

Application of a Modified Immunomagnetic Positive Selection Method for Isolation of Human CD34⁺ Stem/Progenitor from Cord Blood

¹Ranad Al-Kadry; ¹Souad Al-Okla; ²Majed Al-Jamali; and ³Lama Youssef

¹Dept. of Biology, Faculty of Sciences

²Dept. of Biochemistry and Microbiology, Faculty of pharmacy

³Dept. of Pharmaceutics, Faculty of pharmacy,
University of Damascus, Damascus, Syria

ABSTRACT

ID # (2777)

Received: 13/09/2013

In-revised: 22/10/2013

Corresponding Author;

Souad Al-Okla

E-mail: soka65@yahoo.com

KEYWORDS

Hematopoietic stem cells (HSCs), CD34⁺ cells, Human umbilical cord blood, immunomagnetic separation, Immunophenotyping, Hematopoietic progenitors.

Umbilical cord blood (UCB) and isolated umbilical cord blood stem cells (UCBSCs) have become an alternative source of hematopoietic progenitor cells for transplantation. The aim of this study was to test the effectiveness of some modifications of human hematopoietic stem cells isolation protocols with the intention of improving the output and viability of CD34⁺ cells and progenitor subpopulations progeny that can be obtained from a sample of human umbilical cord blood. By that, we contribute to current studies on the human hematopoietic stem cells (HSCs) in order to bank UCB units suitable for basic research of very-long-term hematopoietic as well as for transplantation. Cord blood samples were transformed to buffy coat prior to the isolation of HSCs which was performed by two steps involving CD34 pre-enrichment using human cord blood CD34 positive selection kit and an Immunomagnetic cell separation, targeting CD34 surface antigen. CD34⁺ cells were immunophenotyped by four-color fluorescence, using a large panel of monoclonal antibodies (CD34/PE, CD45/FITC, CD38/APC, CD33/Per-Cy, HLA-DR/PE, CD117/APC, CD123/Per-Cy, CD105-FITC, CD56/PE, CD14/Per-Cy, CD19/Per-Cy and CD3/APC) recognizing different lineage or activation antigens. Our results showed that the percentage of CD34⁺ cells in whole human cord blood samples was 0.02% of total cells. After isolation by two-step, combining CD34 pre-enrichment and Immunomagnetic isolation, the frequency of CD34⁺ stem cells represented 0.65% among total MNCs and 83.53% among total isolated cells. This isolation led to a purity of over 95% and viability of 98.60%. In addition, we found that the percentage of CD34⁺ cells which are CD45⁺ was 83.53%, whereas CD34⁺CD38⁻ cells comprised 21.70%. About 70.85% of isolated CD34⁺ cells were characterized by the absence of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR). Concerning the CD117, CD33, CD123 and CD105 antigens which characterize true stem cells, we found a high expression percentage among isolated HUCB CD34⁺ cells (81.26%, 57.14%, 47.45%, 58.52% for CD117, CD33, CD123 and CD105, respectively), while a very small number displayed markers of advanced myeloid commitment, such as CD14 (Myeloid lineage, 0.7%) and CD56 (NK-cell lineage, 4.48%), or those of lymphoid differentiation: CD3 (T-cell lineage, 5.22%), and CD19 (B-cell lineage, 1.76%). After testing 12 samples of cord blood using modified positive magnetic isolation technique, no variations in subpopulations were observed from sample to sample. We conclude that our modified technique enabled us to obtain an important proportion of primitive hematopoietic progenitors, as suggested by the absence of HLA-DR and CD38, as well as the presence of CD117, CD33, CD123, and CD105 on their surface. These cells are recognized as having long-term reconstitution capacity within the human CD34⁺ cell population.

تطبيق طريقة مُعدّلة للانتقاء المناعي الايجابي لعزل الخلايا الجذعية⁺ CD34 والخلايا السليقة البشرية من دم الحبل السري

¹رناد القادري، ²اسعاد العقلة، ³مجد الجمالي، و ³لمى يوسف

¹ قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم
² قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة
³ قسم الصيدلانيات، كلية الصيدلة
جامعة دمشق، دمشق، سوريا

المُستخلص

أصبح دم الحبل السري والخلايا الجذعية المعزولة من دم الحبل السري يشكلان المصدر البديل لسلالات الخلايا المؤلدة للدم التي تستعمل في عمليات الاغتراس. تهدف هذه الدراسة إلى اختبار فعالية بعض التعديلات على طرق عزل الخلايا الجذعية البشرية المؤلدة للدم بغية تحسين مردود وحيوية نساقل الخلايا CD34+ وتحت المجموعات السليقة التي يمكن الحصول عليها من دم الحبل السري البشري ويمكن المساهمة من خلال ذلك في الدراسات الحالية على الخلايا الجذعية المؤلدة للدم البشرية بغية حفظ عينات قابلة للاستعمال في الدراسات البحثية الأساسية على الخلايا المؤلدة للدم طويلة الأمد والفعالة في عمليات الاغتراس. حُوّلت عينات دم الحبل السري إلى غلالة بيضاء قبل عزل الخلايا الجذعية المؤلدة للدم والتي أجريت على مرحلتين تضمنتا: الإغناء الأولي بالخلايا CD34+ باستعمال عتيدة خاصة بالانتقاء الإيجابي للخلايا CD34+ من دم الحبل السري البشري، ومن ثم الفصل الخلوي المناعي المغناطيسي الذي استهدف المستضد السطحي CD34. نُمِطت الخلايا CD34+ مناعياً بإمرار الخلايا في جهاز التدفق الخلوي رباعي اللون، وباستعمال مجموعة كبيرة من الأضداد وحيدة النسيلة (CD34/PE، CD45/FITC، CD38/APC، CD33/Per-Cy، و HLA-DR/PE، و CD117/APC، و CD123/Per-Cy، و CD105-FITC، و CD56/PE، و CD14/Per-Cy، و CD19/Per-Cy، و CD3/APC) وتتعرف على مستضدات نسيلية أو مُفعّلة مختلفة. وقد بينت نتائجنا أن النسبة المئوية للخلايا CD34+ في عينة دم الحبل السري بلغت 0.02 % من مجموع الخلايا. وشكل تواتر الخلايا الجذعية CD34+، بعد عزلها بإتباع مرحلتين ترافق فيهما الإغناء الأولي بالخلايا CD34+ بالعزل المغناطيسي المناعي، 0.65 % من مجموع الخلايا وحيدة النواة و 83.53 % من مجموع الخلايا المعزولة. ولقد قاد هذا العزل إلى الحصول على هذه الخلايا بنقاوة تزيد على 95 % وحيوية 98.60 %. كما وجدنا أن النسبة المئوية للخلايا CD34+ الإيجابية للمستضد CD45 هي 83.53 %، بينما تبين أن الخلايا CD34+CD38- تُشكّل 21.70 % من الخلايا CD34+ ووُصِفَت حوالي 70.85 % من الخلايا CD34+ المعزولة بغياب مستضد الكريات البيضاء من النمط DR (HLA-DR). وفي ما يتعلق بالمستضدات CD117 و CD33 و CD123 و CD105 التي تُميّز الخلايا الجذعية الحقيقية، فلقد أشارت نتائجنا إلى ارتفاع نسبة التعبير عنها بين الخلايا CD34+ (81.26 % و 57.14 % و 47.45 % و 58.52 % للواسمات CD117 و CD33 و CD123 و CD105، على التوالي)، بينما أبدت مجموعة صغيرة جداً من الخلايا واسمات الخلايا التي تلتزم الخط النقوي المُتقدّم كما هو حال الواسمة CD14 (سلالة وحيدات النوى، 0.7 %) و CD56 (سلالة القتل الطبيعيين، 4.48 %) أو تلك الخاصة بالتمايز اللمفي: CD3 (سلالة اللمفاويات التائية، 5.22 %) و CD19 (سلالة اللمفاويات البائية، 1.76 %). تم في هذه الدراسة اختبار 12 عينة من دم الحبل السري باستعمال تقنية العزل المغناطيسي الإيجابي المُعدّلة ولم يتم ملاحظة أي اختلافات معنوية في النسب المئوية لتحت المجموعات المعزولة. وبالتالي نستنتج أن طريقتنا المُعدّلة مكننتنا من الحصول على نسبة مهمة من السلالات الأولية المؤلدة للدم التي تتصف بغياب مستضد الكريات البيض HLA-DR والواسمة CD38 وبوجود المستضدات CD117 و CD33 و CD123 و CD105 على سطوحها. وتعرف هذه الخلايا بقدرتها على الترميم طويل الأمد من بين الخلايا CD34+ البشرية.

رقم المسودة: (2777)

استلام المسودة: 2013/09/13

استلام المعدلة: 2013/10/22

الباحث المراسل:

اسعاد العقلة

بريد الكتروني:

soka65@yahoo.com

الكلمات الدالة

الخلايا الجذعية المؤلدة للدم، الخلايا

CD34+، دم الحبل السري البشري،

العزل المناعي المغناطيسي،

التنميط المناعي، السلالات المؤلدة للدم

المقدمة

المثال، تتصف هذه الخلايا بالتعبير المرتفع bright عن الواسمة CD34 خلال المراحل المبكرة من تطورها في نقي العظم أو في دم الحبل السري البشري، وهي تضم تحت مجموعات من الخلايا ذات خصائص سليفة. ويترافق التعبير عن الواسمة CD34 بالتعبير المتوسط عن الواسمة CD45 والواسمة CD133، وعن مستضد الكريات البيض (human leukocyte antigen-DR (HLA-DR). بينما يكون التعبير عن الواسمة CD90 متبدلاً، ومنخفضاً إلى متوسطاً للواسمة CD13، ومنخفضاً للواسمة CD117، و CD123 و CD135، ومنخفضاً جداً للواسمة CD33، ومنخفضاً أو غائبا للواسمة CD38. ولا تُعبر الخلايا الجذعية المؤلفة للدم والخلايا السليفة في هذه المرحلة عن المستضدات التي تُميز خط خلوي مُحَدَد أو عن مستضدات المراحل المبكرة من التمايز. ومع النضج الأولي لهذه الخلايا، تبدأ بالانقسام والتكاثر وتكتسب التعبير عن الواسمة CD38 و CD117، ويترجع وبشكل طفيف التعبير عن الواسمة CD34 والواسمة CD133، وينخفض التعبير عن الواسمة CD90. ويؤدي النضج المتقدم لهذه الخلايا، والتي تبدو على شكل جماعة خلوية متجانسة، إلى تمايزها إلى مكونات مختلفة مثل وحيدات النوى النقية myelomonocytic، وخلايا تُؤَلد الكريات الحمر erythroid، والخلايا اللمفية lymphoid، وأنماط خلوية أخرى. ويترافق ذلك مع اكتساب المستضدات المرتبطة بالخط الخلوي ونمط التعبير عنها الذي يميز هذا الخط الخلوي عن جميع الخطوط الخلوية الأساسية؛ حيث تُفقد كل من الواسمات CD34 و CD133 و CD117 و CD38. وفي ما يتعلق بالمفاويات البائية، تبدي هذه الخلايا فقداناً للواسمة CD33 و CD13 وتراجعاً في التعبير عن الواسمة CD45، وبالمقابل تُكتسب الواسمة CD10 و CD19 مع المحافظة على الواسمة HLA-DR. بينما يتصف التمايز باتجاه الخط الخلوي للكريات الحمر باكتساب ساطع للواسمة CD71، ومتوسط للواسمة CD36، وتراجع في الواسمة CD45 و HLA-DR و CD13 و CD33 وزيادة أولية معتدلة في التبعثر (Darzynkiewicz, et al, 2004).

تُعزل عادة الخلايا الجذعية المؤلفة للدم CD34⁺ من دم الحبل السري البشري حسب الطريقة التقليدية التي تتضمن إما فصل وحيدات النوى على الفيكول ومن ثم العزل المناعي المغناطيسي للخلايا CD34⁺، أو الاغناء باستعمال عديدة الانتقاء الايجابي ومن ثم العزل المغناطيسي (Law, et al, 1993)، أو تحويل العينة إلى غلالة بيضاء ومن ثم فصل وحيدات النوى بالنبذ على الفيكول يليها العزل المغناطيسي (Wisniewski, et al, 2011). لقد أولت العديد من الدراسات الحديثة اهتماماً كبيراً بطريقة التعامل، خارج الكائن الحي ex-vivo، مع الخلايا الجذعية المؤلفة للدم CD34⁺ وتحت المجموعات السليفة أثناء عزلها لتستعمل لاحقاً في العديد من المجالات السريرية كإغتراس الخلايا المؤلفة للدم وفي المعالجة الجينية. كما تم الإشارة إلى تأثير هذه الخلايا بطريقة العزل المُطَبَّقة، الأمر الذي ينعكس على تواتر ترميم جميع خلايا الجهاز المناعي في الأفراد التي تتلقى هذه الخلايا الجذعية بعد عمليات الإغتراس (Belvedere, et al, 1999). لذلك تم في هذه الدراسة تطبيق طريقة للعزل تتضمن مراحل العزل المختلفة مجتمعة بغية الحصول على مردود مرتفع من الخلايا الجذعية المؤلفة للدم وسلانها والحفاظ

يُعد دم الحبل السري (CB) cord blood، و الدم المحيطي peripheral blood (PB)، ونقي العظم (BM) bone marrow، المصادر الرئيسية للخلايا الجذعية البالغة المؤلفة للدم hematopoietic stem cells وللخلايا السليفة progenitor cells التي يمكن أن تستعمل في الطب التجديدي regenerative medicine (Azouna, et al, 2011). عُرِفَت هذه الخلايا تقليدياً بقدرتها على التضاعف الذاتي وعلى التمايز إلى سلالات progenitors ذات إمكانات محددة بحيث تستطيع أن تنتج تنوعات خلوية تقع فقط ضمن سلالتها. تستطيع هذه الخلايا الجذعية أن تتمايز فقط إلى خلايا لمفية ونقوية مؤلفة بذلك جميع خطوط خلايا الدم (Piacibello, et al, 1997)، لذلك وُصِفَت سابقاً بأنها خلايا عديدة الإمكان multipotent وليس كثيرة الإمكان pluripotent، كالخلايا الجذعية الجنينية. ولكن مؤخراً، بينت العديد من المجموعات البحثية أن الخلايا الجذعية المؤلفة للدم تتصف بالمرونة plasticity، واستطاع الباحثون جعل الخلايا الجذعية تتجاوز الخطوط السلالية الخاصة بها. فمثلاً، حُوِلَت الخلايا الجذعية المؤلفة للدم إلى خلايا كبدية وعظلية وعصبية ووعائية وعظمية وذلك حسب طبيعة العوامل المضافة إلى وسط الاستنبات وعددها (Hurlbut and Doerflinger, 2004; Parker, et al, 2004). وعُزِي ذلك أيضاً إلى أن خلايا دم الحبل السري تحتوي بالإضافة إلى السلان المولدة للدم hematopoietic progenitors سلانف أخرى غير مولدة للدم non-hematopoietic stem cells؛ مثل السلان الميزانشيمية mesenchymal progenitors وسلانف الخلايا البطانية endothelial cell progenitors والطلائع العصبية neuronal precursors (Ghen, et al, 2006). وتم توثيق ذلك عندما تبين أن الخلايا المعزولة من دم الحبل السري البشري تُعبر عن كل من الجين Oct3/4 و Sox2 و Mdr1 و Rex1، والتي تعد الجينات المرمزة للعوامل المنظمة التي تسيطر في حالة الخلية الجذعية كثيرة الإمكان (Habich, et al, 2006). وتزايد في السنوات الأخيرة، وبشكل كبير، استعمال الخلايا الجذعية المؤلفة للدم المعزولة من دم الحبل السري في معالجة العديد من الأمراض، حيث يعد المصدر الأكثر أمناً وسهولة لجمع عينات الدم specimen collection، وباستعماله يتم تجنب التطرق إلى الصعوبات التقنية والإشكاليات الأخلاقية التي تعاني منها الخلايا الجذعية المأخوذة من المصادر الأخرى. كما أن خلايا دم الحبل السري هي أقل نضجاً، ومن ثم تنخفض قدرتها المحرصة لردود الفعل المناعية، لذلك استعملت وبشكل كبير في حالات الإغتراس الغيري للخلايا الجذعية stem cell allo-transplantation، إذ لا تشترط توافقاً نسيجياً بين المتبرع والأخذ. كما برهنت العديد من الدراسات على ارتفاع تواتر الخلايا الجذعية المؤلفة للدم المعزولة من دم الحبل السري بالمقارنة مع نقي العظم والدم المحيطي، وهي أكثر استجابة لعوامل النمو والانقسام في الوسط الصناعي in vitro وفي الكائن الحي in vivo (Cutler and Ballen, 2009).

تُعبّر الخلايا الجذعية المؤلفة للدم عن واسمات سطحية فريدة تجعلها قابلة للتمييز عن بقية الأنماط الخلوية تنتمي إلى معقدات تَعَبُد التمايز (CD) cluster of differentiation. فعلى سبيل

1.077 غرام/ ميلي لتر (Ficoll-Paque plus, Stem Cell Technologies, Canada) بسرعة 400 xg مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة. جُمِعت وحيدات النوى monocytes من السطح البيني، وغُسِلَتْ، بالنبذ بسرعة 300 xg مدة 10 دقائق وعند نفس درجة الحرارة، بالدارنة الملحية الفسفاتية المدعمة بنسبة 2 % من مصل بقري جنيني FBS (Euro lone Fetal bovine serum) بعد تخريب بروتينات جملة المتممة بالحرارة (التسخين في الدرجة 56 مئوية مدة 30 دقيقة)، وتحتوي مضادات حيوية (100 وحدة دولية/ ميلي لتر من بنسلين/ستربتومييسين penicillin/streptomycin (Stem Cell Technologies, Canada)، والمضاد الفطري amphotericine (Euroclone, Italia)، و1 ميلي مول EDTA. أُعيدت عملية الغسل وبفس الدارئة ولكن بسرعة نبذ 120 xg مدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة. حُضر مُعلَقُ خُلُوي تركيزه $10^8 \times 2$ خلية/ ميلي لتر من دارنة الغسل، وتم تقييم حيوية الخلايا cell viability بتلوينها بمحلول التريبان الأزرق Trypan blue (Sigma, Germany) تركيزه 0.4 %، وعُدَّت الخلايا باستعمال عِدَاة المالايسز (Mallasses: Germany).

(4.2) العزل المناعي المغناطيسي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+

حُصِنَتْ وحيدات النوى بوجود أضعاد وحيدة النسيلة نوعية للواسمة CD34، وبمعدل 100 ميكرو لتر من الأضعاد لكل واحد ميلي لتر من المعلق الخلوي ($10^8 \times 2$ خلية) مدة 15 دقيقة، في درجة حرارة 25 مئوية، ثم أُضيف 50 ميكرو لتر من مزيج من الحبيبات النانوية الممغنطة لكل واحد ميلي لتر من المعلق الخلوي ($10^8 \times 2$ خلية)، وحُصِنَتْ مدة 15 دقيقة اضافية وفي نفس الدرجة. كُمِّلَ حجم العينة بالدارنة الملحية الفسفاتية المدعمة حتى 2.5 ميلي لتر، وعُزِلَت الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ التي ارتبطت إلى الحبيبات الممغنطة بتمرير الخلايا ثلاث إلى أربع مرات على عمود مغناطيسي (Stem Cell Technologies, Canada)، مدة 5 دقائق في كل مرة. فُصِلَتْ عمليات تمرير الخلايا عن بعضها البعض بالغسل بـ 2.5 ميلي لتر من الدارئة PBS المدعمة. وأخيراً، عُلِّقَت الخلايا الجذعية CD34+ المعزولة في وسط استنبات IMDM (Sigma, Germany)، وقَدِّرَ عددها وحيويتها باستعمال عِدَاة المالايسز بعد تلوينها بمحلول أزرق التريبان تركيزه 0.4 %، وحُفِظَتْ في الدرجة 4 مئوية مدة 24 ساعة تقريباً إلى حين تنميطها.

(3) تنميط الخلايا بالجريان الخلوي بالتدفق Flow cytometry

استعملت خلاط مختلفة من الأضعاد وحيدة النسيلة المقترنة بأصبغة قابلة للتفلور نوعية للمستضدات السطحية للخلايا الجذعية CD34+ والخلايا السليفة المعزولة، جميعها أضعاد فأرية ضد-بشرية: ضد-CD34 مُقْتَرَنَةٌ بـ (PE) Phycoerythrin، وضد-CD34 مُقْتَرَنَةٌ بـ (FITC) Fluorescein Isothiocyanate، وضد-CD45 مُقْتَرَنَةٌ بـ (APC) allophycocyanin، وضد-CD38 مُقْتَرَنَةٌ بـ (APC) allophycocyanin، وضد-CD33 مُقْتَرَنَةٌ بـ (Per) phycoerythrin and a cyanine، وضد-CD117 مُقْتَرَنَةٌ بـ (APC)، وضد-CD123 مُقْتَرَنَةٌ بـ (Per-Cy)، وضد-CD56 مُقْتَرَنَةٌ بـ (PE)، وضد-CD14 مُقْتَرَنَةٌ بـ (Per-Cy)، وضد-CD19 مُقْتَرَنَةٌ بـ (Per-Cy)، وضد-CD3 مُقْتَرَنَةٌ بـ (APC)، وضد-CD105 مُقْتَرَنَةٌ بـ

على حيويتها دون زيادة الكلفة اللازمة لذلك. وتم التأكد من كفاءة هذه الطريقة بالتنميط المناعي لهذه الخلايا وتحديد نسبها المئوية وحيويتها. وتُعد هذه الدراسة أساساً لدراسات لاحقة على هذه الخلايا تتعلق بزراعتها وتمايزها في الوسط الصناعي وفي الكائن الحي، وإمكان استعمالها في التطبيقات السريرية المختلفة.

المنهج والمواد وطرق البَحْث

(1) جمع عينات دم الحبل السري البشري

أُخِذَتْ عينات دم وريد الحبل السري لعدد 12 من حالات الولادة القيصرية في مشفى التوليد وأمراض النساء الجامعي بدمشق بعد الحصول على موافقة مستنيرة من الأهل. تراوحت أعمار السيدات بين 25 و38 عاماً، وتم تسجيل المعلومات الخاصة بجنس المولود وعمر الأم وعدد الولادات. سُحِبَتْ عينات الدم من وريد الحبل السري في شروط عقيمة بعد الولادة مباشرة؛ حيث أُخِذَتْ المشيمة المتصلة مع الحبل السري، ووضعت على قاعدة عقيمة بحيث تكون المشيمة في الأعلى ويتدلى الحبل السري منها نحو الأسفل للحصول على أكبر حجم ممكن من الدم. جُمِعت عينة الدم باستعمال أكياس نقل الدم أحادية تحوي سترات فوسفات دكستروز-أدينين citrate phosphate dextrose-adenine (CPD-A) كمحلول مانع للتخثر، ومجهزة بإبرة خاصة لجمع الدم. وحصلنا في كل مرة على حجم من الدم يتراوح بين 80-100 ميلي لتر (53.75 ± 61.04). نُقِلَت العينات إلى المختبر في درجة حرارة الغرفة، وتم العمل عليها بعد حوالي ساعة من عملية الجمع.

(2) عزل الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+

(1.2) تحويل عينات دم الحبل السري إلى غلالة بيضاء

حُوِّلَتْ عينات دم الحبل السري إلى ما يسمى بالغلالة البيضاء buffy coat بغية إغناء العينة بالخلايا، والتخلص من أكبر جزء من الصفائح الدموية وخلايا الدم الأحمر، وذلك بنبذ الدم بسرعة 1320 xg ولمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة ($15^\circ - 25^\circ$ مئوية). أُهْمِلَ الطافي وجُمِعت الغلالة البيضاء بواسطة ماصة عقيمة ثم نبذت بسرعة 61 xg مدة 7 دقائق. وبعد طرح البلازما حصلنا على غلالة محمّرة تصل فيها نسبة الخلايا البيض إلى 90 %.

(2.2) الاغناء الأولي بالخلايا CD34+

تضمنت هذه المرحلة استعمال عتيدة مصممة للانتقاء الايجابي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ من عينات دم الحبل السري البشري (Human Cord blood CD34 positive selection kit, Stem Cell Technologies, Canada)، تحوي مزيجاً يستعمل للاغناء الأولي بالخلايا الجذعية CD34+ (CD34 pre-) human cord blood cocktail enrichment) يتكون من أضعاداً رباعية القسيم ترتبط من جهة بالكريات الحمر ومن جهة أخرى بالخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة CD34. أُضِيفَ المزيج لعينة الغلالة البيضاء بتركيز قدره 5 ميكرو لتر/ ميلي لتر، وحُصِنَتْ مدة 10 دقائق، في درجة حرارة الغرفة.

(3.2) فصل وحيدات النوى البشرية

مُدِّدَتْ عينة الدم، بعد إغنائها الأولي بالخلايا CD34+، بنسبة 1:1 بدارئة ملحية فسفاتية PBS خالية من شوارد الكالسيوم والمغنسيوم (DPBS, HyClone®)، ونُبِذَتْ على وسط الفيكول تركيزه

مول من بيكربونات البوتاسيوم KHCO_3 ، و 154 ميلي مول من كلوريد الامونيوم NH_4Cl ، و 9.93 ميلي مول من EDTA، والرقم الهيدروجيني (pH 7.4)، وتم الحضان من دقيقة إلى دقيقتين، ثم غسّلت الخلايا بالدارنة الملحية الفوسفاتية بنبذها بسرعة 970 xg مدة 3 دقائق، وطُرح الطافي.

نُظِّمَت الخلايا مناعيا بتقنية الجريان الخلوي بالتدفق وباستعمال جهاز (FACS) fluorescence- activated cell sorting (Becton Dickinson, USA) لأربعة ألوان والمجهز بليزرين (448 and 635 nm; Becton Dickinson, USA) للكشف الكيفي عن المستضدات الخلوية الغشائية التي تُعبّر عنها الخلايا المدروسة باعتماد طريقة التلوين الرباعية، ودُرِسَتْ حوالي عشرة آلاف حادثة على الأقل لتوصيف الخلايا المعزولة وتحديد درجة نقاوتها ونسبها المئوية. وتم تحليل نتائج التتميط باستعمال برنامج (Becton Pro-Cell Quest Dickinson, USA).

نَتَائِج البَحْث

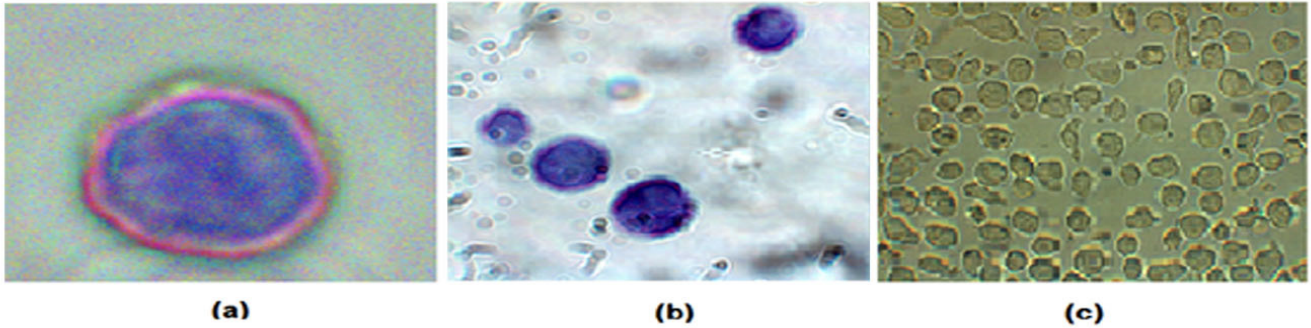
(1) تقييم كفي وكمي للخلايا الجذعية CD34^+ المعزولة من دم الحبل السري

عُزِلَت الخلايا الجذعية المؤلّدة للدم CD34^+ من ما مجموعه 12 عينة من دم الحبل السري. وتم انتقاء ثلاث عينات منها عشوائيا خَصَصَتْ الى شروط متماثلة للعزل المغناطيسي، وحُسِبَ المتوسط الحسابي لجميع القيم التي حصلنا عليها. بلغ متوسط حجم الدم في العينات المختلفة التي سُحِبَتْ من وريد الحبل السري (53.75 ± 61.04) ميلي لتر. تم تحويل عينات الدم إلى غلالة بيضاء ثم عُزِلَت الخلايا الجذعية المؤلّدة للدم CD34^+ على ثلاث مراحل؛ تضمنت المرحلة الأولى الانتقاء الإيجابي للخلايا CD34^+ بالتخلص من الكريات الحمر ومن الخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة CD34^+ ، ثم فُصِّلَت الخلايا بالنبذ على الفيكول، وتُبِعَتْ بالعزل المناعي المغناطيسي للخلايا الجذعية المؤلّدة للدم CD34^+ (الشكل 1). تم تحليل عدد الخلايا وحيادات النوى، وعدد الخلايا CD34^+ باستعمال عدادة الملاسيز؛ فبلغ متوسط عددها الكلي $(20 \pm 11.45 \times 610)$ خلية/ميلي و $(2 \pm 1.32 \times 610)$ خلية/ميلي لتر، على التوالي، وبنسبة حيوية عالية (97 %) قُدِّرَت بالتلوين بصبغة التريبيان الأزرق.

FITC. وإِسْتُعْمِلَت جميع الشواهد اللازمة؛ فإِسْتُعْمِلَ شاهد النمط المثيل (الشاهد السلبي) الذي يتكون من الاضداد IgG1-FITC و IgG2b-PE و IgG2a-Cy5 و IgGa-APC، وشاهد التفلور الذاتي للخلايا (بتمرير معلق للخلايا المدروسة غير مرتبطة بأي من الأضداد المتفلورة). إن جميع الأضداد التي استعملت في هذه الدراسة حصلنا عليها من شركة (BD Biosciences, USA) باستثناء الاضداد ضد-CD38-APC وضد-CD105-FITC من شركة (Invitrogen, Paisley, UK). وتم تقييم حيوية الخلايا باستعمال صبغ Propidium iodide (PI) (الصبغ المتفلور النوعي للـ DNA يلون الخلايا الميتة) (Sigma, Germany).

وُزِعَت الخلايا بعد العزل المغناطيسي المناعي بمعدل $10^6 \times 1$ خلية/ميلي من الدارئة الملحية الفوسفاتية في أنابيب التحليل الخاصة بجهاز الجريان الخلوي بالتدفق، ونبذت بسرعة 970 xg مدة ثلاث دقائق. أُهْمِلَ الطافي، وغُسِّلَت الخلايا بالنبذ وبالسرع نفسها. أُشْبِعَت المواقع غير النوعية لارتباط الأضداد على سطوح الخلايا بحضن الخلايا مع أضداد فأرية ضد-مستقبلات القطعة Fc $\text{CD16/CD32 Fc receptor (FcR)}$; BD Biosciences, USA) CD64 ، وذلك بمعدل 67 مكرو لتر/ميلي من المعلق الخلوي (3 ميلي غرام/ميلي لتر)، مدة 10 دقائق على الثلج، ثم غُسِّلَت الخلايا بالنبذ بسرعة 970 xg مدة ثلاث دقائق.

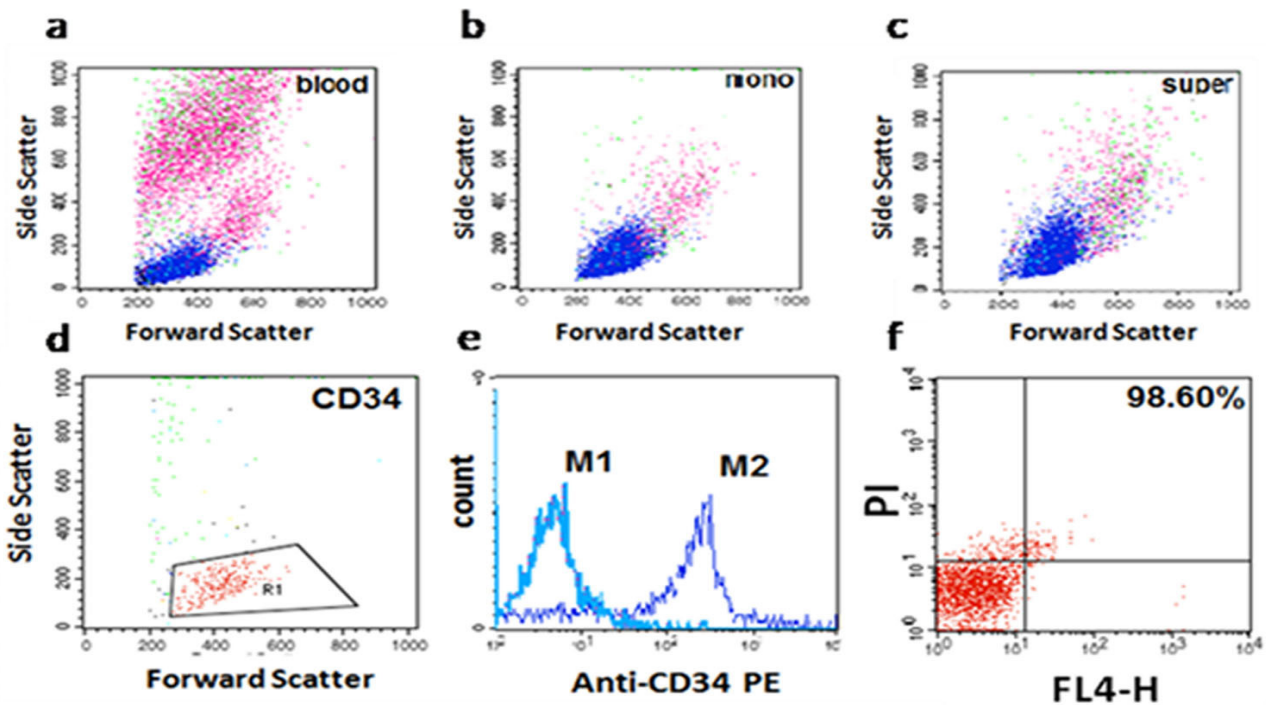
حُضِرَت الأضداد المتفلورة على شكل خلانط في أنابيب إيبيندورف بحيث ترافق استعمال الاضداد ضد- CD34 المقترنة بـ FITC مع كل من الأضداد الأخرى المتفلورة الموجهة تجاه الواسمات الأخرى المذكورة أعلاه مباشرة قُبِيلَ الاستعمال في مكان خافت الإضاءة، وتُرِكَت على الثلج ضمن خيمة زراعة الخلايا. ثم أضيفت خلانط الأضداد والشواهد إلى الخلايا وبمعدل 20 مكرو لتر لكل مليون خلية مُعَلَّقة في واحد ميلي لتر من الدارئة الملحية الفوسفاتية، وحُفِظَت على الثلج مدة 30 دقيقة في مكان مظلم. غُسِّلَت الخلايا بالدارئة الملحية الفوسفاتية مرة واحدة بالنبذ بسرعة 970 xg مدة ثلاث دقائق. وإِسْتُعْمِلَ صبغ PI بتركيز نهائي قدره 11 مكرومول لتحديد الخلايا الميتة. تُبِنَّت الخلايا بإضافة 0.5 ميلي لتر/أنبوب من محلول بارافورم الدهيد تركيزه 1 %، وتُرِكَت الخلايا في الظلام وفي الدرجة 4 مئوية مدة ساعة. أضيف إثرها 2ملي المحلول الحال لخلايا الدم الحمر lysing reagent (9.98 ميلي



الشكل 1: صور بالمجهر الضوئي تُظهر خلايا جذعية مولدة للدم CD34^+ بعد عزلها مباشرة مثبتة وملونة بملون غيمزا بتكبير كالاتي: (a) بتكبير 1000 مرة/ (b) بتكبير 400 مرة/ (c) صورة بالمجهر المقلوب لخلايا معلقة في وسط الاستنابات بتكبير 400 مرة.

الخلوية التي لا تحمل الواسمة CD34، ومن الأشلاء الخلوية، والحصول على نسبة مرتفعة من الخلايا الجذعية CD34+. كما بينت نتائج تنميط المجموعة الخلوية CD34+ أن الطريقة المتبعة في هذه الدراسة تؤدي إلى الحصول على الخلايا CD34+ بنقاوة عالية جداً بلغت قيمتها 95.53%. ويُشير التوزيع R1 في (الشكل 2، d) إلى المجموعة الخلوية CD34+. ويُبين (الشكل 2، e) إشارة فلورة الشاهد الإيجابي M2 بالمقارنة مع إشارة فلورة الشاهد السلبي M1. كما استُعمل صبغ PI النوعي للـ DNA الذي يعبر الأغشية الخلوية للخلايا الميتة بسبب الموت المبرمج، وتبين أن نسبة الخلايا CD34+ الحية هي 98.60% (الشكل 2، f).

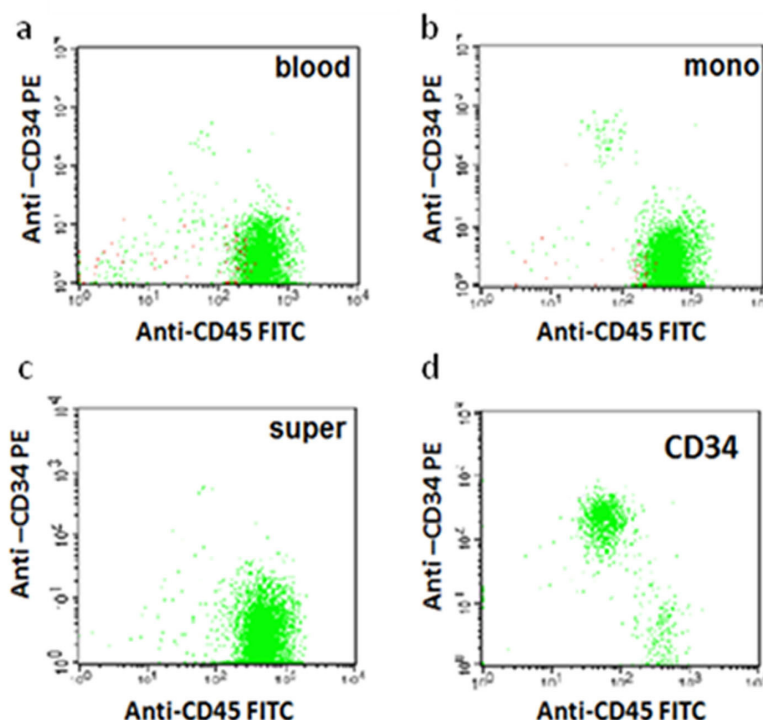
تم تنميط الخلايا CD34+ بتقنية الجريان الخلوي بالتدفق، خلال المراحل المختلفة من العزل (دم حبل سري، والإغناء الأولي، والنبذ على الفيكول، والعزل المغناطيسي للخلايا CD34+)، وبمقارنة شكل المجموعات الخلوية على محوري التبعثر الأمامي (Forward Scatter (FSC) والتبعثر الجانبي (Side Scatter (SSC)) خلال هذه المراحل: دم حبل سري (blood)، الخلايا المنواة بعد العزل على الفيكول (mono)، المعلق الخلوي المهمل بعد التمرير على عمود المغناطيس (super)، والخلايا المنواة المعزولة بالمغناطيس (CD34+). تبين في (الشكل 2: d، c، b، a) أنه تم خلال مراحل العزل المتتالية التخلص من الأنماط



الشكل 2: تمثيلات بيانية نقطية على محوري التبعثر FCS وSSC تبين الإغناء بالخلايا الجذعية المؤلفة للدم CD34 خلال مراحل العزل المختلفة الآتية: (a) دم الحبل السري / (b) الخلايا وحيدة النواة بعد الإغناء الأولي والفصل على الفيكول / (c) المعلق الخلوي المهمل بعد العزل المناعي المغناطيسي / (d) الخلايا CD34+ المعزولة مغناطيسياً / (e) تمثيل هستوغرامي لكل من إشارة فلورة الشاهد السلبي M1 وإشارة فلورة الشاهد الإيجابي M2 بعد حضن الخلايا المعزولة مع ااضداد ضد-CD34 متفلورة / (f) تمثيل بياني نقطي يبين النسبة المئوية للخلايا CD34+ الحية باستعمال الصباغ PI المتفلور).

هذه الخلايا بعد النبذ على الفيكول والإغناء الأولي (mono) إلى 0.65% بينما احتوى المعلق الخلوي المهمل (super) بعد العزل المناعي المغناطيسي فقط 0.27% ووصل المردود الخلوي للخلايا CD34+ المعزولة مغناطيسياً (CD34) إلى 83.53% وبنقاوة بلغت 95.53% وحيوية قُدِّرت بـ 98.60% (الشكل 2: d، c، b، a).

وبينت نتائج التحليل الكمي للخلايا الجذعية CD34+ خلال مراحل العزل الثلاث المختلفة غنى عينات دم الحبل السري بهذا النمط الخلوي، ونجاح عملية الإغناء بهذه الخلايا بطريقة الإنتقاء الإيجابي المتبعة في هذه الدراسة؛ حيث بلغت النسبة المئوية للخلايا CD34+ في دم الحبل السري (blood) 0.02%، وارتفع مردود



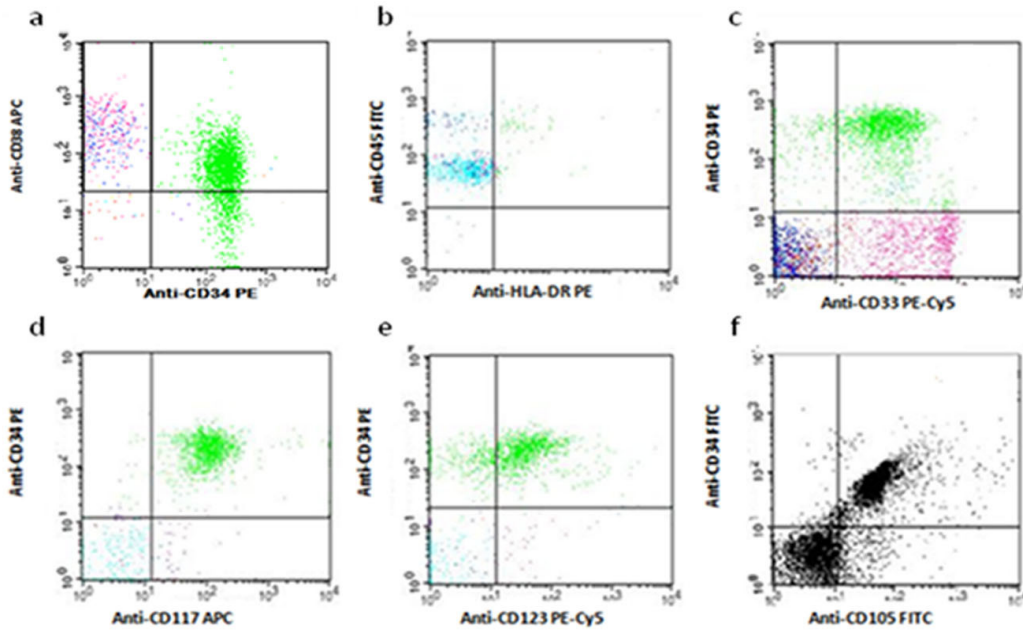
الشكل 3: تمثيلات بيانية نقطية تبين النسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+ خلال مراحل العزل المختلفة الآتية: (a) دم الحبل السري / (b) الخلايا وحيدة النواة MNCs بعد الإغناء الأولي والفصل على وسط الفيكول / (c) المعلق الخلوي المهمل بعد العزل المناعي المغناطيسي / (d) الخلايا الجذعية المؤلفة للدم CD34+ المعزولة مغناطيسياً.

الخلايا الجذعية ذات الخصائص السلفية والتي تلتزم التمايز النقوي الأولي؛ حيث تم الكشف عن التعبير عن المستضد النقوي المبكر CD33 على سطوح الخلايا CD34+. وحصلنا في دراستنا على نسبة مرتفعة من الخلايا CD34+ التي تُعبر عن الواسمة CD33؛ حيث بلغ تواتر المجموعتين الخليئتين CD34+CD33+ و CD34+CD33- من نسبة الخلايا CD34+ 57.14 % و 9.89 %، على التوالي، الشكل (c،4). كما تم التحليل الكمي لنسبة الخلايا CD34+ التي تعبر عن الواسمة CD117 والتي يعرف بأنها تُميز الخلايا الجذعية الحقيقية، وبينت نتائجنا ارتفاع كبيراً في تواتر التعبير عن هذه الواسمة؛ حيث بلغت النسب المئوية للمجموعتين الخليئتين (CD34+CD117+) و (CD34+CD117-) 81.23 % و 8.26 %، على التوالي (الشكل d،4). وبينت نتائجنا أيضاً أن دم الحبل السري يحتوي نسبة مرتفعة من الخلايا CD34+CD123+ (47.45 %) التي تمثل السلأف النقوية التي تتصف بقدرتها على الانقسام والتوسع النسيلي (الشكل e،4). وبشكل مشابه، ارتفعت نسبة الخلايا CD34+ والتي تعبر عن المستضد CD105 الضروري لبقاء الخلايا في حالة فقية؛ حيث بلغت نسبتها المئوية 58.52 %، بينما لم تتجاوز نسبة الخلايا (CD34+CD105-) القيمة 1.44 % (الشكل f،4).

(2) الطابع المناعي للخلايا الجذعية CD34+

إن التمييز المناعي للخلايا الجذعية CD34+ سمح لنا بمتابعة التعبير عن مستضدات أخرى تُميز تحت المجموعات الخلوية المختلفة [CD45 (سلأف ميكرة)، CD38 (الطلائع المفعلة)، HLA-DR (الطلائع المفعلة)، CD33 (الطلائع النقوية)، CD117 (مستقبل عامل الخلايا الجذعية)، CD123 (مستقبل الانترلوكين-3)، CD105 (مستقبل TGF-β)]. استعمل طاقم من الاضداد وحيدة النسيلة النوعية لهذه المستضدات، وحُدِدت تحت المجموعات المختلفة من الخلايا CD34+ ونسبها المئوية.

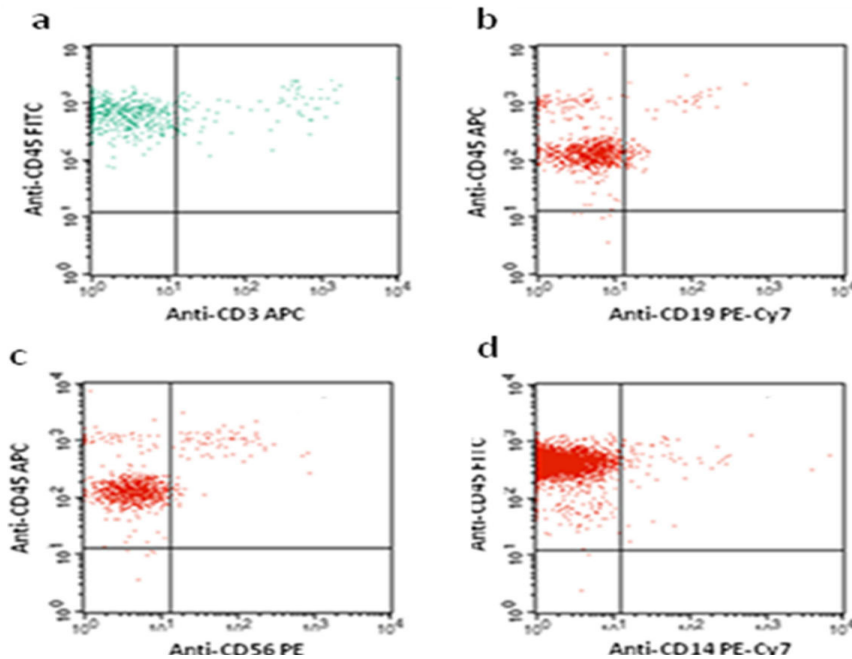
دُرِسَ التعبير المترافق لكل من الواسمتين CD34 و CD45 على سطوح الخلايا الجذعية CD34+، وبينت النتائج ارتفاع النسبة المئوية للخلايا التي تزامن فيها التعبير عن هاتين الواسمتين (83.54 %) (أنظر الشكل d،3). كما تم التحري عن الخلايا CD34+ السلفية الأولية التي تتمثل بغياب الواسمة CD38 (CD34+CD38-)، وتبين أننا حصلنا على نسبة مئوية تقدر 21.70 %، الشكل (a،4). وأبدت الخلايا الجذعية CD34+ المعزولة في دراستنا تعبيراً منخفضاً عن الواسمة HLA-DR؛ حيث لم تتجاوز النسبة المئوية للخلايا CD34+HLA-DR القيمة 5.32 %، بينما بلغت النسبة المئوية للنمط الخلوي CD34+HLA-DR- القيمة 70.85 % (الشكل b،4). وتم بالتمييز المناعي التحري أيضاً عن



الشكل 4 : الطابع المناعي للخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ بتمثيلات بيانية نقطية ترافق فيها التعبير عن الواسمة CD34 مع الواسمات (a) / CD38 / (b) / HLA-DR / (c) / CD33 / (d) / CD117 / (e) / CD123 / (f) / CD105.

تلتزم بالخط الخلوي للمفاويات الثانية (5.22 %) واللمفاويات البائية (1.76 %) التي تبدي التعبير المستضدي للجزيئين CD3 و CD19، على التوالي. كما يبدو الانخفاض الكبير في النسبة المئوية للخلايا السليفة التي تلتزم الخط الخلوي للقتلة الطبيعيين (4.48 %) أو لوحيدات النوى (0.7 %) والتي تُعبر عن الواسمتين CD56 و CD14، على التوالي.

كما تم في هذه الدراسة تحديد تواتر الخلايا الايجابية للواسمات CD3 أو CD19 أو CD56 أو CD14 من بين الخلايا CD34+CD45+ والتي تميز الخلايا الجذعية CD34+ الناضجة التي تلتزم الخط اللمفي أو النقوي، وذلك بغية التأكد من استنفاد جميع الانماط الخلوية غير المرغوب بعزلها. ويظهر (الشكل 5، a، b، c، d) وجود فقط مجموعة صغيرة من الخلايا CD34+CD45+



الشكل 5: تمثيل بياني نقطي يبين تواتر الخلايا الايجابية للواسمة CD3 (a) أو CD19 (b) أو CD56 (c) أو CD14 (d) من بين الخلايا CD34+CD45+ المعزولة في هذه الدراسة.

المناعي المغناطيسي، وبنقاوة عالية جدا بلغت قيمتها 95.53 % وحيوية قُدِّرَت 98.60 %. وقد يعود هذا المردود الخلوي المرتفع الذي حصلنا عليه والذي يتصف بالنقاوة والحيوية العاليتين إلى أن تحويل عينة دم الحبل السري إلى غلالة بيضاء يؤدي إلى زيادة عدد الخلايا وحيدات النوى بشكل عام. يضاف إلى ذلك أن الإغناء الأولي للعينات بالخلايا CD34+ بحضنها مع مزيج الإغناء-pre enrichment cocktail الذي يتكون من أضداد رباعية القسيم ترتبط من جهة بالخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة CD34، وترتبط من جهة أخرى مع خلايا الدم الحمر يؤدي إلى تشكل معقدات يسهل ترسيبها أثناء النبذ على وسط الفيكول في المرحلة التي تليها، ومن ثم يقلل وبشكل كبير من عدد مراحل الغسل أثناء تمرير العينة على المغناطيس (لايتجاوز 5مرات). كما أن مرحلة الإغناء الأولي سمحت بخفض حجم دائرة حل كريات الدم الحمر المستعملة عادة في طرق العزل، والتي قد تؤثر في حال استعمالها بكميات كبيرة على حيوية الخلايا، مما أدى بالنتيجة إلى زيادة عدد الخلايا الجذعية CD34+ وعدد السلانف المؤلدة للدم الحية. بينما انخفض المردود الخلوي إلى حوالي 50 % وحيوية الخلايا في معظم الدراسات السابقة التي اتبعت طريقة الإنتقاء الإيجابي، واقتصرت على النبذ على الفيكول ومن ثم العزل المناعي المغناطيسي، وذلك بسبب زيادة عدد مرات الغسل أثناء تمرير العينة على المغناطيس (حوالي عشر مرات) للحصول على نقاوة عالية (Kekaraine, et al, 2006).

وتجانست النتائج المتعلقة بالنسبة المئوية للخلايا الجذعية CD34+ التي حصلنا عليها بتطبيق طريقة الإنتقاء الإيجابي المُعَلَّة على العينات التي تم انتقاء نتائجها لهذه الدراسة (81.93%-85.29)، والتي تضمنت شروط عمل متماثلة من حيث الفترة الزمنية لبدء العمل على العينة، وتنميطها، ومزيج الأضداد المستعمل للتنميط. بينما أشارت الدراسات السابقة إلى اختلاف نسبة الخلايا المعزولة ضمن مجال واسع، وبينت أن هذا الاختلاف قد يعود إلى تأثير شروط العمل المتعلقة بجمع العينة ومعالجتها. وأُعزَّت دراسة حديثة هذا التبدل في النسبة المئوية للخلايا CD34+ المعزولة إلى مجموعة من العوامل والمعطيات المرتبطة أيضا بالأم (العمر، وعدد الولادات، وعمر الحمل، وزمرة الدم) ووليدها (الوزن، والجنس) والتي تؤثر في نسبة الخلايا CD34+ الموجودة في دم الحبل السري. وأوصت هذه الدراسة بأخذ هذه العوامل بعين الاعتبار عند معالجة العينة لحفظها في بنوك دم الحبل السري، مما يضمن الحصول على عدد أكبر من الخلايا الجذعية CD34+ والسلانف المؤلدة للدم المُبكرة (Azouna, et al, 2011). لذلك قد يعود التجانس في نسبة الخلايا CD34+ في العينات المختلفة التي استعملت في دراستنا إلى تماثل شروط العمل في الحالات الثلاث المنتقاة في هذه الدراسة، كما تماثل جنس المولود في هذه الحالات فجميعهن إناث، وتقارب عمر الأم (30-35عام) وعدد الولادات (2-3 ولادة).

يُعد توصيف الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ وتحت المجموعات الخلوية السليفة لها، وتحديد نسبها المئوية بتنميطها مناعيا هاما لدراسة سلوك هذه الجماعات الخلوية في الوسط الصناعي، بغية انتقاء الجماعة الخلوية الأمثل القادرة على إنتاج

هذا وتجدر الإشارة إلى أنه تم انتقاء 3 عينات دم حبل سري من بين 12 عينة خضعت إلى شروط متماثلة من حيث طريقة جمع العينة، ومراحل العمل، والأضداد المستعملة، والمدة الزمنية التي تفصل بين جمع العينة والعمل عليها وبين عزل الخلايا وتنميطها، وكنا نحصل في كل مرة على النتائج نفسها تقريبا، وحُسيب المتوسط الحسابي لجميع القيم التي حصلنا عليها. بينما تمثل الأشكال التي وردت في هذا البحث نتائج إحدى هذه الدراسات.

مناقشة البحث

تعد الخلايا CD34+ خلايا جذعية غير متخصصة توجد في "منتجات الدم" تُعبّر عن الواسمة السطحية CD34، وهي تتضمن تحت المجموعات الخلوية ذات الخصائص السليفة. ولقد أشارت العديد من الدراسات إلى اختلاف في تواتر الخلايا الجذعية CD34+ التي تم الحصول عليها من عينات دم الحبل السري البشري. وتبين فيما بعد أنه بالرغم من أن تواتر هذه الجماعة الخلوية يعد مؤشرا حقيقيا لقدرة الخلايا السليفة إلا أن ذلك لا يعني أبدا عدم تجانسها في الطبيعة، وإنما يعزى عدم التجانس الملاحظ في الدراسات المختلفة لعزل الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ إلى حساسية طرق العزل المستعملة والتي تؤثر في عددها وحيويتها، مما ينعكس على تواتر تعويض الجماعات الخلوية الدموية في الأفراد التي تتلقى هذه الخلايا بعد الاغتراس (Rivadeneyra-Espinoza, et al, 2006)، لذلك اهتم الباحثون بشكل كبير بالتوصل إلى أفضل تقنية لعزل الخلايا CD34+ وتحديدتها بتنميطها مناعيا. هدفت دراستنا إلى تقييم فعالية بعض التعديلات على طريقة الانتقاء الإيجابي لعزل الخلايا الجذعية البشرية المؤلدة للدم CD34+ بتحليل كيميائي وكمي للخلايا CD34+ وللخلايا السليفة المعزولة من دم الحبل السري البشري، بغية الحصول على نسبة مرتفعة من هذه الخلايا الجذعية والمحافظة على حيويتها وعلى السلانف الأقل نضجا والتي تفيد في الغرسات طويلة الأمد.

تم في هذه الدراسة عزل الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ بالطريقة المناعية المغناطيسية بعد تعديلها، والتي يمكن اختصارها بأربع مراحل تضمنت: تركيز عدد خلايا الدم بتحويل عينات دم الحبل السري البشري إلى عينات من الغلالة البيضاء، ثم الإغناء الأولي بالخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+، والذي يُعَبِّد بقطف الخلايا وحيدات النوى بعد النبذ على الفيكول، وأخيرا عزل هذه الخلايا بالطريقة المناعية المغناطيسية. وتم تحديد الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+ المعزولة، وحساب نسبتها المئوية بالتنميط المناعي بتقنية الجريان الخلوي بالتدفق بعد كل مرحلة من مراحل العزل.

بينت النتائج أهمية التعديلات التي أُجريت في هذه الدراسة على تقنية الإنتقاء المناعي الإيجابي للخلايا CD34+ بالطريقة المناعية المغناطيسية؛ حيث بلغت النسبة المئوية لهذه الخلايا في دم الحبل السري 0.02 %، وبعد التخلص من الكريات الحمر ومن الخلايا غير المرغوب بعزلها والتي لا تحمل الواسمة CD34 ارتفعت هذه النسبة إلى 0.65 % في معلق الخلايا وحيدات النوى، ووصل المردود الخلوي لهذه الخلايا إلى 83.53 % بعد العزل

المختلفة باختلاف العينات البيولوجية المدروسة وشروط التجربة وطريقة العمل المتبعة في هذه الشروط (Azouna, et al, 2011). كما يترافق التعبير عن الواسمة CD34 مع واسمات سطحية أخرى تُميز الخلايا الجذعية الحقيقية، من بينها الواسمة CD117 والتي تسمى أيضا c-kit وهي تمثل المستقبل الغشائي لعامل الخلية الجذعية (SCF) الذي يمنح الخلايا القدرة على الانقسام الذاتي (Wells, et al, 1996). ولقد كانت معظم الخلايا CD34+ التي عُزلت في دراستنا تُعبر عن الواسمة CD117؛ حيث بلغت نسبتها المئوية 81.23 % من مجموع الخلايا CD34+، وتوافقت بذلك وتفاوتت أيضا على النسب التي تم الحصول عليها في دراسات سابقة قارنت التعبير المتزامن عن الواسمتين CD34 و CD117 على سطوح الخلايا CD34+ المعزولة من مصادر مختلفة، حيث بلغت نسبة هذا النمط الخلوي المعزول من دم الحبل السري 41 % (Azouna, et al, 2011). بينما ترافق التعبير عن هاتين الواسمتين في دراسة أخرى بنسبة تُشكل 70 % من الخلايا الجذعية CD34+ (Broxmeyer, et al, 1989). وأشارت هذه الدراسات إلى أن الارتفاع في التعبير عن الواسمة CD117 على سطوح الخلايا الجذعية المؤلفة للدم في دم الحبل السري مقارنة مع تلك في نقي العظم والدم المحيطي يفسر الاستجابة المرتفعة للخلايا CD34+ المعزولة من دم الحبل السري للعامل SCF، مما يزيد من قدرتها على الانقسام والتجديد (Azouna, et al, 2011). وأشارت دراسات أخرى إلى مستويات مختلفة من التعبير عن المستضد D117 في عينات دم الحبل السري. واقترح الباحث (Machaliński, et al, 2006) أن التعبير عن المستضد CD117 يرتبط بعمر الفرد الذي أخذت منه العينة؛ حيث يبدو أن التعبير عن هذا المستضد يرتفع وبشكل معنوي في الخلايا المعزولة من افراد بعمر 35 عاما أو أقل بالمقارنة مع تلك المعزولة من افراد بعمر يزيد على 35 عاما (Machalinski, et al, 2006). وتبدو أهمية نتائجنا من أنه يعرف عن الخلايا CD34+c-kithigh بأنها غنية جدا بالسلالات النقية progenitor cells المسؤولة عن توليد الخلايا المحببة والبالعات الكبيرة colony-forming unit-granulocyte/macrophages (CFU-GM) التي تلعب دورا هاما في عمليات الاغتراس، بينما تتصف الخلايا CD34+c-kitlow بغناها بسلالات الكريات الحمر erythroid progenitors (Gunji, et al, 1993). ومن ثم، فإن التعبير عن c-kit يمكن أن يستعمل لتحديد سلالات دم الحبل السري البشري ذات القدرة على التطعيم طويل الأمد (Laver, et al, 1995).

إن التمييز المناعي للخلايا الجذعية CD34+ سمح لنا أيضا بمتابعة تواتر التعبير عن المستضد CD33. وبينت نتائجنا أن النمط الخلوي CD34+CD33+ يمثل 57.14 % من نسبة الخلايا CD34+، بينما لم تتجاوز نسبة الخلايا CD34+CD33- 9.89 %. وتوافقت نتائجنا وتفاوتت قليلا على النسب التي تم الحصول عليها في دراسات أخرى بينت أن نسبة هذه الخلايا بلغت 52% (Azouna, et al, 2011). وتبرز أهمية النمط CD34+CD33+ بكونه يحتوي أيضا على عدد كبير من النسيلة النقية CFU-GM المكونة للمحبيبات والبالعات التي تلعب دورا هاما في عمليات الاغتراس (Sakabe, et al, 1997).

نسائل مؤلفة لخلايا الدم تُفيد في حالات الاغتراس طويلة الأمد بهدف العلاج الطبي. ولقد برهنت الدراسات على ان الخلايا السليفة المؤلفة للدم البشرية المبكرة جدا هي خلايا تعبر بشكل أساسي عن الواسمة CD34 مترافقة مع واسمات أخرى مثل CD45 و CD117 و CD135 و CD90، بينما يغيب المستضد HLA-DR والواسمة CD38 والواسمات المميزة للخط الخلوي. كما بينت الدراسات أن الخلايا CD34+ تتصف بكونها خلايا غير متجانسة، لذلك استعمل التعبير المترافق لهذه الواسمة مع واسمات أخرى لتمييز تحت المجموعات الخلوية الغنية بالجماعات السليفة (De Wynter, et al, 1998). ولقد بينت نتائج التمييز المناعي في دراستنا على أن الخلايا الجذعية المؤلفة للدم المعزولة وفق الطريقة المتبعة في هذه الدراسة هي الخلايا من النمط CD45bright CD34bright CD38dim HLA-DRdim/- CD33+ CD117+ CD123+ CD105+ lineage-؛ حيث تُعبر بشكل كبير عن كل من الواسمتين CD34 و CD45 وبشكل منخفض عن الواسمة CD38 ومنخفض جدا للواسمة HLA-DR وهي ايجابية للواسمة CD33 و CD117 و CD123 و CD105. وانخفضت وبشكل كبير النسبة المئوية لخلايا القتل الطبيعيين (4.48 %) و وحيدات النوى (0.7 %) والمفاويات الثانية (5.22 %) والمفاويات البائية (1.76 %) التي تعبر عن الواسمات CD56، و CD14، و CD3، و CD19، على التوالي. وتشير هذه النتائج بشكل عام إلى درجة النقوة المرتفعة للخلايا CD34+ التي حصلنا عليها في هذه الدراسة وإلى كونها خلايا جذعية حقيقية. فلقد تبين في الدراسة التي قام بها Ogata وزملاؤه عام 2005 أن التعبير عن الواسمة CD45 على سطوح الخلايا الجذعية CD34+ يتم في مرحلة مبكرة تسبق مرحلة التعبير عن الواسمة CD34، حيث برهن على ان الخلايا (CD45+CD34-CD38-) (lin-CD45+CD34+CD38-lin-) هي أقل نضجا من الخلايا (lin-CD45+CD34+CD38-lin-). لذلك اعتمدت الواسمة CD45 والثابتة (Ogata, et al, 2005). لذلك اعتمدت الواسمة CD45 وبشكل كبير للكشف عن الخلايا الجذعية البشرية في البروتوكولات الكيفية والكمية المختلفة. ولقد حصلنا في نتائجنا على نسبة مرتفعة من الخلايا التي تزامن فيها التعبير عن الواسمتين CD34 و CD45 (83.54 %) بعد العزل المناعي المغناطيسي، وهي تفوق وبشكل كبير النسب التي تم الحصول عليها في دراسات سابقة؛ حيث لم تتجاوز النسبة المئوية للخلايا (CD34+CD45+) المعزولة من دم الحبل السري البشري في احدى الدراسات مثلا النسبة 40% (D>Arena, et al, 1996). وفي دراسات أخرى ركزت على مقارنة التعبير المترافق عن الواسمتين CD34 و CD45 على سطوح الخلايا الجذعية المؤلفة للدم CD34+ المعزولة من مصادر مختلفة، تبين ان النسبة المئوية للخلايا (CD34+CD45+) تتماثل في دم الحبل السري وفي الدم المحيطي للأفراد الاسوياء وتبلغ حوالي 30 %، بينما ترتفع نسبتها المئوية في نقي العظم (60 %) (Lefrere, et al, 2007). وأكدت دراسة حديثة على انخفاض تواتر هذا النمط من الخلايا في دم الحبل السري (44.6 %) بالمقارنة مع تلك المعزولة من عينات الدم المحيطي (68 %) واعتُبر الاختلاف في هذه النسب بين الدراسات المختلفة غير معنوي احصائيا؛ حيث يعتقد أن النسبة المئوية لهذا النمط الخلوي تختلف في الدراسات

السري تنتمي الى النمط الخلوي CD34+HLA-DR+ (Payne, Traycoff, et al, 1994). مع ذلك فإن البرهان على أن تواتر الخلايا CD34+HLA-DR+ يزيد في النمط الخلوي CD34+CD38+ عن تواترها في الخلايا CD34+CD38-، يؤكد على أن ارتفاع التعبير عن جزيئات HLA-DR على سطوح الخلايا يُمَيِّز الخلايا الأكثر تمايزاً (Law, et al, 1993).

ومن الجدير بالذكر أن الخلايا الجذعية المؤلدة للدم CD34+CD38- تُعَبِّر عن المستقبل الخلوي CD123 الذي يلعب دوراً هاماً في توليد خلايا الدم؛ حيث تمثل هذه الواسمة السلسلة الفا من مستقبل الإنترلوكين-3 IL-3 البشري. ويُحَفِّز ارتباط الإنترلوكين-3 إلى المستقبل CD123 في الخلايا السليمة السبيل الإشاري المسؤول عن حيوية الخلايا وانقسامها وتوسعها النسيلي (Jin, et al, 2009). وبينت نتائجنا ارتفاع تواتر ظهور الواسمة CD123 على سطوح الخلايا الجذعية CD34+ حيث يتم التعبير عن هذه الواسمة بنسبة 47.45%. وتبرز أهمية هذه الواسمة بشكل خاص بكون المجموعة الخلوية CD34+CD123low تحوي توزعاً غير متجانس من الخلايا CD34+ السليفة المبكرة والملزمة المسؤولة عن تطور السلالات النقية (Huang and Terstappen, 1992).

كما بينت نتائجنا أن الخلايا الجذعية CD34+ التي حصلنا عليها في دراستنا تُعَبِّر أيضاً عن الواسمة CD105 (58.52%)، كمستقبل لعوامل النمو الغشائية، والسيوكتينات الدموية وغير الدموية التي لها دور في تكون الدم، وهي تمثل أحد مكونات معقد مستقبل عامل النمو الاستحالي- بيتا transforming growth factor beta (TGF-β) الضروري لبقاء الخلايا CD34+CD105+ في حالة فتيّة، وتعد بذلك ضرورية لكل من بقاء الخلايا وحيويتها/وموتها المبرمج وعدم نضج الخلايا/ وتمايزها (Fortune, et al, 2003). مما يشير إلى أننا حصلنا على خلايا جذعية حقيقية؛ حيث بينت الدراسات أن تحت مجموعة خلوية صغيرة من الخلايا CD34+ المؤلدة للدم المعزولة من دم الحبل السري تُعَبِّر عن الواسمة CD105 والتي يعتقد أنها خلايا جذعية حقيقية مبكرة جدا (Pierelli, et al, 2001). وهذا يتوافق مع الدراسات التي أجريت على الخلايا الجذعية الجنينية المستنبطة في الوسط الصناعي in vitro والتي بينت أن التعبير عن المستقبل CD105 يتم خلال تمايز الخلايا من النمط CD45- الى النمط CD45+، مما يشير الى الدور الهام للمستضد CD105 في تطور ونمو الخطوط الخلوية الدموية بدءاً من سلالتها (Cho, et al, 2001).

نتائج البحث

لقد تمكّنّا في هذه الدراسة، وهي الأولى من نوعها في سوريا، من عزل وتنميط الخلايا الجذعية المؤلدة للدم والتي كانت فيها الخلايا ذات طابع مناعي (CD34^{bright} CD38^{dim/-} HLA-DR^{dim/-} CD117⁺ CD123⁺ CD105⁺ lineage⁻)، وهذا يقترح الحصول على خلايا جذعية حقيقية لا تُعَبِّر عن المستضدات التي تُمَيِّز خط خلوي مُحدّد وعلى خلايا تُعَبِّر عن المستضدات التي تميز الطلائع الأولية للخط النقوي والتي تفيد في الزراعات طويلة

كما برهنت العديد من الدراسات السابقة على أن الخلايا السليفة المؤلدة للدم التي لا تُعَبِّر عن الواسمة CD38 والواسمة HLA-DR تكون غنية بالخلايا الجذعية الأولية وهي مسؤولة عن اغتراس الخلايا السليفة المؤلدة للدم في حالات الطعوم طويلة الأمد (Broxmeyer, et al, 1989) (Berardi, et al, 1995). ولقد برهن غير مستمر في تراتب الخلايا المؤلدة للدم وإنما يمتلك تواتر مرتفع في الخلايا المتضمنة في التأثير بين الخلايا المرتبط بتمايز الخلايا الجذعية. ومع أنه أشار إلى أن الخلايا CD34+CD38- تتصف بكونها أقل هجوعاً ولديها مقدرة على الإنقسام تفوق النمط CD34+CD38-، ولكن بين أن دورها يقتصر فقط على إعادة جبهة الخلايا وإنتاج السلالات خلال فترة قصيرة. كما تبين أن التعبير عن الواسمة CD38 الى أكثر من مستوى معين يصبح غير قابل للعكس ويرتبط بالقدرة على التمايز وإعادة الجبهة (McKenzie, et al, 2007). ولقد بينت عدد من الدراسات أن معظم الخلايا CD34 تُعَبِّر عن المستضد CD38 في خلايا دم الحبل السري البشري، حيث تراوحت نسبة الخلايا CD38- من بين الخلايا CD34+ بين 2.6% و 3.9% (Rusten, et al, 2001) (Malangone, et al, 1994). ولا تتوافق بذلك نتائج هذه الدراسات مع نتائجنا؛ حيث بلغت نسبة النمط الخلوي CD34+CD38- (21.07%)، بينما تتوافق مع دراسات أخرى بينت أن تواتر الخلايا CD34+CD38- في دم الحبل السري يفوق ما وجد في نقي العظم وتزيد على 16% من مجموع الخلايا CD34+ (D'Arena, et al, 1996). ولقد تم الإشارة سابقاً إلى تناقض النتائج المتعلقة بالنسب المئوية للجماعات الخلوية (CD34+CD38-) و (CD34+CD38+) في دم الحبل السري من فريق بحث إلى آخر (Hao, et al, 1995). وبالنتيجة تُعد النسبة التي حصلنا عليها في هذه الدراسة نموذجية ودليل الحصول على نمط خلوي نقي وغير محفز على الرغم من أن دراستنا اعتمدت العزل المناعي المغناطيسي الإيجابي الذي قد يؤدي إلى تفعيل بعض المستقبلات السطحية وبيد من هوية ووظيفة النمط الخلوي المعزول (Belvedere, et al, 1999). كما نقترح هذه النتائج أن الخلايا CD34+ المعزولة في دراستنا هي طلائع أولية تمتلك قدرة عالية على التطعيم، وهذا يتوافق مع الحالات السريرية الناجحة لاستعمال دم الحبل السري حتى عندما يغترس عدد قليل منها لأنها تستطيع أن تتكاثر وبسرعة كبيرة استجابة للتحريض بالسيوكتينات بالمقارنة مع تلك العائدة لنقي العظم (Wisniewski, et al, 2011).

وبالتحري عن النمط الخلوي CD34+HLA-DR- بلغت نسبته في دراستنا 70.85%، وبالمقارنة مع الدراسات السابقة فإن انخفاض التعبير عن المستضد HLA-DR في خلايا دم الحبل السري تم ملاحظته أيضاً من قبل باحثين آخرين. وتُعد هذه الخاصة مُميزة للخلايا الجذعية البشرية CD34+ المعزولة من دم الحبل السري مقارنة مع تلك المعزولة من مصادر أخرى لما تتصف به من القدرة على الاغتراس، وتراجع في ردود الفعل المناعية تجاه الاعضاء المغترسة (Fasouliotis and Schenker, 2000). مع ذلك، بينت الدراسات التي قام بها الباحث (Traycoff, et al, 1994) في دراسات مختلفة أن الخلايا السليفة المبكرة جدا في دم الحبل

Cho SK; Bourdeau A; Letarte M; and Zuniga-Pflucker JC (2001) Expression and Function of CD105 during the Onset of Hematopoiesis from Flk1(+) Precursors. *Blood*, **98** (13): 3635-3642.

Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/98/13/3635.full.pdf>

Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/98/13/3635.long>

Cutler C; and Ballen K (2009) Reduced Intensity Conditioning and Umbilical Cord Blood Transplantation in Adults. *Bone Marrow Transplant*, **44** (10): 667-671.

Available at: <http://www.nature.com/bmt/journal/v44/n10/abs/bmt2009283a.html>

D'Arena, G; Cascavilla, N; Musto, P; Greco, M; Di Mauro, L; and Carella AM (1996) Flow Cytometric Characterization of CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells in Mobilized Peripheral Blood and Bone Marrow of Cancer Patients. *Haematologica*, **81** (3): 216-223.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8767526>

Darzynkiewicz Z; Roederer M; and Tanke H (2004) Preface, In: *Methods in Cell Biology, Cytometry 4th edition: New developments, vol. 75*, Elsevier Academic Press, California, USA. pp 3-16.

Available at: <http://www.darzynkiewicz.com/zbigniew/chapters.htm>

De Wynter EA; Buck D; Hart C; Heywood R; Coutinho LH; and Clayton A (1998) CD34+AC133+ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. *Stem Cells*, **16** (6): 387-396.

Fasouliotis SJ; and Schenker JG (2000) Human Umbilical Cord Blood Banking and Transplantation: a State of the Art. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, **90** (1): 13-25.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767505>

Fortunel NO; Hatzfeld JA, Monier MN; and Hatzfeld A (2003) Control of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Fate by Transforming Growth Factor-Beta. *Oncology Research*, **13** (6-10): 445-453.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

الأمد وقصيرة الامد، على التوالي. وتتوافق بذلك نتائج هذه الدراسة مع دراسات بحثية حديثة، وتشير إلى كفاءة الطريقة المُعدَّلة المتبعة لعزل هذه الخلايا في التخلص من جميع الأنماط الخلوية غير المرغوب بعزلها (CD56 و CD14 و CD3 و CD19)، والحصول على خلايا جذعية تنصف بنقاوة وحيوية عاليتين، وتمتلك قدرة عالية على الاغتراس تُمهد لدراسات بحثية لاحقة ضمن الكائن الحي *In vivo* وفي الوسط الصناعي *In vitro*.

الشكر والعرفان

تم إجراء هذا البحث في كل من مختبر المناعة في قسم البيولوجيا الحيوانية في كلية العلوم بجامعة دمشق ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، لذلك يتوجه الباحثون بالشكر العميق لكل من الدكتور عصام قاسم المدير العام للهيئة العامة للتقانة الحيوية و الدكتور حسن ناصر الدين رئيس قسم البيولوجيا الحيوانية. كما يود الباحثون أن يعبروا عن عميق امتنانهم للدكتور سعد نانو المدير الطبي لمستشفى التوليد الجامعي لتقديم كل التسهيلات اللازمة للحصول على عينات دم الحبل السري، والدكتور عدنان اختيار والسيد عبد المنعم جباوي في هيئة الطاقة الذرية لاستقبال الباحثين وإتاحة الفرصة لهم لإجراء جزء من هذا البحث في مختبرهما.

المراجع باللغة الإنجليزية

Azouna NB; Berraeis L; Regaya Z; and Jenhani, F (2011) Immunophenotyping of Hematopoietic Progenitor Cells: Comparison between Cord Blood and Adult Mobilized Blood Grafts. *World Journal of Stem Cells*, **3** (11): 104-112.

Available at: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/pdf/v3/i11/104.pdf>

Belvedere O; Feruglio C; Malangone W; Bonora ML; Donini A; and Dorotea L (1999) Phenotypic Characterization of Immunomagnetically Purified Umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **25** (3/4): 141-146.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575539>

Berardi AC; Wang A; Levine JD; Lopez P; and Scadden DT (1995) Functional Isolation And Characterization of Human Hematopoietic Stem Cells. *Science*, **267** (5194): 104-108.

Broxmeyer HE; Douglas GW; Hangoc G; Cooper S; Bard J; and English, D (1989) Human Umbilical Cord Blood as a Potential Source of Transplantable Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86** (10): 3828-3832.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566997>

- Kekarainen T; Mannelin S; Laine J; and Jaatinen T** (2006) Optimization of Immunomagnetic Separation for Cord Blood Derived Hematopoietic Stem Cells. *BMC Cell Biol*, **7**: 30.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kekarainen+T%3B+>
- Laver JH; Abboud MR; Kawashima I; Leary AG; Ashman LK; and Ogawa M** (1995) Characterization of C-kit Expression by Primitive Hematopoietic Progenitors in Umbilical Cord Blood. *Exp Hematol*, **23** (14): 1515-1519.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Laver+JH%3B+Abboud+MR>
- Law P; Ishizawa L; Van de Ven C; Burgess J; Hardwick A; and Plunkett M** (1993) Immunomagnetic Positive Selection and Colony Culture of CD34+ Cells from Blood. *J Hematother*, **2** (2): 247-250.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Law+P%3B+Ishizawa+>
- Lefrere F; Zohar S; Beaudier S; Audat F; Ribeil JA; and Ghez D** (2007) Evaluation of an Algorithm Based on Peripheral Blood Hematopoietic Progenitor Cell and CD34+ Cell Concentrations to Optimize Peripheral Blood Progenitor Cell Collection by Apheresis. *Transfusion*, **47** (10): 1851-1857.
- Machalinski B; Paczkowska E; Koziarska D; and Ratajczak MZ** (2006) Mobilization of Human Hematopoietic Stem/ Progenitor-Enriched CD34+ Cells into Peripheral Blood during Stress Related to Ischemic Stroke. *Folia Histochem Cytobiol*, **44** (2): 97-101.
- Malangone W; Belvedere O; Astori G; Adami V; Donini A; and Falasca E** (2001) Increased Content of CD34(+)CD38(-) Hematopoietic Stem Cells in the Last Collected Umbilical Cord Blood. *Transplant Proceedings*, **33** (1/2): 1766-1768.
- McKenzie JL; Gan OI; Doedens M; and Dick JE** (2007) Reversible Cell Surface Expression of CD38 on CD34-Positive Human Hematopoietic Repopulating Cells. *Experimental Hematology*, **35** (9): 1429-1436.
Available at: [http://www.exphem.org/article/S0301-472X\(07\)00347-5/abstract](http://www.exphem.org/article/S0301-472X(07)00347-5/abstract)
- Ghen MJ; Roshan R; Roshan RO; Blyweiss DJ; Corso N; and Khalili, B** (2006) Potential Clinical Applications using Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood. *Reproductive Biomedicine Online*, **13** (4): 562-572.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007681>
- Gunji Y; Nakamura M; Osawa H; Nagayoshi K; Nakauchi H; and Miura Y** (1993) Human Primitive Hematopoietic Progenitor Cells are more Enriched in KITlow Cells than in KIThigh cells. *Blood*, **82** (11): 3283-3289.
Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7694677/reload=0;jsessionid=6>
- Habich A; Jurga M; Markiewicz I; Lukomska B; Bany-Laszewicz U; and Domanska-Janik K** (2006) Early Appearance of Stem/ Progenitor Cells with Neural-Like Characteristics in Human Cord Blood Mononuclear Fraction Cultured in Vitro. *Experimental Hematology*, **34** (7): 914-925.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797419>
- Hao, QL, Shah, AJ, Thiemann, FT, Smogorzewska, EM, and Crooks, GM** (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, **86** (10), 3745-3753.
- Huang S; and Terstappen LW** (1992) Formation of Haematopoietic Microenvironment and Haematopoietic Stem Cells from Single Human Bone Marrow Stem Cells. *Nature*, **360** (6406): 745-749.
Available at: <http://adsabs.harvard.edu/abs/1992Natur.360..745H>
- Hurlbut W; and Doerflinger R** (2004) Can a Morally Acceptable Way be Found to Obtain Embryonic Stem Cells? *Origins*, **34** (27): 429-433.
- Jin L; Lee EM; Ramshaw HS; Busfield SJ; Peoppl AG; and Wilkinson L** (2009) Monoclonal Antibody Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, **5** (1): 31-42.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570512>

- Sakabe H; Ohmizono Y; Tanimukai S; Kimura T; Mori KJ; and Abe T** (1997) Functional differences between Subpopulations of Mobilized Peripheral Blood Derived CD34+ Cells Expressing Different Levels of HLA-DR, CD33, CD38 and C-Kit Antigens. *Stem Cells*, **15** (1): 73-81.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007225>
- Traycoff CM; Abboud MR; Laver J; Brandt JE; Hoffman R; and Law P** (1994) Evaluation of the in Vitro Behavior of Phenotypically Defined Populations of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Progenitor Cells. *Experimental Hematology*, **22** (2): 215-222.
- Wells SJ; Bray RA; Stempora LL; and Farhi DC** (1996) CD117/CD34 Expression in Leukemic Blasts. *American Journal of Clinical Pathology*, **106** (2): 192-195.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wells+SJ%3B+>
- Wisniewski D; Affer M; Willshire J; and Clarkson B** (2011) Further Phenotypic Characterization of the Primitive Lineage-CD34+CD38-CD90+CD45RA- Hematopoietic Stem Cell/Progenitor Cell Sub-Population Isolated from Cord Blood, Mobilized Peripheral Blood and Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood Cancer Journal*, **1** (9): e36.
- Ogata K; Satoh C; Tachibana M; Hyodo H; Tamura H; and Dan K** (2005) Identification and Hematopoietic Potential of CD45- Clonal Cells with very Immature Phenotype (CD45-CD34-CD38-Lin-) in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Stem Cells*, **23** (5): 619-630.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849169>
- Parker GC; Anastassova-Kristeva M; Broxmeyer HE; Dodge WH; Eisenberg LM; and Gehling UM** (2004). Stem Cells: Shibboleths of Development. *Stem Cells and Development*, **13** (6): 579-584.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15684825>
- Payne TA; Traycoff CM; Laver J; Xu F; Srour EF; and Abboud MR** (1995) Phenotypic Analysis of Early Hematopoietic Progenitors in Cord Blood and Determination of their Correlation with Clonogenic Progenitors: Relevance to Cord Blood Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **15** (2): 187-192.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539665>
- Piacibello W; Sanavio F; Garetto L; Severino A; Bergandi D; and Ferrario J** (1997) Extensive Amplification and Self Renewal of Human Primitive Hematopoietic Stem Cells from Cord Blood. *Blood*, **89** (8): 2644-2653.
Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/89/8/2644.full>
- Pierelli L; Bonanno G; Rutella S; Marone M; Scambia G; and Leone G** (2001) CD105 (Endoglin) Expression on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Leukemia & Lymphoma*, **42** (6): 1195-1206.
- Rivadeneira-Espinoza L; Perez-Romano B; Gonzalez-Flores A; Guzman-Garcia MO; Carvajal-Armora F; and Ruiz-Arguelles A** (2006) Instrument- and Protocol Dependent Variation in the Enumeration of CD34+ Cells by Flow Cytometry. *Transfusion*, **46** (4): 530-536.
Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.1537-2995.abstract>
- Rusten LS; Jacobsen SE; Kaalhus O; Veiby OP; Funderud S; and Smeland EB** (1994) Functional Differences between CD38- and DR-Subfractions Of CD34+ Bone Marrow Cells. *Blood*, **84** (5): 1473-1481.
Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/84/5/1473.abstract>