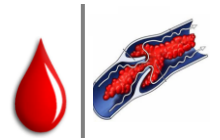




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ

Επιστημονική Υπεύθυνη: Ομότιμη Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού

Διπλωματική Εργασία

«Παρασκευή ερυθρών αιμοσφαιρίων για
μετάγγιση από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα »

ΟΝΟΜΑ : Χρηστάκη Ευαγγελία Ελένη

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαριάννα Πολίτου

Ακαδημαϊκό Έτος Εισαγωγής : 2014-2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετάγγιση του αίματος μπορεί να θεωρηθεί μια μορφή μεταμόσχευσης αιμοποιητικού ιστού και οι πρώτες αναφορές της ξεκινούν το 17^ο αιώνα μετά από την μελέτη του κυκλοφορικού συστήματος από τον William Harvey. Η έννοια της ανοσολογίας της μετάγγισης εισήχθη στις αρχές του 20^{ου} αιώνα με την ανακάλυψη των ABO ερυθροκυτταρικών αντιγόνων από τον Karl Landsteiner. Η εξέλιξη της μετάγγισης αίματος σε μια ασφαλή μορφή θεραπείας που εφαρμόζεται καθημερινά στην κλινική πράξη, οφείλεται σε ένα μεγάλο όγκο επιστημονικών μελετών οι οποίες θέσπισαν την εφαρμογή των αυστηρών ελέγχων που εφαρμόζονται σε όλα τα στάδια της μετάγγισης. Παρόλα αυτά, η μεταγγισιοθεραπεία σήμερα συνεχίζει να αντιμετωπίζει αρκετά προβλήματα που αφορούν όλες τις φάσεις της, από τη συλλογή του αίματος μέχρι τη χορήγησή του. Η ανεπάρκεια ικανού αριθμού δοτών, η μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών, η αλλοανοσοποίηση και το συνολικό κόστος της διαδικασίας, στρέφουν το επιστημονικό ενδιαφέρον προς την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων μετάγγισης. Η *ex vivo* παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων δυνάμενων να αντικαταστήσουν μια μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών, αποτελεί μια ιδιαίτερα θελκτική προοπτική και ακόμα περισσότερο εντυπωσιακή είναι η ιδέα μιας μαζικής τέτοιας παραγωγής. Διάφορες επιστημονικές ομάδες εκμεταλλευόμενες τα χαρακτηριστικά των στελεχιαίων κυττάρων και την συνεχώς ανανεούμενη γνώση στους τομείς της συλλογής, της καλλιέργειας, της διατήρησης και της ανάπτυξης των κυττάρων αυτών, έχουν σημειώσει σημαντική πρόοδο προς την υλοποίηση μιας τέτοιας ιδέας. Και οι τρεις βασικές πηγές προέλευσης των στελεχιαίων κυττάρων (HSPCs, ESCs και iPSCs), θεωρούνται ικανές να δημιουργήσουν τεράστιες ποσότητες ερυθρών αιμοσφαιρίων. Με την περαιτέρω μελέτη και τελειοποίηση των πρωτοκόλλων παραγωγής *in vitro* ερυθροκυττάρων, προβλέπεται ότι τα οικονομικά και βιοτεχνολογικά εμπόδια των επί του παρόντος εφαρμοζόμενων μεθόδων, θα μπορέσουν να υπερκεραστούν πιθανά ακόμα και μέσα στα επόμενα δέκα χρόνια.

ABSTRACT

Blood transfusion may be considered as a form of hematopoietic tissue transplantation and its first reports began in the 17th century after William Harvey's studies of blood circulation system. The concept of transfusion immunology was introduced at the beginning of the 20th century with the discovery of ABO blood group antigens by Karl Landsteiner. The evolution of blood transfusion into a safe form of treatment that is applied daily in clinical practice, is based on a large range of scientific studies that have established strict control systems which are applied at all stages of transfusion. However, transfusion therapy continues to face several problems concerning all phases, from the collection of the blood to its administration. The sufficiency of donors, the transmission of pathogenic microorganisms, the alloimmunization and the overall costs of the process, turn the scientific interest to the search for alternative transfusion methods. The ex vivo production of red blood cells capable of replacing a unit of packed red blood cells is a very attractive prospect, let alone the idea of a massive production of such a product. Various scientific groups, exploiting the stem cell characteristics and the constantly renewed knowledge in the fields of collection, culture, preservation and expansion of these cells, have made significant progress towards the realization of such an idea. All three major sources of stem cells (HSPCs, hESCs and iPSCs) are thought to be capable of generating enormous amounts of red blood cells. By further studying and refining of in vitro red cell production protocols, it is anticipated that the economic and biotechnological obstacles of the current methods will be overcome even within the next ten years.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού επιστημονική υπεύθυνη του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου επίκουρη καθηγήτρια κ. Μαριάννα Πολίτου καθώς και τον κ. Βασιλόπουλο Γεώργιο, μέλος της τριμελούς επιτροπής επίβλεψης της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αθανασόπουλο Άγγελο, διευθυντή της Αιμοδοσίας του ΕΑΝΠ Μεταξά, για την πολύτιμη βοήθεια και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια. Αφιερώνω αυτή την εργασία στον σύντροφό μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

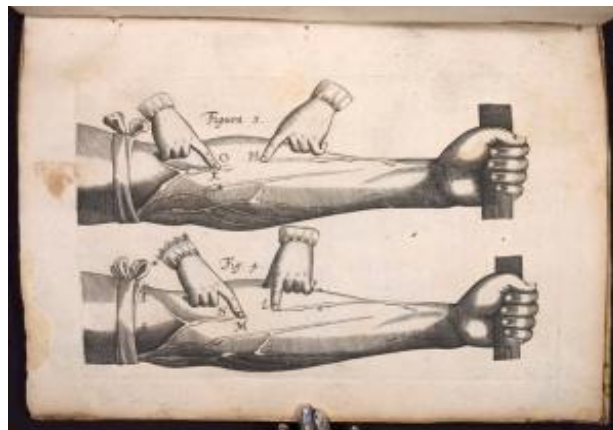
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	6
1.2 Στατιστικά Δεδομένα.....	9
1.3 Περιορισμοί της Αιμοδοσίας – Αναδυόμενα Προβλήματα.....	12
1.4 Εναλλακτικές Μέθοδοι Μετάγγισης.....	15
1.5 Ερυθροποίηση.....	18
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: EX VIVO ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	26
2.1 Εισαγωγικό μέρος.....	26
2.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	32
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: EX VIVO ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ –	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1 Ενίσχυση της ανάπτυξης των HSPCs in vitro.....	37
3.2 In vitro παραγωγή απύρηνων ερυθρών απο HSPCs.....	39
3.3 In vitro παραγωγή απύρηνων ερυθρών απο HSPCs χωρίς την παρουσία feeder cells.....	42
3.4 Συνθήκες συντήρησης και ανάπτυξης των ESCs.....	48
3.5 Ερυθροποίηση μέσω των ESCs.....	50
3.6 Τα iPSCs στην ex vivo ερυθροποίηση.....	55
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
5. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΑ.....	68
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η μετάγγιση αίματος, αποτελεί την πρώτη μορφή επιτυχούς κυτταρικής θεραπείας και αναφέρεται ως θεραπευτική πράξη από το 17^ο αιώνα [1]. Κατά την αρχαιότητα πολλοί λαοί αποδύσανε στο αίμα μαγικές ή θεραπευτικές ιδιότητες, φαίνεται μάλιστα πως οι Αρχαίοι Έλληνες και οι Λατίνοι γνώριζαν τη μετάγγιση. Στα χρόνια της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας και της Αναγέννησης υπήρξαν περιστασιακές προσπάθειες, η πρώτη πάντως καθορισμένη και λεπτομερής περιγραφή της τεχνικής της μετάγγισης βρίσκεται σε πραγματεία του Γερμανού χημικού Ανδρέα Libanius (1615), αν και κατά τους Ιταλούς η προτεραιότητα ανήκει στο ιατρό Jean De Colle (1628) από την Πάδοβα [2].

Σταθμό για τη μεταγγισιοθεραπεία αποτελεί η μελέτη του Βρετανού William Harvey το 1628 στην οποία περιγράφεται η κυκλοφορία του αίματος [2].



Εικόνα 1: Σκίτσο από την έκδοση του 1628 της πραγματείας του Harvey που απεικονίζει το μονόδρομο σύστημα βαλβίδων στις φλέβες και το ρόλο του στην κυκλοφορία του αίματος [3].

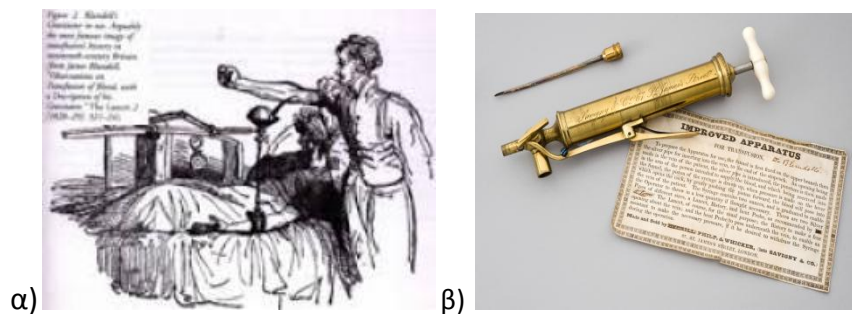
Ακολούθησε μεγάλος αριθμός πειραμάτων αρχικά με μεταγγίσεις που εφαρμόστηκαν σε ζωικά μοντέλα [4]. Το 1665 στην Αγγλία ο Richard Lower πραγματοποίησε την πρώτη επιτυχή μετάγγιση αίματος διατηρώντας στη ζωή ένα

σκύλο. Η πρώτη επίσημη αναφορά μετάγγισης σε άνθρωπο γίνεται το 1667 από τον ιατρό Jean-Baptiste Denys, ο οποίος μετάγγισε με 255gr αίματος προβάτου ένα νεαρό αγόρι [4].



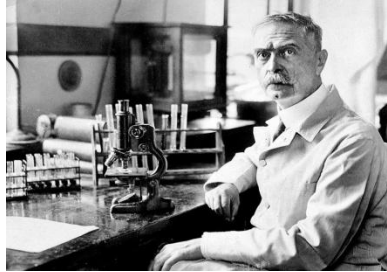
Εικόνα 2: Ο Γάλλος ιατρός Jean-Baptiste Denis μετάγγιζει με 255gr αίματος προβάτου ένα νεαρό αγόρι που υπέφερε από παρατεινόμενο εμπύρετο. Συνδέει την καρωτίδα του προβάτου με κεντρική φλέβα από το βραχίονα του νεαρού, χωρίς ο ασθενής να παρουσιάσει κάποια ανεπιθύμητη αντίδραση [4].

Το 1818 καταγράφεται η πρώτη μετάγγιση ολικού ανθρώπινου αίματος από τον ιατρό James Blundel, η οποία πραγματοποιήθηκε μεταξύ ενός παντρεμένου ζευγαριού για την αντιμετώπιση αιμορραγίας μετά τον τοκετό [4].



Εικόνα 3: α) Ο Βρετανός μαιευτήρας James Blundel πραγματοποιεί την πρώτη μετάγγιση ολικού ανθρώπινου αίματος χρησιμοποιώντας ως δότη τον σύζυγο της ασθενούς [5]. β) Συσκευή μετάγγισης αίματος που χρησιμοποιήθηκε από τον Blundel [6].

Ο σημαντικότερος σταθμός στην ιστορία της μετάγγισης θεωρείται η ανακάλυψη του συστήματος ABO, που αποτελεί και το σημαντικότερο από τα 30 συστήματα ομάδων αίματος, από τον Αυστριακό ερευνητή Karl Landsteiner το 1901, για την οποία και τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1930 [7].



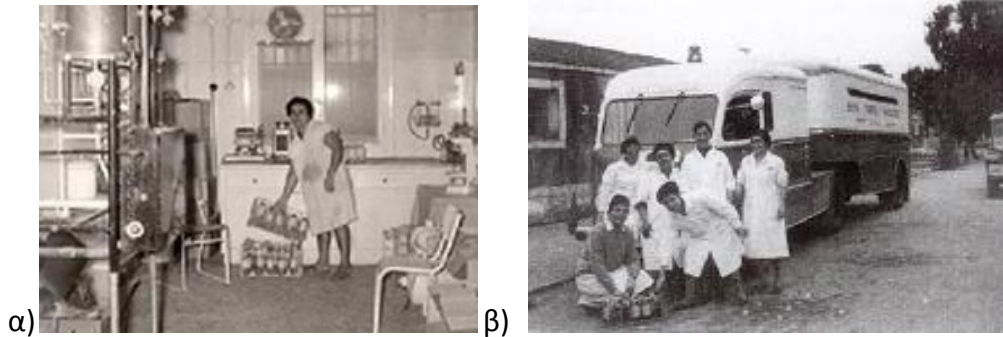
Εικόνα 4: Karl Landsteiner, Αυστριακός επιστήμονας, 1901 [7].

Ακολούθησαν μελέτες σχετικά με τα αντιπηκτικά διαλύματα και τις συνθήκες αποθήκευσης του αίματος που προορίζεται για μετάγγιση. Μεταξύ του πρώτου και δεύτερου παγκοσμίου πολέμου υπήρξε μεγάλη και ταχεία πρόοδος στη χρήση και αποθήκευση του αίματος. Η πρώτη υπηρεσία εθελοντών αιμοδοτών οργανώθηκε το 1921 στο Λονδίνο από τον Percy Oliver ενώ το 1932 ιδρύθηκε η πρώτη τράπεζα αίματος στο νοσοκομείο του Λένινγκραντ. Το 1936 ο ιατρός Federico Duran-Jorda εγκαινιάσε την υπηρεσία αιμοδοσίας της Βαρκελώνης. Ο όρος "τράπεζα αίματος" εισήχθη το 1937 από τον Dr. Bernard Fantus. Μεταξύ του 1940-1950 οργανώθηκαν διάφορες τράπεζες αίματος. Παράλληλα ανακαλύπτονται πολλά από τα συστήματα ομάδων αίματος, όπως το Rhesus το 1940 από τους Karl Landsteiner και Alexander Wiener [7].



Εικόνα 5: Τράπεζα αίματος που στεγάζεται στο νοσοκομείο του Σικάγο, με Διευθυντή θεραπευτικής τον Dr. Bernard Fantus [8].

Στην Ελλάδα, η πρώτη μετάγγιση αίματος πραγματοποιείται στην Πολυκλινική Αθηνών από τον καθηγητή Σπύρο Οικονόμου μεταξύ 1916 και 1919, ο οποίος χρησιμοποίησε αίμα που πήρε από το βοηθό του Μ.Πατρικαλάκη. Το 1935 ιδρύθηκε από τον Μ.Μακκά, η Οργάνωση Αιμοδοσίας του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού (Ε.Ε.Σ). Το 1939 ο Μ.Παϊδούσης, ο πρώτος διευθυντής της Αιμοδοσίας του Ε.Ε.Σ πραγματοποιεί την πρώτη μετάγγιση συντηρημένου αίματος στην Ελλάδα, στο Λαϊκό νοσοκομείο. Το 1952, έτος ορόσημο για την Ελληνική Αιμοδοσία, δημιουργείται στο Υπουργείο Υγιεινής, η Εθνική Υπηρεσία Αιμοδοσίας και καταρτίζεται το Εθνικό πρόγραμμα αιμοδοσίας που βασίζεται στην αρχή ότι η οργάνωση της αιμοδοσίας πρέπει να είναι ενιαία και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατόν να υφίσταται άλλη οργάνωση παράλληλη ή ανταγωνιστική της Κρατικής Υπηρεσίας Αιμοδοσίας. Ιδρύονται τέσσερα Περιφερειακά Κέντρα Αιμοδοσίας και αρχίζει ο αγώνας για την επικράτηση του θεσμού της εθελοντικής αιμοδοσίας [8].

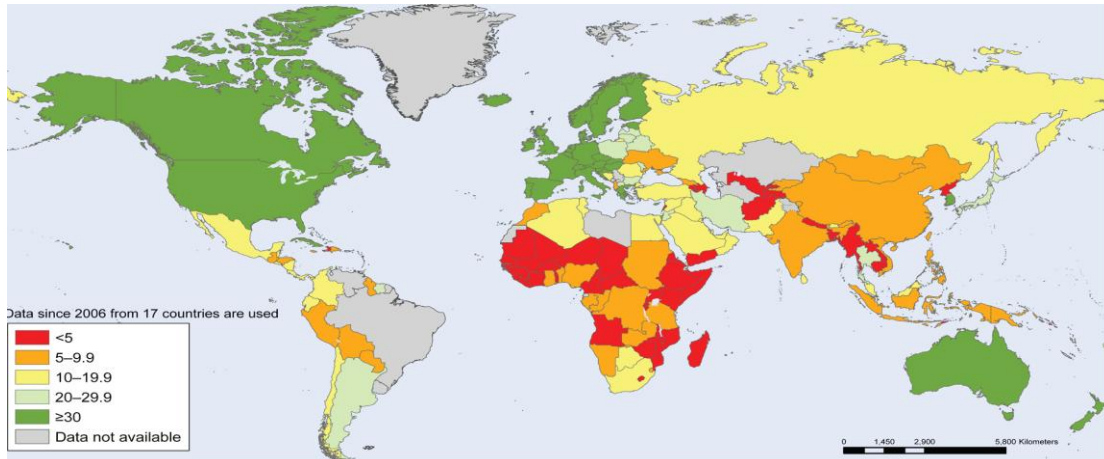


Εικόνα 6: α) Κρατική Υπηρεσία Αιμοδοσίας, β) Το πρώτο και μοναδικό κινητό συνεργείο αιμοληψιών [8].

1.2 Στατιστικά Δεδομένα

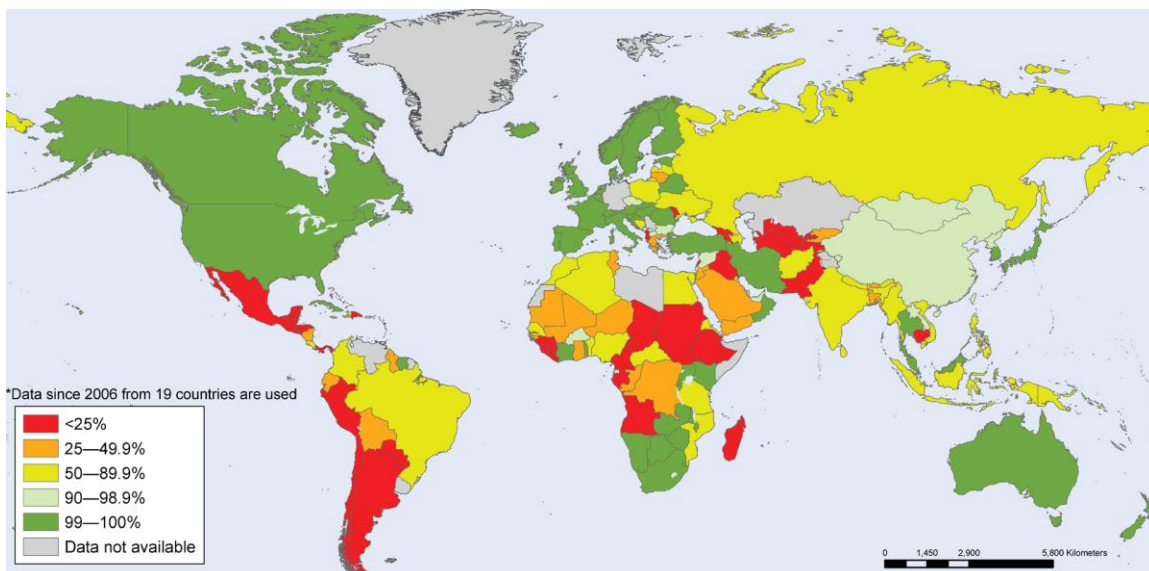
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) παρουσιάζει στη συνεχώς ανανεούμενη βάση δεδομένων του, την ετήσια συλλογή μονάδων αίματος παγκοσμίως, η οποία ανέρχεται σε 112,5 εκατομμύρια μονάδες. Η συμμετοχή των διαφόρων κρατών σε αυτό τον αριθμό παρουσιάζει μεγάλη ανισοκατανομή αφού οι μισές από αυτές τις μονάδες προέρχονται από χώρες με υψηλά εισοδήματα, οι οποίες κατοικούνται μόνο

από το 19% του παγκόσμιου πληθυσμού [9]. Υπολογίζεται πως περισσότερες απο 300 εκατομμύρια μονάδες χρειάζονται ετησίως για να ικανοποιηθούν οι ανάγκες σε αίμα παγκοσμίως [88].



Εικόνα 7: Χάρτης κατανομής ΠΟΥ της συλλογής μονάδων αιματος ανά 1000 κατοίκους ανά χώρα για το έτος 2008 (οι αριθμοί δίνονται σε %) [10].

Διαφορές υπάρχουν σε παγκόσμια κλίμακα και μεταξύ των αιμοδοτών. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες αιμοδοτών: οι εθελοντές, οι αιμοδότες περιβάλλοντος (αντικατάστασης) και οι αμοιβόμενοι. Ο ΠΟΥ αναφέρει ότι μεταξύ των ετών 2008-2013 σημειώθηκε αύξηση άνω των 10 εκατομμυρίων μονάδων αίματος προσφερόμενες από εθελοντές αιμοδότες. Παρόλα αυτά το ποσοστό συμβολής των κατηγοριών των αιμοδοτών στο σύνολο των μονάδων αίματος που συλλέγονται σε κάθε χώρα διαφέρει σημαντικά. Σε 74 χώρες το ποσοστό των μονάδων που προέρχονται από εθελοντές αιμοδότες φτάνει το 90% στο σύνολο των συλλεγόμενων μονάδων αίματος, ενώ σε 71 χώρες περισσότεροι από τους μισούς αιμοδότες ανήκουν στις άλλες δύο κατηγορίες [9].



Εικόνα 8: Χάρτης ΠΟΥ, με το ποσοστό εθελοντών αιμοδοτών ανά χώρα για το έτος 2008 [10].

Περισσότεροι από 9 εκατομμύρια ασθενείς μεταγγίζονται ετησίως σε περίπου 90 χώρες [10]. Η ηλικία των μεταγγιζόμενων ασθενών ποικίλλει μεταξύ των χωρών. Στις οικονομικά ασθενείς χώρες το 65% των μεταγγίσεων δίνονται σε παιδιά κάτω των 5 ετών, ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες το 76% των μεταγγίσεων διατίθεται σε ασθενείς άνω των 65 ετών [9]. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στα αίτια των μεταγγίσεων για κάθε χώρα. Στις χώρες με υψηλό οικονομικό επίπεδο οι μεταγγίσεις κατανέμονται κυρίως στα καρδιοχειρουργικά περιστατικά, στις μεταμοσχεύσεις οργάνων, στους πολυτραυματίες και στα ογκολογικά – αιματολογικά περιστατικά, σε αντίθεση με τις αναπτυσσόμενες χώρες που το μεγαλύτερο ποσοστό των μονάδων αίματος χορηγείται για την αντιμετώπιση επιπλοκών της κύησης και σε παιδιά με σοβαρή αναιμία [10].

Στην Ελλάδα απαιτούνται περίπου 650.000 μονάδες αίματος ετησίως. Το 2015 συγκεντρώθηκαν συνολικά 538.580 μονάδες αίματος από τις οποίες οι 318.044 προέρχονταν από εθελοντές αιμοδότες και οι υπόλοιπες από δότες περιβάλλοντος [8].

1.3 Περιορισμοί της Αιμοδοσίας – Αναδυόμενα Προβλήματα

Όλες οι υπηρεσίες αιμοδοσίας έχουν υποχρέωση έναντι των ασθενών που μεταγγίζουν να παρέχουν ασφαλές αίμα και προϊόντα αίματος. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη ύπαρξης ελέγχου σε όλα τα στάδια της αλυσίδας της μετάγγισης.

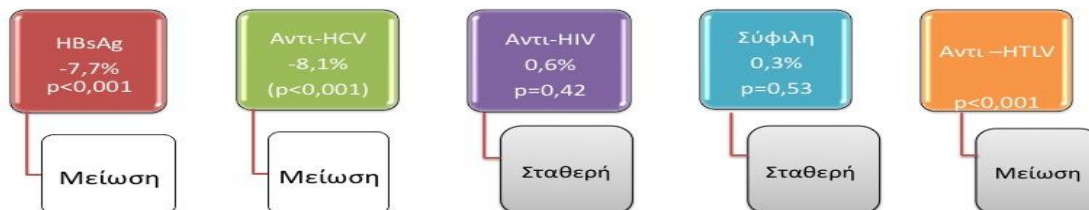
Οι περιορισμοί που έχουν τεθεί στην επιλογή του αιμοδότη τόσο για την ασφάλεια του δότη όσο και του δέκτη, αναπόφευκτα μειώνει τον αριθμό των διαθέσιμων αιμοδοτών [8].

Ο έλεγχος της προσφερόμενης μονάδας αίματος με βάση τις οδηγίες του ΠΟΥ περιλαμβάνει τις δοκιμασίες διαλογής για δείκτες λοιμωδών νοσημάτων. Κάθε μονάδα αίματος ελέγχεται για Ηπατίτιδα Β, Ηπατίτιδα C, HIV και Σύφιλη. Με βάση τα στοιχεία που κοινοποίησε ο Αμερικανικός Ερυθρός Σταυρός, ο κίνδυνος μετάδοσης του εκάστοτε παθογόνου ανά χορηγούμενη μονάδα αίματος είναι: για τον ιό της ηπατίτιδας C 1: 1.149.000, για την ηπατίτιδα Β 1:357.000- 1:280.000 και για τον HIV 1:1.467.000 [12].

Το κόστος παραγωγής μιας μονάδας συμπυκνωμένων ερυθρών ξεκινά από τα 200 ευρώ και περιλαμβάνει τα έξοδα της συλλογής, του ιολογικού ελέγχου, της επεξεργασίας, της αποθήκευσης και της διανομής [90].

Κάποιες χώρες αδυνατούν να εφαρμόσουν τους ελέγχους για ένα ή και περισσότερα από τα παθογόνα που μπορεί να μεταδοθούν μέσω μεταγγίσεων [13]. Επιπλέον υπάρχουν λοιμώδεις παραγόντες που μπορεί να μεταδοθούν με τη μετάγγιση αλλά δεν μπορούν να ανιχνευτούν είτε γιατί δεν έχει βρεθεί κάποια μέθοδος ελέγχου είτε γιατί είναι ακόμα άγνωστοι [93].

Λοιμώξεις που μεταδίδονται με το αίμα Μέση ετήσια μεταβολή ορολογικών δεικτών, 2003-2013

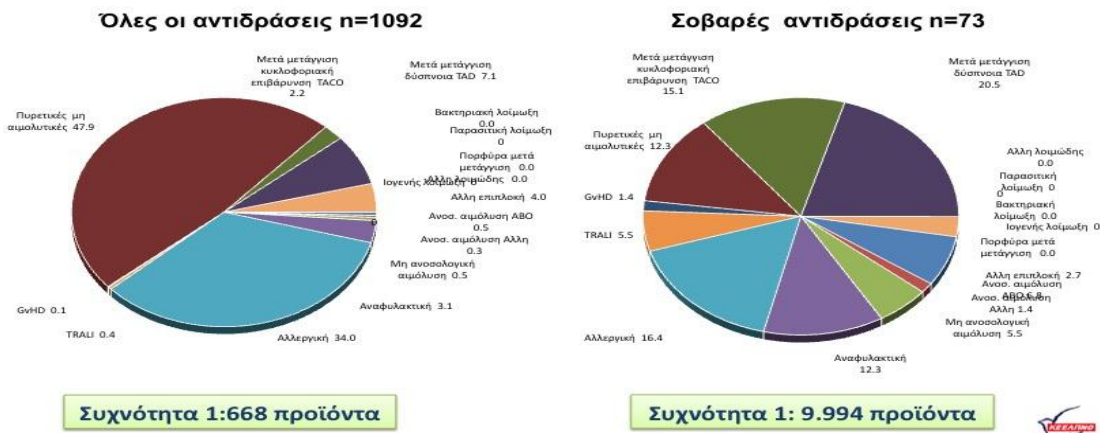


Εικόνα 9: Αιμοεπαγρύπνηση στην Ελλάδα. Λοιμώξεις που μεταδίδονται με το αίμα. Μέση ετήσια μεταβολή ορολογικών δεικτών, 2003-2013 [15]

Η Αιμοεπαγρύπνηση αποτελεί σύνολο οργανωμένων διαδικασιών επιτήρησης των ανεπιθύμητων αντιδράσεων και συμβάντων που συνδέονται με τη μετάγγιση αίματος και αφορούν στους δότες και λήτες αίματος καθώς και στην επιδημιολογική επιτήρηση δοτών [16]. Μόνο το 13% των αναπτυσσόμενων χωρών έχει καθιερώσει ένα εθνικό σύστημα Αιμοεπαγρύπνησης ώστε να ελέγχει και να βελτιώνει την ασφάλεια των χορηγούμενων μεταγγίσεων [17].

Παρά τις ασφαλιστικές δικλείδες που εφαρμόζονται στην διαδικασία συλλογής, παραγωγής, σήμανσης, αποθήκευσης, συμβατότητας και χορήγησης, οι μεταγγίσεις αίματος συχνά συνοδεύονται από ανεπιθύμητες αντιδράσεις που μπορεί να είναι άμεσες ή απώτερες και να οφείλονται σε ανοσολογικούς ή μη μηχανισμούς [18]. Οι επιπλοκές αυτές όχι μόνο θέτουν υπό αμφισβήτηση την ποιότητα του παρεχόμενου προϊόντος αλλά προσθέτουν ένα επιπλέον κόστος. Ακόμα και στις αναπτυγμένες χώρες 0,24% των μεταγγίσεων σχετίζονται με ανεπιθύμητα συμβάματα [17].

Κατανομή αντιδράσεων 2013



Εικόνα 10: Αιμοεπαγρύπνηση στην Ελλάδα. Κατανομή αντιδράσεων από μετάγγιση στην Ελλάδα για το έτος 2013 [15].

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις της Αιμοδοσίας είναι η εξασφάλιση συμβατού αίματος για μετάγγιση. Τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν αντιγόνα από 30 διαφορετικές ομάδες αίματος και έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 300 αντιγόνα. Η πιθανότητα αλλοανοσοποίησης, εμφάνισης δηλαδή αντισώματος έναντι ερυθροκυτταρικού αντιγόνου, είναι μεγαλύτερη στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς ή στα άτομα με σπάνιες ομάδες αίματος για τα οποία δεν μπορεί να βρεθεί απόλυτα συμβατό αίμα. Περίπου 30% των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζουν προβλήματα στις μεταγγίσεις λόγω αλλοανοσοποίησης [89]. Ο κίνδυνος είναι ακόμη μεγαλύτερος σε κοινωνίες όπου οι δότες και οι δέκτες προέρχονται από διαφορετικές εθνικότητες [19].

1.4 Εναλλακτικές Μέθοδοι Μετάγγισης

Η διαθεσιμότητα αίματος για μετάγγιση είναι ζωτικής σημασίας σε παγκόσμια κλίμακα τόσο για την κάλυψη επειγουσών αναγκών, όσο και για την ανάπτυξη νεότερων χειρουργικών τεχνικών που θα αποβούν σωτήριες ή για την υλοποίηση θεραπειών έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου [21].

Οι κύριοι λόγοι που οδήγησαν στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων αλλογενούς μετάγγισης είναι:

- Η ασφάλεια του χορηγούμενου αίματος. Η εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών διάγνωσης των μεταδιδόμενων με το αίμα λοιμωδών νοσημάτων, έχει ελαχιστοποιήσει τους κινδύνους από τη μετάγγιση αλλά δεν τους έχει εξαλείψει [34].
- Η παγκόσμια έλλειψη αίματος. Παρατηρείται μια αυξανόμενη ανισορροπία μεταξύ της ζήτησης και της προσφοράς αίματος. Στις ΗΠΑ η ζήτηση αυξάνεται κατά 6-8% ετησίως ενώ η προσφορά μόνο κατά 2-3% [35].
- Το συνεχώς αυξανόμενο κόστος του αίματος και των προϊόντων του. Οι έλεγχοι για την ασφάλεια του αίματος αυξάνουν το κόστος των παραγόμενων μονάδων. Παράλληλα, οι τυχόν ανεπιθύμητες αντιδράσεις από τις μεταγγίσεις προσδίδουν μια επιπλέον οικονομική επιβάρυνση [35].
- Ειδικές ομάδες ασθενών. Υπάρχουν ασθενείς που είτε αρνούνται τη μετάγγιση κυρίως για θρησκευτικούς λόγους (π.χ. οι μάρτυρες του Ιεχωβά), είτε δεν μπορούν να μεταγγιστούν λόγω προβλημάτων ασυμβατότητας [35].
- Μελλοντικοί περιορισμοί. Περίοδοι οικονομικών κρίσεων, πολιτικές αναταραχές, φυσικές καταστροφές και αναδυόμενες λοιμώξεις, μειώνουν ακόμα περισσότερο την προσφορά αίματος. Ταυτόχρονα η γήρανση του πληθυσμού παγκοσμίως αναμένεται να επηρεάσει την επάρκεια του προς μετάγγιση αίματος. Ο παγκόσμιος πληθυσμός ανέρχεται στα 7,5 δισεκατομμύρια το έτος 2017 και υπολογίζεται ότι θα ξεπεράσει τα 9 δισεκατομμύρια το 2050. Η μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού θα παρουσιαστεί στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου τα άτομα άνω των 60 ετών

αναμένεται να αποτελούν πάνω από 1,1 δισεκατομμύρια του πληθυσμού. Οι ανάγκες για χορήγηση αίματος θα διευρυνθούν ενώ ο αριθμός των αιμοδοτών δε θα επαρκεί. Ο Αμερικανικός Ερυθρός Σταυρός αναφέρει πως παρόλο που σημειώθηκε άνοδος στο ποσοστό των αιμοδοτών ηλικίας άνω των 50 ετών, οι αιμοδότες ηλικίας 20-49 ετών μειώθηκαν. Παρόμοια στοιχεία επιβεβαιώνουν και Γερμανικές μελέτες [11,20].

Η ιδανική εναλλακτική μέθοδος θα πρέπει να παρέχει επαρκείς ποσότητες αίματος, να είναι ασφαλής για τον ανθρώπινο οργανισμό και οικονομικά αποδεκτή [88]. Οι τρόποι εναλλακτικής μετάγγισης έχουν αναπτυχθεί ιδιαίτερα στο χειρουργικό τομέα με στόχο να μειωθεί η ανάγκη υποστήριξης του ασθενούς με αίμα. Περιλαμβάνουν τακτικές που εφαρμόζονται προεγχειρητικά, διεγχειρητικά ή μετεγχειρητικά [35].

Στην προεγχειρητική περίοδο, η χορήγηση ανασυνδιασμένης ερυθροποιητίνης και η αυτόλογη προκατάθεση αποτελούν τις κύριες εναλλακτικές λύσεις. Ο ασθενής εφόσον του το επιτρέπει η κλινική του κατάσταση, μπορεί να προκαταθέσει 1-2 μονάδες αίματος πριν από προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις [34]. Η διαδικασία αυτή προλαμβάνει τον κίνδυνο μετάδοσης ιογενών λοιμώξεων και την πιθανότητα ανάπτυξης αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων από τον ασθενή. Δεν αποτρέπει όμως τον κίνδυνο βακτηριδιακής επιμόλυνσης και υπερφόρτωσης της κυκλοφορίας. Η διαδικασία είναι πιο δαπανηρή και επιπλέον οι μονάδες που δεν μεταγγίζονται, αχρηστεύονται [35].

Η χορήγηση ανασυνδιασμένης ερυθροποιητίνης ξεκινάει προεγχειρητικά, 2-3 εβδομάδες πριν το χειρουργείο σε συνδιασμό με σκευάσματα σιδήρου, και μπορεί να συνεχιστεί και μετεγχειρητικά ανάλογα των επιπέδων αιμοσφαιρίνης του ασθενούς. Με την τακτική αυτή επιταχύνεται η ερυθροποίηση και αυξάνεται η αιμοσφαιρίνη με αποτέλεσμα ταχύτερη μετεγχειρητική αποκατάσταση [36].

Η ισοογκαιμική αιμοαραίωση αποτελεί μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη συλλογή αίματος από τον ασθενή αμέσως πριν τη χειρουργική επέμβαση, την

αντικατάσταση του αφαιρούμενου όγκου με κρυσταλλοειδή ή κολλοειδή διαλύματα και την επαναχορήγηση του αυτόλογου αίματος μετά το χειρουργείο [37].

Η διεγχειρητική συλλογή αίματος είναι μία μέθοδος κυτταρικής διάσωσης. Το αίμα που εξαγγειώνεται στο χειρουργείο αναρροφάται με ειδικές συσκευές από το στείρο χειρουργικό πεδίο και επαναχορηγείται στον ασθενή. Η μέθοδος έχει τα πλεονέκτηματά ότι μπορεί να εφαρμοστεί και σε επείγουσες καταστάσεις, δεν υπάρχει κίνδυνος αλλοανοσοποίησης και είναι αποδεκτή από μάρτυρες του Ιεχωβά. Τα μειονεκτήματά της μεθόδου είναι ο κίνδυνος επιμόλυνσης στο χειρουργικό πεδίο, η εμβολή αέρα ή λίπους και οι διαταραχές στην αιμόσταση που μπορεί να προκληθούν [38].



Εικόνα 11: Συσκευή cell saver [39].

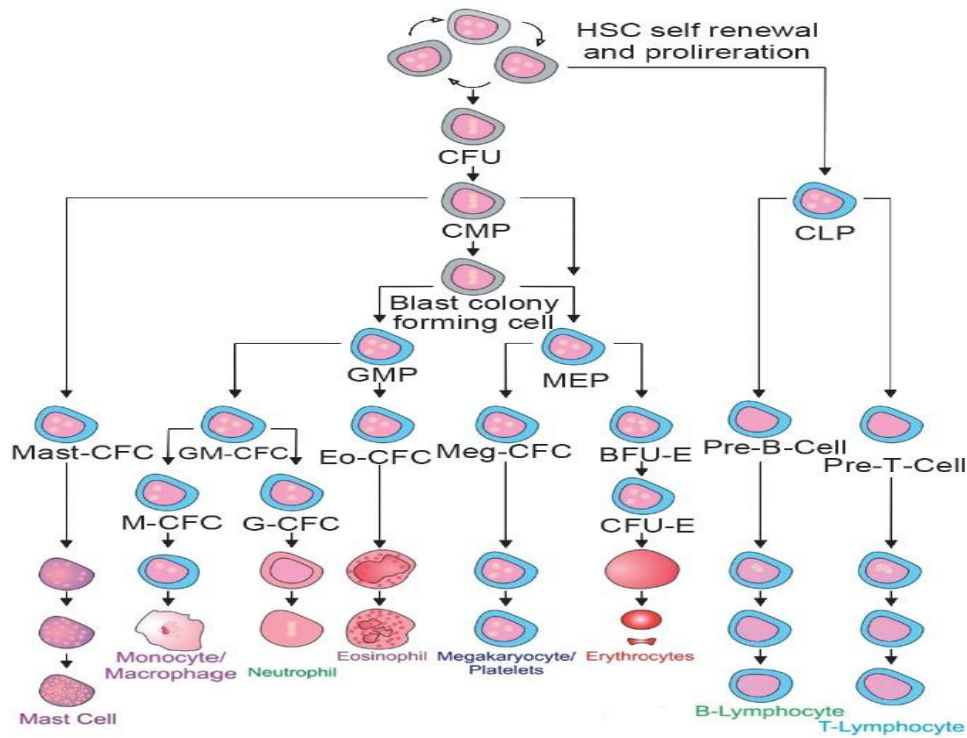
Οι τεχνητοί μεταφορείς οξυγόνου είναι βιοτεχνητοί ή συνθετικοί. Οι βιοτεχνητοί μεταφορείς έχουν ως βάση τους την αιμοσφαιρίνη η οποία μπορεί να είναι ανασυνδιασμένη, κεκαθαρμένη ανθρώπινη ή ζωικής προέλευσης [40]. Οι συνθετικοί μεταφορείς αποτελούνται από χηλικές οργανομεταλλικές ενώσεις που μιμούνται την αναστρέψιμη ένωση της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο. Τα υποκατάστατα αυτά του αίματος είναι απαλλαγμένα από παράγοντες πήξης και κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος [41].

Οι έρευνες στον τομέα της μεταγγισιοθεραπείας έχουν στραφεί τα τελευταία χρόνια και προς μία άλλη κατεύθυνση, την *ex vivo* παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα πλεονεκτήματα που θα προεκύπταν από την υλοποίηση αυτών των προσπαθειών είναι η εξάλειψη του κινδύνου μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων με τη μετάγγιση, ο περιορισμός της ανάγκης για μετάγγιση διότι ο χρόνος ζωής των παρασκευασμένων κυττάρων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια που περιέχονται σε έναν ασκό μετάγγισης και φυσικά η αποδέσμευση από τους αιμοδοτές. Η *ex vivo* παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων ουσιαστικά μιμείται τη διαδικασία της ερυθροποίησης σε συνθήκες εργαστηρίου και προϋποθέτει τη χρήση κυττάρων που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ώριμα ερυθρά.

1.5 Ερυθροποίηση

Οι εναλλακτικές μέθοδοι για την αλλογενή μετάγγιση βασίζονται πάνω στην συνεχώς εξελισσόμενη και βελτιούμενη επιστημονική γνώση σχετικά με την διαδικασία της ερυθροποίησης στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η Αιμοποίηση είναι μια διαδικασία μέσω της οποίας ένας πληθυσμός στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (Haemopoietic Stem Cells, HSC) με ικανότητα αυτο-ανανέωσης, διαιρείται και διαφοροποιείται ώστε να παρέχει συνεχώς στον οργανισμό τα κύτταρα του αίματος που χρειάζεται για τις ανάγκες του [22]. Καθώς εξελίσσεται η διαδικασία, χάνεται η πολυδυναμία του κυττάρου, η οποία ορίζεται ως η δυνατότητά του να δίδει απογόνους και των τριών αιμοποιητικών σειρών, δημιουργώντας πρόγονους δεσμευμένους ως προς μια αιμοποιητική σειρά, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένα ώριμα κύτταρα του αίματος [23].

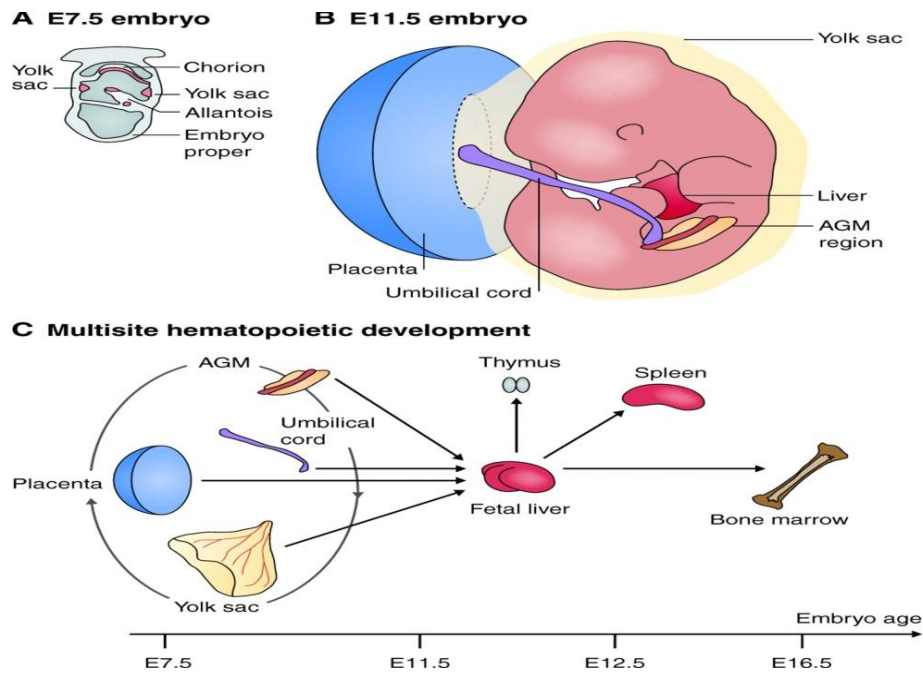


Εικόνα 12: Διαδικασία ωρίμανσης των αιμοποιητικών κυττάρων [24].

Το αιμοποιητικό σύστημα του ανθρώπου αναπτύσσεται στα πρώτα στάδια της εμβρυικής ζωής ως πρώιμο (primitive) και δίνει γένεση σε αντίστοιχα πρωτόγονα κύτταρα της ερυθράς και της μυελικής σειράς. Αυτή η μορφή αιμοποίησης λαμβάνει χώρα στο λεκιθικό ασκό περίπου την 21^η ημέρα της κύησης. Στο λεκιθικό ασκό τα αιμοποιητικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα γεννιούνται από τον ίδιο κοινό πρόγονο του μεσοδέρματος, την αιμαγγειοβλάστη. Στις περιοχές αυτές σχηματίζονται αιμοποιητικές νησίδες αποτελούμενες από μεσεγχυματικά κύτταρα [25].

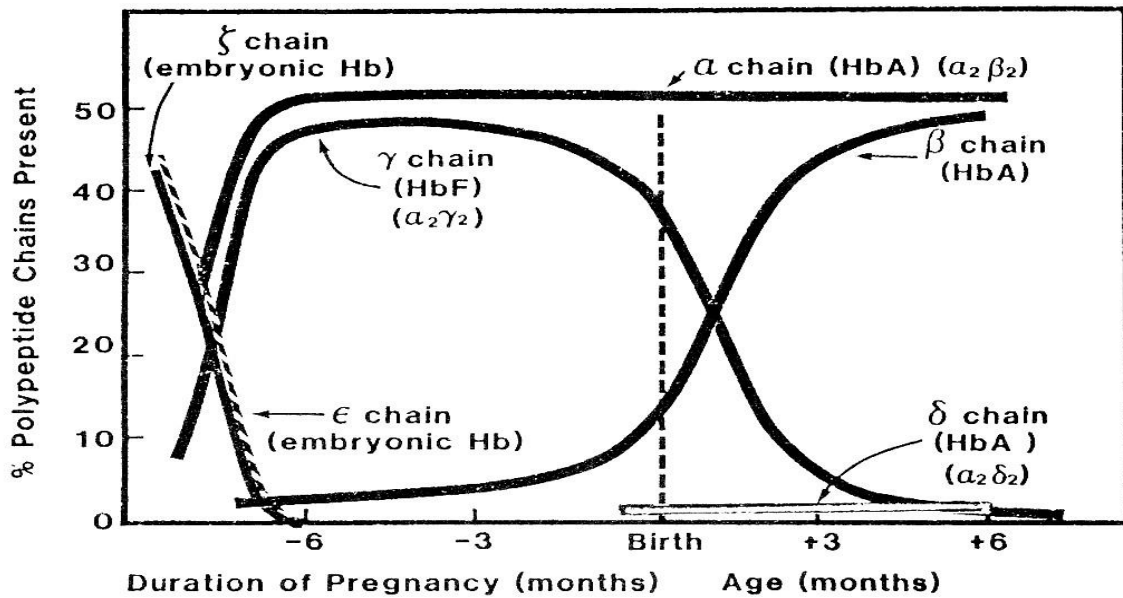
Το δεύτερο και οριστικό κύμα της αιμοποίησης (definitive) αρχίζει την 4^η εβδομάδα της εμβρυικής ζωής στην περιοχή της σπλαγχνόπλευρας (αορτή, γονάδες, μεσόνεφρος) όπου ομάδες των στελεχειαίων κυττάρων του αίματος σχηματίζονται στο κοιλιακό τοίχωμα της αορτής και των τοξοειδών αρτηριών. Μετά την 5^η εβδομάδα της κύησης τα αιμοποιητικά κύτταρα μεταναστεύουν και αποικίζουν άλλες αιμοποιητικές περιοχές μεταξύ των οποίων κυριότερο ρόλο έχει το εμβρυικό ήπαρ. Από την 12^η

εβδομάδα, η αιμοποίηση υποστηρίζεται από τον μυελό των οστών, ο οποίος αποτελεί αποκλειστική θέση της ερυθροποίησης κατά το 3^ο τρίμηνο [26].



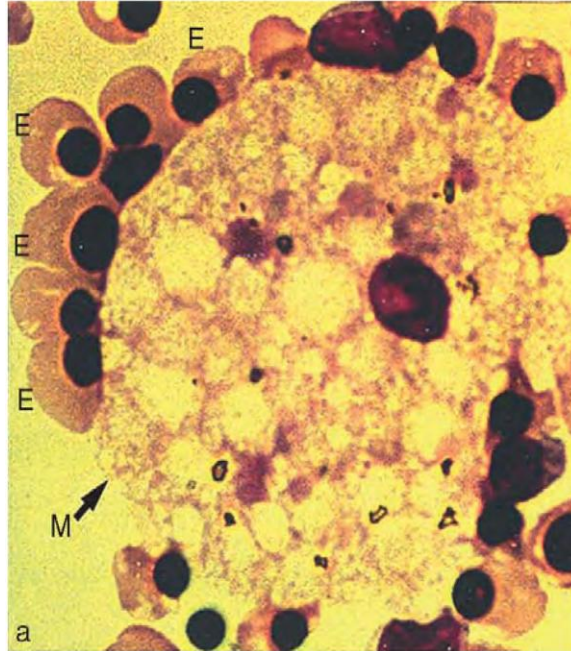
Εικόνα 13: Τα στάδια της αιμοποίησης στην εμβρυική ζωή [27].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που σχηματίζονται στο λεκιθικό ασκό είναι εμπύρνα κύτταρα και εκφράζουν αποκλειστικά εμβρυονικού τύπου αιμοσφαιρίνη (Gower-1, Gower-2, Portland). Στο δεύτερο κύμα της αιμοποίησης, τα ερυθροκύτταρα μπορούν να ωριμάζουν σε απύρνα κύτταρα που περιέχουν εμβρυική αιμοσφαιρίνη (HbF) και προς το τέλος της κύησης αρχίζει η έκφραση της αιμοσφαιρίνης που επικρατεί στην ενήλικη ζωή (HbA) [28].



Εικόνα 14: Τύπος αιμοσφαιρίνης που εκφράζεται κατά την εμβρυική ζωή ως και τον 6^ο μήνα ζωής [29].

Οι πρόδρομες κυτταρικές μορφές της ερυθράς σειράς, οι ερυθροβλάστες, μέσα στο περιβάλλον του μυελού οργανώνονται σε κυτταρικούς σχηματισμούς, τις ερυθροβλαστικές νησίδες. Αυτό το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται οι ερυθροβλάστες, περιγράφηκε πρώτη φορά το 1958 από τον Marcel Bessis. Οι νησίδες αποτελούνται από ένα κεντρικό μακροφάγο με κυτταροπλασματικές προσεκβολές που περικλείουν τους ερυθροβλάστες, ο οποίος διατάσσονται σε ομόκεντρους κύκλους γύρω από το μακροφάγο και ωριμάζουν προοδευτικά όσο απομακρύνονται από το κέντρο [75]. Οι αλληλεπιδράσεις των ερυθροβλαστών με το μακροφάγο είναι θεμελιώδεις για τα στάδια της ερυθροποίησης, διότι όχι μόνο προσδίδουν σταθερότητα στη δομή της νησίδας αλλά δίνουν και το έναυσμα για την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο [30].



Εικόνα 15: Ερυθροβλαστική νησίδα. M: κεκτρικό μακροφάγο, E: ερυθροβλάστες [30].

Η διαδικασία της ερυθροποίησης χωρίζεται σε τρία στάδια: 1) δέσμευση των HSC προς την ερυθρά σειρά, 2) διαίρεση και διαφοροποίηση των μορφολογικά αναγνωρίσιμων πρόγονων ερυθροκυττάρων, 3) τελική διαφοροποίηση και αποβολή του πυρήνα με σχηματισμό δικτυοερυθροκυττάρων και μετάβαση προς ώριμα ερυθροκύτταρα [17].

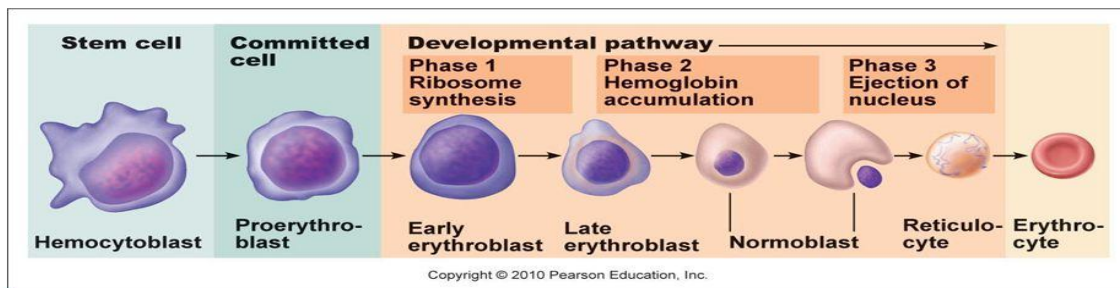
Το πρώτο στάδιο του σχηματισμού των ερυθροκυττάρων δεν είναι ορατό στο μικροσκόπιο. In vitro, με την καλλιέργεια των κυττάρων σε ημιστερεά μέσα που περιέχουν κυτοκίνες [69], ο πρώτος αναγνωρίσιμος πρόγονος της ερυθράς σειράς είναι ο burst-forming unit erythroid (BFU-E), ο οποίος μπορεί να σχηματίσει μεγάλες αποικίες ερυθροκυττάρων (RBC, Red Blood Cells). Οι αποικίες μπορεί να αποτελούνται από μερικές εκατοντάδες ως 30.000 κύτταρα. Ο BFU-E δίνει γένεση στον colony-forming unit erythroid (CFU-E), ο οποίος σχηματίζει μικρότερες αποικίες και εκφράζει υποδοχείς για την ερυθροποιητίνη (EPO), τον σημαντικότερο αυξητικό παράγοντα της ερυθράς σειράς [14].

Στο δεύτερο στάδιο της διαδικασίας προκύπτουν ορατοί, μορφολογικά αναγνωρίσιμοι πρόγονοι της ερυθράς σειράς. Μέσα από διαδοχικές διαιρέσεις τα κύτταρα εξελίσσονται από το στάδιο του προερυθροβλάστη σε βασεόφιλο, πολυχρωματόφιλο και ορθόχρωμο ερυθροβλάστη.

Στο τελικό στάδιο μετά απο μια διαδικασία κυτταροπλασματικών συσπάσεων, τα κύτταρα αποβάλλουν τον πυρήνα και προκύπτουν τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ). Τα ΔΕΚ αποβάλλουν τα κυτταροπλασματικά τους οργανίδια και μετατρέπονται σε ώριμα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια [30].

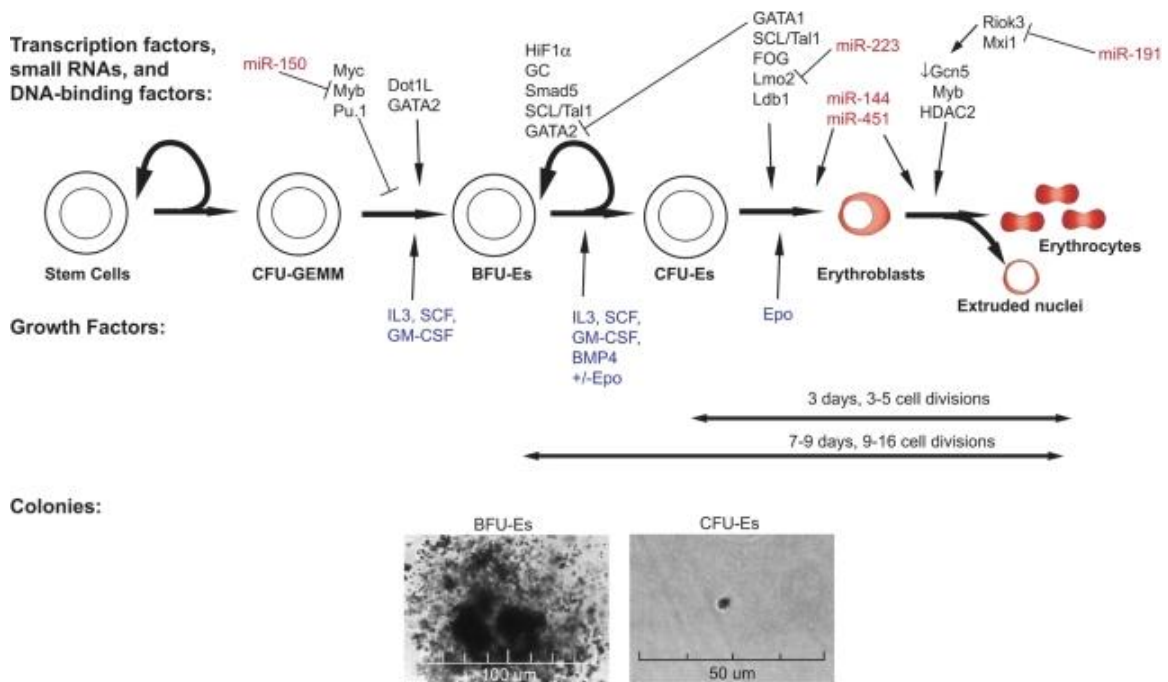
RBC PRODUCTION

- ▶ Erythropoiesis → formation of only RBCs in the red bone marrow of adults



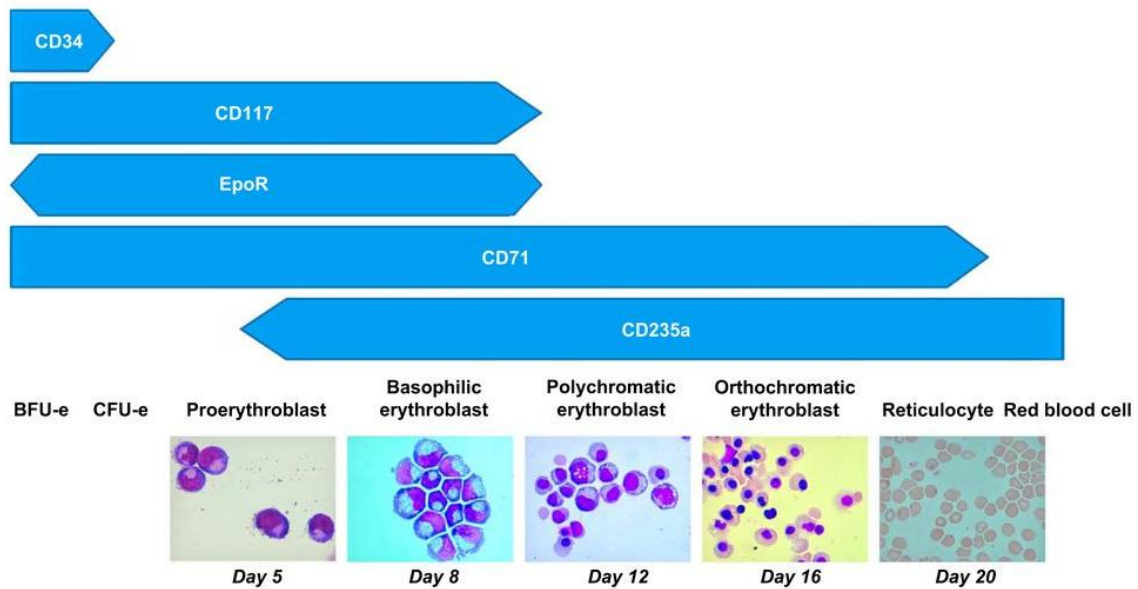
Εικόνα 16: Η διαδικασία της ερυθροποίησης [31].

Ο σχηματισμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα στελεχιαία κύτταρα επάγεται και ρυθμίζεται από μεγάλο αριθμό μορίων σηματοδότησης που συμμετέχουν σε διαφορετικά στάδια της ερυθροποίησης. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες μπορεί είτε να προέρχονται από το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο γίνεται η διαδικασία πχ. κυτοκίνες και φμπρονεκτίνη, είτε να αποτελούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια πχ. μεταγραφικοί παράγοντες και miRNAs [138].



Εικόνα 17: Τα διαφορετικά στάδια της ερυθροποίησης και οι ρυθμιστικοί τους παράγοντες. Με μπλέ χρώμα σημειώνονται οι εξωκυττάριοι παράγοντες, με μαύρο οι μεταγραφικοί και με κόκκινο τα miRNAs. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται οι αποικίες που σχηματίζονται στη φάση της BFU-E (αριστερά) και CFU-E (δεξιά) ερυθροποίησης [138].

Κατά τη διαδικασία της ερυθροποίησης παρατηρείται η έκφραση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας που καθορίζουν τόσο την ερυθρά σειρά αλλά και τη φάση ωρίμανσής της. Ο δείκτης CD34 εμφανίζεται από το επίπεδο του HSC και σταματάει να εκφράζεται στη φάση του CFU-E. Ο δείκτης CD71, ο υποδοχέας της τρανσφερίνης (TfR), εντοπίζεται σε όλα τα στάδια της ερυθροποίησης με μεγαλύτερη όμως έκφραση στη φάση του πολυχρωματόφιλου ερυθροβλάστη. Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης (EPO-R) χαρακτηρίζει με την παρουσία του τα στάδια από CFU-E μέχρι του βασεόφιλου ερυθροβλάστη (ερυθροποίηση εξαρτώμενη από την EPO) και ακολούθως σταδιακά εξασθενεί η έκφρασή του (ερυθροποίηση ανεξάρτητη από την EPO). Ο δείκτης CD235a που καθορίζει τη γλυκοφορίνη A (GPA) είναι μεμβρανική σιαλογλυπρωτεΐνη που εμφανίζεται σε όλα τα στάδια της ερυθροποίησης από τη φάση του BFU-E και μετά με σταθερή έντονη έκφραση από το στάδιο του προερυθροβλάστη [14,32].



Εικόνα 18: Η έκφραση των δεικτών επιφάνειας κατά την ωρίμανση της ερυθράς σειράς [33].

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και πρωτοπαρουσιάζεται στον προερυθροβλάστη. Καθως σχηματίζονται πιο ώριμες μορφές αυξάνεται και η παρουσία της Hb στο κύτταρο με αποτέλεσμα το κυτταρόπλασμα στο ώριμο ερυθρό να περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό Hb [26].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΧ ΝΙΝΟ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

2.1 Εισαγωγικό μέρος

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της μελέτης των βιολογικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την εξέλιξη και τη διαφοροποίηση των στοιχείων της ερυθράς σειράς προς ώριμα και πλήρως λειτουργικά ερυθροκύτταρα. Οι έρευνες αποδεικνύουν την τεράστια δυναμική τριών τύπων στελεχειαίων κυττάρων στο να διαφοροποιούνται προς την ερυθρά σειρά με τη χρήση παρόμοιων πρωτοκόλλων [42]. Τα κύτταρα που είναι ικανά να υποστηρίξουν την ex vivo ερυθροποίηση είναι:

α) Τα CD34+ HSPCs (Hematopoietic Stem/ Progenitor Cells), αιμοποιητικά στελεχειαία/ προγονικά κύτταρα

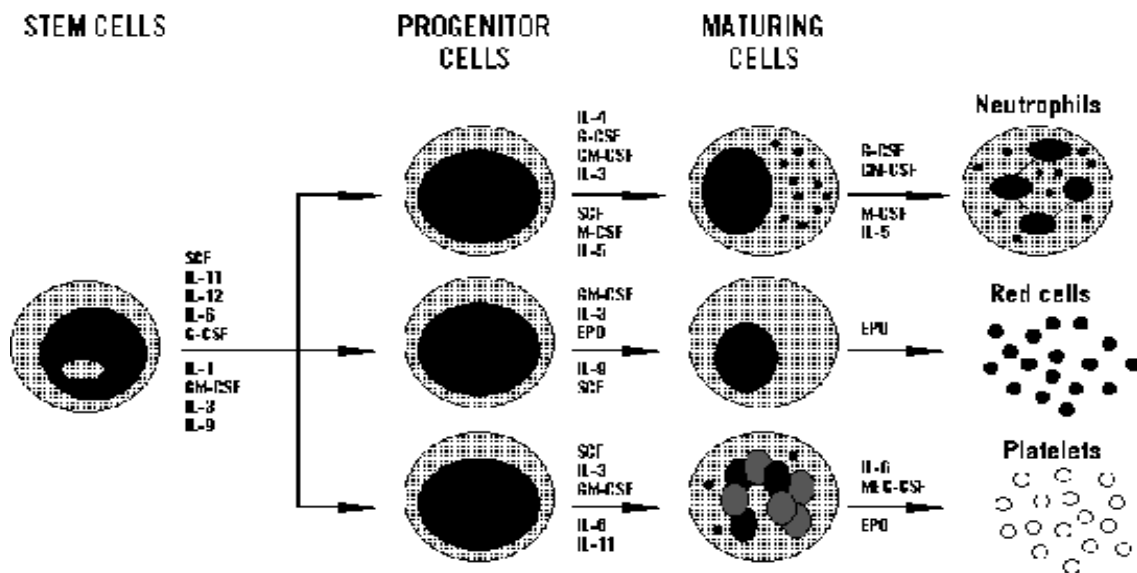
β) Τα ESC (Embryonic Stem Cells), εμβρυονικά στελεχειαία κύτταρα

γ) Τα iPSC (induced Pluripotent Stem Cells), επαγόμενα πολυδύναμα στελεχειαία κύτταρα

Τύπος Κυττάρων	Προέλευση	Ανάγκη Ειδικών Συνηθικών	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
	Παράγωγο Λευκαφαίρεσης	Όχι	Δότης με γνωστό φαινότυπο	Περιορισμένη δυνατότητα επέκτασης κυττάρων
Μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs)	Παράγωγο Συλλογής	Ναι	>3 παράγωγα απο μια συλλογή	Δότες μπορεί να μην είναι διαθέσιμοι
	Κινητοποίηση προ συλλογής	Ναι (για κινητοποίηση και συλλογή)	Επέκταση κυττάρων παρόμοια με CB	Απαιτούνται περισσότεροι ποιοτικοί έλεγχοι
Ομφαλοπλακουντιακό αίμα (CB)	Μονάδες μικρού όγκου ακατάλληλες για μεταμόσχευση	Ναι	Μεγαλύτερος αριθμός αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων	Μονός δότης Ποιοτικοί έλεγχοι σχετικά περίπλοκοι
Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχειαία κύτταρα (iPSCs)	Καλλιέργειες ινοβλαστών απο αυτόλογους ή αλλογενείς δότες με γνωστό φαινότυπο	Ναι	Απεριόριστη δυνατότητα επέκτασης κυττάρων	Ποιοτικοί έλεγχοι ιδιαίτερα περίπλοκοι
Εμβρυονικά στελεχειαία κύτταρα (ESCs)	Κυτταρικές σειρές	Ναι	Απεριόριστη δυνατότητα επέκτασης κυττάρων	Ποιοτικοί έλεγχοι ιδιαίτερα περίπλοκοι Ηθικοί περιορισμοί

Εικόνα 19: Προέλευση των κυττάρων που μπορούν να υποστηρίξουν την ex vivo ερυθροποίηση, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών (μεταφρασμένος πίνακας) [11].

Τα CD34+ HSPCs χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία των αιματολογικών κακοηθειών τα τελευταία 40 χρόνια. Αποτελούν ένα μορφολογικά και ανοσολογικά ετερογενή πληθυσμό που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να δημιουργεί in vitro κλωνικές συναθροίσεις πρώιμων και όψιμων προγονικών κυττάρων. Το CD34+ αντιγόνο που εκφράζεται στην επιφάνειά τους δεν είναι ειδικό ως προς κάποια αιμοποιητική σειρά αλλά υποδεικνύει τα πρώιμα στάδια οντογένεσης των κυττάρων [77]. Τα κύτταρα αυτά υπόκεινται στη ρύθμιση διαφόρων αυξητικών παραγόντων. Η ρύθμιση αφορά στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην επιβίωση και στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος. Οι κυτοκίνες ασκούν δράση σε ολά τα στάδια της αιμοποίησης, εξειδικεύονται ωστόσο ως προς την κυτταρική σειρά και τη φάση ανάπτυξης [78].

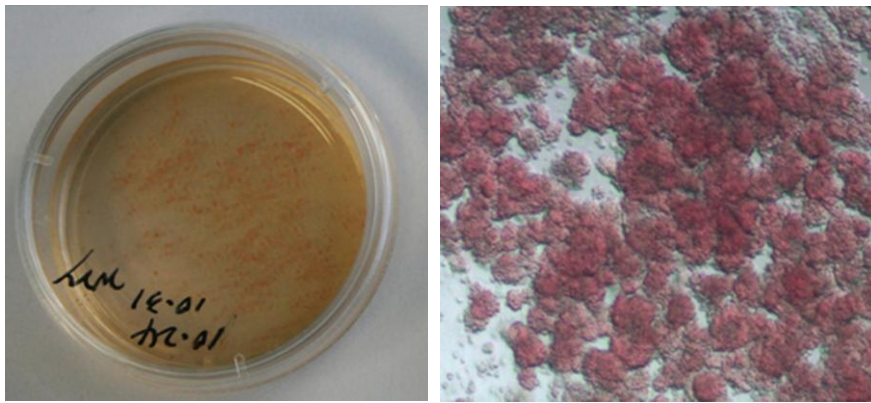


Εικόνα 20: Η δράση των αυξητικών παραγόντων ανάλογα με την κυτταρική σειρά και την ωρίμανση [78].

Πέρα από τον μυελό των οστών (bone marrow, BM), CD34+ HSPCs υπάρχουν και στο περιφερικό αίμα (peripheral blood, PB) και στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα (cord blood, CB). Η ποσότητά τους διαφέρει ανάλογα με τον ιστο: στον BM εμφανίζονται με

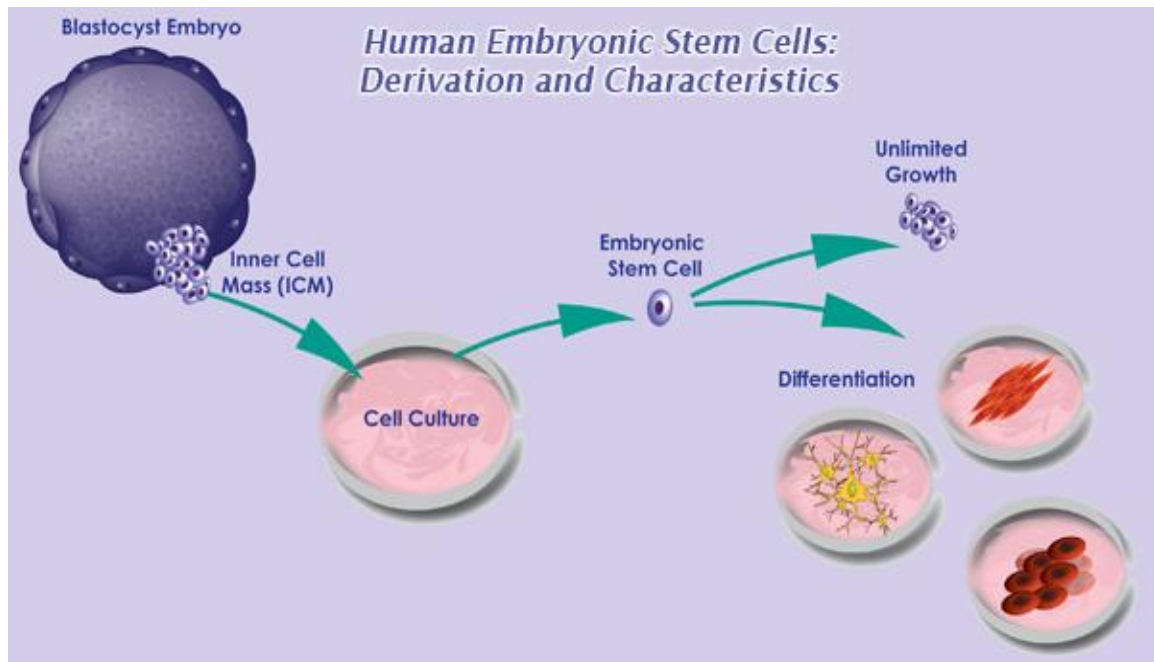
πυκνότητα $3-9 \times 10^8$ / ml, στο PB $0.9- 2.5 \times 10^7$ /ml, ενώ το CB περιέχει 2.5 φορές περισσότερα CD34+ κύτταρα από ότι μία αντίστοιχη μονάδα όγκου BM [79]. Κατά συνέπεια το CB έχει καλύτερα αποτελέσματα στις μελέτες διότι έχει τη δυνατότητα να παράγει 5-10 φορές περισσότερα ερυθρά σε σχέση με το PB [83].

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα φυλάσσεται στις αντίστοιχες τράπεζες εφόσον η ποσότητά του κριθεί ικανοποιητική δηλαδή πάνω από 90ml. Οι μικρότερες ποσότητες που απορρίπτονται μπορούν να αποτελέσουν υλικό για την παραγωγή ερυθροκυττάρων [91]. Σύμφωνα με μια αναφορά του 2010, περίπου 450.000 CB μονάδες είχαν συγκεντρώθει συνολικά παγκοσμίως και είχαν ελεγχθεί ως προς την έκφραση των ερυθροκυτταρικών τους αντιγόνων [85]. Το 2016 ο αριθμός αυτός ανέρχεται στις ένα εκατομμύριο μονάδες [88].



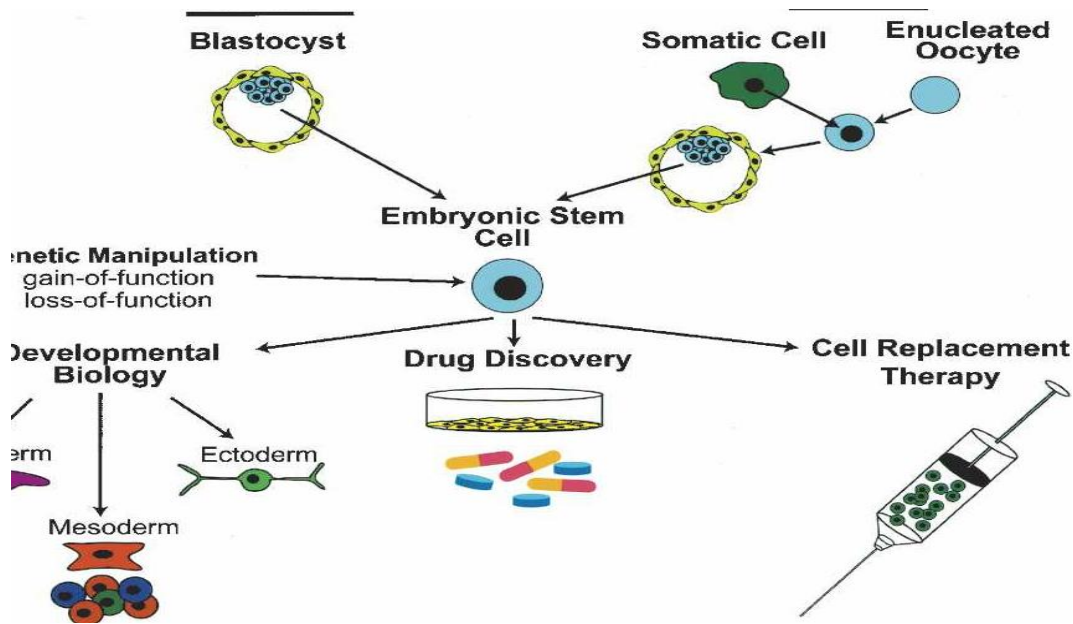
Εικόνα 21: Προγονικά ερυθροκύτταρα που προέκυψαν από την καλλιέργεια ομφαλοπλακουντιακού αίματος [70].

Τα εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '80 και αποτέλεσαν μία μεγάλη πρόοδο στη βιολογία και στην πειραματική ιατρική. Αρχικά απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικού και προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης πριν ή κατά την εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα [94].



Εικόνα 22: Χαρακτηριστικά των εμβρυονικών στελεχειαίων κυττάρων [95].

Τα ESC όταν διατηρηθούν σε καλλιέργεια, έχουν τη δυνατότητα της αυτοανανεώσης διότι μπορούν να αναπτύσσονται επ'άόριστον (immortalized cells) χωρίς να διαφοροποιούνται. Παράλληλα είναι πολυδύναμα γιατί είναι ικανά να δώσουν γένεση σε κύτταρα και των τριών βλαστικών σιβάδων (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) όταν εγχυθούν σε μια βλαστοκύστη- δέκτη και να σχηματίσουν τεράτωμα όταν ενεθούν σε έκτοπο σημείο [96]. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών τους αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή κυττάρων για την αναπτυξιακή έρευνα και τη γενετική, για τον τομέα των μεταμοσχεύσεων και για τη φαρμακολογία [97].

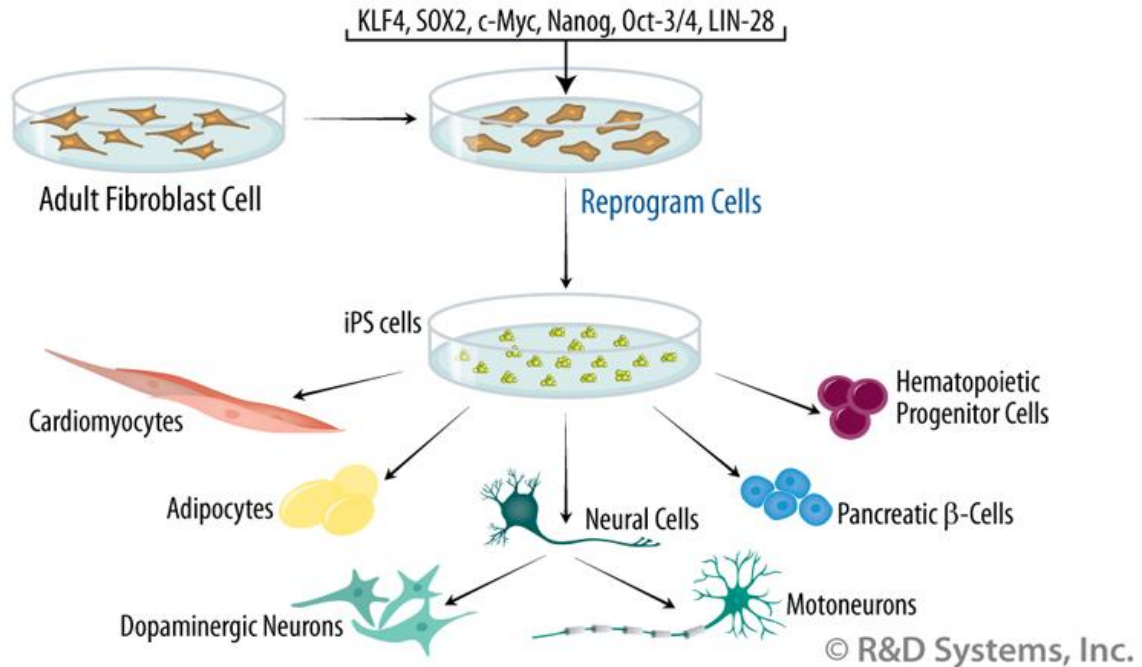


Εικόνα 23: Τομείς οι οποίοι εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά των ESC [97].

Μια άλλη κατηγορία πολυδύναμων και immortalized κυττάρων είναι τα επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (iPSCs), τα οποία βασίζονται στην τεχνική που εδραιώθηκε από τους Yamanaka et al. το 2006. Η τεχνική επαναπρογραμματίζει τα σωματικά κύτταρα μετατρέποντάς τα σε πολυδύναμα κύτταρα που μοιάζουν με τα εμβρυονικά (embryonic-like cells) [129].

Τα iPSCs που προέρχονται από ανθρώπινα κύτταρα (hiPSCs) μπορούν να κατασκευαστούν από ένα ευρύ φάσμα σωματικών κυττάρων πχ. ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από τον λιπώδη ιστό, CD34+ κύτταρα από το περιφερικό αίμα [139] και μπορούν να αποτελούν αυτόλογα προϊόντα, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ανοσολογικής απόρριψης από τον δέκτη και πιθανά την έγερση λιγότερων ηθικών ζητημάτων. Από την άλλη μέρη, τα iPSCs είναι γενετικά τροποποιημένα κύτταρα και θα πρέπει να προσαρμόζονται με συγκεκριμένες ρυθμιστικές οδηγίες για την προστασία της παγκόσμιας υγείας [88]. Το 2014 μια γυναίκα από την Ιαπωνία με εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας ήταν η πρώτη που

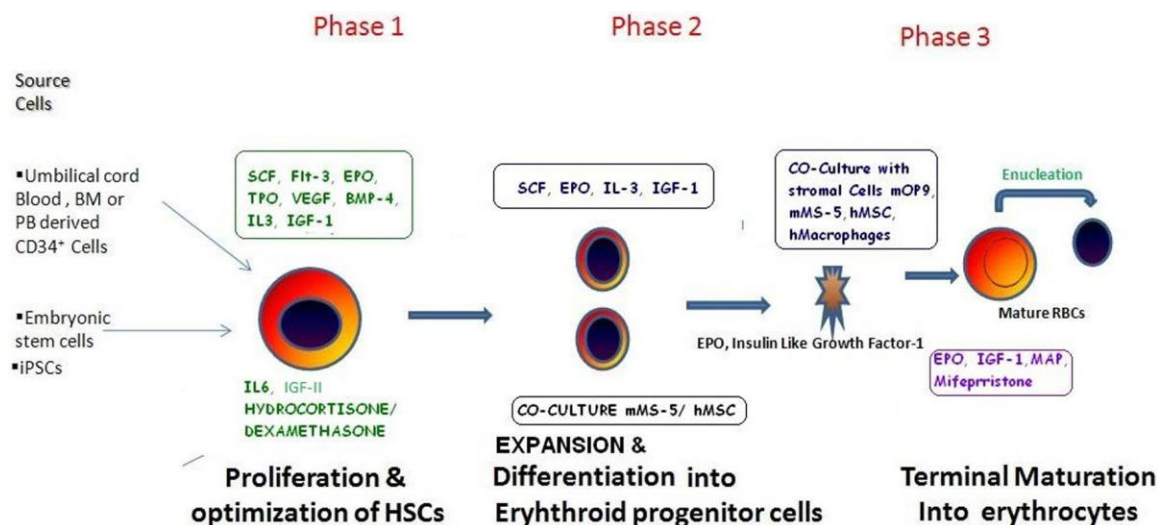
έλαβε μόσχευμα κυττάρων αμφιβληστροειδούς κατασκευασμένα από αυτόλογα hiPSCs [141].



Εικόνα 24: Επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών ενήλικου ατόμου σε iPSCs με δυνατότητα παραγωγής κυττάρων και των τριών βλαστικών στιβάδων [130]

Οι σύγχρονες τεχνικές που εφαρμόζονται για την εξασφάλιση θεραπευτικών προϊόντων που προέρχονται από iPSC είναι πολύπλοκες, παρουσιάζουν ελλείψεις σχετικά με την διασφάλιση της ποιότητας του προϊόντος, φέρουν σε αδιευκρίνιστο βαθμό το ρίσκο για ανάπτυξη όγκων ή για τη μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών και συνεπώς απαιτούν την εισαγωγή συγκεκριμένων ρυθμιστικών παραμέτρων και σαφέστερων κατευθυντήριων οδηγιών [127].

Ανεξάρτητα από τον τύπο των στελεχιαίων κυττάρων, η εξέλιξή τους προς την ερυθρά σειρά μπορεί να προωθείται μέσω τριών βασικών βημάτων. Τα κύτταρα πρέπει πρώτα να δεσμευτούν προς τη συγκεκριμένη αιμοποιητική σειρά, ακολούθως να αυξηθούν και να καταλήξουν σε ώριμες μορφές [17].

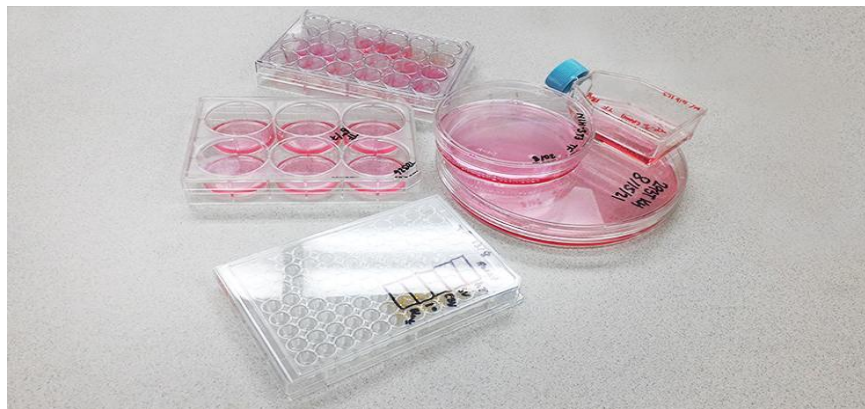


Εικόνα 25: Διαφορετικές πηγές κυττάρων και τα βασικά βήματα των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες για την *ex vivo* ερυθροποίηση [17]

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

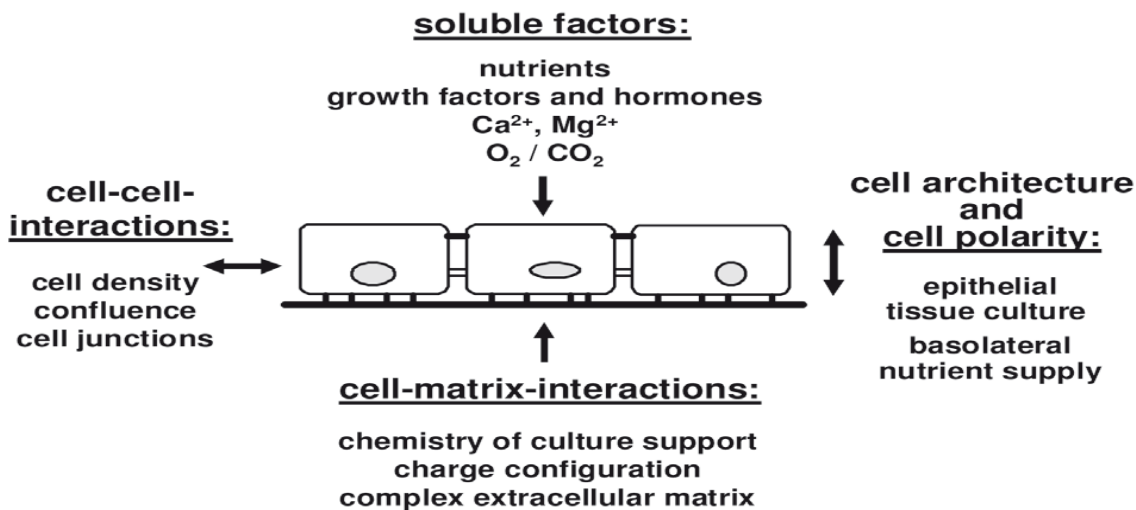
Η Αιμοποίηση μελετήθηκε αρχικά με την καλλιέργεια των αρχέγονων κυττάρων σε τρυβλία με ημι-στερεά μέσα (πχ. αγαρ) [69]. Με τη διαδικασία αυτή δεν είναι εφικτή η διαφοροποίηση των κυττάρων προς ώριμες μορφές, τα κύτταρα που προκύπτουν είναι περιορισμένα σε πληθυσμό και δεν μπορεί να διερευνηθεί ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων [70].

Οι καλλιέργειες σε υγρό μέσο αναπτύχθηκαν με στόχο να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα. Στην πλειοψηφία τους όμως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων δεν είναι ικανοποιητικός και παρουσιάζεται μεγάλο έλλειμα σχετικά με την εξέλιξη των κυττάρων σε ώριμες μορφές [71]. Επίσης η δυνατότητα αφαίρεσης ή προσθήκης ουσιών στο δοχείο είναι μειωμένη, συνεπώς η παρατήρηση της επίδρασης στα κύτταρα διαφορετικών παραγόντων είναι δύσκολη [70].



Εικόνα 26: Διάφοροι τύποι δοχείων κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες [74].

Σε μία καλλιέργεια το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται πρέπει να μιμείται όσο το δυνατόν περισσότερο τις *in vivo* συνθήκες. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται *ex vivo* προμηθεύονται τις απαραίτητες ουσίες για το μεταβολισμό τους, την ανάπτυξή τους και τον πολλαπλασιασμό τους από το μέσο στο οποίο καλλιεργούνται [72].



Εικόνα 27: Παράμετροι που ελέγχουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση των διαφόρων μεταβολικών λειτουργιών των κυττάρων μίας καλλιέργειας [44]

Συνήθως αυτό επιτυγχάνεται με προσθήκη ορού σε ένα κλασσικό θρεπτικό μέσο. Ο ορός που χρησιμοποιείται είναι ζωικής προέλευσης, συχνότερα απο βοοειδή και αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μείγμα από βιομόρια όπως πρωτεΐνες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, λιπίδια, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Με αυτόν τον τρόπο παρέχονται στα κύτταρα τα αναγκαία μέσα για τις βασικές τους λειτουργίες. Παρόλα αυτά η προσθήκη του ορού αποτελεί ένα βασικό πρόβλημα στον τομέα των κυτταροκαλλιεργειών όχι μόνο επειδή η σύνθεσή του ποικίλλει και άρα το αποτέλεσμα της καλλιέργειας πιθανά να μην είναι το αναμενόμενο, αλλά μπορεί ακόμα και να αποβεί επιζήμιος, επιμολύνοντας την καλλιέργεια με ιούς, βακτήρια ή μύκητες που τυχόν να περιέχει. Επιπλέον προκύπτουν ηθικά ζητήματα σχετικά με την προστασία των ζώων ειδικά όταν ο ορός προέρχεται από έμβρυα βοοειδών (FBS, Fetal Bovine Serum)[44].



Εικόνα 28: Κλασσικά θρεπτικά υλικά καλλιέργειών [46].

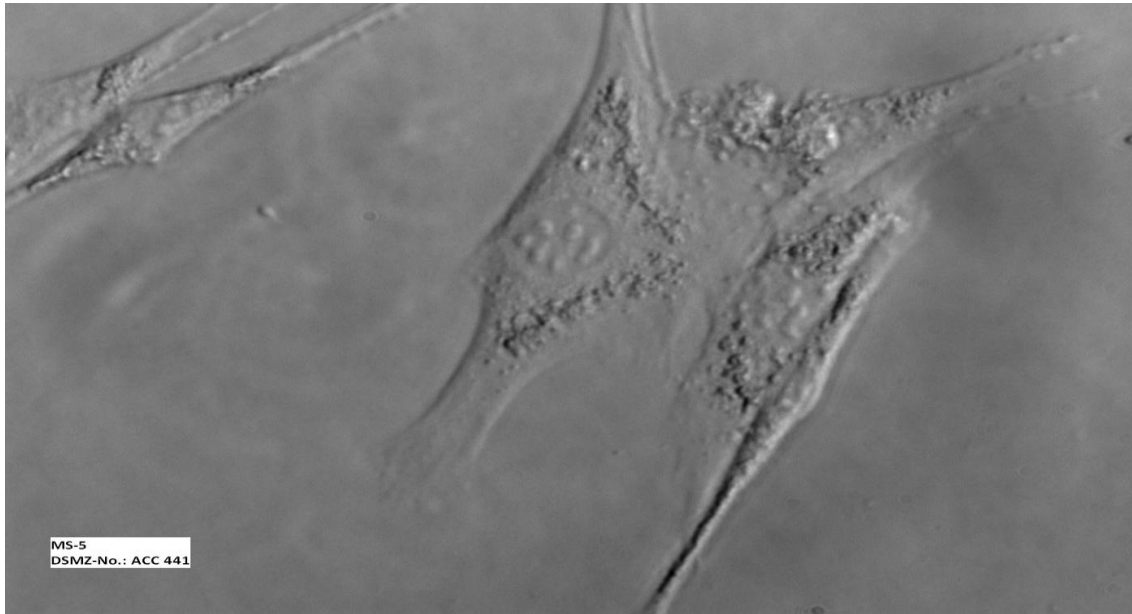
Μεγάλος αριθμός μελετών στρέφονται προς την αντικατάσταση του FBS με άλλες πηγές όπως ο ορός που προέρχεται από νεογέννητα ή ενήλικα βοοειδή ή από άλλα ζώα ή φυτά. Επίσης έχει δοκιμαστεί και η χρήση ανθρώπινου πλάσματος, από το οποίο όμως πρέπει να έχουν αφαιρεθεί οι παράγοντες πήξης [57]. Ωστόσο, το ανθρώπινο πλάσμα δεν υπάρχει σε αφθονία, οπότε η μέθοδος αυτή θεωρείται μη πρακτική [54]. Εναλλακτικά, προτείνεται η παραγωγή ενός μέσου καλλιέργειας που μειώνει την ανάγκη χρήσης του ορού ή είναι πλήρως απαλλαγμένο από ορό (serum-free). Το μειονέκτημα είναι ότι με αυτή την στρατηγική απαιτείται περισσότερος χρόνος για την ανάπτυξη των κυττάρων [45].

Ένα από τα συστατικά του ορού είναι τα γλυκοκορτικοειδή. Μέσα από διάφορες έρευνες που έγιναν στην προσπάθεια απαλλαγής των κυτταροκαλλιιεργιών από τον ορό, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα γλυκοκορτικοειδή προωθούν τον πολλαπλασιασμό αλλά αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροκυττάρων [63]. Πρόσφατα, από πειράματα σε ερυθροβλάστες από έμβρυα ποντικού, διαπιστώθηκε ότι οι αποακετυλάσες των ιστονών είναι αναγκαίες για την τελική διαφοροποίηση των ερυθρών διότι προάγουν την συμπύκνωση του πυρήνα και την αποβολή του από το κύτταρο. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ισχυροί αναστολείς των αποακετυλασών [92]. Συνεπώς η απουσία του ορού πιθανά να συμβάλλει στην τελική διαφοροποίηση. Από την άλλη μεριά όμως φαίνεται από πολλά πειράματα ότι η αφαίρεση του ορού από τη διαδικασία έχει ολέθριες συνέπειες στη ζωτικότητα των κυττάρων [64].

Η ανακαλλιέργεια ή κυτταρικά περάσματα (passages) είναι αναγκαία για την διαφύλαξη της ζωτικότητας των καλλιεργούμενων κυττάρων. Τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται όταν η πυκνότητά τους στο δοχείο καλλιέργειας φτάνει τα 10^6 ανά μικρόλιτρο [87]. Καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων ενός δοχείου καλλιέργειας προσεγγίζει το 90-100%, τουλάχιστον τα μισά κύτταρα πρέπει να απομακρυνθούν για να μην υπάρξει αναστολή της ωρίμανσής τους και κυτταρικός θάνατος [58]. Παρά την τεχνική των passages, τα κύτταρα μιας καλλιέργειας δεν είναι αθάνατα. Ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων είναι πεπερασμένος και σχετίζεται με το μήκος των τελομερών στο άκρο του DNA του κυττάρου. Η εισαγωγή των τεχνικών ανάπτυξης κυτταρικών σειρών (cell lines) κατάφερε να υπερκεράσει το φυσικό αυτό περιορισμό. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους τα κύτταρα μιας κυτταρικής σειράς μετατρέπονται σε αθάνατα (immortalized cell line) πχ. εισαγωγή στα κύτταρα του μορίου της ανάστροφης τρανσκριπτάσης της τελομεράσης (TERT) ή απενεργοποίηση συγκεκριμένων μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου [74].

Τα υποστηρικτικά κύτταρα (feeder cells) προστίθενται σε μια καλλιέργεια στο πλαίσιο της επίτευξης ακόμα μεγαλύτερης προσομοίωσης με το περιβάλλον του οργανισμού μέσα στο οποίο αναπτύσσονται φυσιολογικά τα κύτταρα [50]. Τα feeder

cells είναι συνήθως ινοβλάστες που προέρχονται από ποντίκια (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF) ή ανθρώπινης προέλευσης μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (Mesenchymal Stromal Cells, MSCs) ή ανθρωπίνοι ινοβλάστες [51,52]. Επίσης έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές από κύτταρα του στρώματος του μυελού των ποντικίων (MS-5) [53].



Εικόνα 29: MS-5 κυτταρική σειρά που κατασκευάστηκε μετά από μακράς διάρκειας καλλιέργεια μυελού των οστων από συγκεκριμένη γενιά ποντικίων [56].

Γενικά, τα τεχνικά προβλήματα που αναδύονται κατά την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων σε μία καλλιέργεια είναι πολλά και αφορούν : στην εξάντληση του θρεπτικού υλικού, στην αλλαγή του pH, στη συσσώρευση κυττάρων που αποθνήσκουν. Η επαφή μεταξύ των κυττάρων μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση. Επιπροσθέτως, μπορεί να συμβούν μεταβολές γενετικές ή επιγενετικές, με αποτέλεσμα την επιλεκτική ανάπτυξη των τροποποιημένων κυττάρων [73].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΧ VIVO ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ενίσχυση της ανάπτυξης των HSPCs in vitro

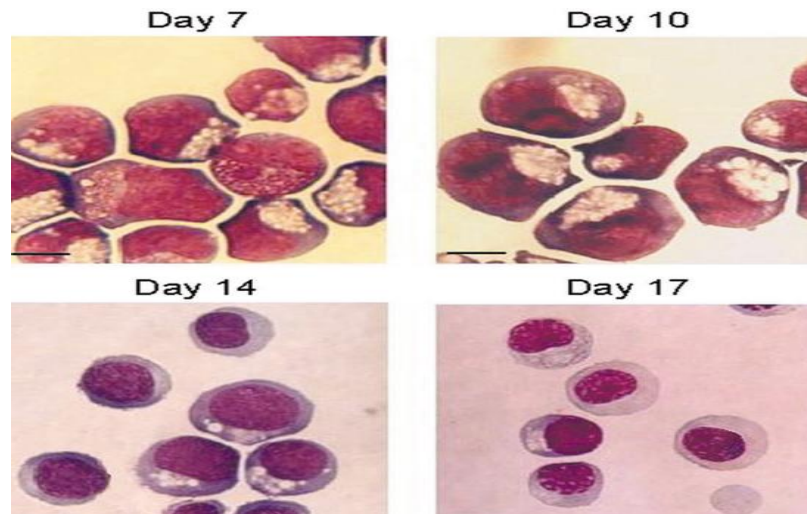
Μέχρι τις αρχές του 2000 είχαν αναπτυχθεί οι μέθοδοι για την καλλιέργεια των στελεχιαίων κυττάρων [65], αλλά οι πληθυσμοί των κυττάρων που προέκυπταν ήταν ετερογενείς και περιορισμένης ποσότητας [66]. Η γνώση που κατακτήθηκε σχετικά με τη δράση διαφόρων παραγόντων στα HSPCs, χρησιμοποιήθηκε στα πρωτόκολλα καλλιέργειας και ανάπτυξης των κυττάρων in vitro.

Πρώτη, η ερευνητική ομάδα του Neildez-Nguyen το 2002 ανέπτυξε μια μέθοδο που βασίζεται σε τρία βήματα και περιλαμβάνει τη διαδοχική προσθήκη ειδικών συνδυασμών κυτταροκινών στο υλικό καλλιέργειας [43]. Τα CD34+ HSPCs προέρχονταν από CB και καλλιεργήθηκαν σε serum- free θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με BSA (Bovine Serum Albumin), ανθρώπινη τρανσφερίνη κορεσμένη με σίδηρο, θειϊκό σίδηρο, νιτρικό σίδηρο, ινσουλίνη, λιπίδια και υδροκορτιζόνη. Στο πρώτο βήμα (διάρκειας από την ημέρα 0 ως την ημέρα 7), τα κύτταρα αναπτύχθηκαν παρουσία Flt3 συνδέτη (Flt3-L), θρομβοποιητίνης (TPO) και παράγοντα των στελεχιαίων κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF). Στο δεύτερο βήμα (διάρκειας 7 ημερών) τα κύτταρα επανακαλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό αλλά παρουσία EPO, SCF και Insulin-like Growth Factor I (IGF-I). Το τρίτο βήμα περιλαμβάνει την εκ νέου καλλιέργεια των κυττάρων για ακόμα δύο έως επτά ημέρες, στις ίδιες συνθήκες με του δεύτερου βήματος χωρίς όμως την προσθήκη SCF. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε τρεις ημέρες. Με αυτή τη διαδικασία τα CD34+ HSPCs αναπτύχθηκαν και εξελίχθηκαν προς CD34+ προγονικά κύτταρα δεσμευμένα για την ερυθρά σειρά [47].

Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στο πρώτο σκέλος (Flt3-L, TPO και SCF) ασκούν θετική ρύθμιση στην ανάπτυξη των στελεχιαίων και των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων. Ο SCF δρά και σε πιο ώριμες μορφές και ενισχύει τη διαφοροποίησή τους [48]. Η EPO που προστίθεται στη συνέχεια δρά στους δεσμευμένους για την ερυθρά σειρά προγόνους (ερυθροποίηση εξαρτώμενη από την ερυθροποιητίνη) προάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους και παράλληλα τους

προστατεύει από την απόπτωση [67]. Ο IGF-I προωθεί τον πολλαπλασιασμό και την τελική διαφοροποίηση [68].

Τα κύτταρα που παράχθηκαν στην καλλιέργεια ελέγχθηκαν ως προς την αιμοσφαιρίνη που εκφράζουν με τη μέθοδο της χρωματογραφίας. Η κύρια αιμοσφαιρίνη ήταν η HbF. Υπολογίστηκε ότι την ημέρα 17, τα κύτταρα αυξήθηκαν 200.000 φορές. Συνεπώς, ένας αρχικός πληθυσμός από 10^6 CD34+ μπορεί να παράγει 40-50 γραμμάρια αιμοσφαιρίνης.



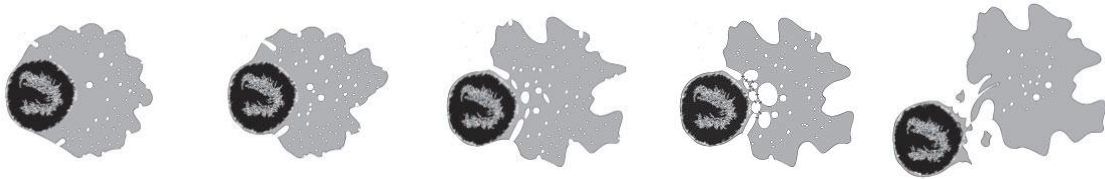
Εικόνα 30: Φωτογραφίες από τα κύτταρα της καλλιέργειας με την μέθοδο των Neildez-Nguyen et al. , τις ημέρες 7, 10 ,14 και 17. Παρατηρείται η εξέλιξή τους προς εμπύρηννα ερυθρά [48].

Ακολούθως, τα κύτταρα αυτά ενέθηκαν σε μη- παχύσαρκα διαβητικά με σοβαρή συνδιασμένη ανοσοανεπάρκεια ποντίκια (non-obese diabetic/ severe combined immunodeficient, NOD/ SCID) και παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε ώριμα τελικώς διαφοροποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια με έκφραση HbA [48]. Την 10^η ημέρα της καλλιέργειας ο αριθμός των παραγόμενων κυττάρων φτάνει τα $6-10 \times 10^9$. Μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και ο αριθμός τους αναμένεται να φτάσει τα $6-10 \times 10^{11}$ κύτταρα. Με το πρωτόκολλο των Neildez-Nguyen et al. και λαμβάνοντας υπόψιν ότι μία μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών περιέχει 1,8-

2×10^{12} ερυθρά αιμοσφαίρια, φαίνεται ότι από μια μονάδα CB μπορούν να παραχθούν ποσότητες κυττάρων που αντιστοιχούν σε μία έως τρεις μονάδες αίματος.

3.2 In vitro παραγωγή απύρηνων ερυθρών από HSPCs

Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αποβολή του πυρήνα στα τελευταία στάδια της ερυθροποίησης δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Η διαδικασία περιλαμβάνει πολλά μοριακά και κυτταρικά μονοπάτια όπως την αποακετυλίωση των ιστονών, τον πολυμερισμό της ακτίνης, την αλληλεπίδραση κυττάρου- στρώματος και την συμμετοχή των miRNAs [138]. Η παρατήρηση των Ganesan Keerthivasan et al. ότι τα κενοτόπια στο κυτταρόπλασμα του πρώιμου ερυθροβλάστη συσσωρεύονται κοντά στον πυρήνα πρωτού αυτός εξέλθει του κυττάρου, οδήγησε στην υπόθεση ότι αυτή η κινητοποίηση συμβάλλει επίσης στην εκπυρήνωση [49].

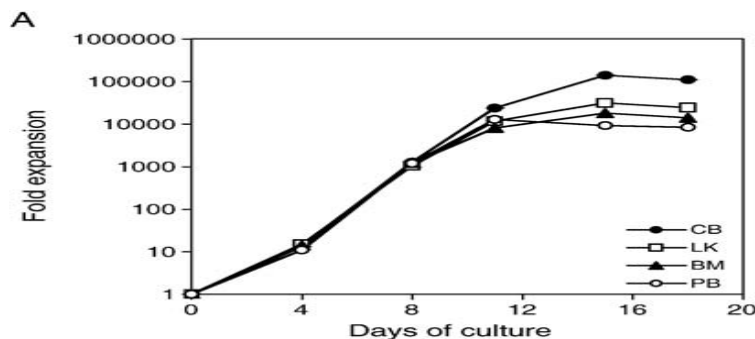


Εικόνα 31: Εκπυρήνωση ερυθροβλάστη από εμβρυικό ήπαρ ποντικού [49].

Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης των ερυθροκυττάρων με άλλα κύτταρα όπως τα μακροφάγα της ερυθροβλαστικής νησίδας, σε αυτή τη διαδικασία είναι αμφιλεγόμενος [50].

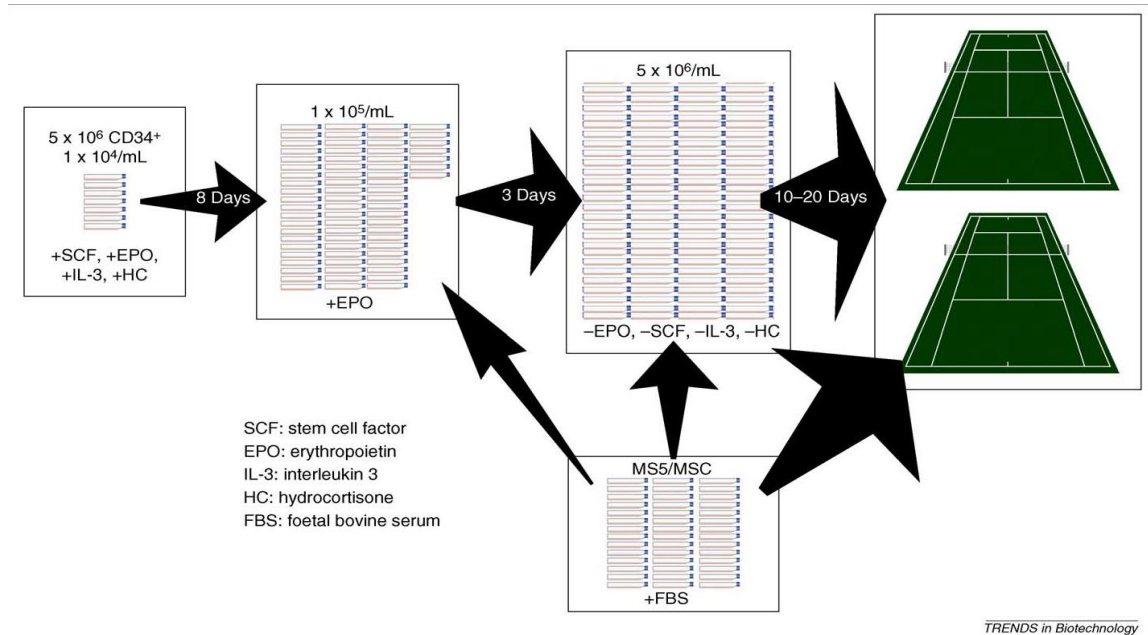
Στο πείραμα των Neildez-Nguyen et al., παρόλο που τα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη προηγούμενη μελέτη, δεν επιτεύχθηκε η τελική ωρίμανση των κυττάρων και ο χρόνος ζωής τους στην καλλιέργεια ήταν μικρός [48]. Τα προβλήματα αυτά αποδόθηκαν από πολλούς μελετητές στην απουσία στρωματικών κυττάρων από την καλλιέργεια.

Το 2005 η ομάδα των Giarratana *et al.*, εφάρμοσε ένα πρωτόκολλο με τελικό στόχο την παραγωγή απύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα HSPCs που περιλάμβανε η μελέτη προέρχονταν από διαφορετικές πηγές: BM, CB και PB, τα τελευταία με ή χωρίς κινητοποίηση με Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) και λευκαφαίρεση. Το υλικό της καλλιέργειας ήταν παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα Neildez-Nguyen *et al.* Στο πρώτο σκέλος της μεθόδου προστέθηκαν SCF, EPO και ιντερλευκίνη 3 (IL-3). Πιο συγκεκριμένα, την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας μια ποσότητα από τα κύτταρα αραιώθηκε με τετραπλάσια ποσότητα φρέσκου θρεπτικού υλικού που περιείχε υδροκορτιζόνη, SCF, EPO και IL-3. Στο δεύτερο βήμα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν προσκολλημένα σε feeder cells παρουσία EPO. Στο τελευταίο στάδιο τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με feeder cells απουσία κυτταροκινών. Την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας 90-100% των κυττάρων ήταν απύρηνια. Τα υποστηρικτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν είτε από MS-5 κυτταρικές σειρές είτε από ανθρώπινα MSCs (human Mesenchymal Stromal Cells, hMSCs). Με βάση την ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων της μελέτης ($1.95 \times 10^6 - 1.55 \times 10^5$ φορές), και εφόσον μια μονάδα CB περιέχει $2-5 \times 10^6$ CD34+ κύτταρα, υπολογίστηκε ότι από τη δωρεά μιας μονάδας CB μπορεί να παραχθούν περίπου πέντε μονάδες αντίστοιχων συμπυκνωμένων ερυθρών. Επιπλέον ο χρόνος ζωής των καλλιεργημένων ερυθρών είναι 120 ημέρες σε αντίθεση με τις περίπου 28 ημέρες από μια μονάδα αιμοδότησης [55].



Εικόνα 32: Ικανότητα πολλαπλασιασμού των CD34+ κυττάρων από διαφορετικές πηγές (CB: cord blood, LK: leukapheresis, BM: bone marrow, PB: peripheral blood) καλλιεργημένα με MS-5 [76].

Η μέθοδος των Giarratana *et al.*, παρότι ρηζικέλευθος, δεν μπορεί να εφαρμοστεί κλινικά διότι για να παραχθεί μια μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών απαιτούνται 400 λίτρα θρεπτικού υλικού και το μέγεθος της καλλιέργειας θα έπρεπε να είναι αντίστοιχο με την έκταση δύο γηπέδων τέννις.



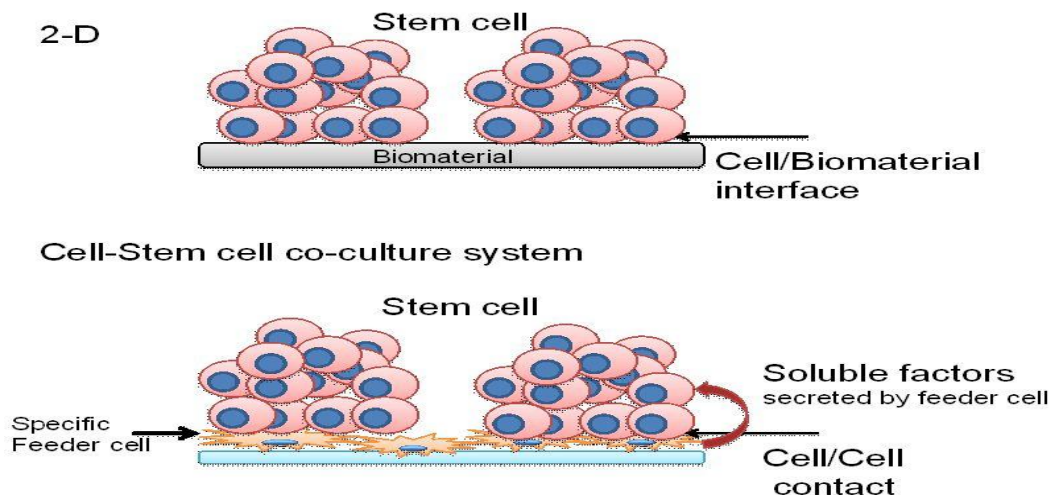
Εικόνα 33: Η εφαρμογή της μελέτης των Giarratana *et al.*, με στόχο να παραχθεί ποσότητα ερυθρών αντίστοιχη μίας μονάδας συμπυκνωμένων ερυθρών. Η μεθοδος μπορεί να ξεκινήσει με επτά δοχεία καλλιέργειας των 175cm² αλλά η έκπτυξη των CD34+ κυττάρων και των αντίστοιχων feeder cells καταλήγει να απαιτεί 9500 τέτοια δοχεία, δηλαδή μία έκταση αντίστοιχη με δυο γήπεδα τέννις [21].

Άλλες ερευνητικές ομάδες επεδίωξαν την ανάπτυξη τελικώς διαφοροποιημένων ερυθρών με διαφορετικά feeder cells όπως στρωματικά κύτταρα από ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε ότι μπορούσε να αυξηθεί ως και 10¹⁰ φορές [70].

3.3 In vitro παραγωγή απύρηνων ερυθρών από HSPCs χωρίς την παρουσία feeder cells

Τα feeder cells διαιρούνται παράλληλα με τα υπόλοιπα κύτταρα στην καλλιέργεια με αποτέλεσμα την μείωση της έκτασης των τελομερών τους μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, μια κατάσταση που ισοδυναμεί με το γήρας και τον κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς τα υποστηρικτικά κύτταρα πρέπει να ανανεώνονται. Η διάθεση κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινο ιστό ως feeder cells, δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική διότι απαιτείται και ο αντίστοιχος αριθμός δοτών. Ακολούθησαν διάφορες απόπειρες για την ανάπτυξη μιας ανεξάνλητης πηγής ανθρώπινων σωματικών κυττάρων που θα απαγκίστρωνε την έρευνα από την συνεχή ανάγκη της δωρεάς κυττάρων. Από αυτές, οι μελέτες που εισάγουν στα στρωματικά κύτταρα ανθρώπινα γονίδια που διατηρούν το μήκος των τελομερών (hTERT), είναι και οι πιο αξιόλογες [80].

Η χρήση των feeder cells έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τις ερευνητικές ομάδες στον τομέα των κυτταροκαλλιιεργιών. Οι MEF και οι MS-5 κυτταρικές σειρές μειονεκτούν στο ότι δεν περιλαμβάνουν ανθρώπινο ιστό και προσδίδουν τον κίνδυνο επιμόλυνσης από λοιμογόνους παράγοντες ή την εμφάνιση ανοσολογικών αντιδράσεων έναντι του ξένου ιστού [54]. Η συνεχής έρευνα αμφισβήτησε το ρόλο των feeder cells στην εκπυρήνωση και γενικά στα τελικά στάδια ωρίμανσης των κυττάρων [57]. Αναμφίβολα όμως συμβάλουν: 1) στην ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων που καλλιεργούνται διότι τα κύτταρα του στρώματος παράγουν τους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες των HSPCs [26] , 2) στην σταθερότητα και βιωσιμότητα των καλλιεργούμενων κυττάρων κατά τη φάση της αποβολής του πυρήνα [84] και 3) ευοδώνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων [62].

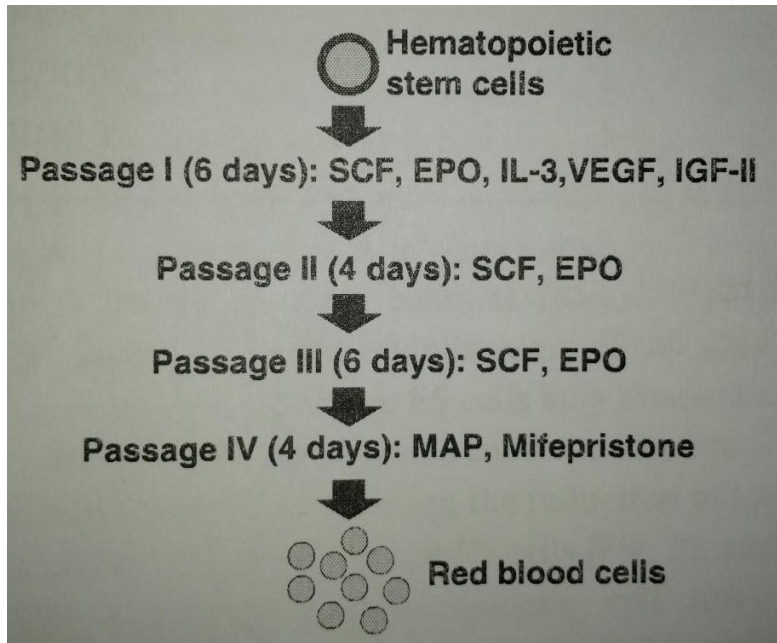


Εικόνα 34: Καλλιέργειες στελεχειαίων κυττάρων με ή χωρίς την υποστήριξη από feeder cells [62].

Υπάρχουν όμως και άλλες παράμετροι που καθορίζουν την τελική απόδοση της καλλιέργειας όπως η καθαρότητα του αρχικού υλικού σε CD34+ κύτταρα, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων, η χρονική διάρκεια της καλλιέργειας και η ανάπτυξη της καλλιέργειας σε συνθήκες με ή χωρίς ορό [57].

Το 2006 η ερευνητική ομάδα των Miharada *et al.* περιέγραψε μια μέθοδο, μέσω δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων, που είχε ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή απύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς τη χρήση feeder cells. Τα CD34+ κύτταρα από CB καλλιεργήθηκαν με μία διαδικασία που αποτελούνταν από τέσσερα στάδια. Κάθε στάδιο περιλάμβανε την ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Τα κύτταρα στις τρεις πρώτες ανακαλλιέργειες αναπτύχθηκαν παρουσία αυξητικών παραγόντων και Erythroid Differentiation Medium (EDM). Το EDM περιέχει ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες και συνθετικά συστατικά, δεν περιέχει ορό ή άλλα συστατικά ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης και έχει παρασκευαστεί για να χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες ερυθροκυττάρων αφού εμπλουτιστεί με αυξητικούς παράγοντες και άλλα συμπληρώματα [59]. Οι αυξητικοί παράγοντες που περιλάμβανε η μελέτη στο πρώτο passage ήταν οι SCF, EPO και IL-3 για το πρώτο πρωτόκολλο και οι SCF, EPO, IL-3, VEGF (vascular endothelial growth factor) και IGF-II για το δεύτερο. Στα δύο επόμενα

περάσματα οι καλλιέργειες περιλάμβαναν μόνο SCF, EPO και EDM και για τα δύο πρωτόκολλα [60]. Στο τελευταίο passage τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (θρεπτικό υλικό που περιέχει αμινοξέα και βιταμίνες αλλά όχι πρωτεΐνες, λιπίδια και αυξητικούς παράγοντες), εμπλουτισμένο με διάφορα συστατικά μεταξύ των οποίων και μιφεπριστόνη (ανταγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών) [61].



Εικόνα 35: Το πρωτόκολλο των Miharada et al. [47].

Στο δεύτερο πρωτόκολλο, τα αποτελέσματα που σχετίζονται τόσο με τον τελικό αριθμό των κυττάρων όσο και με το ποσοστό των κυττάρων χωρίς πυρήνα είναι καλύτερα σε σχέση με το πρώτο πρωτόκολλο [60]. Παρόλα αυτά, ο ρυθμός ανάπτυξης και το ποσοστό ωριμότητας των κυττάρων, δεν κατάφεραν να φτάσουν στα επίπεδα της μελέτης των Giarratana et al. [17].

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη των Miharada et al., αποδεικνύεται ότι η αποβολή του πυρήνα των ερυθροκυττάρων δεν είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος. Τα σήματα που μεταδίδονται μέσω των χυμικών παραγόντων φαίνεται ότι επαρκούν για την

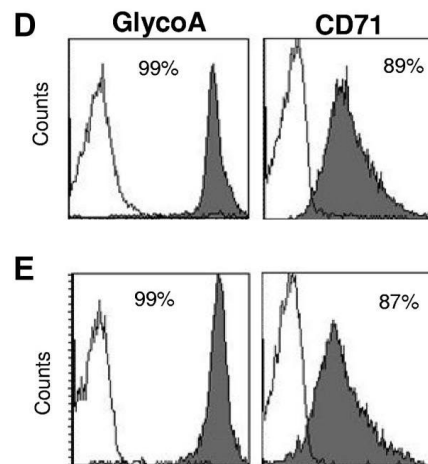
εκκυρήνωση. Επιπλέον σημειώνεται ότι η μέθοδος αυτή συμφέρει περισσότερο από οικονομικής και τεχνικής άποψης [47].

Άλλες έρευνες προτείνουν την αντικατάσταση των υποστηρικτικών κυττάρων με το πολυμερές Poloxamer 188, το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από το υδροδυναμικό στρες κατά τη φάση της εκκυρήνωσης μέσω αύξησης της σταθερότητας της κυτταρικής μεμβράνης [54] ή τη χρήση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), τρανσφερρίνης και κιτρικού σιδήρου στο θρεπτικό υλικό [79].

Μεταγενέστερες μελέτες επεδίωξαν την αύξηση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων από CD34+ κύτταρα, συχνότερα από CB, χωρίς την παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων. Οι περισσότερες περιλαμβάνουν την ανάπτυξη της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα όπου τα κύτταρα αναπτύσσονται σε τρεις διαστάσεις και θεωρητικά μπορεί να επιτευχθεί μία μαζική παραγωγή [81]. Παρόλο που το μέσο αυτό εφαρμόζεται από το 1980 για την κατασκευή μονοκλωνικών αντισωμάτων, οι τεχνικές που αφορούν στην *ex vivo* ερυθροποίηση δεν έχουν ολοκληρωθεί. Η πιο υποσχόμενη μέχρι σήμερα μελέτη είναι των Timmins *et al.*, που αναφέρει την αύξηση $2,25 \times 10^8$ φορές των CD34+ κυττάρων από μια μονάδα CB, αριθμός που αντιστοιχεί σε ικανότητα παραγωγής 500 μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών [82].

Οι Giarratana *et al.* δημοσίευσαν το 2011 μια μελέτη σταθμό στον τομέα των εναλλακτικών μεθόδων μετάγγισης. Για πρώτη φορά αναφέρεται η έγχυση σε άνθρωπο των ερυθροκυττάρων που δημιουργήθηκαν από περιφερικά CD34+ HSC. Τα στελεχειαία κύτταρα συλλέχθηκαν από το δότη μετά από κινητοποίηση με G-CSF και λευκαφαίρεση. Η έκπτυξη του πληθυσμού τους έγινε με ένα πρωτόκολλο παρόμοιο με αυτό που παρουσίασαν στη μελέτη του 2005 αλλά χωρίς τη χρήση feeder cells. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η ανάπτυξη $3,7 \times 10^{10}$ ερυθροκυττάρων από έναν αρχικό πληθυσμό 10^6 CD34+ HSC με τη χρήση 13 λίτρων καλλιεργητικού μέσου. Η ποσότητα των κυττάρων που παρήχθηκε αντιστοιχεί σε 2ml μίας μονάδας συμπυκνωμένων ερυθρών [42]. Η διάρκεια ζωής των κυττάρων στην καλλιέργεια δεν μπορούσε να ξεπεράσει τις 18 ημέρες ενώ το 70% αυτών ήταν απύρνηνα. Τα κύτταρα σημάνθηκαν με

χρώμιο, εγχύθηκαν πίσω στο δότη και κατάφεραν να επιβιώσουν για 26 ημέρες. Τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια του δότη συγκρίθηκαν με τα κατασκευασμένα ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά τους πριν και μετά την επαναχορήγησή τους. Μορφολογικά, στα 10.000 παραγόμενα κύτταρα τα 84% ήταν ΔΕΚ και μόνο το 0,08% αποτελούνταν από ορθοχρωματικούς ερυθροβλάστες. Ο μέσος όγκος ερυθρών (Mean Corpuscular Volume, MCV) των καλλιεργημένων κυττάρων ήταν σαφώς μεγαλύτερος, γεγονός που συμβαδίζει με το στρες της επαγόμενης ερυθροποίησης. Η έκφραση της αιμοσφαιρίνης ήταν 75% HbA και 25% HbF. Η παρουσία των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων δεν είχε αλλάξει. Παρά τη μικρή ποσότητα ερυθρών αιμοσφαιρίων που προέκυψαν από αυτή τη μέθοδο, η μελέτη των Giarratana *et al.* απέδειξε την κλινική εφαρμογή των κατασκευασμένων ερυθρών [83]. Το μειονέκτημα της μελέτης είναι η κινητοποίηση με G-CSF που μπορεί μέσω της μετάγγισης να αυξήσει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων αντιδράσεων [42].

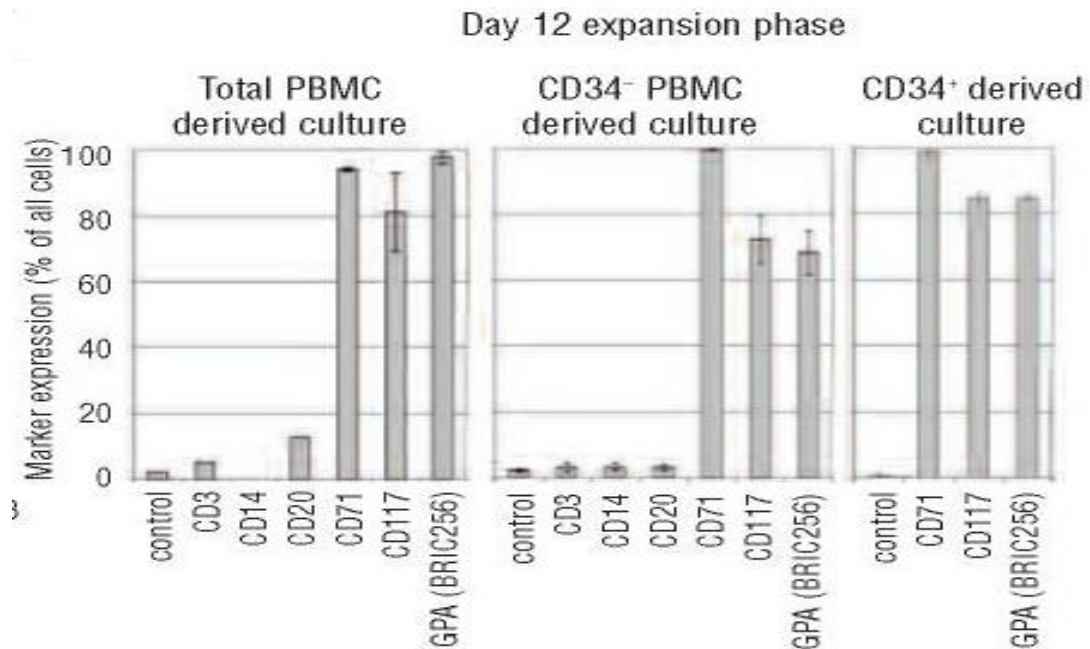


Εικόνα 36: Ανάλυση της έκφρασης γλυκοφορίνης A (Glyco A) και του CD71 στα κατασκευασμένα (D) και στα γνήσια ερυθρά του δότη (E) της μελέτη των Giarratana *et al* [83].

Κάποιες ομάδες μελετητών παρατήρησαν τη σημαντική ερυθροποιητική δυναμική των CD34- κυττάρων και προτείνουν την εκμετάλλευσή της με στόχο την αύξηση της ποσότητας των παραγόμενων ερυθροκυττάρων [64]. Τα CD34- κύτταρα υπάρχουν τόσο

στο BM, όσο και στο PB και στο CB και συμμετέχουν στην αιμοποίηση. Τα πειράματα που έγιναν περιλάμβαναν μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) χωρίς την απομόνωση από αυτά των CD34+ κυττάρων. Οι ερυθροβλάστες που προέκυψαν είχαν παρόμοιους χαρακτήρες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε σχέση με τα αποτελέσματα των μελετών πάνω σε CD34+ κύτταρα [84].

Τα PBMC μπορούν εύκολα να συλλεχθούν από το buffy coat κατά την παρασκευή προϊόντων αίματος [86]. Το γεγονός ότι τα CD34- κύτταρα υπάρχουν στο περιφερικό αίμα σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα CD34+ κύτταρα και έχουν εξ ίσου την ικανότητα να εξελίσσονται σε κύτταρα της ερυθράς σειράς και μάλιστα να παράγουν μεγαλύτερο πληθυσμό κυττάρων, καθιστά τα κύτταρα αυτά μια πολύ ενδιαφέρουσα πηγή *ex vivo* ερυθροποίησης [32].



Εικόνα 37: Έκφραση δεικτών επιφανείας στην 12^η ημέρα καλλιέργειας στο σύνολο των PBMC (αριστερά), σε CD34- κύτταρα (μέση) και σε CD34+ κύτταρα (δεξιά) [84].

3.4 Συνθήκες συντήρησης και ανάπτυξης των ESCs

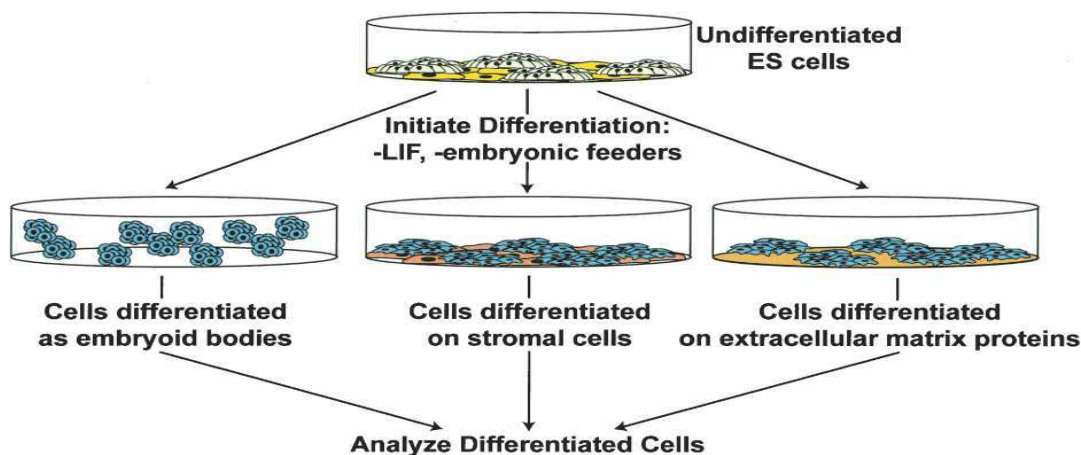
Από τις πρώτες μελέτες πάνω στα ESCs φάνηκε ότι η παρουσία feeder cells είναι αναγκαία. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν εμβρυονικά κύτταρα ποντικού ως υπόστρωμα [98]. Ακολούθησε η ανακάλυψη ότι ο Leukemia Inhibitory Factor (LIF) που προέρχεται από τα υποστηρικτικά κύτταρα παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση των ESCs [99]. Παρουσία ορού από έμβρυο μοσχαριού, ο ανασυνδιασμένος LIF μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως τα feeder cells, παρέχοντας τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των αδιαφοροποίητων ESCs [100]. Αργότερα ο ορός αντικαταστάθηκε από Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) [101]. Έτσι είναι εφικτό τα ESCs να διατηρούνται στην καλλιέργεια απουσία ορού και υποστηρικτικών κυττάρων. Η δράση των LIF και BMP4 ασκείται μέσω συγκεκριμένων μεταγραφικών μονοπατιών [102]. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκαν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διατήρηση των ESCs στην αδιαφοροποίητη φάση πχ. οι Oct3/4 και nanog [103,104].

Τα ESCs από ανθρώπινες πηγές (human ESCs) διαφέρουν από αυτά του ποντικού ως προς τη ρύθμισή τους, πχ. ο LIF δεν ασκεί καμία δράση πάνω τους [105]. Μπορούν να αναπτυχθούν με τη βοήθεια feeder cells αλλά υπάρχουν και πρωτόκολλα που τα αποφεύγουν με το να διατηρούν τα κύτταρα πάνω σε στρώμα πρωτεϊνών και εφαρμόζοντας ένα θρεπτικό υλικό που προέρχεται από ινοβλάστες εμβρύου ποντικού [106, 107]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct3/4 και nanog εκφράζονται και στα hESCs αλλά χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστούν οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που αφορούν στην αυτοανανέωση των hESCs και στη διατήρησή τους σε αδιαφοροποίητο στάδιο [108]. Τα hESCs έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να διαιρεθούν τουλάχιστον 300 φορές χωρίς να γηράσκουν, διατηρώντας ταυτόχρονα τον καρυότυπό τους, την πολυδυναμία τους και το μήκος των τελομερών τους [119]. Ένα από τα μειονεκτήματα των hESCs είναι τα ηθικά ζητήματα που προκύπτουν σε σχέση με την προέλευσή τους και τη δυνατότητα ένταξης σε κλινικές εφαρμογές [123]. Μετά από έγκριση των αρμόδιων οργανισμών, έχουν δημιουργηθεί πάνω από 200 hESCs σειρές, κύτταρα των οποίων χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια ανα τον κόσμο για πειράματα

που σχετίζονται με hESCs. Οι μελέτες που αφορούν στην αιμοποίηση χρησιμοποιούν σχεδόν αποκλειστικά τρεις από αυτές τις κυτταρικές σειρές [150].

Η διαφοροποίηση των ESCs ξεκινάει όταν απομακρύνονται οι παράγοντες που συμβάλλουν στο να διατηρούνται τα κύτταρα στη φάση του στελεχιαίου κυττάρου. Τρεις είναι οι βασικοί τρόποι που εφαρμόζονται ώστε τα ESCs να εξελιχθούν προς κύτταρα των βλαστικών στιβάδων [97]. Στην πρώτη μέθοδο, τα κύτταρα κάνουν συναθροίσεις και σχηματίζουν τρισδιάστατες αποικίες, τα εμβρυονικά σώματα (embryoid bodies, EBs) [109]. Στη δεύτερη, τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε feeder cells και η διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα κατά την επαφή με αυτά [110]. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστηρικτικά κύτταρα προέρχονται από την κυτταρική σειρά OP9 [111]. Η τελευταία μέθοδος περιλαμβάνει πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας πάνω στις οποίες τοποθετούνται τα ESCs [112].

Και οι τρεις μέθοδοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα EBs λόγω της δομής τους, ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Από την άλλη μεριά οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες που συμμετέχουν στα EBs δεν μπορούν να μελετηθούν ξεχωριστά, λόγω της περίπλοκης αυτής δομής. Στη δεύτερη μέθοδο τα feeder cells προσδίδουν ένα αυξητικό πλεονέκτημα, όμως μπορούν μέσω αδιευκρίνιστων παραγόντων που παράγονται από αυτά, να κατευθύνουν την ανάπτυξη των ESCs προς ένα ανεπιθύμητο τύπο κυττάρων. Επιπλέον τα ESCs δεν είναι εύκολο να διαχωριστούν από τα feeder cells. Η τελευταία μέθοδος έχει το θετικό ότι είναι πιο απλή και ελαχιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων που πιθανά να αποφέρουν απρόβλεπτα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας που εντάσσονται σε ένα τέτοιο πρωτόκολλο έχουν μεγάλη σημασία, διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να επηρεάσουν τη δημιουργία και την επιβίωση των ESCs [97].

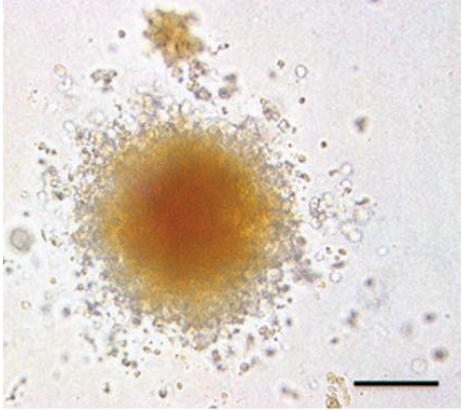


Εικόνα 38: Οι τρεις τρόποι που εφαρμόζονται για τη διαφοροποίηση των ESCs [97].

3.5 Ερυθροποίηση μέσω των ESCs

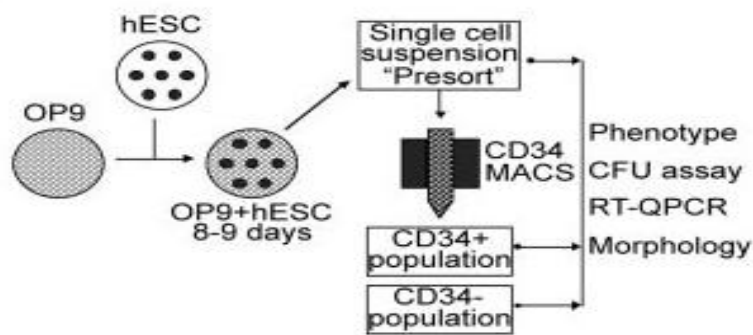
Η διαφοροποίηση των hESCs προς κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και κατ'επέκταση προς την ερυθρά σειρά, μελετήθηκε μέσω συστημάτων που βασίζονται είτε στον σχηματισμό EBs, είτε στην συνκαλλιέργεια με στρωματικά κύτταρα [113,114]. Τα κύτταρα του στρώματος στα περισσότερα πειράματα προέρχονται από ζωικές κυτταρικές σειρές, όπως η OP9 που αφορά σε μεσεγχυματικά κύτταρα ποντικού [115] ή η S17 που πηγάει από κύτταρα της αιμοποιητικής νησίδας του ποντικού [116]. Τα συστήματα που βασίζονται στα EBs, είχαν ως αποτέλεσμα την ερυθροποίηση σε ένα στάδιο που να μοιάζει μορφολογικά με την definitive αλλά η εκφραζόμενη αιμοσφαιρίνη ανήκε στην κατηγορία της εμβρυονικής ή της εμβρυικής [117].

Απο τις πρώτες αναφορές πάνω στην δημιουργία αιμοποιητικών κυττάρων από hESCs, είναι η μελέτη των Dan S. Kaufman *et al.*, που παρουσιάζει τον σχηματισμό προγονικών κυττάρων της αιμοποίησης μέσω της καλλιέργειας των hESCs μαζί με τις κυτταρικές σειρές S17 ή C166 (και οι δύο έχουν προέλευση από κύτταρα αιμοποιητικού ιστού του ποντικού). Η προσπάθεια αυτή απέδωσε κύτταρα που ανήκουν και στις τρεις αιμοποιητικές σειρές [119].



Εικόνα 39: Αποικία από κύτταρα που ανήκουν στην μυελική και ερυθρά σειρά, μετά από τη διαφοροποίηση των hESCs με τη βοήθεια της κυτταρικής σειράς S17 [119].

Άλλες ερευνητικές ομάδες που επεδίωξαν τη διαφοροποίηση των hESCs με τη βοήθεια OP9 feeder cells κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά η διαφοροποίηση γίνεται πιο γρήγορα και αποδίδει μεγαλύτερους πληθυσμούς CD34+ κυττάρων. Από τους Vodnyanik et al., αναφέρεται η παραγωγή 10^7 CD34+ κυττάρων μέσα σε μία εβδομάδα. Ωστόσο οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν τα υποστηρικτικά αυτά κύτταρα ως προς την ικανότητά τους να προάγουν την αιμοποίηση [120].



Εικόνα 40: Διάγραμμα του πρωτοκόλλου που εφαρμόστηκε από τους Vodnyanik et al. για την δημιουργία CD34 + κυττάρων από hESCs και τις μεθόδους που χρησιμοποίησαν για τον διαχωρισμό τους από τον CD34 – πληθυσμό [120].

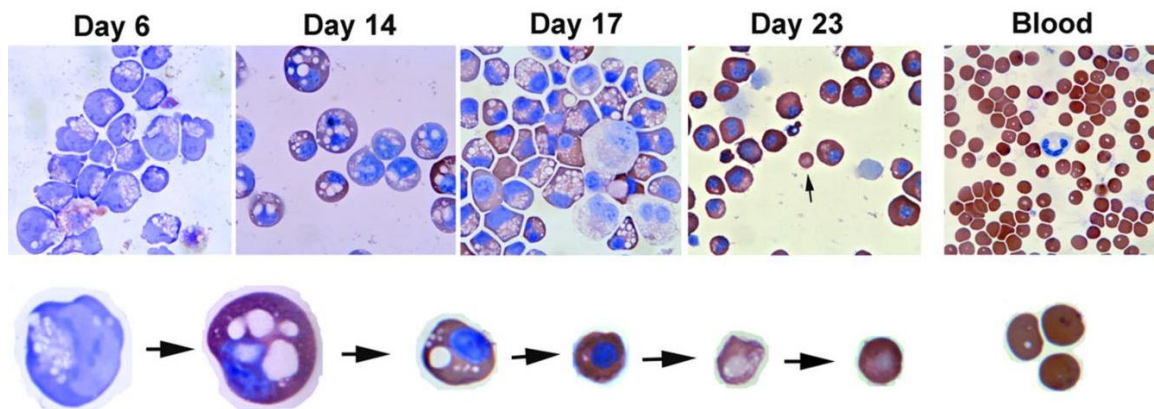
Όπως και στις μελέτες που σχετίζονται με την παραγωγή ερυθρών από στελεχειαία κύτταρα, η χρήση ζωικής προέλευσης ορού ή κυττάρων για την ανάπτυξη των hESCs αποτελεί σημαντικό ανασταλή για την κλινική εφαρμογή τους. Πολλές ερευνητικές ομάδες περιγράφουν μεθόδους που αφορούν σε feeder cells που προέρχονται από ανθρώπινους ιστούς π.χ. ινοβλάστες από ανθρώπινη ακροβυστία ή από τον πλακούντα [124] ή πρωτεΐνες από τον πλακούντα [125].

Μια πειραματική διαδικασία που περιγράφει τη χρήση fetal human liver clone B cell line (FH-B-hTERT), μια κυτταρική σειρά από ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου που έχει την ικανότητα να προσστατεύει τα τελομερή, απέφερε την ανάπτυξη 150.000 CD34 + κυττάρων ανά 5 εκατομμύρια hESCs. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιήθηκαν περαιτέρω προς την ερυθρά σειρά με την εφαρμογή αντίστοιχων πρωτοκόλλων που αποδίδουν ερυθροκύτταρα από HSPC. Το τελικό προϊόν της μελέτης ήταν 5×10^6 έως 5×10^7 κύτταρα της ερυθράς σειράς (80 ερυθρά/ hESCs, σε σχέση με τα 5×10^4 / CD34+ κύτταρο απο CB [128]), τα οποία ομοιάζουν με αυτά της primitive ερυθροποίησης δηλαδή εμπύρνα κύτταρα με έκφραση εμβρυονικής αιμοσφαιρίνης. Όταν ο χρόνος της καλλιέργειας των κυττάρων αυξήθηκε στις 21 ημέρες, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της HbF [121]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια που προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των hESCs, είναι ικανά να ωριμάζουν αλλάζοντας τον τύπο της αιμοσφαιρίνης [122].

	cord blood-derived RBCs		hESC-derived RBCs	
	relative diameter* (%)	estimated size (μm)	relative diameter* (%)	estimated size (μm)
enucleated	119 ± 19.6	9.4 ± 1.5	NA	NA
orthochromatic	135 ± 25.6	10.6 ± 1.9	222 ± 43.4	17.4 ± 3.4

Εικόνα 41: Σύγκριση μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προέρχονται από καλλιέργειες CB και hESCs. Στη δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα είναι εμπύρνα και μεγαλοβλαστικά, γεγονός που παραπέμπει στα πρώτα στάδια ωρίμανσης της ερυθράς σειράς [121].

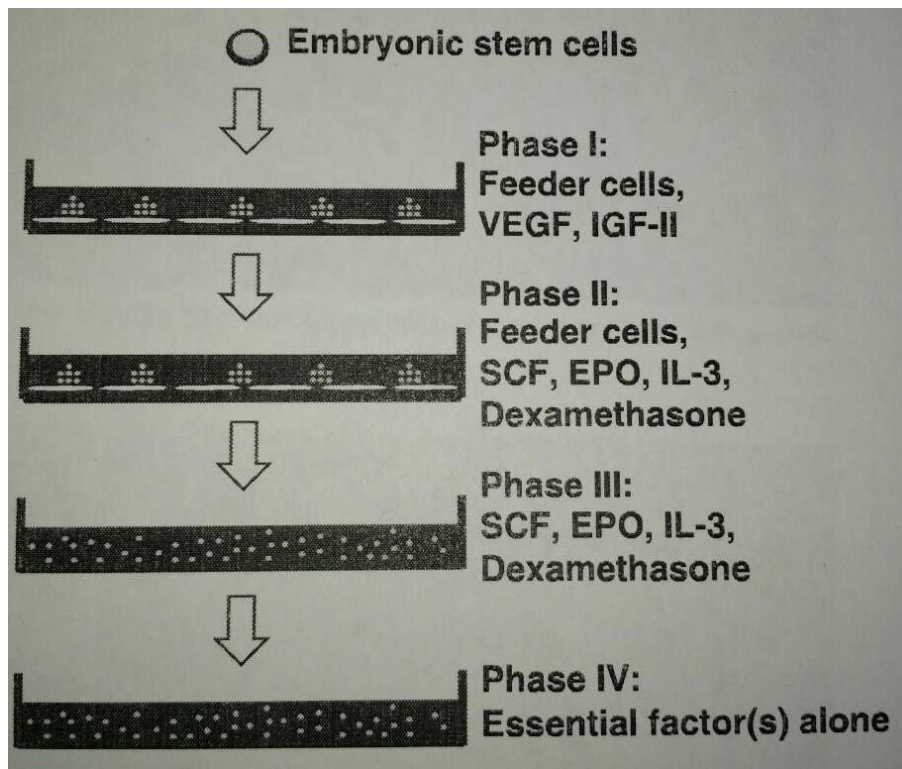
Το 2008, η ερευνητική ομάδα των Lu *et al.* περιγράφει μια μέθοδο με την οποία κατάφεραν τη δημιουργία λειτουργικών ερυθροκυττάρων από EBs υπό συνθήκες κατάλληλες για την παραγωγή μεγάλου πληθυσμού κυττάρων. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποίησαν περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: 1) δημιουργία EBs από αδιαφοροποίητα hESCs συνκαλλιεργούμενα με MEF, 2) σχηματισμός αιμαγγειοβλάστης και ανάπτυξη των κυττάρων, 3) διαφοροποίηση προς κύτταρα της ερυθράς σειράς και ενίσχυση αυτών για αύξηση του πληθυσμού τους, 4) εμπλουτισμός των ερυθροκυττάρων με θρεπτικά υλικά. Παρόλο που η πλειοψηφία των κυττάρων που προέκυψαν εξέφραζαν εμβρυονικό ή εμβρυικό τύπο αιμοσφαιρίνης, πάνω από 15% αυτών μετά από περαιτέρω καλλιέργεια παρουσίασαν έκφραση HbA [118]. Ο πληθυσμός των παραγόμενων κυττάρων έφτασε τα 10^{11} - 10^{12} ερυθροκύτταρα [17].



Εικόνα 42: Προοδευτική ωρίμανση των ερυθροκυττάρων που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο των Lu *et al.* σε 23 ημέρες. Κατά τη διαφοροποίηση παρατηρείται αύξηση της αιμοσφαιρίνης στο κυτταρόπλασμα και μείωση του μεγέθους των κυττάρων [118].

Την ίδια χρονιά, οι Hirogama *et al.* ανέπτυξαν μια μέθοδο που καταλήγει στον σχηματισμό κυτταρικών σειρών προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων από ESCs ποντικού. Κάθε μια από αυτές τις σειρές μπορούσε να διαφοροποιηθεί *in vitro* σε πιο ώριμα ερυθροκύτταρα, περιλαμβάνοντας ακόμα και απύρρηνα ερυθρά. Τα κύτταρα μετά από έγχυση σε αναιμικά ποντίκια πολλαπλασιάστηκαν και διαφοροποιήθηκαν σε λειτουργικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η ιδέα της κατασκευής κυτταρικών σειρών από προγονικούς ερυθροβλάστες βασίζεται στο γεγονός ότι ακόμα και υπό τις καλύτερες συνθήκες καλλιέργειας με την πιο αποδοτική εμβρυονική κυτταρική σειρά, ο χρόνος που χρειάζεται για την παραγωγή ικανού αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το να υπάρχουν ήδη έτοιμες σειρές προγονικών κυττάρων [151].



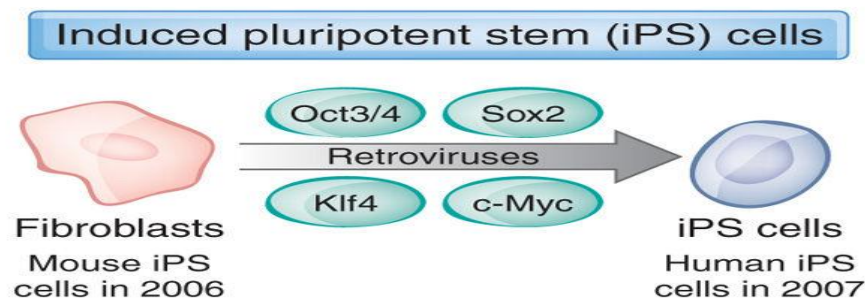
Εικόνα 43: Πρωτόκολλο των Hiroyama et al. για την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών προγονικών ερυθροκυττάρων από ESCs [47].

Είναι σαφές ότι τα αποτελέσματα των πειραμάτων σχετικά με την ερυθροποιητική ικανότητα των hESCs, εξαρτώνται από την κυτταρική σειρά των εμβρυονικών κυττάρων που χρησιμοποιείται και από τις συνθήκες της καλλιέργειας [47]. Αν και ο ρόλος των feeder cells και της EPO στη διαδικασία της αποβολής του πυρήνα των ερυθροκυττάρων αμφισβητείται, η παρουσία τους στα τελευταία στάδια των πρωτοκόλλων που σχετίζονται με hESCs, παραμένει αναγκαία. Αυτό απορρέει από τα

αποτελέσματα των πειραμάτων που περιλαμβάνουν ή όχι τη χρήση τους. Απουσία και των δύο αυτών παραγόντων, τα ερυθροκύτταρα που δημιουργούνται είναι εμπύρνα σε ποσοστό 90%, ενώ με την παρουσία και των δύο, τα απύρνα κύτταρα φτάνουν το 65%. Επίσης στα περισσότερα πρωτόκολλα τα κύτταρα της ερυθράς σειράς που σχηματίζονται δεν εκφράζουν αιμοσφαιρίνη ενηλίκου [17]. Έρευνες που προσπαθούν να υπερκεράσουν το εμπόδιο αυτό, προτείνουν την επιμήκυνση του χρόνου καλλιέργειας [122] ή την εξαναγκασμένη έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην ερυθροποίηση πχ. RUNX1a [126].

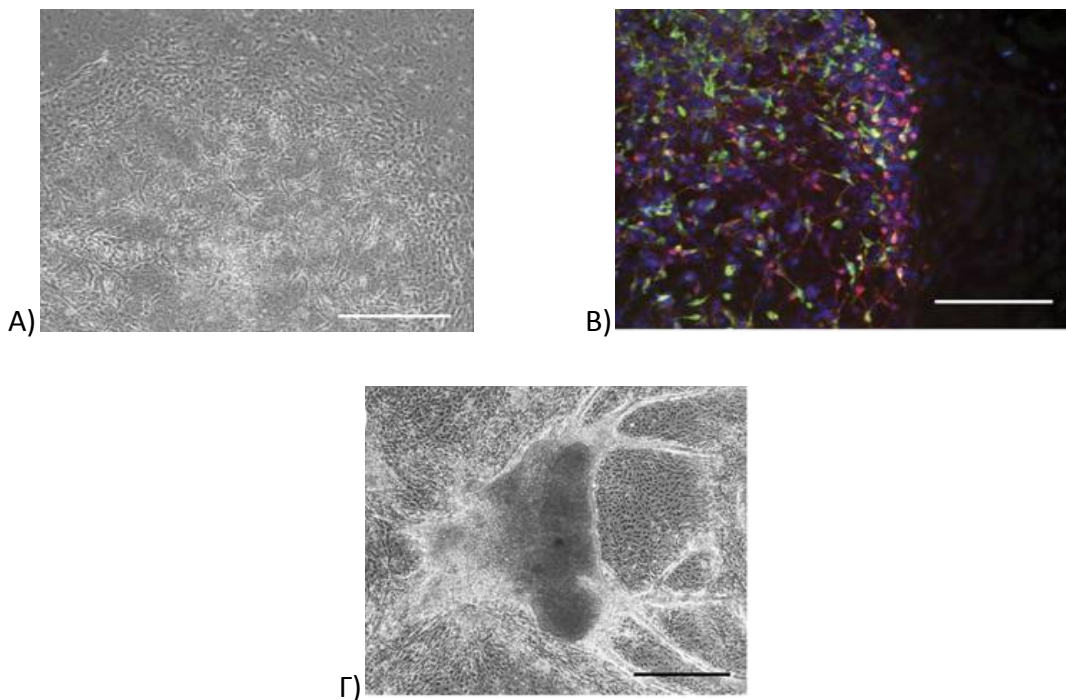
3.6 Τα iPSCs στην ex vivo ερυθροποίηση

Η εισαγωγή των iPSCs στη φαρέτρα της έρευνας στους τομείς της ιατρικής, της βιολογίας και της γενετικής, αποτέλεσε μια ακόμα επανάσταση. Οι δυνητικές τους κλινικές εφαρμογές είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρες για την αναπτυξιακή έρευνα. Η μελέτη του Yamanaka το 2006 αρχικά με ινοβλάστες ποντικών και την επόμενη χρονιά με αντίστοιχα ανθρώπινα κύτταρα, απέσπασε το βραβείο Nobel το 2012. Η μελέτη περιλαμβάνει την εισαγωγή τεσσάρων γονιδίων μέσω ρετροϊών, σε ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα γονίδια αυτά εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες: Oct3/4, Sox2, c-Myc, και Klf4, οι οποίοι αποδείχθηκαν ότι διατηρούν την πολυδυναμία των εμβρυονικών κυττάρων.



Εικόνα 44: Η εισαγωγή συγκεκριμένων γονιδίων στους ινοβλάστες τους επαναπρογραμματίζει και τους μετατρέπει σε πολυδύναμα κύτταρα [131].

Τα iPSCs που δημιουργήθηκαν απο ινοβλάστες εμβρύου ή απο την άκρη της ουράς του ενήλικου ποντικίου συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα ESCs και φάνηκε ότι ήταν πανομοιότυπα σε επίπεδο μορφολογίας, ικανότητας πολλαπλασιασμού και δυνατότητας σχηματισμού τερατωμάτων. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν την απόδειξη ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε πολυδύναμα στελεχιαία μέσω του συνδιασμού μικρού αριθμού μεταγραφικών παραγόντων [132]. Ωστόσο, πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η γονιδιακή έκφραση και τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA των iPSCs είναι διαφορετικά από αυτά των ESC [134]. Επιπλέον τα iPSCs πιθανά να φέρουν γενετικές μεταλλάξεις που οφείλονται στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, όπως για παράδειγμα αναφέρεται ο κίνδυνος ανάπτυξης όγκων λόγω της εισαγωγής του c-Myc γονιδίου [135,145].



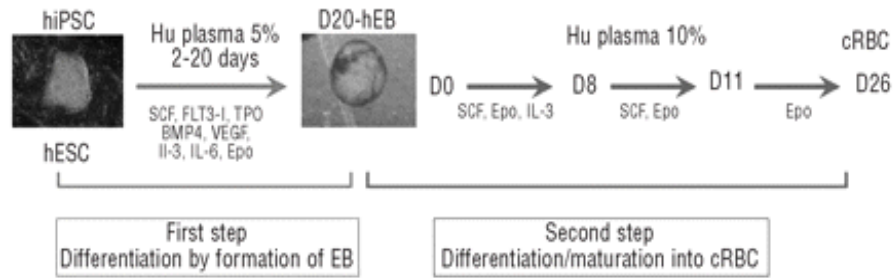
Εικόνα 45: A) Διαφοροποίηση των hiPSCs σε νευρονικά κύτταρα ως αποτέλεσμα της συνκαλλιέργειάς τους με συγκεκριμένου τύπου *feeder cells*, B) Ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα που ταυτοποιούν νευρονικά κύτταρα, Γ) Διαφοροποίηση των hiPSCs σε μυοκαρδιοκύτταρα [132].

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των iPSCs στην *ex vivo* ερυθροποίηση είναι το ότι μπορούν να πολλαπλασιαζόνται επ' άοριστον και να επαχθούν από οποιοδήποτε τύπο κυττάρων ενός ενήλικα δίνοντας τη δυνατότητα επιλογής του δότη ως προς τον φαινότυπό του. Έχει υπολογιστεί πως iPSCs από τρεις μόνο δότες με σπάνιο φαινότυπο μπορεί να είναι αρκετοί ώστε να καλύψουν το 99% των αλλοανοσοποιημένων ασθενών στη Γαλλία, συμπεραίνοντας πως η δημιουργία μιας τράπεζας iPSCs θα μπορούσε να αποτελεί μια ανεξάντλητη πηγή παρασκευής ερυθροκυττάρων [44]. Ένα μειονέκτημα των iPSCs σχετίζεται με την τεχνολογία του επαναπρογραμματισμού που περιλαμβάνει τη μεταφορά των μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα μέσω ιών, γεγονός που συνεπάγεται τη μόνιμη ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού στα κύτταρα [136]. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργειά τους είναι παρόμοια με αυτά των ESC και περιλαμβάνουν το σχηματισμό EBs ή την συνύπαρξη feeder cells [88].

Το 2009 περιγράφεται από τους Seifinejad *et al.* η παρασκευή hiPSCs από δερματικούς ινοβλάστες ατόμου με ομάδα αίματος Bombay με την τεχνική των Yamanaka *et al.* Τα πολυδύναμα κύτταρα είχαν τα χαρακτηριστικά των hESCs, μπορούσαν να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα και των τριών αιμοποιητικών σειρών και εξέφραζαν HbF. Η μελέτη αναφέρει επίσης τα προβλήματα ασφαλείας του προϊόντος σχετικά με την κλινική του εφαρμογή [146].

Το 2010 αναφέρεται για πρώτη φορά από τους Lapillonne *et al.* η πλήρης διαφοροποίηση των hiPSCs σε ωριμάζοντα ερυθροκύτταρα ικανά να αποβάλλουν τον πυρήνα τους και να εκφράζουν εμβρυική αιμοσφαιρίνη με λειτουργική τετραμερή μορφή. Τα επαγόμενα κύτταρα προέρχονταν από ανθρώπινους ινοβλάστες εμβρύου ή ενήλικα και τα αποτελέσματά τους συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των hESCs. Η μέθοδος της διαφοροποίησης προς την ερυθρά σειρά αφορούσε στον σχηματισμό αρχικά EBs και η ωρίμανση προς ώριμα ερυθρά έγινε παρουσία κυτοκινών. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα hiPSCs δε διαφέρουν από τα hESCs όσον αφορά στη δυνατότητά τους να δεσμεύονται προς την ερυθρά σειρά, στην έκφραση ειδικών για τη σειρά δεικτών και στον τύπο της αιμοσφαιρίνης, διαφέρουν ωστόσο στον αριθμό των

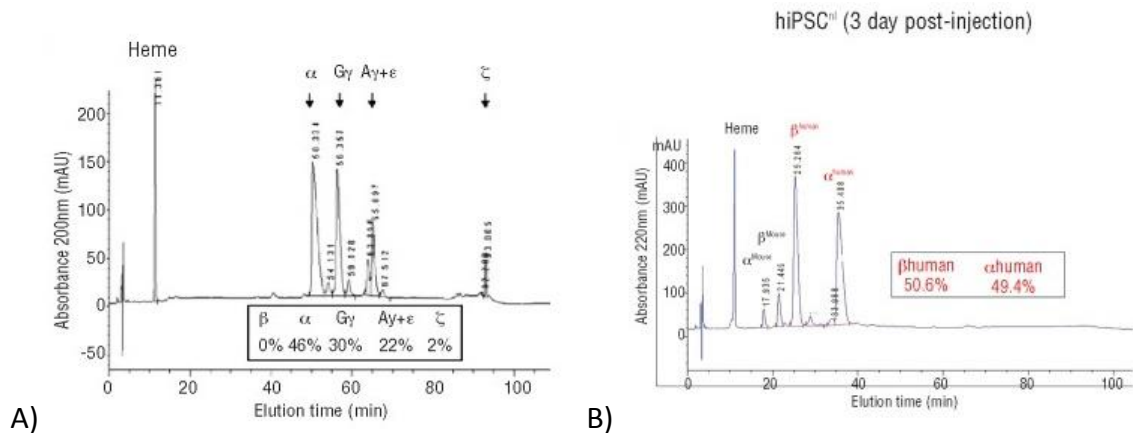
παραγόμενων κυττάρων και στο ποσοστό αυτών που μπορούν να αποβάλλουν τον πυρήνα τους [133].



Εικόνα 46: Σχηματική παρουσίαση των βημάτων του πρωτοκόλλου των Lapillonne *et al.* Στο πρώτο βήμα παράλληλες καλλιέργειες από hESCs και hiPSCs διαφοροποιήθηκαν σε 20 ημέρες με τη μέθοδο του σχηματισμού EBs και ακολούθως καλλιεργήθηκαν για 25 ημέρες με διαδοχικά ‘κοκτέιλ’ κυτοκινών για το σχηματισμό ώριμων ερυθρών [133].

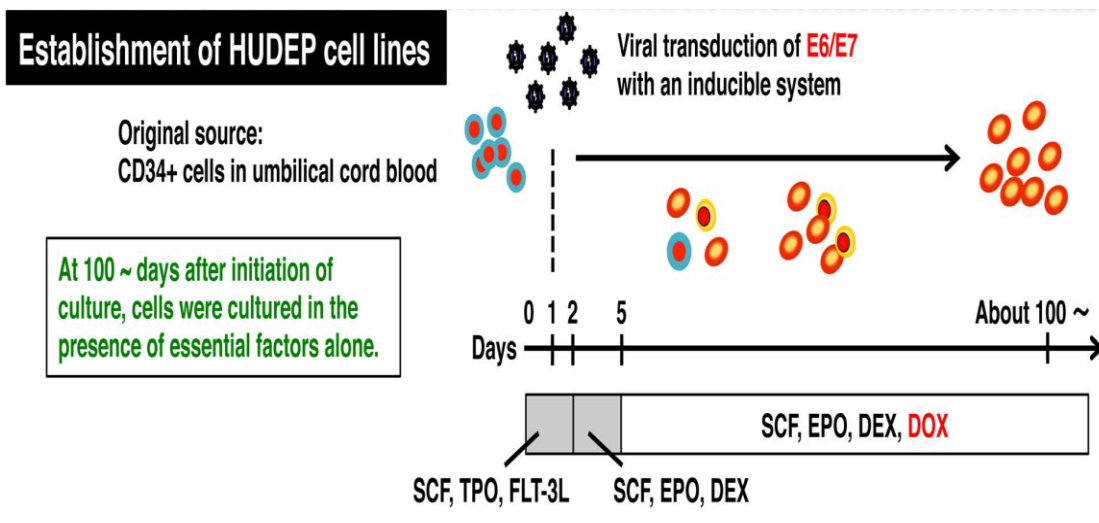
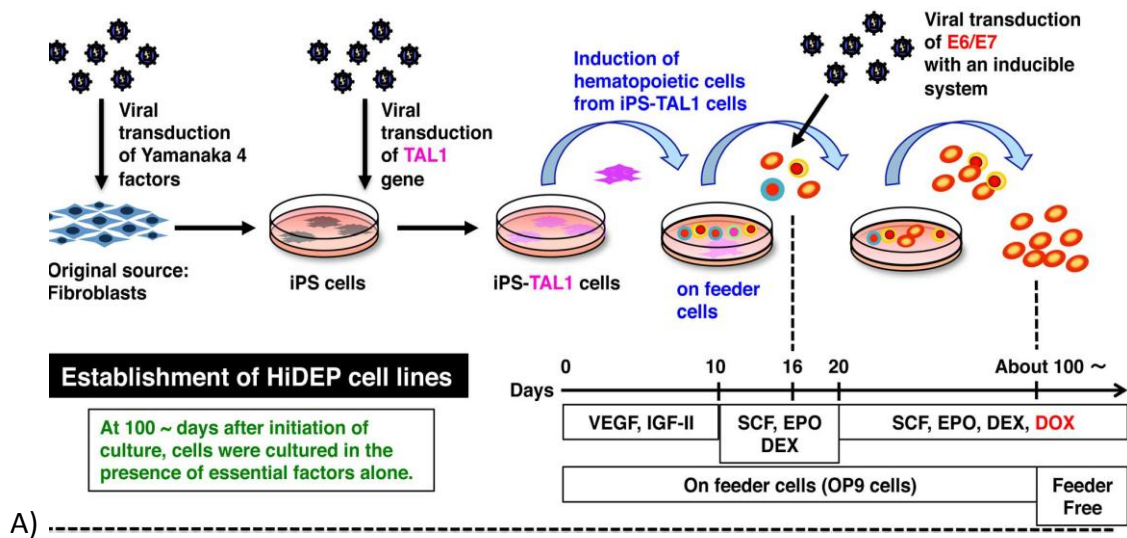
Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της συνκαλλιέργειας των hiPSCs με feeder cells, π.χ. με την κυτταρική σειρά OP9, με στόχο τη διαφοροποίησή τους και στη συνέχεια επεδίωξαν την ανάπτυξή τους προς κύτταρα της ερυθράς σειράς με τη χρήση κυτοκινών που ενισχύουν την ερυθροποίηση. Η ομάδα των Dias *et al.* κατάφερε την ενσωμάτωση στο ανθρώπινο γενετικό υλικό των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων βασιζόμενη σε επισωματικούς φορείς γονιδιακής μεταφοράς. Τα αποτελέσματά τους ήταν παρόμοια με αυτά των hESCs στις αντίστοιχες συνθήκες καλλιέργειας [136]. Έχουν αναπτυχθεί πολλά πρωτόκολλα που αναφέρουν τεχνικές παράκαμψης των ιών- μεταφορέων [140], εκ των οποίων οι νεότερες και πιο ενθαρρυντικές αφορούν στην εισαγωγή των γονιδίων-κλειδιών στο κύτταρο μέσω ενός συνθετικού RNA μετάγραφου [143] ή ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης [147].

Το 2012 αποδείχθηκε για πρώτη φορά από τους Kobari *et al.* πως τα hiPSCs μπορούν να ωριμάσουν πλήρως *in vitro* αποβάλλοντας τον πυρήνα τους και *in vivo* εκφράζοντας αιμοσφαιρίνη ενήλικου, μετά από έγχυση των παραγόμενων προγονικών τους κυττάρων σε NOD/ SCID ποντίκια. Τα ώριμα ερυθρά διατηρήθηκαν στην κυκλοφορία για τέσσερις ημέρες και ο συνολικός αριθμός τους που προέκυψε από 1×10^6 hiPSCs ήταν $15-28,3 \times 10^8$ [137].



Εικόνα 47: Η έκφραση της αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα που προέρχονται από hiPSCs πριν και μετά την έγχυσή τους σε ποντίκια, όπως προέκυψε από τα πειράματα των Kobari *et al.* Α) Προ της έγχυσης HbF :86%, Β) μετά από την έγχυση HbA : 99% [137].

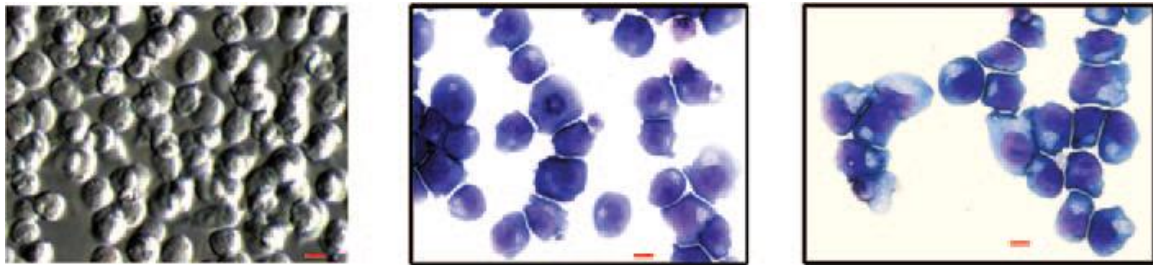
Το 2013 η ομάδα των Nakamura *et al.* κατάφερε να εξελίξει τα προηγούμενα πειράματά της που σχετίζονταν με κυτταρικές σειρές σε ποντίκια [151], και να δημιουργήσει μια παρόμοια τεχνική που αφορά στη δημιουργία κυτταρικών σειρών από ανθρώπινα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς. Χρησιμοποίησαν hiPSCs και CB κύτταρα τα οποία τροποποιήθηκαν σε immortalized (HiDEP και HUDEP, αντίστοιχα) με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Τα hiPSCs μέσω της εισαγωγής στα κύτταρα συγκεκριμένων ογκογονιδίων (TAL1, HPV16 E6/E7) με τη βοήθεια ιών – μεταφορέων και στη συνέχεια συνκαλλιέργεια με OP9 υποστηρικτικά κύτταρα παρουσία παραγόντων κατάλληλων για τη διαφοροποίησή τους προς την ερυθρά σειρά. Τα CB κύτταρα μέσω της εισαγωγής του HPV16 E6/E7 και παρουσία αυξητικών παραγόντων. Τρεις μήνες μετά, τα ερυθροκύτταρα που προέκυψαν μπορούσαν να επιβιώσουν χωρίς την παρουσία feeder cells. Η μελέτη αναφέρει πως η μέθοδος που περιγράφεται μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή απύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς όμως να δίνονται συγκεκριμένα ποσοστά. Σημειώνεται όμως πως δεν έχει δοκιμαστεί η απόδοση των κυττάρων *in vivo*, όπου πιθανά τα κύτταρα να μπορούν να ωριμάσουν περαιτέρω. Επίσης φαίνεται ότι η HUDEP κυτταρική σειρά έχει μεγαλύτερη τάση έκφρασης HbA σε σχέση με την HiDEP [152].



Εικόνα 48: Σχηματική απεικόνιση των πειραμάτων των Nakamura et al. Δημιουργία κυτταρικών σειρών A)HiDEP (Human inducedPSCs Derived Erythroid Progenitor) και B)HUDEP (Human Umbilical Cord Blood Derived Erythroid Progenitor) [152].

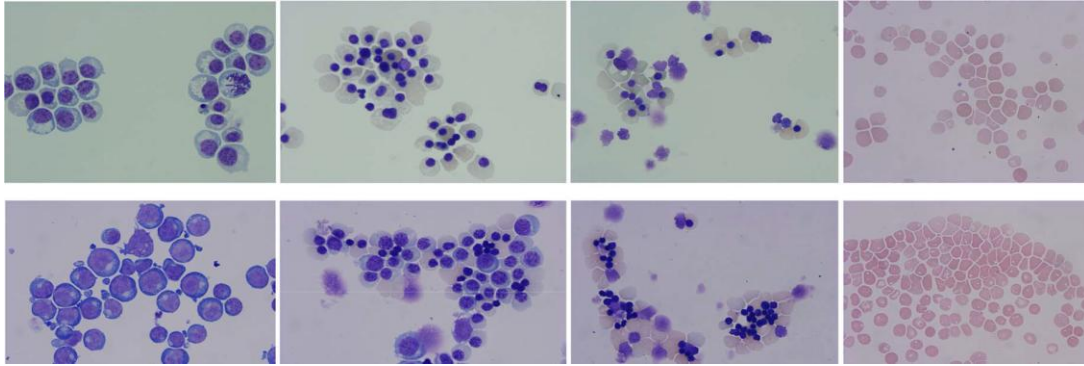
Την ίδια χρονιά, η ερευνητική ομάδα των Huang et al. ασχολήθηκε επίσης με την παραγωγή κυτταρικών σειρών πρόδρομων ερυθροκυττάρων από CB κύτταρα με την εφαρμογή της τεχνικής των Yamanaka et al. Οι ερυθροβλάστες που προέκυψαν

μπορούσαν να αυξηθούν 10^{68} φορές μέσα σε δώδεκα μήνες, χωρίς να σημειωθούν αλλαγές στην ταυτότητα ή στη λειτουργικότητα των κυττάρων. Η επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών οδηγεί στην παραγωγή απύρηνων ερυθροκυττάρων που εκφράζουν HbF. Στη μελέτη σημειώνεται πως το ογκογονίδιο c-Myc που εισάγεται στα κύτταρα με στόχο την επαγωγή τους σε πολυδύναμα, φαίνεται να καταστέλλεται κατά τη φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων προς ώριμες μορφές, γεγονός αρκετά ελπιδοφόρο για τον αποκλεισμό του κινδύνου ανάπτυξης όγκων από τα επαγόμενα κύτταρα [153].



Εικόνα 49: Η εικόνα των ερυθροβλαστών που σχηματίστηκαν από την μελέτη των Huang *et al.* όπως φαίνονται στην καλλιέργεια (αριστερά) και μετά από χρώση τους τις ημέρες 132 (μέση) και 265 (δεξιά). Σχεδόν όλα τα κύτταρα μορφολογικά αντιστοιχούν σε προερυθροβλάστες και βασεόφιλους ερυθροβλάστες [153].

Η πιο πρόσφατη μελέτη προέρχεται από την ομάδα των Trakarnsanga *et al.* και αφορά στη δημιουργία κυτταρικής σειράς πρόδρομων ερυθροκυττάρων από CD34+ κύτταρα μυελού ενήλικου ατόμου (Bristol Erythroid Line Adult; BEL-A). Στα CD34+ κύτταρα εισήχθη το ογκογονίδιο HPV16 E6/E7. Μορφολογικά τα κύτταρα έχουν την εικόνα προερυθροβλαστών και βασεόφιλων ερυθροβλαστών. Τα κύτταρα μετά από εκατό ημέρες καλλιέργειας, μεταφέρθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει τη διαφοροποίηση. Η έκφραση του ογκογονιδίου ανακόπηκε τεχνητά και το 30% των κυττάρων εξελίχθηκε σε απύρηννα ΔΕΚ. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της εκφραζόμενης αιμοσφαιρίνης αποκαλύπτουν την πλήρη έκφραση HbA [154].



Εικόνα 50: Συγκριτικές εικόνες μεταξύ BEL-A (πάνω) και CD34+ κυττάρων από PB ενήλικου ατόμου (κάτω) κατά τις ημέρες καλλέργειας 4,10 και 18 (από αριστερά προς τα δεξιά), καθώς και των ΔΕΚ μετά από φιλτράρισμα (τελευταία εικόνα δεξιά) [154].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που κατασκευάζονται από hiPSCs, όπως και από ESCs διαφέρουν από εκείνα που προέρχονται από CD34+ HSPCs, τόσο στη δυναμική της ανάπτυξής τους όσο και στον αριθμό των απύρηνων κυττάρων. Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται στη διαφορετική έκφραση γονιδίων στα ερυθροκύτταρα ανάλογα με την πηγή τους. Πράγματι, η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα της ερυθράς σειράς που προκύπτουν από διαφορετικές πηγές αποδεικνύει ότι οι ρυθμιστές της ερυθροποίησης δεν έχουν την ίδια δράση κατά τα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης [142]. Προς το παρόν, γίνονται προσπάθειες βελτίωσης των πρωτοκόλλων μέσω αποσιώπησης των γονιδίων που εισάγονται στα κύτταρα αφού πρώτα επάγουν την πολυδυναμία τους [145]. Παράλληλα αναζητούνται οι καλύτεροι συνδιασμοί γονιδίων που θα συνδιάζουν τη μέγιστη απόδοση με τη δυνατότητα ασφαλούς κλινικής εφαρμογής [149]. Επίσης από πολλές μελέτες συμπεραίνεται ότι τα iPSCs διατηρούν μία ‘επιγενετική μνήμη’ που σχετίζεται με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται και φαίνεται ότι έχουν την τάση να διαφοροποιούνται προς τα μητρικά τους κύτταρα. Επιπλέον είναι πιθανό τα χαρακτηριστικά των μητρικών κυττάρων όπως η ηλικία και ο βαθμός διαφοροποίησης να επηρεάζουν την αποδοτικότητα των iPSCs [144].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στις αρχές του 21^{ου} αιώνα οι βαθύτερες γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς της αιμοποίησης γενικά και της ερυθροποίησης ειδικότερα καθώς και η συνεχής εξέλιξη στον τομέα των επιστημονικών και τεχνολογικών ανακαλύψεων, επιτρέπουν να θεωρείται πλέον εφικτή η κατασκευή ερυθρών αιμοσφαιρίων για μετάγγιση στο άμεσο μέλλον. Υπάρχουν πολλές έρευνες που υποστηρίζουν την υλοποίηση αυτής της ιδέας. Οι έρευνες αυτές στρέφονται προς διάφορες κατευθύνσεις: την βελτιστοποίηση των μεθόδων καλλιέργειας, την ανεύρεση της ιδανικής προέλευσης κυττάρων και τον αυστηρό έλεγχο της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος.

Η διαδικασία της καλλιέργειας πρέπει να είναι όσο το δυνατόν απλούστερη και αναπαραγωγίμη. Οι συνθήκες θα πρέπει να μιμούνται όσο γίνεται περισσότερο την *in vivo* ερυθροποίηση και να επιτρέπουν την παραγωγή ερυθροκυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, ώστε να μπορούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια που προκύπτουν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Ένα μείζον ζήτημα που εγείρεται σχετικά με την εφαρμογή των τεχνητά κατασκευασμένων ερυθρών σε κλινικές μελέτες, είναι η ανάγκη αντικατάστασης των ζωικών προϊόντων που περιέχονται τόσο στο θρεπτικό μέσο όσο και στα feeder cells με προϊόντα ασφαλή για χορήγηση στον ανθρώπινο οργανισμό. Πολλές μελέτες έχουν γίνει που αφορούν σε αυτόν τον στόχο με αρκετά καλά αποτελέσματα. Πρέπει να σημειωθεί όμως πως αυτές αναφέρονται κυρίως στα HSPCs τα οποία έχουν μελετηθεί περισσότερο μιας και χρησιμοποιούνται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στις πειραματικές διαδικασίες σε σχέση με τα ESCs και iPSCs.

Η αύξηση της παραγωγής των τεχνητών ερυθροκυττάρων αποτελεί ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα. Μια μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών περιέχει περίπου 2×10^{12} ερυθρά αιμοσφαίρια. Μεχρι σήμερα έχει αποδειχθεί η παραγωγή μεταγγίσιμων ερυθρών που αντιστοιχούν στο ένα δέκατο της μονάδας. Οι προσπάθειες για να αυξηθεί η ικανότητα πολλαπλασιασμού των καλλιεργούμενων κυττάρων περιλαμβάνουν τόσο τις συνθήκες της καλλιέργειας όσο και τη φυσιολογία των ίδιων των κυττάρων. Δημοσιεύσεις από πολλές ερευνητικές ομάδες αναφέρουν διάφορους

συνδυασμούς αυξητικών παραγόντων, την προσθήκη ουσιών που δρουν στη χρωματίνη και επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων ή την ενεργοποίηση μονοπατιών που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση. Ο πεπερασμένος αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων που χαρακτηρίζει τα HSPCs, πιθανά να μπορεί να αναιρεθεί με την διατήρηση των τελομερών. Τα ESCs και iPSCs μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' άοριστον όμως ο πληθυσμός των κυττάρων που προκύπτουν δεν είναι επαρκής για να καλύψει τις ανάγκες μίας μετάγγισης. Η δυνατότητα ανάπτυξης κυτταρικών σειρών που θα προέχονται από την ιδανικότερη πηγή κυττάρων και ταυτόχρονα θα δίνουν το πλεονέκτημα της απεριόριστης αναπαραγωγής, πιθανά να αποτελεί την καλύτερη πρόταση για την αύξηση της παραγωγής. Ωστόσο, παρά τις όποιες προσπάθειες διατήρησης της ζωτικότητας των κυττάρων και βελτίωσης της ικανότητας πολλαπλασιασμού τους, είναι σαφές ότι οι καλλιέργειες με στατικές μεθόδους δεν έχουν τον επιθυμητό βαθμό απόδοσης. Νεότερες τεχνολογίες σχετικές με τους βιοαντιδραστήρες επιτρέπουν την τρισδιάστατη ανάπτυξη των κυττάρων αυξάνοντας έτσι τον όγκο παραγωγής. Παρόλα αυτά, μια μαζική παραγωγή που θα ανταποκρινόταν στις παγκόσμιες ανάγκες απαιτεί έναν τεράστιο αριθμό κυττάρων και οι υπάρχουσες τεχνολογίες δεν επαρκούν για την υλοποίηση μιας τέτοιας ιδέας.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται στα πρωτόκολλα της ex vivo ερυθροποίησης προέρχονται από διαφορετικές πηγές και το μεγαλύτερο ερώτημα που προκύπτει είναι ποιά από αυτές είναι η ιδανικότερη. Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας τέτοιας πηγής είναι η προέλευση από απορριπτόμενα ή εύκολα προσβάσιμα υλικά, η απεριόριστη διαθεσιμότητα, η δυνατότητα πλήρους ωρίμανσης προς την ερυθρά σειρά και η ανικανότητα ανοσολογικής διέγερσης.

Τα HSPCs μπορούν να απομονωθούν από BM, PB και CB. Η χρήση των κυττάρων από τον BM για την παραγωγή ερυθρών δεν προτείνεται λόγω της δυσκολίας στον τρόπο συλλογής τους και της χαμηλής αποδοτικότητάς τους. Τα στελεχειαία κύτταρα από PB που συλλέγονται μέσω αφαίρεσης με ή χωρίς προηγηθείσα κινητοποίηση είναι λιγότερα σε αριθμό σε σχέση με τα κύτταρα από CB, αλλά μπορούν να αποδώσουν περισσότερα ερυθρά που εκφράζουν HbA. Και για τις δύο αυτές πηγές στελεχειαίων

κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι, μετά απο κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, παράγουν ερυθρά αιμοσφαίρια που ομοιάζουν των φυσιολογικών ΔΕΚ, σε βαθμό μεγαλύτερο σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη πηγή στελεχιαίων κυττάρων. Ένα σαφές πλεονέκτημα των HSPCs είναι ότι δεν είναι γενετικά τροποποιημένα, συνεπώς είναι αποδεκτή η κλινική τους εφαρμογή. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι έχουν μικρή ικανότητα απόδοσης μεταγγίσιμων μονάδων αίματος και εξαρτώνται από δωρεές.

Τα ESCs και iPSCs έχουν το πλεονέκτημα του απεριόριστου πολλαπλασιασμού όμως η δυνατότητά τους να εξελιχθούν σε ώριμα ερυθρά είναι αρκετά περιορισμένη. Η χρήση των iPSCs, σε αντίθεση με τα ESCs, δεν εγείρει ηθικά ζητήματα όμως τα επαγόμενα κύτταρα είναι γενετικά τροποποιημένα και φέρουν ογκογονίδια. Παρόλα αυτά ο κίνδυνος της ογκογένεσης φαίνεται να είναι απίθανος στην περίπτωση που τα iPSCs διαφοροποιηθούν προς ώριμα απύρρηνα ερυθρά.

Ένα ESC μπορεί να δημιουργήσει μέχρι 4500 ερυθροκύτταρα σε αντίθεση με τα μόλις 1500 που μπορούν να προέλθουν απο ένα iPSC, ενώ ένα μόνο CD34+ κύτταρο από CB μπορεί να δώσει γένεση σε αρκετά εκατομμύρια. Αντίστοιχα τα απύρρηνα ερυθρά μπορούν να φτάσουν έως και το 100% των συνολικών ερυθροκυττάρων στην περίπτωση των CD34+ κυττάρων, το 60% σε πειράματα που σχετίζονται με ESCs, ενώ το ποσοστό αυτό ανέρχεται μόλις στο 26% για τα iPSCs.

Οι παράμετροι που σχετίζονται με την ποιότητα των *in vitro* κατασκευασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων χρήζουν αυστηρών ελέγχων ώστε τα κύτταρα που παράγονται να είναι συγκρίσιμα με τα φυσιολογικά ερυθρά ως προς τη λειτουργικότητα και την αποτελεσματικότητα. Το μέγεθος των *ex vivo* ερυθροβλαστών είναι τριπλάσιο σε σχέση με τους προερυθροβλάστες του μυελού αλλά κατά την ωρίμανση στην καλλιέργεια, τα κύτταρα αποκτούν τη διάμετρο του φυσιολογικού ορθόχρωμου ερυθροβλάστη και των ΔΕΚ. Η μορφολογία του κυτταροπλάσματος διαφέρει διότι τα *ex vivo* παραγόμενα κύτταρα περιέχουν πολλά κενοτόπια, παρόλα αυτά η πλαστικότητα των κυττάρων δε φαίνεται να επηρεάζεται. Τα μεταβολικά μονοπάτια των κατασκευασμένων ερυθρών ταυτίζονται με αυτά του φυσιολογικού ερυθροκυττάρου. Ο τύπος της αιμοσφαιρίνης που εκφράζεται από τα *ex vivo* ερυθροκύτταρα εξαρτάται από την αρχική προέλευση

των κυττάρων και από τις συνθήκες της καλλιέργειας. Η μεγαλύτερη έκφραση HbA παρατηρείται σε HSPCs ιδίως όταν καλλιεργούνται υπό συνθήκες που μιμούνται το μικροπεριβάλλον της ερυθροποίησης του ενήλικου ατόμου ή όταν τα κύτταρα εγχύονται στον ενήλικο οργανισμό. Η απόδοση του οξυγόνου διαφέρει μεταξύ των in vivo και in vitro ερυθρών λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας HbF στα τελευταία.

Η έκφραση των γονιδίων των κατασκευασμένων ερυθρών φαίνεται από μελέτες ότι δε διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθρά του οργανισμού. Τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα, αντιγόνα επιφανείας και δομικές πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στα κύτταρα κατά την ωρίμανση στην καλλιέργεια ενώ τα γονίδια που σχετίζονται με τα κυτταρικά οργανίδια φαίνεται να εκπίπτουν ως προς την έκφρασή τους. Οι ίδιες αλλαγές παρατηρούνται και κατά την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η έκφραση των ομάδων αίματος στα ex vivo ερυθρά καθορίζεται από την προέλευσή τους. Στα HSPCs από οποιαδήποτε πηγή και να προέρχονται, τα αντιγόνα των ομάδων είναι ήδη ελεγμένα και καταγεγραμμένα, στα ESCs η ομάδα αίματος προκύπτει από την εκάστοτε κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ενώ στα iPSCs τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ταυτίζονται με αυτά του σωματικού κυττάρου από το οποίο προέρχονται. Συνεπώς η μεγαλύτερη πρόκληση είναι η δημιουργία μίας τράπεζας in vitro παραγόμενων κυττάρων, που θα αποτελείται από κυτταρικές σειρές με έκφραση ομάδων αίματος συμβατών με το μεγαλύτερο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού. Από μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα πως μόνο οκτώ τύποι κυτταρικών σειρών επαρκούν ώστε να καλύψουν όλους τους πιθανούς φαινότυπους των συνηθέστερα ελεγχόμενων ομάδων αίματος. Επιπλέον, η μέθοδος που αναπτύχθηκε και αφορά στην απομάκρυνση των αντιγόνων A και B από τα ερυθρά, θα μπορούσε να εφαρμοστεί στις κυτταρικές σειρές και να προκύψει η ομάδα O/RhD(-) του παγκόσμιου δότη, η οποία θεωρητικά μπορεί να μεταγγιστεί σε οποιοδήποτε άτομο. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έλεγχοι για το κατά πόσο τα συστατικά της καλλιέργειας και το γενετικό προφίλ των εκάστοτε χρησιμοποιούμενων στελεχιαίων κυττάρων, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των αντιγόνων των ομάδων αίματος και να προκαλέσουν

απρόβλεπτες ανοσολογικές αντιδράσεις. Τέλος, οποιοδήποτε πρωτόκολλο και να εφαρμοστεί για την παρασκευή ex vivo ερυθροκυττάρων, θα πρέπει να συμμορφώνεται με τις πρακτικές που καθορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες (Good Manufacturing Practice- GMP), ώστε να μπορεί το προϊόν να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη.

Η ex vivo παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων ικανών να χρησιμοποιηθούν στη μεταγγισιοθεραπεία απαιτεί την αντιμετώπιση βιολογικών και βιοτεχνολογικών προκλήσεων που θα οδηγήσουν στη μαζική παραγωγή ενός ασφαλούς και λειτουργικού προϊόντος καθώς και στην υπερπήδηση του οικονομικού προβλήματος που παρουσιάζει μέχρι τώρα μία τέτοια παραγωγή, μιας και με τις μέχρι σήμερα μεθόδους το κόστος μίας μονάδας κατασκευασμένων ερυθρών ανέρχεται στα 20.000 ευρώ. Αναμφισβήτητα το καινοτόμο αυτό ιατρικό προϊόν έχει κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον και όσο συνεχίζεται η έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή, προβλέπεται ότι η ex vivo παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων θα αποκτήσει σίγουρα μία θέση στον τομέα των μεταγγίσεων στο κοντινό μέλλον.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΑ

ΔΕΚ	δικτυοερυθροκύτταρα
Ε.Ε.Σ	Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
BFU-E	burst- forming unit erythroid
BM	μυελός των οστών
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BSA	αλβουμίνη ορού βοοειδούς
CB	ομφαλοπλακουντιακό αίμα
CFU-E	colony- forming unit erythroid
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
EBs	εμβρυονικά σώματα
EDM	Erythroid Differentiation Medium
EPO	ερυθροποιητίνη
EPO-R	υποδοχέας της ερυθροποιητίνης
ESC	εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα
FBS	ορός πλάσματος βοοειδούς
FH-B-hTERT	κυτταρική σειρά ανθρώπινου εμβρυικού ήπατος
Flt3-L	Fms-related tyrosine kinase 3 συνδέτης
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GMP	Good Manufacturing Practice
GPA	γλυκοφορίνη A
Hb	αιμοσφαιρίνη
HbA	αιμοσφαιρίνη ενηλίκου
HbF	εμβρυική αιμοσφαιρίνη
HiDEP	Human inducedPSCs Derived Erythroid Progenitor
HSC	Στελεχιαία Αιμοποιητικά Κύτταρα
HSPCs	αιμοποιητικά στελεχιαία/ προγονικά κύτταρα
HUDEP	Human Umbilical Cord Blood Derived Erythroid Progenitor
IGF-I	Insulin- like Growth Factor I
IL-3	ιντερλευκίνη 3
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

iPSC	επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MCV	μέσος όγκος ερυθρών
MEF	εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού
miRNAs	χαμηλού μοριακού βάρους ριβονουκλεϊκό οξύ
MS-5	κυτταρική σειρά στρωματικών κυττάρων ποντικού
MSCs	μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα
NOD/ SCID	μη- παχύσαρκα διαβητικά με σοβαρή συνδιασμένη ανοσοανεπάρκεια ποντίκια
OP9, S17, C166	κυτταρικές σειρές από ποντίκια
PB	περιφερικό αίμα
PBMC	μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος
RBC	ερυθροκύτταρα
SCF	αυξητικός παράγοντας των στελεχιαίων κυττάρων
TAL1, HPV16 E6/E7	ογκογονίδια
TERT	ανάστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης
TfR	υποδοχέας της τρανσφερίνης
TPO	θρομβοποιητίνη
VEGF	αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.H.J. Alter and H.G. Klein, "The hazards of blood transfusion in historical perspective" , Blood, vol.112, no.7, pp. 2617- 2626 (2008)
- 2.Ιστορία της Αιμοδοσίας. Available from: <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=124>
3. Circulatory system. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Circulatory_system.
- 4.Η Ιστορία των μεταγγίσεων πριν την ανακάλυψη των ομάδων αίματος. Available from: <http://atlaswikigr.wikifoundry.com/page/ομάδες+αίματος-μεταγγίσεις>
- 5.James G. Chandler, "Direct Blood Transfusions", Journal of vascular surgery,vol.56,Is.4, p.1173-1177 (2012)
- 6.Blundell's blood transfusion apparatus, London, England,1801-1900. Available from: <http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/objects/display?id=91993>
- 7.Highlights of transfusion Medicine History. Available from: <http://www.aabb.org/tm/Pages/highlights.aspx>
8. Ιστορία της Μετάγγισης. Available from: <http://med.ekea.gr/history-blood/>
9. World Health Organization, Blood Safety and availability. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>
10. World Health Organization, Global Database on Blood Safety, Summary Report 2011
- 11.Carolyn Whitsett, Stefania Vaglio and Giuliano Grazzini, 'Alternative Blood Products and Clinical Needs in Transfusion Medicine', Stem Cells International, vol.2012,article ID 639561 (2012)
- 12.J.S.Epstein and J.A.Holmberg, "Progress in monitoring blood safety", Transfusion,vol.50, no.7, pp 1408-1412 (2010)
- 13.Department of Health and Human Services. (2013). The 2011 National Blood Collection and Utilization Survey Report. Available from: <https://www.aabb.org/research/hemovigilance/bloodsurvey/Documents/11-nbcus-report.pdf>
- 14.A.Victor Hoffbrand , "Postgraduate Haematology", 6th edition,Wiley-Blackwell
- 15.Αιμοεπαγρύπνηση στην Ελλάδα.Available from: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=6610>
- 16.Ελληνική Αιματολογική Εταιρία, 'Αντιδράσεις απο τη μετάγγιση αίματος και παραγώγων του',ημεριδα 2009
17. VimalK.Singh, AbhishekSaini, KohichiroTsuji, P.B.Sharma and RameshChandra, "Manufacturing blood ex vivo: a futuristic approach to deal with the supply and safety concerns", frontiers in Cell and Developmental Biology, doi:10.3389 (2014)

18. Ελληνική Αιματολογική Εταιρία, ‘ Κατευθυντήριες οδηγίες μετάγγισης αίματος και παραγώγων του’, Αθήνα 2010
- 19.A.A. Thompson, “Red cell alloimmunization in a diverse population of transfused patients with thalassaemia”, *British Journal of Haematology*, vol.153, no.1, pp.121-128 (2011)
- 20.Akif Ali, Marja-Kaisa Auvinen, and Jukka Rautonen “The aging population poses a global challenge for blood services”, *TRANSFUSION* Volume 50, March 2010
- 21.NE.Timmins, “Blood cell manufacture: current methods and future challenges”, *Trends Biotechnol*, doi:10.1016 (2009)
- 22.Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *AnnuRev Immunol*. 2003; 21:759–806
23. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*. 2000;1:57–64. [PubMed: 11262875]
24. Hematopoietic stem cell hierarchy. ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/224899751_fig1_Hematopoietic-stem-cell-hierarchy-Self-renewing-HSC-give-rise-to-several-multipotent
25. Palis,J.,and Yoder,M.C.(2001).Yolk-sachematopoiesis:thefirstblood cellsofmouseandman. *Exp.Hematol*. 29, 927–936.doi:10.1016/S0301- 472X(01)00669-5
26. “Αιματολογία στην κλινική πράξη”, Γεράσιμος Πάγκαλης, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008
27. Alexander Medvinsky, Stanislav Rybtsov and Samir Taoudi,“ Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions”, *Development* 138, 1017-1031 (2011)
28. Palis,J.(2008).Ontogeny of erythropoiesis. *Curr.Opin.Hematol*. 15, 155–161doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97ae1
29. Available from: <http://www.ilym.org/tiki-index.php?page=Plummer1983>
30. Deepa Manwani and James J. Bieker, The Erythroblastic Island, *Curr Top Dev Biol*. 2008 ; 82: 23–53. doi:10.1016/S0070-2153(07)00002-6.
31. Available from: <http://slideplayer.com/slide/4463296/>
32. Valentina Tirelli, Barbara Ghinassi, Anna RitaMigliaccio,CarolynWhitsett,Francesca Masiello, Massimo Sanchez, and GiovanniMigliaccio, “ Phenotypic Definition of the Progenitor Cells with Erythroid Differentiation Potential Present in Human Adult Blood”, *Stem Cells International* Volume 2011, Article ID 602483, 9 pages (2011)

33. Pascal Hänggi, Vsevolod Telezhkin, Paul J. Kemp, Markus Schmugge, Max Gassmann, Jeroen S. Goede, Oliver Speer, Anna Bogdanova, " Functional plasticity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor in differentiating human erythroid precursor cells", *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Published 15 June 2015 Vol. 308 no. 12, C993-C1007 DOI: 10.1152/ajpcell.00395 (2014)
34. Λουκόπουλος Δ, Πολίτη Μ, "Μαθήματα Αιματολογίας" κεφ 20. Ιατρική της Μετάγγισης, Εκδόσεις Κάλλιπος, Αθήνα 2015, Available from: <http://hdl.handle.net/11419/3081>
35. Μεταπτυχιακό μάθημα 'Εναλλακτικές Μέθοδοι , αυτόλογη μετάγγιση ' Ντουραμάνη Π, 2016.
36. Terri g Monk, " Preoperative recombinant human erythropoietin in anemic surgical patients", *Critical care*, vol.8, pp 45-48 (2004)
37. David Murray, " Acute normovolemic hemodilution", *Eur Spine J.* ,(Suppl 1): S72–S75 (2004)
38. Poonam S. Ghodki, Shalini P. Sardesai, " Obstetric hemorrhage: anesthetic implications and management", *Anaesthesia, pain and intensive care*", Available from: <http://www.apicareonline.com/newsite/obstetric-hemorrhage-anesthetic-implications-and-management/>
39. Available from: <http://www.cardiothoracicsurgeryservices.com/26.html>
40. Toby A. Silverman, M.D., Richard B. Weiskopf, M.D. " Hemoglobin-based Oxygen Carriers", *Anesthesiology* 2009; 111:946–63
41. Donat R Spahn, " Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions", *Crit Care*. 1999; 3(5): R93–R97.
42. ANN ZEUNER, FABRIZIO MARTELLI, STEFANIA VAGLIO, GIULIA FEDERICI, aCAROLYN WHITSETT, ANNA RITA MIGLIACCIO, " Concise Review: Stem Cell-Derived Erythrocytes as Upcoming Players in Blood Transfusion", *STEM CELLS* 2012; 30:1587–1596 www.StemCells.com
43. Thi My Anh Neildez-Nguyen, Henri Wajcman, Michael C. Marden, Morad Bensidhoum, Vincent Moncollin, Marie-Catherine Giarratana, Ladan Kobari, Dominique Thierry, and Luc Douay, " Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*", <http://biotech.nature.com> , MAY 2002 , VOLUME 20 , *nature biotechnology*
44. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G., " Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database", *ALTEX* 27(1), 53-62, (2010)
45. Fred van Engelen, "5 reasons to switch to serum-free culture media", Available from: <https://www.westburg.eu/blog/serum-free-cell-culture-media>
46. Available from: <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/cell-culture-products/classical-media.aspx>

47. Yukio Nakamura, "In vitro Production of Transfusable Red Blood Cells", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, ISSN: 0264-8725 (Print) 2046-5556 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tbgr20>, (2013)
48. Thi My Anh Neildez-Nguyen, Henri Wajcman, Michael C. Marden, Morad Bensidhoum, Vincent Moncollin, Marie-Catherine Giarratana, Ladan Kobari, Dominique Thierry and Luc Douay, "Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*", Nature Publishing Group <http://biotech.nature.com> (2002)
49. Ganesan Keerthivasan, Sara Small, Hui Liu, Amittha Wickrema, and John D. Crispino, "Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation", Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 19, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-277426.
50. Available from: <http://www.nature.com/stemcells/2007/0706/070614/full/stemcells.2007.22.html>
51. Roya Mehrasa,¹ Hamidreza Vaziri,¹ Arezoo Oodi,² Mona Khorshidfar,² Mahin Nikogoftar,² Monireh Golpour,³ and Naser Amirizadeh, Mesenchymal Stem Cells as a Feeder Layer Can Prevent Apoptosis of Expanded Hematopoietic Stem Cells Derived from Cord Blood, *Int J Mol Cell Med*. 2014 Winter; 3(1): 1–10.
52. Available from: <http://www.amsbio.com/human-and-mouse-feeder-cells.aspx>
53. Cherifa Issaad, Laure Croisille, Andre Katz, William Vainchenker, and Laure Coulombel, "A Murine Stromal Cell Line Allows the Proliferation of Very Primitive Human CD34 + -I- /CD38 - Progenitor Cells in Long-Term Cultures and Semisolid Assays", *From INSER UM U 362, Institut Gustave Roussy, Villejuif; France 1993*.
54. Eun Jung Baek, Han-Soo Kim, Ju-Hye Kim, Nahn Ju Kim, and Hyun Ok Kim, "Stroma-free mass production of clinical-grade red blood cells (RBCs) by using poloxamer 188 as an RBC survival enhancer", *Volume 49, November 2009 TRANSFUSION*
55. Marie-Catherine Giarratana, Ladan Kobari, Helene Lapillonne, David Chalmers, Laurent Kiger, Therese Cynober, Michael C Marden, Henri Wajcman & Luc Douay, "Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells", *NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 23 NUMBER 1 JANUARY 2005*
56. DSMZ, catalogues. Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-441.html>
57. LUC DOUAY, "Experimental Culture Conditions Are Critical for Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Cells", *JOURNAL OF HEMATOTHERAPY & STEM CELL RESEARCH* 10:341–346 (2001)
58. Tissue Culture Laboratory. Available from: <http://www.ruf.rice.edu/~bioewhit/labs/bioe342/docs/cell%20passage.htm>

59. Available from: <https://www.stemcell.com/stemspan-erythroid-expansion-medium-acf.html>
60. Kenichi Miharada, Takashi Hiroshima, Kazuhiro Sudo, Toshiro Nagasawa & Yukio Nakamura, "Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells", 2006 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>
61. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12440053>
62. Fengming Yue, Sakiko Shirasawa, Hinako Ichikawa, Susumu Yoshie, Akimi Mogi, Shoko Masuda, Mika Nagai, Tadayuki Yokohama, Tomotsune Daihachiro and Katsunori Sasaki, "Induce Differentiation of Embryonic Stem Cells by Co-Culture System", "Regenerative Medicine and Tissue Engineering", book edited by Jose A. Andrades, ISBN 978-953-51-1108-5, Published: May 22, 2013 under CC BY 3.0 license.
63. KOLBUS, A., BLÁZQUEZ-DOMINGO, M., CAROTTA, S., ET AL. (2003) Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 102, 3136-46.
64. Cornelia Leberbauer, Florence Boulme´, Gertrud Unfried, Johannes Huber, Hartmut Beug, and Ernst W. Mu¨ller Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors, *Blood*. 2005;(105:85-94)
65. Eliason, J.F., Testa, N.G. & Dexter, T.M. Erythropoietin-stimulated erythropoiesis in long-term bone marrow culture. *Nature* **281**, 382–384 (1979).
66. Malik, P. *et al.* An *in vitro* model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood* **91**, 2664–2671 (1998).
67. H. Dolznig, B. Habermann, K. Stangl *et al.*, "Apoptosis protection by the Epo target Bcl-XL allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts," *Current Biology*, vol.12, no. 13, pp. 1076–1085, 2002.
68. S. I. Miyagawa, M. Kobayashi, N. Konishi, T. Sato, and K. Ueda, "Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors," *British Journal of Haematology*, vol. 109, no. 3, pp. 555–562, 2000.
69. Bradley T R & Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287-300, 1966
70. Jiafei Xi, Yanhua Li, Ruoyong Wang, Yunfang Wang, Xue Nan, Lijuan He, Peng Zhang, Lin Chen, Wen Yue, and Xuetao Pei, "In Vitro Large Scale Production of Human Mature Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells by Coculturing with Human Fetal Liver Stromal Cells", *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 807863, 12 pages

71. E. Fibach and E. A. Rachmilewitz, "The two-step liquid culture: a novel procedure for studying maturation of human normal and pathological erythroid precursors," *Stem Cells*, vol. 11, pp. 36–41, 1993.

72. https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture

73. H.T. Nguyen, M. Geens, C. Spits, "Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells", *Hum Reprod Update* (2013) 19 (2): 187-205.

74. abm. Cell culture. Available from:

https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/cell_culture_introduction.php

75. Chasis JA, Mohandas N. "Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis." , *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):470-8. doi: 10.1182/blood-2008-03-077883.

76. Luc Douay and Georges Andreu, "Ex vivo Production of Human Red Blood Cells From Hematopoietic Stem Cells: What Is the Future in Transfusion?", *TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS*, Vol 21, No 2, (2007)

77. Sutherland RD, Keating A. "The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications". *J Hematother* 1992; 1:115-29.

78. Carmelo Carlo Stella, Mario Cazzola, Paolo De Fabritiis, Armando De Vincentiis, Alessandro Massimo Gianni, Francesco Lanza, Francesco Lauria, Roberto M. Lemoli, Corrado Tarella, Paola Zanon, Sante Tura, " CD34-POSITIVE CELLS: BIOLOGY AND CLINICAL RELEVANCE", *Haematologica* 1995; 80:367-387

79. Maggakis-Kelemen C, Bork M, Kayser P, Biselli M, Artmann G, "Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells" . *Med. Biol. Eng. Comput.* 41, 350-356, (2003)

80. Yutaka Kawano, Masayoshi Kobune, Miki Yamaguchi, Kiminori Nakamura, Yoshinori Ito, Katsunori Sasaki, Sho Takahashi, Takafumi Nakamura, Hiroki Chiba, Tsutomu Sato, Takuya Matsunaga, Hiroshi Azuma, Kenji Ikebuchi, Hisami Ikeda, Junji Kato, Yoshiro Niitsu, and Hirofumi Hamada, " Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (*hTERT*)–transfected human stromal cells ", Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, September 5, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-04-1268.

81. Marta Caminal, Juan P Labrozzi, Irene Oliver-Vila, Martí Alzaga-Gragera, Silvia Marín-Gallén, Arnau Pla, Joan García, Joaquim Vives," Ex vivo production of red blood cells from human cord blood", From 24th European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting: C2P2: Cells, Culture, Patients, Products, Barcelona, Spain. 31 May - 3 June 2015

82. Nicholas E. Timmins, Ph.D., Stavrosia Athanasas, Ph.D., Marko Gu nther, Dipl.-Ing., Penelope Buntine, R.N./R.M., and Lars K. Nielsen, Ph.D., "Ultra-High-Yield Manufacture of Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells", *TISSUE ENGINEERING: Part C*, Volume 17, Number 11, 2011
83. Marie-Catherine Giarratana, He lene Rouard, Agne`s Dumont, Laurent Kiger, Innocent Safeukui, Pierre-Yves Le Pennec, Sabine Francois, Germain Trugnan, Thierry Peyrard, Tiffany Marie, Severine Jolly, Nicolas Hebert, Christelle Mazurier, Nathalie Mario, Laurence Harmand, He lene Lapillonne, Jean-Yves Devaux, and Luc Douay, " Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells", www.clinicaltrials.gov as NCT09292666. (*Blood*.2011;118(19):5071-5079)
84. Emile van den Akker, Timothy J. Satchwell, Stephanie Pellegrin, Geoff Daniels, and Ashley M. Toye, " 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(9):1594-1598.
85. Foeken LM, Green A, Hurley CK, Marry E, Wiegand T, Oudshoorn M; Donor Registries Working Group of the World Marrow Donor Association (WMDA). "Monitoring the international use of unrelated donors for transplantation: the WMDA annual reports." *Bone Marrow Transplant*. 2010 May;45(5):811-8.
86. Anstee DJ, Gampel A, Toye AM. 2012. *Ex-vivo* generation of human red cells for transfusion. *Current Opinion in Hematology* 19: 163–169.
87. Migliaccio AR, Whitsett C, Papayannopoulou T, Sadelain M. 2012a. The potential of stem cells as an *in vitro* source of red blood cells for transfusion. *Cell Stem Cell* 10: 115–119.
88. G. F. Rousseau, C. Mazurier & L. Douay, "Culturing red blood cells from stem cells: a solution to present and future challenges of transfusion medicine?", *ISBT Science Series* (2016) 11 (Suppl. 1), 111–117
89. 4 Norol F, Nadjahi J, Bachir D, et al.: "Transfusion and alloimmunization in sickle cell anemia patients". *Transfus Clin Biol* 1994; 1:27–34
90. Varney SJ, Guest JF: The annual cost of blood transfusions in the UK. *Transfus Med* 2003; 13:205–18
91. Peyrard T, Bardiaux L, Krause C 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;25:206–216.
92. Ji P, Yeh V, Ramirez T et al. 'Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts'. *Haematologica* 2010;95:2013–2021.

93. Sandeep N. Shah, Monique P. Gelderman, Emily M. A. Lewis, John Farrel, Francine Wood, Michael Brad Strader, Abdu I. Alayash, Jaroslav G. Vostal, ' Evaluation of Stem Cell-Derived Red Blood Cells as a Transfusion Product Using a Novel Animal Model', *PLoS ONE* 11(12): e0166657. doi:10.1371/journal.pone.0166657
94. Martin, G. 1981. 'Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 7635
95. Available from: <http://www.umassmed.edu/iscr/stem-cell-facts/>
96. Junying Yu and James A. Thomson, Embryonic Stem Cells, National Institutes of Health, Available from: https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter1.htm
97. Gordon Keller, Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, *GENES & DEVELOPMENT* 19:1129–1155 © 2005
98. Evans MJ, Kaufman MH., " Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos", *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
99. Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., and Abbondanzo, S.J. 1992. 'Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor'. *Nature* **359**: 76–79.
100. Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. 1988. 'Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells'. *Nature* **336**: 684–687.
101. Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. 2003a. 'BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3'. *Cell* **115**: 281–292.
102. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. 1998. 'Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3'. *Genes & Dev.* **12**: 2048–2060.
103. Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. 2000. 'Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells'. *Nat. Genet.* **24**: 372–376.
104. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. 2003. 'The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency'
105. Daheron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G.Q. 2004. 'LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells'. *Stem Cells* **22**: 770–778.

106. Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. 2001. 'Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* **19**: 971–974.
107. Science cell: Mouse Embryonic Fibroblast-Conditioned Medium (MEF-cm). Catalog #5881, Available from: <https://www.sciencellonline.com/PS/5881.pdf>
108. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. 2004. 'Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor'. *Nat. Med.* **10**: 55–63.
109. Keller, G. 1995. 'In vitro differentiation of embryonic stem cells'. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 862–869
110. Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. 1994. 'Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture'. *Science* **265**: 1098–1101.
111. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., and Shultz, L.D. 1990. 'The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene'. *Nature* **345**: 442–444
112. Nishikawa, S., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. 1998. 'Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages'. *Development* **125**: 1747–1757
113. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. 'Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells'. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):906-15. Epub 2003 Apr 17.
114. Ng ES, Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefanty AG. 'Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation.' *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1601-3. Epub 2005 May 24.
115. Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. 'Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures.' *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):2095-105. Epub 2006 Jun 6.
116. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renström J, Lang R, Yung S, Santibanez-Coref M, Dzierzak E, Stojkovic M, Oostendorp RA, Forrester L, Lako M. 'Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches'. *Cell Stem Cell*. 2008 Jul 3;3(1):85-98. doi: 10.1016/j.stem.2008.06.001.
117. Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, Papayannopoulou T. '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 Sep 1;108(5):1515-23. Epub 2006 Apr 27.

118. Shi-Jiang Lu, Qiang Feng, Jennifer S. Park, Loyda Vida, Bao-Shiang Lee, Michael Strausbauch, Peter J. Wettstein, George R. Honig, and Robert Lanza, "Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells". *BLOOD*, 1 DECEMBER 2008 _ VOLUME 112, NUMBER 12
119. Dan S. Kaufman, Eric T. Hanson, Rachel L. Lewis, Robert Auerbach, and James A. Thomson, "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells", *PNAS*, September 11, 2001 u vol. 98 u no. 19
120. Maxim A. Vodyanik, Jack A. Bork, James A. Thomson, and Igor I. Slukvin. "Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential". *BLOOD*, 15 JANUARY 2005 _ VOLUME 105, NUMBER 2
121. Emmanuel N. Oliviera, Caihong Qiu, Michelle Velho, Rhoda Elison Hirschb, and Eric E. Bouhassiraa. "Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells". *Experimental Hematology* 34 (2006) 1635–1642
122. Caihong Qiu, Emmanuel N. Olivier, Michelle Velho and Eric E. Bouhassira. "Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells". *BLOOD*, 15 FEBRUARY 2008, VOLUME 111, NUMBER 4
123. Yasuhiro Ebihara, Feng Ma, Kohichiro Tsuji. "Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion". *Int J Hematol* (2012) 95:610–616
124. M. Amit, V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky, R. Coleman, 4 and J. Itskovitz-Eldor. 'Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells'. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **68**, 2150–2156 (2003)
125. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, Caceres E, McMaster M, McDonagh S, Li Y, Mandalam R, Lebkowski J, Fisher SJ. 'Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders'. *Fertil Steril*. 2005 May;83(5):1517-29.
126. Dan Ran, Wei-Jong Shia, Miao-Chia Lo, Jun-Bao Fan, David A. Knorr, Patrick I. Ferrell, Zhaohui Ye, Ming Yan, Linzhao Cheng, Dan S. Kaufman, and Dong-Er Zhang. 'RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells'. *BLOOD*, 11 APRIL 2013, VOLUME 121, NUMBER 15
127. Mazurier C, Douay L, Lapillonne H. 2011. 'Red blood cells from induced pluripotent stem cells: Hurdles and developments'. *Current Opinion in Hematology* 18: 249–253.
128. Xiaolei Li, Zhiqiang Wu, Xiaobing Fu, and Weidong Han. 'How Far Are Stem-Cell-Derived Erythrocytes from the Clinical Arena?' *BioScience* • August 2013 / Vol. 63 No. 8

129. Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka. 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors'. Cell 126, 663–676, August 25, 2006 ©2006 Elsevier Inc
130. Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells, Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/differentiation-potential-induced-pluripotent-stem-cells>
131. Shinya Yamanaka .Ekiden to iPS Cells. Nature Medicine 15, 1145 - 1148 (2009)
doi:10.1038/nm1009-1145
132. Kazutoshi Takahashi,Koji Tanabe,Mari Ohnuki,Megumi Narita, Tomoko Ichisaka,Kiichiro Tomoda and Shinya Yamanaka. 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors' Cell 131, 861–872, November 30, 2007
133. Hélène Lapillonne, Ladan Kobari,Christelle Mazurier, Philippe Tropel,Marie-Catherine Giarratana,Isabelle Zanella-Cleon,Laurent Kiger,Marie Wattenhofer-Donz  , Hélène Puccio,Nicolas Hebert,Alain Francina,Georges Andreu, Stéphane Viville, and Luc Douay. 'Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine'. Haematologica 2010; 95 (10)
134. Sridharan R, Tchieu J,Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, et al. (2009) 'Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency'. Cell 136: 364–377
135. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, et al. (2007) 'Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution'. Cell Stem Cell 1: 55–70.
136. Jessica Dias, Marina Gumenyuk, HyunJun Kang, Maxim Vodyanik, Junying Yu,James A. Thomson,and Igor I. Slukvin. 'Generation of Red Blood Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells'. STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 20, Number 9, 2011
137. Ladan Kobari, Frank Yates,Noufissa Oudrhiri, Alain Francina, Laurent Kiger, Christelle Mazurier,Shaghayegh Rouzbeh,Wassim El-Nemer, Nicolas Hebert, Marie-Catherine Giarratana, Sabine François,Alain Chapel, Hélène Lapillonne, Dominique Luton, Annelise Bennaceur-Griscelli, and Luc Douay, 'Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: *in vivo* and *in vitro* evidence in the erythropoietic differentiation model'. Haematologica 2012;97(12)
138. Shilpa M. Hattangadi, Piu Wong,Lingbo Zhang, Johan Flygare, and Harvey F. Lodish. 'From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications'. Blood. 2011 Dec 8; 118(24): 6258–6268.

139. KEISUKE OKITA, TATSUYA YAMAKAWA, YASUKO MATSUMURA, YOSHIKO SATO, NAOKI AMANO, AKIRA WATANABE, NAOKI GOSHIMA, SHINYA YAMANAKA. 'An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells'. *STEM CELLS* 2013;31:458–466
140. Muller R, Lengerke C. 'Patient-specific pluripotent stem cells: promises and challenges'. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5(4):195–203.
141. Cyranoski D. Japanese woman is first recipient of nextgeneration stem cells. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/news/japanese-woman-is-first-recipient-of-nextgeneration-stem-cells-1.15915>. Accessed March 10, 2015
142. Alison T. Merryweather-Clarke, Alex J. Tipping, Abigail A. Lamikanra, Rui Fa, Basel Abu-Jamous, Hoi Pat Tsang, Lee Carpenter, Kathryn J. H. Robson, Asoke K. Nandi, and David J. Roberts. 'Distinct gene expression program dynamics during erythropoiesis from human induced pluripotent stem cells compared with adult and cord blood progenitors'. *BMC Genomics* (2016) 17:817
143. Naohisa Yoshioka, Edwige Gros, Hai-Ri Li, Shantanu Kumar, Dekker C. Deacon, Cornelia Maron, Alysson R. Muotri, Neil C. Chi, Xiang-Dong Fu, Benjamin D. Yu, and Steven F. Dowdy. 'Efficient Generation of Human iPS Cells by a Synthetic Self- Replicative RNA'. *Cell Stem Cell*. 2013 August 1; 13(2)
144. K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M. J. Aryee, H. Ji, L. I. R. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi¹, K. C. Cunniff¹, H. Hongguang, S. Mckinney-Freeman, O. Naveiras, T. J. Yoon, R. A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S. H. Orkin, I. L. Weissman, A. P. Feinberg & G. Q. Daley. 'Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells'. *Nature* Vol 467 | 16 September 2010 | doi:10.1038
145. Keisuke Okita, Tomoko Ichisaka, & Shinya Yamanaka. 'Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.' *Nature* Vol 448 | 19 July 2007
146. Ali Seifinejad a, Adeleh Taei a, Mehdi Totonchi b, Hamed Vazirinasab b, Seideh Nafiseh Hassani a, Nasser Aghdami a,c, Ebrahim Shahbazi a, Reza Salman Yazdi b, Ghasem Hosseini Salekdeh, Hossein Baharvand. 'Generation of human induced pluripotent stem cells from a Bombay individual: Moving towards "universal-donor" red blood cells.' *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (2010) 329–334
147. Hongyan Zhou, Shili Wu, Jin Young Joo, Saiyong Zhu, Dong Wook Han, Tongxiang Lin, Sunia Trauger, Geoffery Bien,⁴ Susan Yao, Yong Zhu, Gary Siuzdak, Hans R. Schoeller, Lingxun Duan, and Sheng Ding. 'Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins'. *Cell Stem Cell* 4, May 8, 2009
148. QIANG FENG,^a SHI-JIANG LU,^a IRINA KLIMANSKAYA,^b IGNATIUS GOMES,^c DOHOON KIM,^d YOUNG CHUNG,^a GEORGE R. HONIG,^c KWANG-SOO KIM,^{a,d} ROBERT LANZA. Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence. *STEM CELLS* 2010;28:704–712

149. Junying Yu, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, James A. Thomson. 'Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells'. *SCIENCE* VOL 318 21 DECEMBER 2007
150. Kai-Hsin Chang^a, Angélique M. Nelson^b, Paul A. Fields^a, Jennifer L. Hesson^b, Tatiana Ulyanova^a, Hua Caoc, Betty Nakamoto^a, Carol B. Ware^b, and Thalia Papayannopoulou. 'Diverse hematopoietic potentials of five human embryonic stem cell lines'. *Exp Cell Res.* 2008 October 1; 314(16): 2930–2940
151. HIROYAMA, T., MIHARADA, K., SUDO, K., ET AL. (2008) 'Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells'. *PLoS ONE* **3**, e1544
152. Ryo Kurita, Noriko Suda, Kazuhiro Sudo, Kenichi Miharada, Takashi Hiroyama, Hiroyuki Miyoshi, Kenzaburo Tani, Yukio Nakamura. 'Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells'. *PLOS ONE*. March 2013 | Volume 8 | Issue 3
153. Xiaosong Huang, Siddharth Shah, Jing Wang, Zhaohui Ye, Sarah N Dowey, Kit Man Tsang, Laurel G Mendelsohn, Gregory J Kato, Thomas S Kickler, Linzhao Cheng. 'Extensive Ex Vivo Expansion of Functional Human Erythroid Precursors Established From Umbilical Cord Blood Cells by Defined Factors'. *Molecular Therapy* vol. 22 no. 2, 451–463 feb. 2014
154. Kongtana Trakarnsanga, Rebecca E. Griffiths, Marieangela C. Wilson, Allison Blair, Timothy J. Satchwell, Marjolein Meinders, Nicola Cogan, Sabine Kupzig, Ryo Kurita, Yukio Nakamura, Ashley M. Toye, David J. Anstee, & Jan Frayne. 'An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells'. *NATURE COMMUNICATIONS* | 8:14750 | DOI: 10.1038/ncomms14750. Published 14 Mar 2017