

MOLECULAR MECHANISMS OF REGULATION OF ERYTHROPOIESIS AND STRESS ERYTHROPOIESIS

MOLEKULARNI MEHANIZMI REGULACIJE ERITROCITOPOEZE I STRES ERITROCITOPOEZE

Sanja Momčilović^{1,2}, Andrija Bogdanović^{1,3}, Sanja Vignjević Petrinović²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Beograd, Srbija

³ Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za hematologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: sanja.momcilovic@imi.bg.ac.rs

Abstract

Erythropoiesis under basal conditions involves the continuous production of new erythrocytes at a constant rate. During the adult period, erythropoiesis takes place primarily in the bone marrow and has a substantial capacity. The regulation of this process is achieved through a multitude of cellular and molecular mechanisms that synergistically act to ensure adequate tissue oxygenation while avoiding viscosity-related issues associated with excessive production. Therefore, this process is regulated through both positive and negative feedback mechanisms. In contrast to the continuous renewal of erythrocytes under basal conditions, disruptions in homeostasis such as bleeding, stress, inflammation, etc., lead to the activation of a process known as stress erythropoiesis. Stress erythropoiesis is a unique process that, in addition to the bone marrow, also occurs extramedullary. Extramedullary erythropoiesis primarily takes place in the red pulp of the spleen, where, under the influence of specific signals within its microenvironment, there is an extensive expansion of immature erythroid cell populations. This process ensures an adequate response to the increased demands for erythropoiesis. This paper elucidates the fundamental molecular mechanisms involved in regulating erythropoiesis under basal conditions and stress erythropoiesis. It highlights the dependency of these molecular mechanisms on the microenvironment in which these processes occur. Understanding the molecular mechanisms that govern erythropoiesis and stress erythropoiesis is crucial for advancing therapeutic strategies for hematological disorders.

Keywords:

molecular mechanisms,
erythropoiesis,
stress erythropoiesis

Sažetak

Eritrocitopoeza u bazalnim uslovima stvara nove eritrocite konstantnom brzinom. U adultnom periodu eritrocitopoeza se odvija u koštanoj srži i ima ogromni kapacitet. Regulacija ovog procesa se ostvaruje posredstvom velikog broja ćelijskih i molekularnih mehanizama koji sinergički deluju kako bi obezbedili adekvatnu oksigenaciju tkiva, a istovremeno izbegavajući probleme sa viskozitetom, povezanim sa prekomernom proizvodnjom. Stoga je ovaj proces regulisan kako mehanizmima pozitivne, tako i mehanizmima negativne povratne sprege. Za razliku od kontinuiranog obnavljanja eritrocita u bazalnim uslovima, u uslovima narušene homeostaze kao što su krvarenje, stres, inflamacija, itd, usled nemogućnosti isporuke dovoljne količine kiseonika u tkiva, dolazi do aktivacije procesa nazvanog stres eritrocitopoeza. Stres eritrocitopoeza predstavlja jedinstven proces koji se, pored koštane srži, odvija i ekstramedularno. Ekstramedularna eritrocitopoeza se, pre svega, odvija u crvenoj pulpi slezine, gde pod uticajem specifičnih signala, nastalih u njenoj mikrosredini, dolazi do nagle ekspanzije nezrelih ćelija eritroidne loze, čime se obezbeđuje adekvatan odgovor na povećane zahteve organizma za eritrocitopoezom. U ovom radu su objašnjeni osnovni molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze u bazalnim uslovima i stres eritrocitopoeze. Posebna pažnja je usmerena na zavisnost molekularnih mehanizama od mikrokruženja u kojem se ovi procesi odvijaju. Razumevanje molekularnih mehanizama koji upravljaju eritrocitopoezom i stres eritrocitopoezom od velikog je značaja za unapređenje terapijskih strategija za hematološke poremećaje.

Ključne reči:

molekularni mehanizmi,
eritrocitopoeza,
stres eritrocitopoeza

Uvod

Eritrocitopoeza, kao sastavni deo hematopoeze, predstavlja strogo regulisan proces pri kome nastaju eritrociti. Glavna uloga ovih ćelija jeste oksigenacija tkiva. Molekularni mehanizmi koji učestvuju u regulaciji eritrocitopoeze obezbeđuju adekvatnu produkciju eritrocita. U uslovima narušene homeostaze, kada dolazi do povećane potrebe za kiseonikom i nesposobnosti organizma da proizvede dovoljan broj eritrocita, aktivira se proces stres eritrocitopoeze (SE) (1). Molekularni mehanizmi koji učestvuju tokom ovih procesa međusobno se razlikuju, pri čemu veliki značaj ima mikrokruženje. Mnoga hematološka oboljenja u osnovi imaju poremećaj na nivou regulacije molekularnih mehanizama. Stoga je razumevanje ovih procesa ključno za razumevanje određenih hematoloških bolesti i razvoj odgovarajućih terapijskih pristupa.

Cilj ovog preglednog članka je da se sumiraju najnovija saznanja o mehanizmima regulacije procesa SE i time doprinese identifikaciji ključnih molekula odgovornih za njenu aktivaciju i kontinuitet. Identifikacija ključnih molekula uključenih u SE značajna je ne samo za rasvetljavanje mehanizama koji regulišu ubranu proliferaciju i diferencijaciju nezrelih ćelija eritroidne loze već može doprineti razvoju novih i potencijalno efikasnijih modaliteta lečenja anemije, imajući u vidu rizik od neželjenih dejstava terapije eritropoetinom, naročito kod onkoloških pacijenata (2), kao i sve učestaliji problem rezistencije na postojeće agense za stimulisanje eritrocitopoeze (engl. *erythropoiesis-stimulating agents* - ESAs) (3).

Eritrocitopoeza

Eritrocitopoeza je kontinuiran proces prilikom koga nastaju crvena krvna zrnca (eritrociti). Zahvaljujući eritrocitopoezi, omogućeno je stalno snabdevanje tkiva i

organa kiseonikom. Ovaj proces je deo šireg hematopoeznog procesa prilikom kojeg nastaju sve ćelijske komponente krvi i odvija se kako tokom adultnog perioda, tako i tokom embrionalnog razvoja.

U adultnom periodu glavno mesto eritrocitopoeze je koštana srž. Diferencijacijom hematopoeznih matičnih ćelija (engl. *hematopoietic stem cells* - HSC) najpre nastaju zajednički mijeloidni progenitori (engl. *common myeloid progenitors* - CMP), megakariocitni/eritroidni progenitori, a zatim i prve prepoznatljive forme eritroidnih progenitora, tzv. BFU-E (engl. *burst-forming unit-erythroid*) ćelije. Progenitori BFU-E su krupne ćelije koje poseduju veliki proliferativni kapacitet i koje se diferenciraju u CFU-E (engl. *colony forming unit-erythroid*). Ćelije CFU-E imaju manju mitotsku aktivnost i poseduju dosta krupnije jedro. Daljom deobom i diferencijacijom dolazi do stvaranja niza morfološki različitih prethodnika eritrocita. Najpre nastaju proeritroblasti (ProE) koji predstavljaju najveće ćelije eritroidne loze. Imaju veliko jedro i 1 - 5 jedaraca, okruženih izrazito bazofilnom citoplazmom. Deobom proeritroblasta nastaju bazofilni eritroblasti. Ove ćelije su manje, sadrže veliki broj slobodnih ribozoma, a jedro često nije vidljivo. Od bazofilnih eritroblasta nastaju polihromatofilni eritroblasti. Ove ćelije su još manje, smanjuje se i jedro, a u citoplazmi koja je predominantno bazofilna mogu se uočiti i acidofilna polja. Daljom deobom polihromatofilnih eritroblasta nastaju acidofilni eritroblasti. Acidofilni eritroblasti se više ne dele već podležu samo procesu sazrevanja, pri čemu je njihovo jedro jako malo, a veći deo zauzima citoplazma koja sadrži dosta hemoglobina. Nakon izbacivanja jedra od strane acidofilnih eritroblasta nastaju retikulociti. Oni napuštaju koštanu srž preko sinusoida i ulaze u krvotok. U ovim ćelijama se još neko vreme vrši sinteza hemoglobina, pri čemu retikulociti u perifernoj krvi sazrevaju u zrele eritrocite u roku od 24 - 48 sati (4).

Regulacija eritrocitopoeze u bazalnim uslovima

Životni vek eritrocita iznosi 120 dana, a odrastao čovek dnevno proizvede 200×10^9 eritrocita (5). U zavisnosti od potražnje, njihova proizvodnja se može prilagoditi i značajno povećati. Sposobnost prilagođavanja proizvodnje eritrocita u zavisnosti od potrebe organizma kontrolisana je složenom koordinacijom velikog broja faktora (6). Eritropoetin (EPO) je glavni regulator eritrocitopoeze. On se sintetiše u peritubularnim ćelijama bubrega, pri čemu njegova proizvodnja zavisi od koncentracije kiseonika u krvi. Osnovni faktor koji reguliše produkciju eritropoetina je hipoksijom indukovani faktor 1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha* - HIF1 α), a njegova stabilnost zavisi od enzima polihidroksilaze i koncentracije kiseonika (7). Prisustvo eritropoetinskih receptora na nezrelim formama ćelija eritroidne loze, pre svega CFU-E i proeritroblastima u većoj meri, kao i smanjenje broja ovih receptora na nemerljiv nivo kod zrelih formi (8) eritroidnih ćelija, ukazuje na značaj eritropoetina u održavanju proliferacije i sposobnosti diferencijacije eritroidnih progenitora. Vezivanje EPO za eritropoetinske receptore (EpoR) na površini eritroidnih progenitora dovodi do aktivacije višestrukih intracelularnih puteva za transdukciju signala. Jedan od glavnih signalnih puteva, posredovan interakcijom EPO/EpoR, jeste aktivacija janus kinaze 2 (JAK2), koja zatim fosforiliše i aktivira pretvarač signala i aktivatora transkripcije 5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5* - STAT5). Drugi nishodni putevi aktivacije uključuju protein kinazu aktiviranu mitogenom (MAPK) i fosfatidilinozitol-3-kinazu (PI3K). Svi ovi putevi su uključeni u regulaciju procesa proliferacije i diferencijacije eritroidnih progenitora (9).

Eritrocitopoeza je regulisana i transkripcionim faktorima. Faktor GATA1 je označen kao glavni transkripcioni faktor koji reguliše diferencijaciju i proliferaciju eritroidnih progenitora. On pokreće eritrocitopoezu regulacijom transkripcije nekoliko gena povezanih sa diferencijacijom ćelija eritroidne loze, antiapoptoznih gena iz porodice BH3, gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, kao i glavnog regulatora ekspresije mRNA za EpoR (10). Za razliku od njega, GATA-2 transkripcioni faktor reguliše održavanje i proliferaciju hematopoeznih matičnih i progenitornih ćelija. On je visokoeksprimiran u HSC i CMP, a njegova ekspresija postepeno opada ka eritroidnim progenitorima (11).

Faktor 1 sličan Krupelu (engl. *Krüppel-like factor 1* - KLF1) još jedan je transkripcioni faktor koji učestvuje u regulaciji embrionalne eritrocitopoeze i eritrocitopoeze u adultnom periodu. Vezuje se u neposrednoj blizini GATA-1 i faktora rasta matičnih ćelija (engl. *stem cell factor* - SCF), što sugeriše da ovi proteini zajedno učestvuju u programu transkripcije. Ekspresija i aktivnost KLF1 je strogo regulisana tokom diferencijacije (12). Faktor 1 sličan Krupelu je protein koga ima u izobilju u eritroidnim ćelijama i sadrži tri C2H2 cink prsta na svom C-kraju.

Njegova primarna uloga u eritrocitopoezi je aktivacija transkripcije gena koji inhibiraju diferencijaciju megakariocita, a promovišu ranu diferencijaciju eritrocita (13). Igra važnu ulogu u završnim fazama ćelijskog ciklusa i kondenzacije hromatina, koji stimulišu proizvodnju eritrocita. U nedostatku KLF1 denuklearizacija eritrocita je poremećena, a proliferacija eritrocita je povećana. Iako je KLF1 pretežno aktivator transkripcije, može delovati i kao inhibitor transkripcije (14).

Neophodnost prisustva SCF i interleukina 3 (IL-3), pored EPO za rast BFU-E ćelija u *in vitro* uslovima, ukazuje na značaj ovih molekula za preživljavanje nezrelih ćelija eritroidne loze. Faktor rasta matičnih ćelija se vezuje za svoj receptor c-kit, tirozin kinazu koja aktivira nekoliko signalnih molekula, uključujući PI3K, Src kinaze i fosfolipaze C i D- γ (PLC- γ). Eritropoetin i SCF deluju sinergički kako bi povećali proizvodnju eritrocita putem nekoliko molekularnih mehanizama. Faktor rasta matičnih ćelija povećava osetljivost ćelija na EPO pa je, samim, tim zahtev za EPO manji prilikom proliferacije, dok istovremeno SCF usporava diferencijaciju eritroidnih progenitora, što može dovesti do ekspanzije ovih ćelija (15, 16).

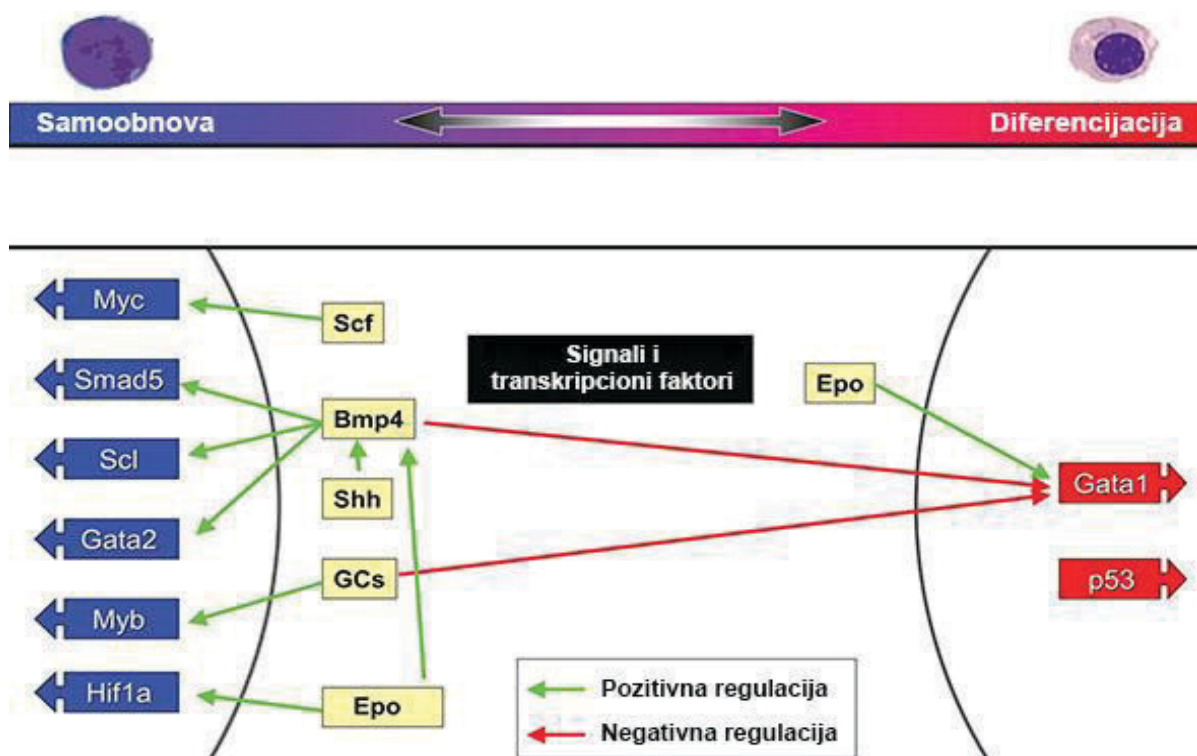
Eritrocitopoeza je regulisana i parakrinim efektom ćelija eritroidne loze. Naime, zreli eritroblasti inhibiraju preživljavanje i diferencijaciju nezrelih eritroblasta kroz Fas/Fas-L interakcije, pri čemu su Fas ligandi ekspimirani na zrelih eritroidnim ćelijama, a Fas receptori su prisutni na površini nezrelih eritroblasta (povećana ekspresija sa BFU-E na CFU-E ćelije, da bi se dostigao maksimalni nivo u stadijumu proeritroblasta i bazofilnih eritroblasta) (17). Osetljivost na Fas-L povećana je citokinima koji indukuju ćelijski ciklus eritroidnih progenitora, uključujući SCF, IL-3 i trombopoetin (TPO).

Eritrocitopoeza se u bazalnim uslovima odvija unutar mikrookruženja koštane srži. Specijalizovane niše u kojima dolazi do razmnožavanja, diferencijacije i enukleacije eritroblasta nazivaju se eritroblastna ostrva (engl. *Erythroid Blast Island* - EBI). Postoje dva tipa EBI. Prvi, tzv. nezrela EBI, koja su udaljena od sinusoida, sadrže centralno pozicioniran makrofag koji je sitniji i kupastog oblika, a oko njega se uglavnom nalaze proeritroblasti. Drugi tip su zrela EBI koja se nalaze u blizini sinusoida i sadrže veći makrofag koji je okružen, pre svega, acidofilnim eritroblastima. Tokom sazrevanja eritrocita dolazi i do migracije EBI prema sinusoidu (18). Interakcija između samih eritroblasta, kao i između centralnih makrofaga i eritroblasta unutar EBI ključna je za preživljavanje i sazrevanje eritroblasta. Protein makrofaga i eritroblasta (engl. *erythroid macrophage protein* - EMP) predstavlja transmembranski protein koji je prisutan i kod eritroblasta i kod makrofaga i ima ulogu u interakcijama između eritroblasta, kao i u interakcijama eritroblasta sa makrofagom putem homofilnog vezivanja (19). Citoplazmatski domen EMP sadrži nekoliko potencijalnih mesta vezivanja za SH2 domene i potencijalno mesto vezivanja za domen koji vezuje fosfotirozin, što ukazuje na signalnu funkciju ovog proteina. Vezivanje eritroblasta/centralnog makrofaga unutar ostrva posredovano je i integrinom eritroblasta, $\alpha 4 \beta 1$, sa

U uslovima narušene homeostaze, kao što su krvarenje, stres, inflamacija i dr, usled nemogućnosti adekvatnog

snabdevanja tkiva kiseonikom dolazi do aktivacije SE (1). Naime, usled nemogućnosti koštane srži da proizvede dovoljan broj eritrocita, proces eritrocitopoeze se odvija i van nje i označava se kao ekstramedularna eritrocitopoeza. Ispitivanja ovakvog oblika eritrocitopoeze najviše su rađena na miševima. Pokazano je da tokom stres eritrocitopoeze u slezini nastaju potpuno drugačiji progenitori koji se označavaju kao stres BFU-E. Stres BFU-E formiraju veće kolonije za kraći vremenski period i, za razliku od BFU-E koštane srži, mogu da rastu samo uz prisustvo EPO, što ih čini sličnim fetalnim BFU-E (32) (**slika 1**).

Usled narušene homeostaze dolazi do povećane produkcije proinflamatornih citokina koji stimulišu povećanu produkciju ćelija imunog sistema, pa samim tim i ćelija monocitno/makrofagne loze. U ovakvim stanjima, makrofagi slezine produkuju monocitni hemotaksni protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1) koji regrutuje cirkulišuće monocite i učestvuju u formiranju novih EBI u slezini. Makrofagi slezine regulišu cirkulaciju eritroidnih ćelija slezine uklanjanjem starih i oštećenih eritrocita i reaguju sa eritroidnim progenitorima. Interakcija se i ovde odvija putem adhezivnih molekula i produkcijom citokina. Međutim, ispitivanjem pojedinih mutacija je otkriveno da određeni adhezivni molekuli imaju veću ulogu tokom SE, dok su drugi tokom eritrocitopoeze u stabilnom stanju (33, 34). Mutacija u genu za $\alpha 4\beta 1$ integrin pokazuje mali efekat tokom eritrocitopoeze u bazalnim uslovima, ali pokazuje odloženi oporavak nakon akutne anemije (33). Nasuprot tome, mutacija gena EMP remeti eritrocitopoezu u bazalnim uslovima, dok je SE očuvana (35). Pokazano je da eliminacijom makrofaga u in vivo i in vitro uslovima izostaje SE (36, 37). Stres eritrocitopoeza je podržana i od strane mezenhimalnih stromalnih ćelija slezine koje produkuju hemokin ligand 12 (engl. *stromal cell-derived factor 1* - SDF-1), SCF i homeoboks 1 T ćelijske



Slika 1. Mehanizmi samoobnove BFU-E ćelija. Modifikovano prema *Hattangadi* i sar. (6)

leukemije (engl. *T-cell leukemia homeobox 1* - TLX1) koji učestvuju u formiranju EBI (38,39). Pod dejstvom ovih faktora dolazi do migracije specijalnih hematopoeznih matičnih ćelija (engl. *short-term hematopoietic stem cells* - ST-HSC), okarakterisanih kao CD34⁺Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ ćelije, iz koštane srži u slezinu (40). Po dolasku do slezine, signali u mikrokruženju slezine usmeravaju ove ćelije ka eritroidnoj lozi. Ključni signali u ovom procesu su *Hedgehog* i koštani morfogenetski protein 4 (engl. *bone morphogenetic protein* - BMP4) (41). *Hedgehog* signalizacija indukuje ST-HSC da eksprimiraju BMP4, a zatim sinergički deluju u stvaranju stres BFU-E. Izmene u signalnom putu *Hedgehog* ne utiču na eritrocitopoezu u stabilnom stanju. Nasuprot tome, gubitak signalizacije *Hedgehog* sprečava održavanje puta koji zavisi od BMP4.

Molekul BMP4 je glavni u održavanju SE. Pripada tzv. familiji TGF- β , pri čemu svoje dejstvo ispoljava vezivanjem za specifične receptore BMPR (engl. *bone morphogenetic protein receptor*) tipa I i II. Aktivacija ovih receptora dovodi do aktivacije SMAD5 (42) signalnog puta, koji za posledicu ima ekspanziju stres BFU-E ćelija. Značaj ovog molekula pokazan je na tzv. *Flexed-tail* (f/f) miševima koji razvijaju anemiju tokom neonatalnog i fetalnog perioda, koja se povlači dve nedelje nakon rođenja (43). Mutacija kod f/f miševa zahvata genetski kod koji kodira sintezu proteina SMAD5, transkripcionog faktora u nishodnom putu aktivacije signalnog molekula BMP4 (44).

Deo ST-HSC ostaje na nivou nezrelih eritroidnih stres progenitora (SEP) ne bi li se njihovom proliferacijom obezbedio dovoljan broj progenitora koji mogu adekvatno odgovoriti na uslove povećane potrebe za eritrocitima. Ulogu u ekspanziji ovih ćelija imaju faktor diferencijacije rasta 15 (GDF15) i Wnt signalni put (45,46). U ovom procesu, osim njih, učestvuju i c-kit receptor i njegov ligand SCF (47). Mutacija c-kit ili SCF dovodi do makrocitne anemije, što ukazuje na potrebu za ovim signalnim putem kako u stabilnom stanju, tako i tokom eritrocitopoeze zavisne od BMP4 (48).

Neadekvatna oksigenacija tkiva dovodi do produkcije HIF1 α koji potom reguliše produkciju EPO u peritubularnim ćelijama bubrega i na taj način reguliše SE. Ispitivanja su pokazala da kultivacija BFU-E iz ljudske koštane srži i pupčane krvi, kao i iz mišje fetalne jetre i koštane srži u uslovima hipoksije rezultira povećanim brojem i većom veličinom BFU-E u poređenju sa kultivacijom ovih ćelija u uslovima normoksije (49-52). Hipoksija indukuje i ekspresiju BMP4 u stromalnim ćelijama slezine (53). Perry i sar. pokazali su da BFU-E dostižu proliferativni maksimum tek nakon kultivacije ovih ćelija u uslovima hipoksije uz prisustvo BMP4, EPO i SCF (46).

Eritropoetin, čija je produkcija povećana tokom SE, deluje na SEP, pri čemu one gube sposobnost proliferacije i počinju diferencijaciju ka eritroidnim ćelijama. Razlika u mikrokruženju između slezine i koštane srži dovodi do toga da u slezini EPO ne deluje direktno na SEP već posredstvom makrofaga. Signalizacija EPO menja signale koje generišu makrofagi, inhibirajući ekspresiju Wnt faktora, koji promovišu proliferaciju i povećavaju

proizvodnju prostaglandina (PGJ2 i PGE2) i na taj način promovišu diferencijaciju (54,55). Tokom ovog procesa SEP gube ekspresiju markera matičnih ćelija i počinju da eksprimiraju EpoR, koji pokreće terminalnu diferencijaciju eritroidnih ćelija. Drugi protein koji doprinosi ovoj tranziciji je glukokortikoidni hormon. Glukokortikoidni hormon je hormon nadbubrežne žlezde koji se pojačano luči tokom stresa. Njegov uticaj na eritrocitopoezu ogleda se i kod pacijenata na terapiji glukokortikoidima koji, kao neželjeni efekat, razvijaju policitemiju. Glukokortikoidi deluju zajedno sa EPO i c-kit receptorom, obezbeđujući proliferaciju eritroidnih progenitora, ali i diferencijaciju ovih ćelija tokom SE (56). U uslovima hroničnog psihološkog stresa, kada dolazi do razvoja stres eritrocitopoeze, glukokortikoidi utiču na povećanu proliferaciju BFU-E i CFU-E u slezini. Glukokortikoidi deluju preko svojih glukokortikoidnih receptora, čijom blokadom tokom SE izostaje povećanje broja CFU-E u slezini (57).

Zaključak

Eritrocitopoeza u bazalnim uslovima i SE predstavljaju procese koji su strogo regulisani velikim brojem molekularnih mehanizama, pri čemu razlika u mikrokruženju između koštane srži i slezine utiče na specifičnost ovih procesa. Sveobuhvatno razumevanje molekularnih mehanizama koji upravljaju eritrocitopoezom i SE od velikog je značaja za unapređenje terapijskih strategija za hematološke poremećaje, kao što su anemija i policitemija. Buduća istraživanja mogu otkriti nove strateške ciljeve za modulaciju ovih procesa, na kraju poboljšavajući kako lečenje i tok određenih hematoloških bolesti, tako i našu sposobnost da iskoristimo regenerativni potencijal ćelija eritroidne loze kao odgovor na fiziološke i patološke izazove.

Literatura

1. Paulson RE, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18(3):139-45.
2. Schoen MW, Hoque S, Witherspoon BJ, Schooley B, Sartor O, Yang YT, et al. End of an era for erythropoiesis-stimulating agents in oncology. *Int J Cancer*. 2020; 146(10):2829-35.
3. Mase K, Yamagata K, Yamamoto H, Tsuruya K, Hase H, Nishi S, et al. Predictors of hyporesponsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease (RADIANCE-CKD Study). *Am J Nephrol*. 2023; 54(11-12):471-8.
4. Mačukanović-Golubović M, Antić S, Avramović M, Buzurović M, Deljanin Ilić M, Ilić S, et al. Poremećaji eritrocitne loze. U: Ilić S, urednici. *Interna medicina*. Niš, Medicinski fakultet Niš; 2009.
5. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*. 2014; 5:3.
6. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 2011; 118(24):6258-68.
7. Halawi R, Moukhadder H, Taher A. Anemia in the elderly: a consequence of aging? *Expert Rev Hematol*. 2017; 10(4):327-35.
8. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*. 1991; 77(12):2583-90.
9. Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, Teng R,

- Noguchi CT. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(6):10296-333.
10. Valent P, Büsche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica.* 2018; 103(10):1593-603.
11. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol.* 2014; 100(5):417-24.
12. Yien YY, Bieker JJ. EKLF/KLF1, a tissue-restricted integrator of transcription control, chromatin remodeling, and lineage determination. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(1):4-13.
13. Kim MY, Yan B, Huang S, Qiu Y. Regulating the Regulators: The Role of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) in Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(22):8460.
14. Caulier AL, Sankaran VG. Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis. *Blood.* 2022; 139(16):2450-9.
15. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(3):a011619.
16. Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature.* 1995; 377(6546):242-6.
17. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood.* 1999; 93(3):796-803.
18. Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Vet Med Sci.* 2003; 65(4):449-52.
19. Javan GT, Salhotra A, Finley SJ, Soni S. Erythroblast macrophage protein (Emp): Past, present, and future. *Eur J Haematol.* 2018; 100(1):3-9.
20. Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med.* 1995; 181(1):411-5.
21. Lee G, Lo A, Short SA, Mankelov TJ, Spring F, Parsons SF, et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood.* 2006; 108(6):2064-71.
22. Seu KG, Papoin J, Fessler R, Hom J, Huang G, Mohandas N, et al. Unraveling Macrophage Heterogeneity in Erythroblastic Islands. *Front Immunol.* 2017; 8:1140.
23. Li W, Wang Y, Zhao H, Zhang H, Xu Y, Wang S, et al. Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood.* 2019; 134(5):480-91.
24. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance S, et al. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118(2):583-96.
25. Tordjman R, Delaire S, Plouët J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, et al. Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood.* 2001; 97(7):1968-74.
26. Akinosoglou KS, Solomou EE, Gogos CA. Malaria: a haematological disease. *Hematology.* 2012; 17(2):106-14.
27. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzakowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood.* 2001; 97(10):3075-85.
28. Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, Bassini A, Papa S, Alnemri ES, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood.* 2000; 95(12):3716-24.
29. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E et al. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol.* 2000; 28(8):885-94.
30. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 1999; 401(6752):489-93.
31. Libregts SF, Gutiérrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, et al. Chronic IFN- γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood.* 2011; 118(9):2578-88.
32. Valtieri M, Gabbianelli M, Pelosi E, Bassano E, Petti S, Russo G, et al. Erythropoietin alone induces erythroid burst formation by human embryonic but not adult BFU-E in unicellular serum-free culture. *Blood.* 1989; 74(1):460-70.
33. Ulyanova T, Jiang Y, Padilla S, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Combinatorial and distinct roles of α_5 and α_4 integrins in stress erythropoiesis in mice. *Blood.* 2011; 117(3):975-85.
34. Ulyanova T, Padilla SM, Papayannopoulou T. Stage-specific functional roles of integrins in murine erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2014; 42(5):404-9.e4.
35. Wei Q, Boulais PE, Zhang D, Pinho S, Tanaka M, Frenette PS. Maf expressed by macrophages, but not erythroblasts, maintains postnatal murine bone marrow erythroblastic islands. *Blood.* 2019; 133(11):1222-32.
36. Momčilović S, Bogdanović A, Milošević MS, Mojsilović S, Marković DC, Kočović DM, et al. Macrophages Provide Essential Support for Erythropoiesis, and Extracellular ATP Contributes to a Erythropoiesis-Supportive Microenvironment during Repeated Psychological Stress. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(14):11373.
37. Xiang J, Wu DC, Chen Y, Paulson RF. In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. *Blood.* 2015; 125(11):1803-12.
38. Oda A, Tezuka T, Ueno Y, Hosoda S, Amemiya Y, Notsu C, et al. Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1. *Sci Rep.* 2018; 8(1):8308.
39. Wang X, Cho SY, Hu CS, Chen D, Roboz J, Hoffman R. C-X-C motif chemokine 12 influences the development of extramedullary hematopoiesis in the spleens of myelofibrosis patients. *Exp Hematol.* 2015; 43(2):100-9.e1.
40. Harandi OF, Hedge S, Wu DC, McKeone D, Paulson RF. Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. *J Clin Invest.* 2010; 120(12):4507-19.
41. Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood.* 2009; 113(4):911-8.
42. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(5-6):343-55.
43. Cole RJ, Regan T. Haemopoietic progenitor cells in prenatal congenitally anaemic 'flexed-tailed' (f/f) mice. *Br J Haematol.* 1976; 33(3):387-94.
44. Hegde S, Lenox LE, Lariviere A, Porayette P, Perry JM, Yon M, et al. An intronic sequence mutated in flexed-tail mice regulates splicing of Smad5. *Mamm Genome.* 2007; 18(12):852-60.
45. Hao S, Xiang J, Wu DC, Fraser JW, Ruan B, Cai J et al. Gdf15 regulates murine stress erythroid progenitor proliferation and the development of the stress erythropoiesis niche. *Blood Adv.* 2019; 3(14):2205-17.
46. Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood.* 2007; 109(10):4494-502.
47. Sanja Vignjević. Čelijski i molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet. 2014.
48. Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet.* 1979; 20:357-459.
49. Cipolleschi MG, D'Ippolito G, Bernabei PA, Caporale R, Nannini R, Mariani M, et al. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol.* 1997; 25(11):1187-94.
50. Lu L, Broxmeyer HE. Comparative influences of phytohemagglutinin-stimulated leukocyte conditioned medium, hemin, prostaglandin E, and low oxygen tension on colony formation by erythroid progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol.* 1985; 13(10):989-93.

51. Maeda H, Hotta T, Yamada H. Enhanced colony formation of human hemopoietic stem cells in reduced oxygen tension. *Exp Hematol.* 1986; 14(10):930-4.
52. Rich IN, Kubanek B. The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. *Br J Haematol.* 1982; 52(4):579-88.
53. Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood.* 2005; 105(7):2741-8.
54. Chen Y, Xiang J, Qian F, Diwakar BT, Ruan B, Hao S, et al. Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. *Blood.* 2020; 136(2):235-46.
55. Lau CI, Outram SV, Saldaña JI, Furmanski AL, Dessens JT, Crompton T. Regulation of murine normal and stress-induced erythropoiesis by Desert Hedgehog. *Blood.* 2012; 119(20):4741-51.
56. Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, et al. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* 1999; 13(22):2996-3002.
57. Vignjevic S, Budec M, Markovic D, Dikic D, Mitrovic O, Diklic M, et al. Glucocorticoid receptor mediates the expansion of splenic late erythroid progenitors during chronic psychological stress. *J Physiol Pharmacol.* 2015; 66(1):91-100.