



Sanquin

Bloed is leven

***Bloedcellen uit de bioreactor:
feit of science fiction?***

Robin van Bruggen

Afdeling Bloedcelresearch (BCR)

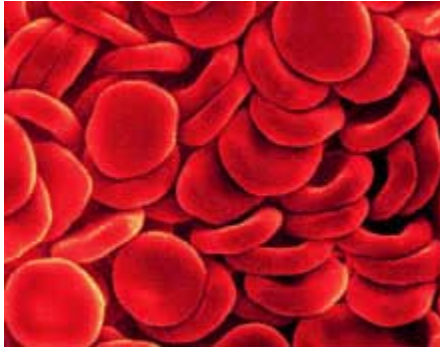
Embryonic stem cells made into functioning red blood cells

Researchers from Japan describe a process that takes human embryonic stem cells and induces them to produce functional, oxygen-carrying red blood cells.

By [John Timmer](#) | Last updated August 12, 2008 2:49

John Timmer

What if there were a potentially-life saving material that the US medical community were perpetually short of? Unfortunately, that's the reality of the nation's blood supply. A combination of disinterest and rigorous screening have left the country in a perpetual state of blood shortage. In a development that may point the way towards making time spent bleeding through a needle in your arm a thing of the past, researchers in Japan have developed a technique that induces human embryonic stem cells to form mature, blood carrying erythrocytes.



February 23, 2009
Volume 87, Number 8
Web Exclusive

Biotechnology

Using Stem Cells To Make Blood Substitutes

Artificial blood derived from cord blood stem cells is being tested in humans

[Sarah Everts](#)

For decades, researchers have been trying to develop artificial blood to eliminate reliance on blood donors, as well as the risk of infectious disease transmission and blood-type rejection.

Bioreactors might solve blood-platelet supply problems

It might be possible to grow human blood platelets in the laboratory for transfusion, according to a new study at The Ohio State University Medical Center. The findings, published in the January 1, 2009 issue of the journal *Experimental Hematology*, might one day enable blood banks to grow platelets continuously and in quantities that can ease the chronically tight supply of these critical blood components.

About 13 million platelet concentrates are collected annually in the United States at a cost of about \$1 billion. They are needed by people who lack platelets or whose platelets function improperly, such as certain cancer chemotherapy patients, bone marrow transplant patients, trauma patients given massive blood transfusions and people with aplastic anemia.

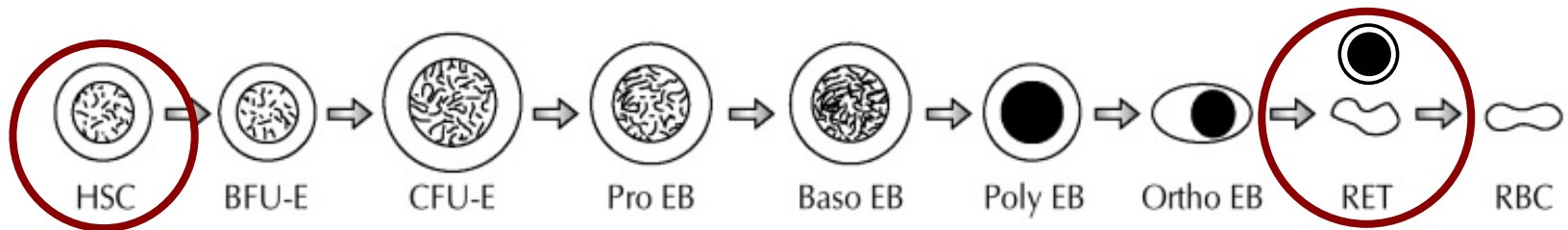
Gekweekte bloedcellen als alternatief voor donorbloed

Voordelen van gekweekte erythrocyten en trombocyten:

- Constant, universeel product.
- Verminderde kans op overdracht van virussen en prionen.
- Oneindige productie.



Differentiatie van rode bloedcellen



Voorwaarden voor *in vitro* kweek RBCs:

- Oneindige proliferatie stamcellen.
- Volledige differentiatie (enucleatie).

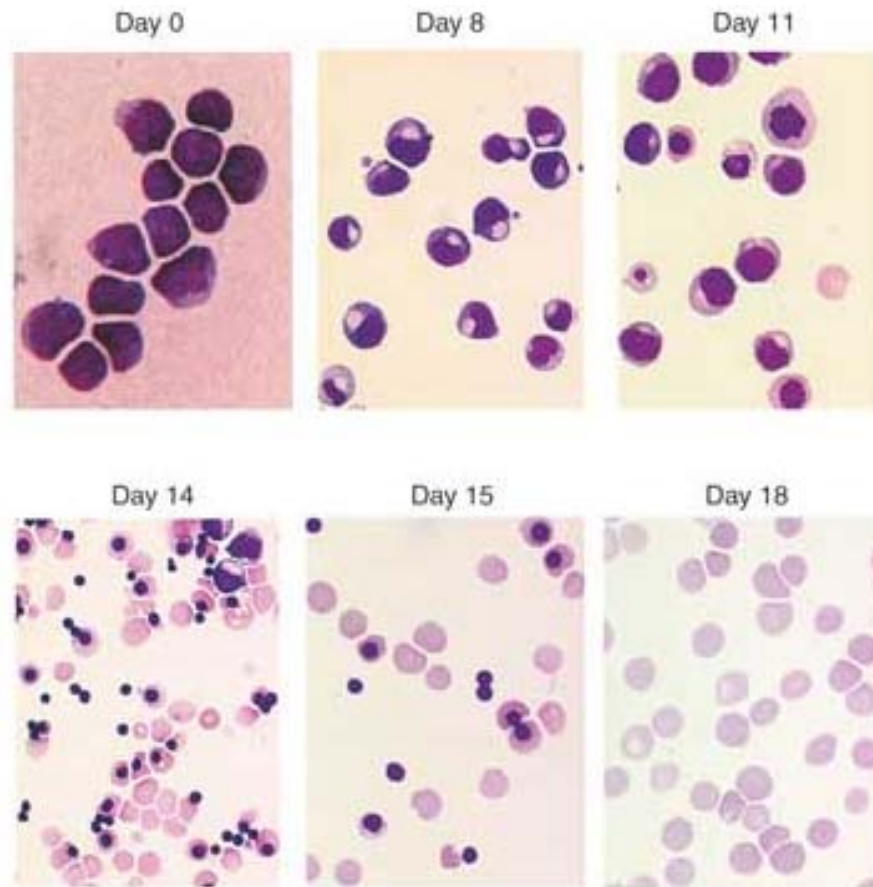
***In vitro* kweken van rode bloedcellen**

Een technologische doorbraak werd bereikt door het kweken van erythrocyten op stromale cellen (Giarratana et al. Nature Biotechnology.)

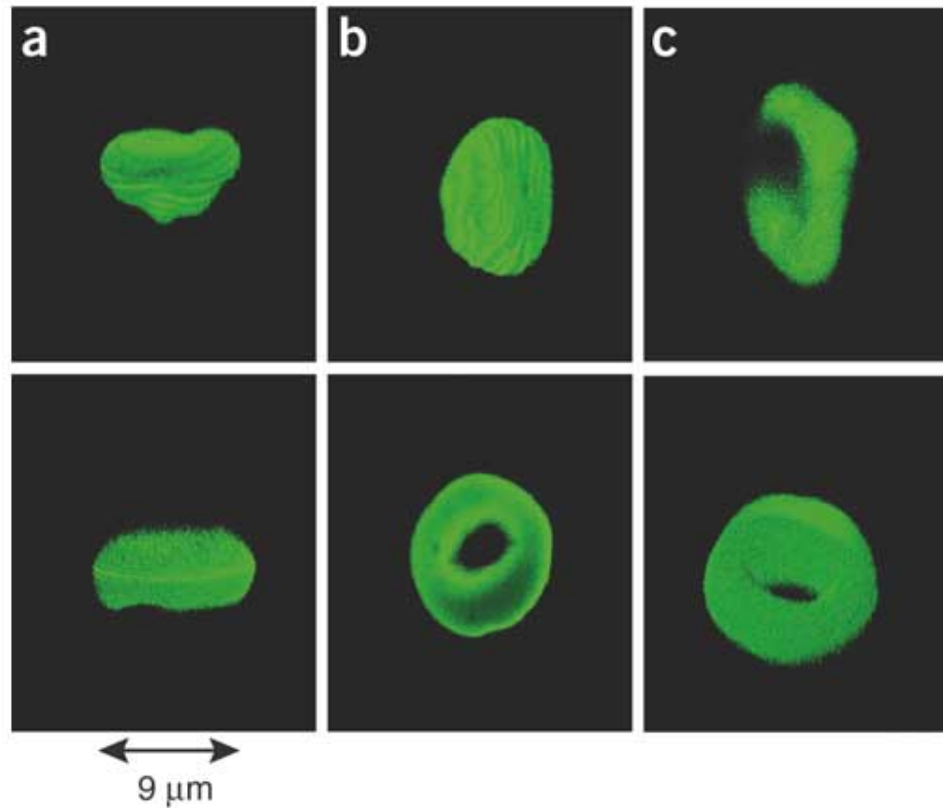
- grote expansie van hematopoietische stamcellen (HSCs)
- volledige differentiatie en enucleatie van de RBCs



In vitro differentiatie rode bloedcellen

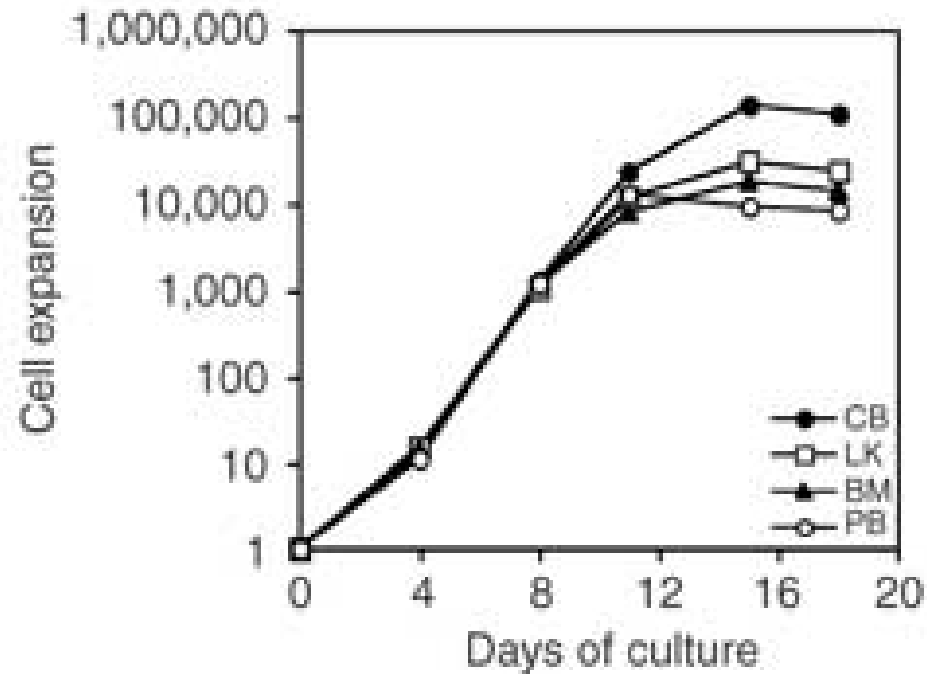


Eigenschappen van *in vitro* gekweekte RBCs



Giarratana et al. Nature Biotechnology

Aantal rode bloedcellen per HSC



Giarratana et al. Nature Biotechnology

Eigenschappen van *in vitro* gekweekte RBCs

- Hemoglobine afhankelijk van de bron van HSCs:
 - HbA voor perifereer bloed en beenmerg
 - HbF voor navelstrengbloed
- Normale vervormbaarheid
- Hemoglobine vertoont normale bindingskarakteristiek voor O₂

Nadelen:

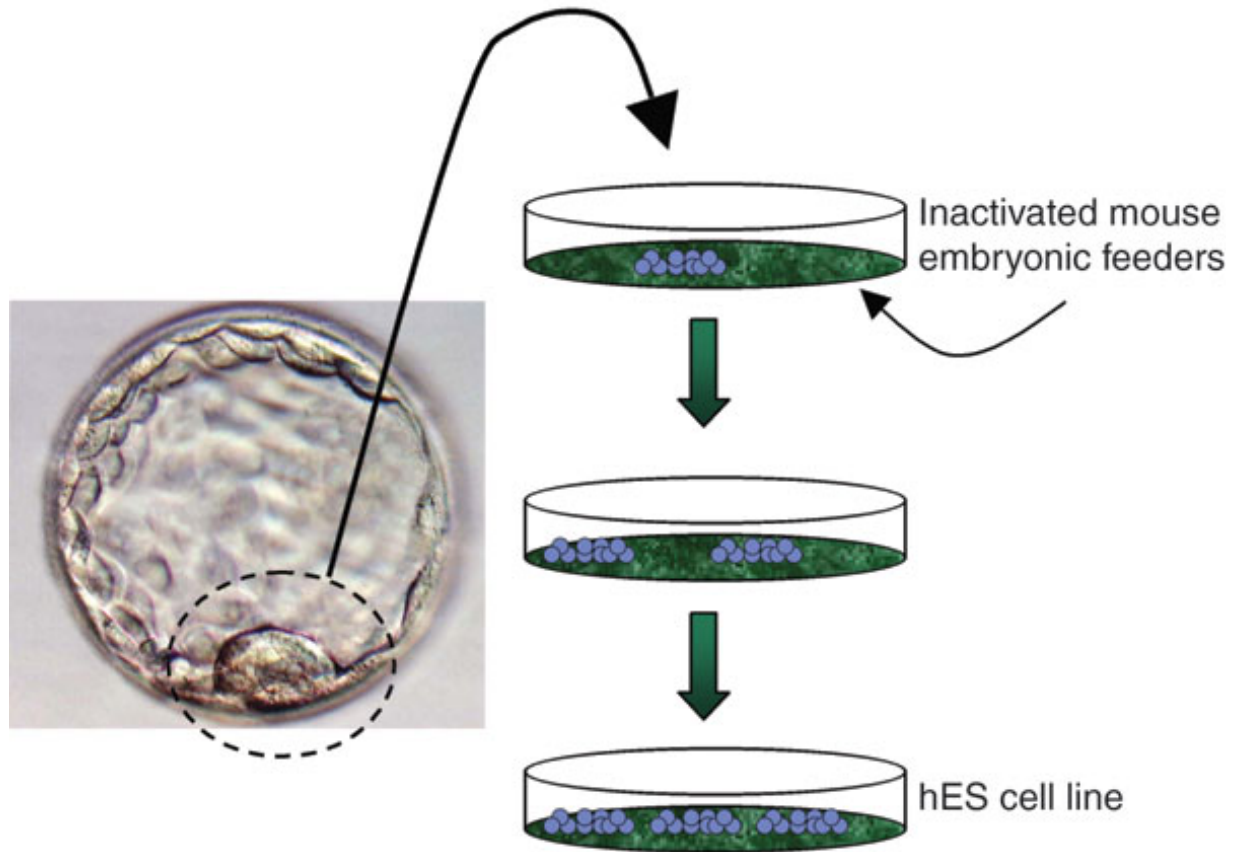
- Geen oneindige deling
- Kans op overdracht virussen en prionen

Gebruik van embryonale stamcellen voor RBC kweken

Recente artikelen (Ma et al., PNAS Sept. 2008 Lu et al., Blood Dec. 2008,) beschrijven het gebruik van humane embryonale stamcellen (hES) voor het kweken van RBCs.



Kweken van embryonale stamcellen



hES als bron voor *in vitro* kweken van RBCs

Functionele tests met RBCs gekweekt uit hES laat zien dat deze cellen zich grotendeels als RBCs gekweekt uit navelstrengbloed gedragen.

Voordelen:

- Eindeloze bron van HSCs
- Universele RBCs (O-Rhesus neg. als uitgangsmateriaal)
- Overdracht pathogenen beter beheersbaar

Nadeel:

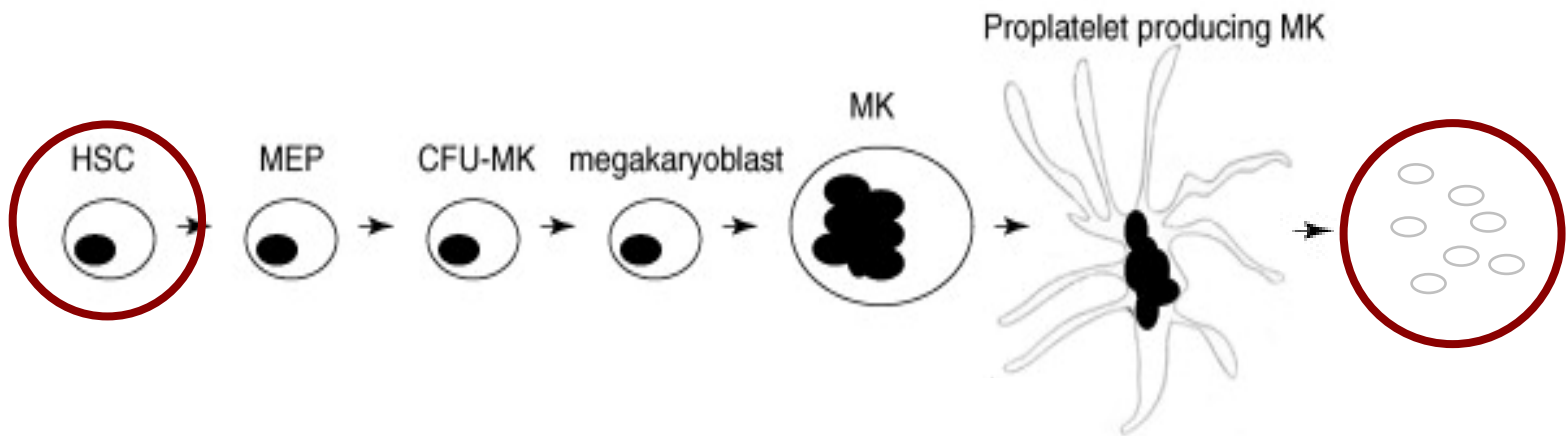
- Kweken hES

Conclusie I

- Het is mogelijk RBCs uit HSC en hES te kweken die morfologisch en functioneel erg op normale RBCs lijken.
- Uitgaande van $2 \cdot 10^6$ HSCs (bloed van 1 navelstreng) genoeg cellen voor 1 transfusie ($2 \cdot 10^{12}$ RBCs).
- Nog niet *in vivo* getest.
- Kweken zijn gecompliceerd en afhankelijk van feeder cellen.

Kosten?

Differentiatie van bloedplaatjes



In vitro kweken van bloedplaatjes

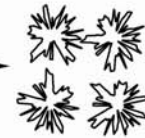
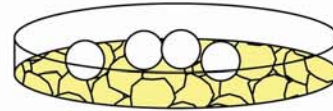
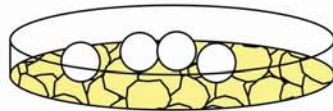
Protocol van Matsunaga et al., Stem Cells 2006

Dag

0-14

15-28

28-33



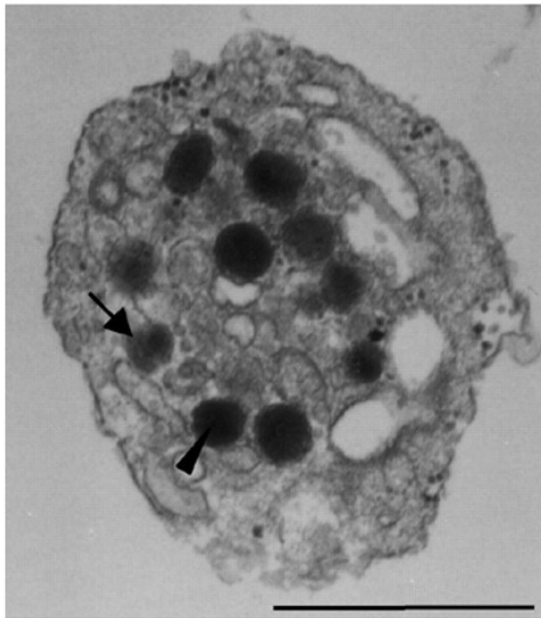
HSC

SCF
TPO
FLT3L

SCF
TPO
FLT3L
IL-11

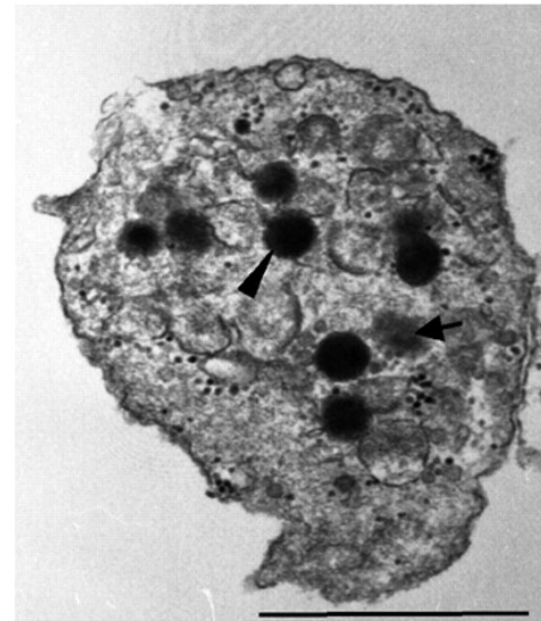
SCF
TPO
FLT3L
IL-11

Morfologie van gekweekte bloedplaatjes



1 μm

Bloedplaatje uit plasma

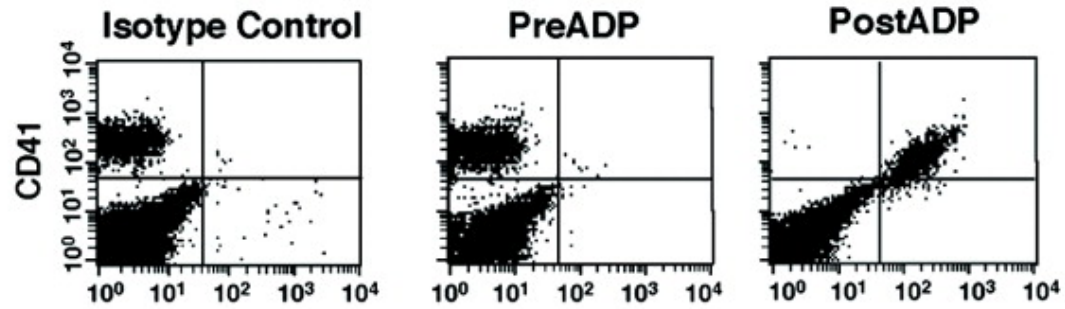


1 μm

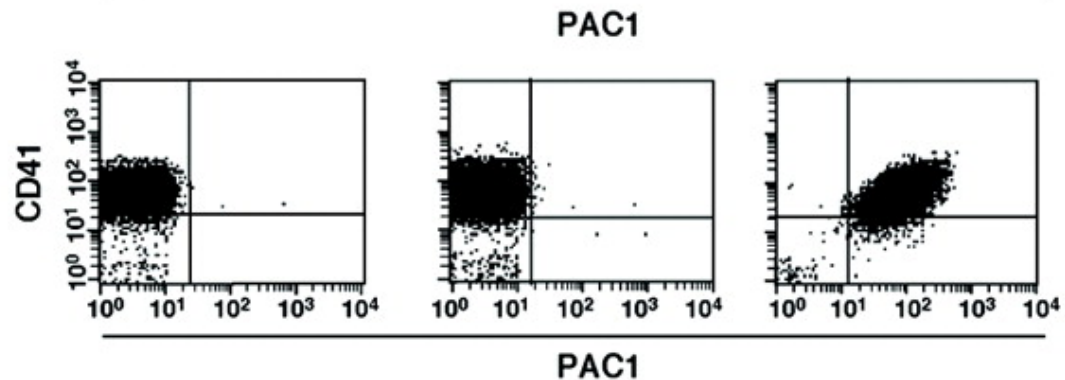
Gekweekt bloedplaatje

Fibrinogeen binding van gekweekte bloedplaatjes

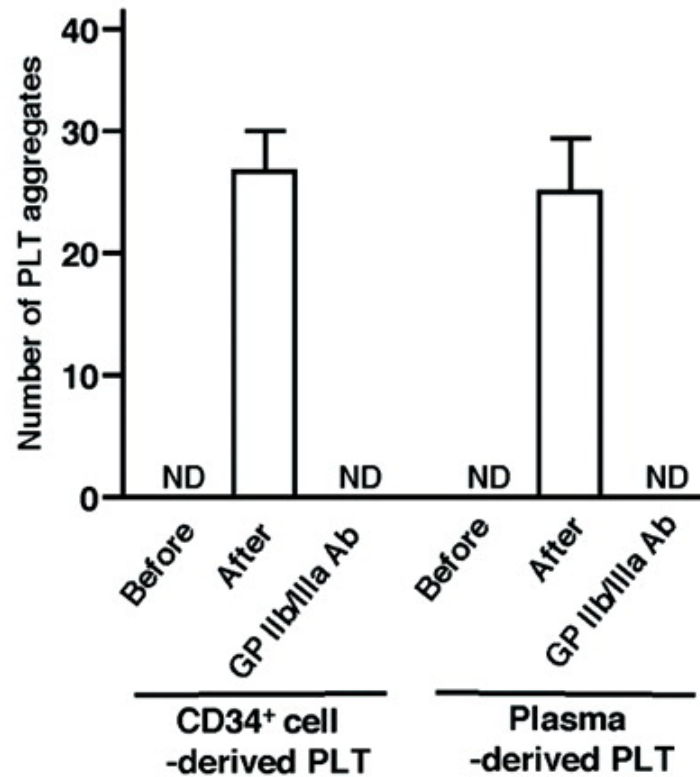
Gekweekte
bloedplaatjes



Bloedplaatjes
uit plasma



Aggregatie van gekweekte bloedplaatjes



Conclusie II

- Het is mogelijk bloedplaatjes uit HSCs te kweken die morfologisch en functioneel op normale bloedplaatjes lijken.
- 10^7 HSCs (bloed van 5 navelstrengen) genereren genoeg cellen voor 1 transfusie ($3 \cdot 10^{11}$ bloedplaatjes).
- Nog niet *in vivo* getest.
- Kweken zijn gecompliceerd en afhankelijk van feeder cellen.

Kosten?



Sanquin

Dus wat is de toekomst?



of



Haalbaar?



In de 3e stap van het protocol van Giarratana et al. worden de RBCs op een concentratie van $6 \cdot 10^6$ cellen/ml op $2,5\text{cm}^2$ feeder cellen gekweekt.

Haalbaar?



Voor een hele eenheid RBCs moet dan 333 liter celsuspensie op 83m² feeder cellen gekweekt worden.

Haalbaar?



De kosten voor het kweken van 1 RBC eenheid bedragen minimaal 20.000,- euro (nu kost een eenheid 170,-).

Haalbaar?



Bij het gebruik van hES liggen de verhoudingen nog ongunstiger (o.a. voorkweek van de hES).

Haalbaar?



In de 1^e stap van het protocol van Matsunaga et al. worden de HSCs op een concentratie van 50 cellen/ml op 7,5cm² feeder cellen gekweekt.

Haalbaar?



Voor het genereren van genoeg voorloper cellen om een plaatjes concentraat te maken is dan 400 liter medium en 150m² feeder cellen nodig.

Haalbaar?



Het medium dat in deze studie wordt gebruikt kost 70,-
euro per liter.....

Haalbaar?



De eerste fase alleen kost dan al 28.000,- euro aan medium.

Conclusie III

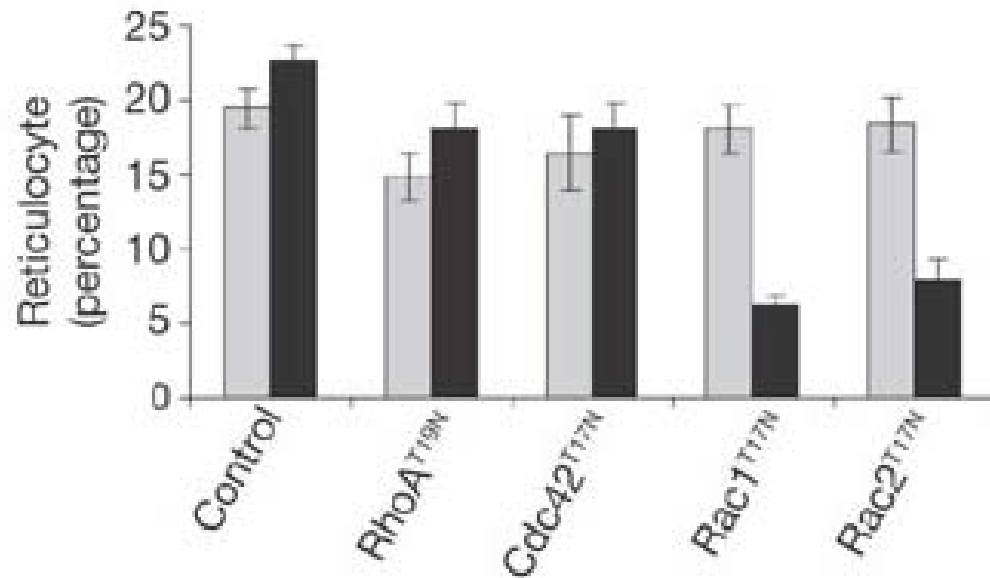
Gebruik van *in vitro* gekweekte bloedcellen nog lang geen vervanging voor donorbloed.

- Technisch: Complex, niet opschaalbaar door gebruik van feederzellen, variabel.
- Duur: Grote hoeveelheden media en groeifactoren nodig.

Voor fundamenteel onderzoek wel van grote waarde.

- Bestudering erythropoïese/thrombocytopoïese
- Bestudering specifieke eiwitten in ontwikkeling/functie van erythrocyten en thrombocyten
- Generatie van erythrocyten/thrombocyten met specifieke antigenen

Bestudering enucleatie in gekweekte RBCs



Ji et al., Nature Cell Biology 2008



Bloedcellen uit de bioreactor: feit of science fiction?

Met dank aan:
Dirk de Korte
Arthur Verhoeven
Daphne Thijssen
Ellen van der Schoot



Sanquin