteriocyte je razvilo učinkovito metodo pridobivanja eritrocitov iz popkovnične krvi (tehnologijo in pridobljene eritrocite je že presojala FDA), ki jo podpira ameriško obrambno ministrstvo, kar kaže na velik strateški pomen te tehnologije (ABC Newsletter July 23, 2010). Prizadevanja gredo v smer razviti »univerzalno kri« – krvne skupine 0 RhD-neg. V članku bomo osvetlili prednosti in pomanjkljivosti ter težave pri uvajanju eritrocitov, gojenih *in vitro*.

Eritropoeza *in vivo* in *in vitro*

Eritrociti so najštevilnejše celice v krvi in prenašajo kisik ter ogljikov dioksid. Nastajajo v procesu eritropoeze, v katerem se krvotvorne matične celice (KMC) iz kostnega mozga ali plodovih jeter diferencirajo v eritrocite, ki se sproščajo v kri.

Pri človeku se primitivne KMC in progenitorske celice z omejenim razvojnim

Slika 2: Zgradba genske skupine z α - in β -globinu podobnimi geni na kromosomih 16 in 11 ter sestava hemoglobinov. Prirejeno po Schechter (2008).¹¹



potencialom v krvnih otočkih ekstraembrionalne rumenjakove vrečke pojavijo pri 21 dni staremu zarodku.⁹ Eritroidne celice, ki tu nastajajo, so megaloplastne, imajo jedro in izražajo pretežno embrionalne oblike hemoglobina Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$ – zeta₂, epsilon₂), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$ – alfa₂, epsilon₂) in Portland ($\zeta_2\gamma_2$ – zeta₂, gama₂).¹⁰ (Slika 2)¹¹ V 6. tednu gestacije, ko se težišče hematopoeze kot rezultat kolonizacije iz predela dorzalne aorte prenese v jetra, pride do naglega upada izražanja verig globina ζ in ϵ . Prevladovati začne fetalni hemoglobin ($\alpha_2\gamma_2$ – alfa₂, gama₂), obenem pa se začne izražati odrasli hemoglobin ($\alpha_2\beta_2$ – alfa₂, beta₂).⁹ Kostni mozeg postane nosilec definitivne eritropoeze

od 20. tedna naprej, ko tudi začne naraščati odrasla oblika hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$).^{12,13} (Slika 3) Ob koncu gestacije β - globin že v dobri meri nadomesti fetalni γ -globin.

Eritropoeza v kostnem mozgu ima tri razvojne stopnje. Najzgodnejša eritroidna progenitorska celica pri človeku, ki nastane iz KMC, je BFU-E (*angl.* burst forming unit-erythroid). Iz celic BFU-E se razvijejo bolj zrele, eritroidno usmerjene progenitorske celice, ki se imenujejo celice CFU-E (*angl.* colony forming unit-erythroid). Iz celic CFU-E se po 7 dneh gojenja *in vitro* razvijejo majhne kolonije eritrocitov. To stopnjo razvoja urejajo rastni dejavniki IL-3, SCF in EPO.^{14,15} Druga stopnja eritroidne dife-

renciacije sestoji iz dozorevanja nukleiranih eritroidnih prekursorjev, ki napredujejo od proeritroblasta do bazofilnih, polikromatičnih in ortokromatičnih oblik. Pri človeku potekajo na tej stopnji diferenciacije trije procesi. Prvi proces je kopičenje hemoglobina, drugi je namnožitev eritroblastov in tretji proces je napredujoča piknoza jedra in nazadnje enukleacija (izločitev jedra), pri kateri pride do celične polarizacije, ki ji sledijo dinamične kontrakcije citoplazme, izbočenje jedra in njegova izločitev iz eritroblasta.¹⁶ Rezultat enukleacije sta retikulocit in pirenocit, z membrano obdano jedro. Pirenocite kasneje fagocitirajo makrofagi v kostnem mozgu.¹⁷ V zadnji stopnji eritroidne diferenciacije retikulociti dozoriijo v zrele eritrocite v obtoku.¹⁸⁻²⁰ (Slika 5)

Vloga kisika in eritropoetina pri dozorevanju eritrocitov

Že dolgo je znano, da med tvorbo eritrocitov in dostavo kisika v telesu obstaja obratno sorazmerje, ki ga ureja rastni dejavnik eritropoetin (EPO).²¹ Nižja raven ki-

sika spodbuja eritropoezo in obratno. EPO se izloča v ledvicah in učinkuje v kostnem mozgu. Receptor za EPO (EPO-R) izražajo pretežno celice CFU-E in nezreli eritroidni prekursorji (proeritroblasti). Padec števila eritrocitov ima za posledico tkivno hipoksijo, ki povzroči povečano sintezo EPO in s tem večjega preživetja CFU-E, ki lahko hitro dozoriijo v eritrocite.²²

EPO z vezavo na receptor EPO-R aktivira signalne molekule, STAT5, Grb2-SOS in p85 v tarčnih celicah. STAT5 se premesti v jedro, kjer uravnava transkripcijo antiapoptotskega gena Bcl-x(L) in spodbuja preživetje eritroidne celice.²³ Molekula Bcl-x(L) zaščiti pred apoptozo primitivne in zrelejše eritroidne celice.²⁴ EPO torej preko specifičnega receptorja (EPO-R) spodbuja mnoge znotrajcelične signalne kaskade, ki zaščitijo eritroidne celice pred apoptozo, povzročajo njihovo diferenciacijo in pospešijo sproščanje retikulocitov.

Tabela 1: Pregled protokolov za pridobivanje gojenih eritrocitov iz popkovnične krvi.

Avtor, leto	Model	Faktorji	Stopnja enukleacije	Pomnožitev vhodnih celic (X kratna)	Hemoglobin v eritroidnih celicah
Panzenboeck, ²⁷ 1998	PK, mononuklearne celice	EPO, SCF, IGF-1, deksametazon, estrogen	1–2 %	10 ⁵	/
Neildez-Nguyen ⁶ , 2002	PK, CD34-pozitivne celice	FLT3 ligand, SCF in TPO, EPO, IGF-1	4 %	2 × 10 ⁵	74 % HbF, 26 % HbA
Leberbauer, ²⁸ 2005	PK, mononuklearne celice	EPO, SCF, IGF-1	(Opisno: visoka)	10 ⁸ –10 ⁹	/
Giarratana, ⁵ 2005	PK, CD34-pozitivne celice	EPO, SCF, IL-3	blizu 100 %	1,95 × 10 ⁶	74 % HbF, 26 % HbA
Miharada, ²⁹ 2006	PK, CD34-pozitivne celice	EPO, SCF, IL-3, VEGF in IGF-2	80 %	10 ⁶	/
Baek, ³⁰ 2008	PK, CD34-pozitivne celice	SCF, EPO, IL-3, TPO in FLT-3 ligand	64 %	5 × 10 ³	/
Fujimi, ³² 2008	PK, CD34-pozitivne celice	SCF, TPO, FLT3 ligand, IL-3, EPO	blizu 100 %	3,5 × 10 ⁶	60 % HbF, 40 % HbA

PK – popkovnična kri, CD34 – cluster of differentiation 34, EPO – eritropoetin, SCF – stem cell factor, IGF-1 – insulin like growth factor-1, IGF-2 – insulin like growth factor, TPO – trombopoetin, FLT3 – FMS – like tyrosine kinase, VEGF – vascular endothelial growth factor, IL-3 – interleukin 3, / – ni podatka

Gojenje eritrocitov *in vitro* iz popkovnične krvi

Popkovnična kri je pomemben vir krvotvornih matičnih celic in progenitornih celic, ki so uporabne za presajanje.²⁵ Ker je popkovnična kri oziroma krvotvornih matičnih in progenitornih celic sorazmerno malo, je postala pomembna tema raziskav učinkovita namnožitev teh celic *in vitro*.²⁶ To je obenem tudi izhodišče za gojenje eritrocitov *in vitro* (Tabela 1).

Panzenboeckova s sod. je l. 1998 uporabila kombinacijo EPO, SCF, IGF-1 (*angl.* insulin growth factor-1), deksametazona in estrogena ter progenitorske celice pomnožili 10^5 -krat.²⁷ Deveti dan gojenja je bila večina celic (86–92 %) na stopnji proeritroblastov, ki so velikem odstotku izražali označevalce CD71 (transferinski receptor), CD117 (SCF receptor/c-kit, označevalec zgodnje eritropoeze), glikoforin A/B (označevalec eritroidne linije) in Band 3 (označevalec eritroidne linije). Celice so nato diferencirali dalje. Začele so kopičiti hemoglobin ter pridobivati morfologijo eritrocitov.

Neildez-Nguyen in sodelavci so l. 2002 dosegli še večjo namnožitev CD34-pozitivnih celic iz popkovnične krvi.⁶ Ocenili so, da je možno iz ene enote popkovnične krvi zagotoviti do 3 enote koncentriranih eritrocitov. Sedemnajsti dan celične kulture je v celicah prevladoval fetalni hemoglobin. Končne dozoritve eritroidnih celic *in vitro* niso uspeli doseči.

Leberbauerjeva in kolegi so l. 2005 v 7 tednih gojenja dosegli 10^8 – 10^9 -kratno pomnožitev celic.²⁸ Skladno z ostalimi študijami je s časom gojenja padel delež CD117 pozitivnih celic, naraščal pa delež CD71-pozitivnih (na koncu gojenja blizu 100 %) ter glikoforin A-pozitivnih celic (na koncu gojenja okrog 80 %), kar pomeni, da so celice med gojenjem pridobile eritroidni fenotip. Uspeli so doseči tudi dokončno eritropoezo, v kateri so nastajali sicer maloštevilni eritrociti brez jedra.

Giarratana in sodelavci⁵ so l. 2005 prvi uspeli vzgojiti zrele eritrocite *in vitro* v velikih količinah. To jim je uspelo z dobro simulacijo mikrookolja kostnega mozga s citokini (EPO, SCF in IL-3) in sokulture na stromalnih celicah – človeških celicah MMC. Stopnja pomnožitve CD34-pozitivnih celic je bila $1,95 \times 10^6$ -kratna, kar pomeni končni izplen eritrocitov v številu, ki je ustrezal 2–5 enotam koncentriranih eritrocitov. Zreli (enukleirani) eritrociti, ki so jih dobili na koncu gojenja, so bili po vseh značilnostih zelo podobni eritrocitom iz periferne krvi, tj. glede na prenos in sproščanje kisika, deformabilnost v mikrocirkulaciji miši NOD/SCID ter glede preživetja *in vivo*. Eritroblasti, ki so jih dobili po 10 dneh gojenja brez podpore stromalnih celic, so izražali pretežno HbF.

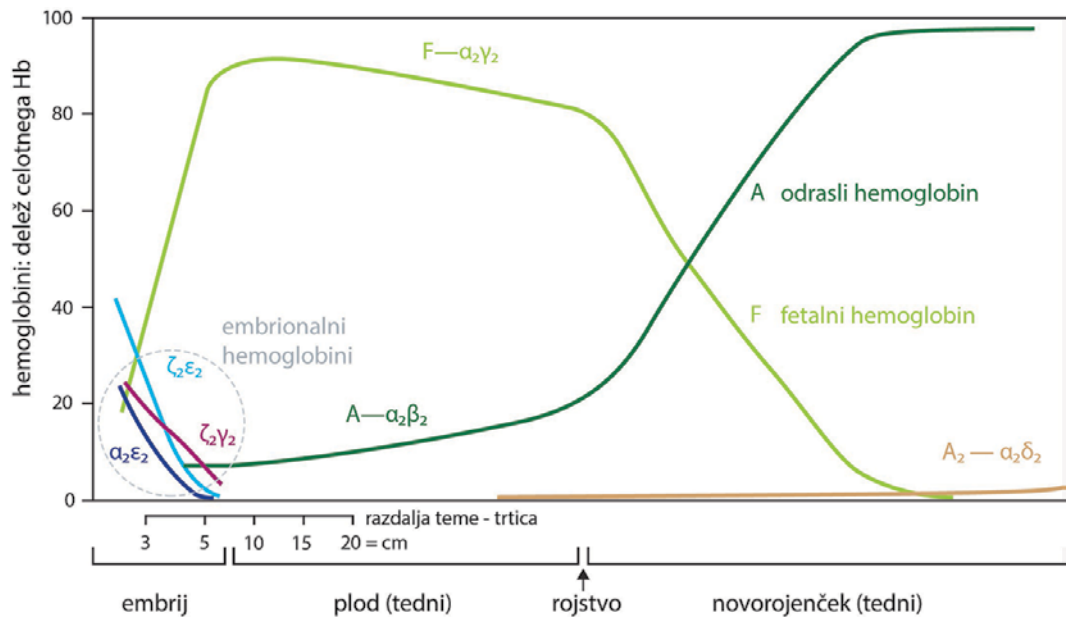
Skupina Miharade je leta 2006 uspela doseči visok delež enukleacije eritroidnih celic (80 %).²⁹ Pomembnost študije je v tem, da je pokazala, da je mogoče doseči visoko stopnjo eritroidne enukleacije tudi brez

Tabela 2: Pregled protokolov za pridobivanje gojenih eritrocitov iz periferne krvi.

Avtor, leto	Model	Faktorji	Stopnja enukleacije	Pomnožitev vhodnih celic (x kratna)	Hemoglobin v eritroidnih celicah
Giarratana ⁴ , 2005	periferna kri po predhodni mobilizaciji z G-CSF, CD34-pozitivne celice	G-CSF pri donorju, EPO, SCF, IL-3, hidrokortizon	blizu 100 %	$1,22 \times 10^5$	94 % HbA, 6 % HbF
Giarratana ³⁴ , 2011	periferna kri, CD34-pozitivne celice, avtotransfuzija gojenih eritrocitov	EPO, SCF, IL-3, hidrokortizon	68 %	$3,7 \times 10^4$	88 % HbA, 12 % HbF

G-CSF – granulocyte colony stimulating factor

Slika 3: Razvojni profil hemoglobinov. Prirejeno po Bunn in Forget (1986).¹³



uporabe sokulture, tj. samo s humoralnimi faktorji. Ker je protokol brez uporabe sokulture enostavnejši in cenejši, predstavlja zanimivo metodo za izdelavo velikih količin eritrocitov za transfuzijo.

Baek in sodelavci so l. 2008 proizvedli eritrocite s pomočjo sokulture popkovničnih KMC z mezenhimskimi matičnimi celicami (MMC).³⁰ Iz popkovnične krvi so izolirali CD 34-pozitivne celice, ki so jih kasneje namnožili in uspešno diferencirali v eritroidno linijo. Ob koncu gojenja celic (21. dan) so pridobili približno 1×10^{10} zrelih eritrocitov (1 transfuzijska enota KE vsebuje $2-3 \times 10^{12}$ eritrocitov). MMC celice naj bi pri tem protokolu odigrale vlogo stromalnih celic kostnega mozga pri procesu enukleacije.³¹

Doslej največja namnožitev eritroidne linije pa je uspela skupini Fujimija in kolegov l.2008, ki je iz 5×10^6 CD34 pozitivnih celic iz ene enote popkovnične krvi pridobila $1,76 \times 10^{13}$ eritrocitov, kar ustreza 8,8 enotam koncentriranih eritrocitov.³² Z uporabo makrofagov v sokulturi jim je uspelo doseči skoraj 100-odstotno enukleacijo eritroblastov. Eritrociti so izražali le okrog 50-odstotni delež HbA.

Gojenje eritrocitov *in vitro* iz periferne krvi

Eritrocite lahko vzgojimo tudi iz krvotvornih matičnih celic periferne krvi (Tabela 2). Taki eritrociti so potencialno uporabni za avtologno transfuzijo bolnikom.

Leta 2005 je skupina Giarratane in sodelavcev opisala protokol, ki je zelo učinkovit tudi pri pomnoževanju CD34-pozitivnih celic iz periferne krvi, ki so jih pridobili z levkaferozo po predhodni stimulaciji s G-CSF (*angl.* granulocyte colony stimulating factor).⁵ Učinkovitost pomnoževanja je bila $1,22 \times 10^5$ -kratna, kar pomeni, da pri normalnem izplenu CD34-pozitivnih celic pri levkaferizi $4-8 \times 10^6$ /kg telesne teže, lahko po tem protokolu teoretično pridobimo več kot 10 enot gojenih funkcionalnih eritrocitov.

Van den Akker in kolegi so l. 2010 proučevali eritroidni potencial različnih celičnih populacij periferne krvi.³³ Ugotovili so, da je izplen eritroidnih celic na koncu gojenja večji, če so v sokulturi poleg populacije CD-34 pozitivnih celic uporabili še ostale mononuklearne celice periferne krvi (CD-34 negativne celice). Izsledki iz te študije kažejo, da so v periferni krvi poleg CD34-pozitivnih celic še druge enojedrne celice, zanimive za tvorbo eritrocitov.

Velik preskok na področju eritrocitov *in vitro* je uspel skupini Giarratane in sodelav-

cev l. 2011, ko so izvedli transfuzijo gojenih eritrocitov človeku.³⁴ Iz 10^6 CD34-pozitivnih celic darovalca, ki so jih pridobili v postopku levkaferoze, so s pomočjo EPO, SCF, IL-3 in hidrokortizona vzgojili $3,7 \times 10^{10}$ eritroidnih celic, kar ustreza 2 ml eritrocitov; stopnja enukleacije je bila 68 %. Eritrocite so nato označili s ^{51}Cr in jih transfundirali istemu človeku. Preživetje transfundiranih gojenih avtolognih eritrocitov v prostovoljcu je bilo primerljivo z nativnimi eritrociti. Celice so imele značilnosti retikulocitov, izražale so glikoforin A v visokem odstotku (99,7 %) ter CD71 (transferinski receptor) (88 %). Izražanje krvnoskupinskih antigenov (ABo, Rh ipd.) pri teh eritrocitih je bilo primerljivo z nativnimi eritrociti. Vzgojeni eritrociti (retikulociti) so bili funkcionalni glede na: kapaciteto za reverzibilno vezavo in transport kisika, normalno vsebnost encimov G6PDH in piruvatne kinaze, ki sta potrebna za redukcijo glutationa in za zagotavljanje zado-

stne ravni ATP, in deformabilnost, ki je bila sicer nekaj nižja kot pri eritrocitih odraslega.

Gojenje eritrocitov *in vitro* iz humanih embrionalnih matičnih celic (EMC)

Humane embrionalne matične celice (EMC) so pluripotentne matične celice, ki jih pridobimo iz blastociste in so lahko neizčrpen vir celic za zdravljenje. Njihov vir danes niso več samo zgodnji zarodki, temveč obstaja vrsta alternativnih načinov, ki nam omogočajo njihovo pridobivanje.³⁵

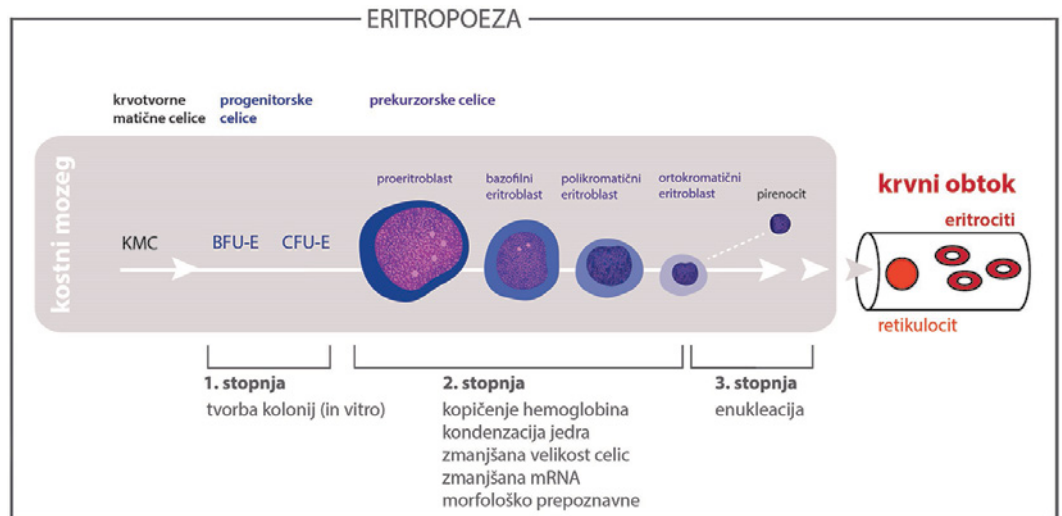
Lu in kolegi l. 2008 so iz hEMC razvili hemangioplastne prekurzorje, ki se lahko diferencirajo tako v hematopoetsko kot endotelijsko celico, jih namnožili in usmerili v eritroidno celično linijo.³⁶ Celice na koncu gojenja so bile podobne eritrocitom, le da so večinoma še imele jedro. Več kot 65 % jih je izražalo fetalni hemoglobin. Glavni globin-

Tabela 3: Pregled protokolov za pridobivanje gojenih eritrocitov iz EMC.

Avtor, leto	Model	Faktorji	Stopnja enukleacije	Pomnožitev vhodnih celic (X kratna)	Hemoglobin v eritroidnih celicah
Chang ³⁸ , 2006	EMC, embrioidna telesa	SCF, GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-6, EPO,	/	/	embrionalni in fetalni
Lu ³⁶ , 2008	EMC, hemangioplastni prekurzorji	EPO, SCF	30–65 %	10^4	embrionalni in fetalni, β - globin v nekaterih celicah po vsiljenju terminalne eritropoeze
Qui ³⁷ , 2008	EMC	EPO, SCF, FLT-3 ligand, BMP-4, hidrokortizon, IL-3, IGF-1	1,5–16 %	$0,8 \times 10^3$	embrionalni in fetalni, nizki nivoji β -globina
Ma ³⁹ , 2008	EMC, sokultura s stromalnimi celicami pridobljenimi iz fetalnih jeter	SCF, IL-3, IL-6, TPO, G-CSF, EPO	Opisno: posamezne enukleirane celice	10^2	fetalni in odrasli, po vsiljenju terminalne eritropoeze tudi visoki deleži β -globina (50–60 %)
Lapillonne ⁴⁰ , 2010 * (glej tudi Tabelo 4)	EMC, embrioidna telesa	SCF, EPO, IL-3	52–66 %	$3,5 \times 10^3$	fetalni hemoglobin, embrionalni pod 10 %, β -globin 5 %

EMC – embrionalne matične celice, GM-CSF – granulocyte macrophage – colony stimulating factor, BMP-4 – bone morphogenic protein 4

Slika 4: Eritropoeza – dozorevanje eritrocitov v kostnem mozgu. Prirejeno po Bron (2001)¹⁹ in Weiss (2005).²⁰



ski tipi v teh eritrocitih so bile embrionalne verige (ε-epsilon in ζ- zeta) ter fetalna veriga Gγ (gama). Glede na sposobnost prenosa kisika so bili ti eritrociti primerljivi z eritrociti odraslega. Če so jih nadalje diferencirali po protokolu za dozorevanje eritroidnih celic (Giarratana⁵), so dosegli izražanje β-globinskih verig, kar kaže na zmožnost teh celic za preklap v odrasel tip globina (Tabela 3).

Modeli eritropoeze *in vitro*, ki temeljijo na embrionalnih matičnih celicah, kažejo, da je možna eritroidna usmeritev embrionalnih matičnih celic z dozorevanjem v morfološko zrele eritrocite, vendar pa le-ti izražajo pretežno embrionalne in fetalne hemoglobine ter praviloma le malo ali nič odraslega β-globina.^{37,38} Ma in kolegi pa so uspeli na svojem modelu doseči definitivno eritropoezo z visokim deležem izražanja le-ttega.³⁹ Učinkovitost pomnoževanja EMC za izdelavo eritrocitov za transfuzijo je tudi z novejšimi protokoli premajhna.⁴⁰

Gojenje eritrocitov *in vitro* iz induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPS)

Leta 2007 je Yamanaki in sod. uspelo z reprogramiranjem s transkripcijskimi faktorji (Oct3/4, Sox2, Klf4 in c-Myc) pridobiti celice iPS iz človeških fibroblastov.⁴¹ Te celice so podobne embrionalnim matičnim celicam, kar se tiče rasti, morfoloških značilnosti, površinskih antigenov, genske ekspresije, epigenetskega statusa genov, specifičnih za pluripotentno stanje in telomerni aktivnosti. Poleg embrionalnih matičnih celic (EMC) so zelo perspektiven dodaten vir matičnih celic za usmeritev v eritroidno proliferacijo in diferenciacijo (Tabela 4).

Skupina Diasove in sodelavcev je l. 2011 pridobila eritroidne celice iz celic iPS.⁴² Celice, ki so jih dobili po 10–15 dneh gojenja, so v visokem odstotku izražale glikoforin A (97 %) in CD71. Morfološko so bile te celice bazofilni eritroblasti. Če so jih gojili še

Tabela 4: Pregled protokolov za pridobivanje gojenih eritrocitov iz celic iPS.

Avtor, leto	Model	Faktorji	Stopnja enukleacije	Pomnožitev vhodnih celic (X kratna)	Hemoglobin v eritroidnih celicah
Lapillonne ⁴⁰ , 2010	Celice iPS, embrioidna telesa	SCF, IL-3, EPO,	4–10 %	4,4 × 10 ²	fetalni hemoglobin, embrionalni pod 10 %, ni β-globina
Dias ⁴² , 2011	Celice iPS	EPO, IL-3, Flt-3, IL-6, deksametazon	2–10 %	2 × 10 ⁵	embrionalni in fetalni

iPS – induced pluripotent stem cells, IL-6 – interleukin 6

naprej v sokulturi s stromalnimi celicami kostnega mozga, so dobili bolj zrele celice, polikromatične in ortokromatične eritroblaste. Eritrociti, ki so jih po tem protokolu pridobili iz celic iPS, so izražali pretežno embrionalni in fetalni hemoglobin.

Podobno študijo je izvedla skupina Lاپillonnejve in sodelavcev l. 2010.⁴⁰ Re-programirane človeške fibroblaste so uspeli diferencirati v eritroidno celično linijo in te celice tudi dozoreti. Na koncu gojenja so v celični kulturi zaznali 4–10 % enukleiranih eritrocitov, 90–96 % pa je bilo ortokromatičnih eritroblastov. Visok delež izražanja glikoforina A in CD71 ter šibko izražanje CD36 je bilo skladno z zrelim eritroidnim fenotipom. HbF je izražalo 93 % celic. Ta študija je prva pokazala, da je mogoče iz celic hiPS vzgojiti zrele eritrocite, ki izražajo HbF v funkcionalni tetramerni obliki.

Zanimiv je tudi dosežek iranske skupine, ki je leta 2010 iz fibroblastov ženske s krvno skupino oh (fenotip Bombay) s transdukcijo z virusnimi vektorji pridobila celice iPS, ki jih je nadalje diferencirala v krvotvorno linijo.⁴³ Eritrociti s fenotipom Bombay na površini ne izražajo antigenov ABH, zato predstavljajo univerzalno krvno skupino.

Razpravljanje

Tehnologija gojenja celic nam danes omogoča vzgajanje eritrocitov *in vitro*. Eritrociti, gojeni *in vitro*, bodo že v bližnji prihodnosti alternativni vir za transfuzijo bolnikom. Trenutno uspemo pridobiti že 2×10^{12} do $1,73 \times 10^{13}$ zrelih eritrocitov (1 terapevtska enota KE vsebuje 2×10^{12} eritroci-

tov) iz KMC. To pa zaenkrat zahteva zelo veliko prostornino medija za celične kulture, tj. vsaj 2.500 litrov.⁴⁴ Cena tako pridobljene enote eritrocitov naj bi po nekaterih ocenah znašala 8.000–15.000 dolarjev, kar je približno 20-krat več od enote eritrocitov krvodajalca.⁴⁵

Za gojenje najpogosteje uporabljajo KMC iz popkovnične krvi, ker so sorazmerno lahko dostopne in imajo večji proliferacijski potencial kot celice iz mobilizirane periferne krvi. KMC iz popkovnične krvi lahko preživijo več mesecev *in vitro*, kar je ključnega pomena pri načrtovanju kontinuirane proizvodnje eritrocitov.⁴⁶

Eritrociti, vzgojeni *in vitro*, razvijejo krvnoskupinske antigene v zaporedju, ki je ustrezno dogajanju *in vivo*,⁴⁷ imajo normalno izražene glikolitične encime, enako deformabilnost, enako preživetje v človeku in funkcionalen hemoglobin.^{5,34,40}

Izražanje HbF v eritrocitih *in vitro* bi lahko imelo pomen pri razvoju avtologne transfuzijske podpore pri hemoglobinopatijah, na primer pri anemiji srpastih celic, saj bi pridobili populacijo eritrocitov, ki bi v visokem odstotku izražali HbF, ki ne polimerizira tako kot HbS.⁵

Imajo celo prednost pred alogenskimi eritrociti, saj so homogeni (sinhrono dozorevanje), njihova življenjska doba je bližju 120 dni, njihova predvidena razpolovna doba pa je daljša od povprečne razpolovne dobe alogenskih eritrocitov krvodajalca. To bi lahko imelo pomembne posledice za bolnika, namreč manjše število potrebnih trasfuzij in zato manjšo obremenitev z železom ter manj aloimunizacij.⁵ Doba uporabnosti

Tabela 5: Prednosti in pomanjkljivosti eritrocitov, gojenih *in vitro*.

prednosti	pomanjkljivosti
zagotavljanje fenotipsko skladnih eritrocitov za senzibilizirane bolnike, tudi redkih krvnih skupin	nezadostno, časovno omejeno pomnoževanje celic
homogenost eritrocitov, daljša razpolovna doba in s tem manj transfuzij	omejenost fenotipov vhodnih matičnih celic
brez tveganja za nekatere potransfuzijske imunske reakcije	tumorigenost EMC in celic iPS
manj aloimunizacij	uporaba lentivirusnih vektorjev
daljša doba uporabnosti komponente	izražanje embrionalnih in fetalnih (hemoglobinov)

pripravkov bo tudi daljša (sedaj je 42 dni). Predvidevajo, da zaradi odsotnosti levkocitov in levkocitnih protiteles v komponenti gojenih eritrocitov po transfuzijah ne bo prihajalo do imunskih reakcij, kot so TRALI (*angl.* transfusion related acute lung injury), febrilna nehemolitična transfuzijska reakcija, TaGVHD (*angl.* transfusion associated graft-versus-host-disease) ter do imunomodulacije. Manj bo tudi aloimunizacij na neskladne antigene.^{48,49} (Tabela 5)

Pomembno je vedeti, da popolne skladnosti v vseh eritrocitnih antigenih, razen pri avtolognih gojenih eritrocitih, ne bo mogoče doseči. Cilj je zagotavljanje gojenih eritrocitov, skladnih v klinično najbolj pomembnih eritrocitnih antigenih.

Kaj je še potrebno storiti, da bodo gojeni eritrociti uporabni?

Nobeden od opisanih protokolov zaenkrat ne zagotavlja dolgotrajne časovno učinkovite produkcije velikih količin zrelih eritrocitov s hemoglobinom A. Še najboljši približek eritropoeze *in vivo* bi v prihodnosti lahko predstavljali protokoli, temelječi na celicah EMC in iPS, ki imajo izjemno zmogljivost samoobnavljanja in proliferacije.^{36,40,42} Peyrard s sod. trdi, da bi za pokritje potreb po eritrocitih 99 % vseh senzibiliziranih bolnikov v Franciji potrebovali zgolj 3 različne celične linije hiPS, ki nosijo zapise za KS 0 ter različne kombinacije fenotipov v krvnoskupinskih sistemih Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lutheran in P1.⁵⁰

Po drugi strani je nabor možnih eritrocitnih fenotipov zaenkrat omejen z naborom uradno dovoljenih celičnih linij embrionalnih matičnih celic. V ZDA na primer trenutno ni celične linije, ki bi imela genotip za krvno skupino 0, RhD-neg.⁴⁰

Ključna težava celic iPS in EMC je njihova dokazana tumorigenost. Ustaljeni protokoli za pridobivanje celic iPS namreč vključujejo vnos transkripcijskega faktorja *myc*, ki je potreben za vzdrževanje pluripotentnosti in samoobnavljanja celic iPS. Hkrati pa je v celicah prisotna tudi endogena varianta *myc* onkogen, ki bi lahko sprožila nastanek rakavih celic.⁵¹⁻⁵³ Zreli eritrociti so brezjedrne celice, vendar bo pred potencialno kli-

nično uporabo nujno zagotoviti, da v končnem pripravku ne bo izhodiščnih celic ESC/iPS, ki bi lahko tvorile teratome.

Problematična je tudi uporaba lentivirusnih vektorjev za vnos transkripcijskih faktorjev, kajti lentivirusi se integrirajo v celični genom. Obstajajo pa že nekatere novejšje strategije za pridobivanje celic iPS s pomočjo episomalnih vektorjev, ki se ne integrirajo v genom celice in zato ne predstavljajo tveganja za mutacije in tumorigenost.⁵⁴

Oksiforne lastnosti eritrocitov, ki so jih pridobili iz celic ESC in iPS, so drugačne kot pri zrelih eritrocitih v periferni krvi. Razlog je v tem, da v visokem odstotku izražajo fetalne in embrionalne hemoglobine, ki imajo večjo afiniteto za kisik kot odrasli hemoglobin.^{36,40,42} V teh modelih gre za reprodukcijo embrionalne in zgodnje fetalne razvojne faze eritropoeze in sinteze hemoglobina. Za večjo uporabnost tega pristopa bo v prihodnje potrebno izboljšati učinkovitost pridobivanja zrelih eritrocitov s hemoglobinom A.

Uporabnost tehnologije eritrocitov *in vitro* bo postala večja, ko bomo bolje obvladovali eritroblastno enukleacijo, ki je eden ključnih korakov pri nastajanju zrelih eritrocitov *in vivo* ter *in vitro*. Njen mehanizem še ni docela pojasnjen.^{16,31} V večini doslej opisanih modelov učinkovitost enukleacije še ni bila zadovoljiva (pri popkovnični krvi v najboljšem primeru blizu 100 %, pri EMC do 65 % in pri celicah iPS 4–10 % brezjedrnih eritrocitov na koncu gojenja). Stopnja enukleacije je eden temeljnih meril kakovosti protokolov za produkcijo eritrocitov, ker eritroblasti z jedrom niso tako učinkoviti pri transportu kisika in so med prehodom skozi drobne kapilare bolj podvrženi hemolizi. Enukleirane celice imajo tudi to prednost, da ne vsebujejo DNA in nimajo sposobnosti delitve, kar odpravi tveganje za prenos potencialno malignih celic v prejemnika.⁴⁴

Ker je ena izmed omejitev trenutnih pristopov tudi premajhna namnožitev celic, se za povečanje izplena eritrocitov na koncu gojenja že uporabljajo nanovlakna z imobiliziranimi substrati, ki služijo kot model mikrookolja kostnega mozga oziroma niše matične celice za bolj učinkovito pomnoževanje hematopoetskih matičnih celic.⁵⁵

Zaključek

Najbolj perspektiven vir gojenih eritrocitov je popkovnična kri, dolgoročno pa vsekakor embrionalne matične celice in celice iPS. Protokoli gojenja postajajo vse bolj varni. Pričakujejo, da se bodo v prihodnosti tovrstne varnostne študije avtolognih eritrocitov *in vitro* nadaljevale, sledile naj bi varnostne študije gojenja in uporabe alogenskih eritrocitov *in vitro* in nato postopoma klinične študije učinkovitosti na majhni izbrani populaciji bolnikov. Trenutno nam

biotehnologija omogoča pridobivanje funkcionalnih eritrocitov, ki normalno izražajo krvnoskupinske antigene, glikolitične encime, imajo normalno preživetje v človeku in učinkovito prenašajo kisik. Toda zaenkrat je njihova rutinska uporaba za transfuzijo bolnikom zaradi visoke cene in zapletenega pridobivanja omejena. Z napredkom gojilnih tehnik in novimi spoznanji o varnosti teh pripravkov je po nekaterih napovedih pričakovati prve terapevtske transfuzije alogenskih eritrocitov *in vitro* v petih do desetih letih.⁵⁶

Literatura

1. The collection, testing and use of blood and blood products in Europe, yearly reports 2001–5. Strasbourg: Council of Europe; 2006
2. Zdravstveni statistični letopisi 2002–2012, transfuzijska dejavnost, Inštitut za varovanje zdravja RS,
3. Poročilo o transfuzijski dejavnosti za leto 2013, Zavod RS za transfuzijsko medicino
4. Greinacher A, Fendrich K, Brzenska R, Kiefel V, Hoffmann W. Implications of demographics on future blood supply: a population-based cross sectional study. *Transfusion* 2011; 51: 702–9.
5. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 69–74.
6. Neildez-Nguyen TMA, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 467–72
7. Kosaryan M, Mahdavi MR, Roshan P, Hojjati MT. Prevalence of alloimmunisation in patients with beta thalassaemia major, Letter to the editor. *Blood Transfus* 2012; 10: 396–7.
8. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood* 1990; 76: 1431–37.
9. Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999; 126: 793–803.
10. Palis J, Segel GB. Developmental biology of erythropoiesis. *Blood Reviews* 1998; 12: 106–14.
11. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112: 3927–38.
12. Mountford J, Olivier El, Turner M. Prospects for the manufacture of red cells for transfusion. *Brit J Haematol* 2010; 149: 22–34.
13. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobinopathy; Hemoglobin; Hemoglobins; Hemoglobinopathies. W.B. Saunders Co. (Philadelphia) 1986, 690 p.
14. Yanai T, Sugimoto K, Takashita E, Aihara Y, Tsurumaki Y, Tsuji T et al. Separate control of the survival, the self-renewal and the differentiation of hemopoietic stem cells. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 117–24
15. Kaneko K, Ikebuchi K. The self-renewal process of murine hemopoietic stem cells supported by interleukin-3 and the synergistic factors and the probability of its occurrence. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1995; 62: 41–9.
16. Wang J, Ramirez T, Ji P, Jayapal SR, Lodish HF, Murata-Hori M. Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. *J Cell Sci* 2012; 125: 340–49.
17. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama, Nagata S. Phosphatidylinositol-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005; 437: 754–58.
18. Wickrema A, Kee B. Molecular Biology of Hematopoiesis. Springer Science 2009: 74–75.
19. Bron D, Meuleman N, Mascaux C. Biological basis of anemia. *Semin Oncol*. 2001; 28(2 suppl 8): 1–6.
20. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1011–1023.
21. Tinsley JC Jr, Moore CV, Dubach R, Minnich V, Grinstein M. The role of oxygen in the regulation of erythropoiesis; depression of the rate of delivery of new red cells to the blood by high concentrations of inspired oxygen. *J Clin Invest* 1949; 28: 1544–64
22. Wu H, Klingmüller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1806–10.
23. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G et al. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 22165–9.
24. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J EXP Med* 1999; 11: 1691–98.
25. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from a HLA identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174–8.

26. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Garetto L, Dane A, Gammaitoni L et al. Ex vivo expansion of cord blood progenitors. *Vox Sang* 1998; 74: 457–62.
27. Panzenböck B, Bartunek P, Mapara MY and Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 1998; 92: 3658–68.
28. Leberbauer C, Boulme F, Unfried G, Huber J, Beug H, Mullner EW. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 2005; 105: 85–94.
29. Miharada K, Hiroshima T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1255–56.
30. Baek EJ, Kim HS, Kim S, Jin H, Choi TY, Kim HO. In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion* 2008; 48: 2235–45.
31. Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD. Erythroblast enucleation. *Stem Cells Int*, 2011; 139851. doi: 10.4061/2011/139851
32. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 2008; 87: 339–50.
33. van den Akker E, Satchwell TJ, Pellegrin S, Daniels G, Toye AM. The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34- cells, outweighing the contribution of CD34+ cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples. *Haematologica* 2010; 95: 1594–98.
34. Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 2011; 118: 5071–79.
35. Rožman P, Jež M. Matične celice in napredno zdravljenje: Zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo. *Pojmovnik. Celjska Mohorjeva družba* 2011: 289 strani.
36. Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 112: 4475–84.
37. Qiu C, Olivier EN, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 111: 2400–8.
38. Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006; 108: 1515–23.
39. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13087–13092.
40. Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana MC, Zanella-Cleon I et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 2010; 95: 1651–59.
41. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–72.
42. Dias J, Gumenyuk M, Kang HJ, Vodyanik M, Yu J, Thomson JA et al. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 1639–47.
43. Seifinejad A, Taei A, Totonchi M, Vazirinasab H, Hassani SN, Aghdami N et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from a Bombay individual: Moving towards „universal-donor“ red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 329–34.
44. Migliaccio R, Whitsett C, and Migliaccio G. Erythroid cells in vitro : from developmental biology to blood transfusion products. *Curr Opin in Hematol* 2009; 164: 259–68.
45. Zeuner A, Martelli F, Vaglio S, Federici G, Whitsett C, Migliaccio AR. Concise review: stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion. *Stem Cells* 2012; 30: 1587–96
46. Ishigaki T, Kazuhiro S, Hiroshima T, Miharada K, Ninomiya H, Chiba S et al. Human hematopoietic stem cells can survive in vitro for several months. *Adv Hematol* 2009; Article ID 936761, 7 pages, doi: 10.1155/2009/936761
47. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood* 1999; 93: 4425–35.
48. Opelz G, Vanrenterghem Y, Kirste G, Gray DW, Horsburgh T, Lachance JG et al. Prospective evaluation of pretransplant blood transfusions in cadaver kidney recipients. *Transplantation* 1997; 63: 964–67.
49. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF. WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. *Transfusion* 2003; 43: 945–52.
50. Peyrard T, Bardiaux L, Krause C, Kobari L, Lapillonne H, Andreu G et al. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: Potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev* 2011; 25: 206–16.
51. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 2009; 27: 1050–56.
52. Varlakhanova NV, Cotterman RF, deVries WN, Morgan J, Donahue LR, Murray S, et al. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation* 2010; 80: 1–21.
53. Cotterman R, Knoepfler PS. N-Myc regulates expression of pluripotency genes in neuroblastoma including *lif*, *klf2*, *klf4*, and *lin28b*. *PLoS ONE* 2009; 4(6): e5799.
54. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324: 797–801.
55. Jiang X, Christopherson GT, Mao HQ. The effect of nanofibre surface amine density and conjugate structure on the adhesion and proliferation of

- human haematopoietic progenitor cells. *Interface focus* 2011; 1: 725–733.
56. Migliaccio AR, Masselli E, Varricchio L, Whitsett C. Ex-vivo expansion of red blood cells: How real for transfusion in humans? *Blood Reviews* 2012; 26: 81–95.