

## تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه سلول‌های P388D1

مرتضی سلیمیان<sup>۱</sup>، زهرا سهیلی<sup>۲</sup>، بهرام گلیایی<sup>۳</sup>

### خلاصه

**سابقه و هدف:** تکنیک‌های هم‌کشت (*co-culture*) در مطالعه تاثیرات متقابل سلول‌ها نقش مهمی دارند. قابلیت افتراق بین جمعیت‌های سلولی هم‌کشت شده در ارزیابی این نوع کشت نقش اساسی دارد. سلول‌های P388D1 از گروه سلول‌های شبه ماکروفاژی هستند ولی ظاهری شبیه لنفوبلاست دارند. در ارزیابی هم‌کشت سلول‌های P388D1 و سلول‌های مغز استخوان، تفاوت در آنتی‌ژن‌های سطحی این دو جمعیت سلولی می‌تواند به افتراق آنها کمک کند. هدف از این تحقیق تهیه آنتی‌بادی است که بتوان به وسیله آن سلول‌های P388D1 را از سلول‌های مغز استخوان افتراق داد.

**مواد و روش‌ها:** جهت تهیه آنتی‌بادی علیه سلول‌های P388D1، ایمن‌سازی خرگوش به وسیله تزریق داخل صفاقی و داخل وریدی این سلول‌ها انجام شد. بعد از خونگیری، ایمونوگلوبولین‌های سرم خرگوش به دفعات متعدد در محلول سولفات آمونیوم رسوب داده شدند. قبل و بعد از رسوب‌دهی، الکتروفورز پروتئین‌های سرم و تعیین مقدار آنها با روش برادفورد انجام شد. آنتی‌بادی‌های دارای واکنش متقاطع با سلول‌های مغز استخوان به وسیله چندین بار عمل جذب توسط سلول‌های مغز استخوان حذف شدند. در مراحل مختلف جذب، حضور آنتی‌بادی‌های ضدسلولی با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم تعیین گردید و قدرت کشندگی آنتی‌بادی‌ها با واسطه کمپلمان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** محلول آنتی‌بادی جذب شده‌ای که در آزمایشات ایمونوفلورسانس غیر مستقیم هیچ واکنشی علیه سلول‌های مغز استخوان نشان نمی‌دهد، واجد آنتی‌بادی‌هایی بر علیه سلول‌های P388D1 می‌باشد که قادر به کشتن با واسطه کمپلمان این سلول‌ها می‌باشند.

**نتیجه‌گیری و توصیه‌ها:** آنتی‌بادی‌های تهیه شده در این تحقیق را می‌توان به منظور تعیین جمعیت سلول‌های P388D1 یا حذف این سلول‌ها از جمعیت سلول‌های مغز استخوان استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های P388D1، آنتی‌بادی.

دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پیراپزشکی

مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و فراورده های زیستی، تهران

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، آزمایشگاه بیوفیزیک و بیولوژی مولکولی، تهران

کرد. از آنجا که این سلول‌ها به لحاظ ریخت‌شناسی مشابه سلول‌های لنفوبلاست مغز استخوان می‌باشند، این خصوصیت نمی‌تواند به افتراق آنها کمک کند. از طرف دیگر شباهت الگوی واکنش سیتوشیمی سلول‌های *P388D1* با سلول‌های ماکروفاژ مغز استخوان نیز مانع استفاده از این روش جهت افتراق می‌باشد. وجود آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌هایی بر سطح سلول‌های *P388D1* گزارش شده است که بر سطح ماکروفاژها وجود ندارد. این گزارشات ما را بر آن داشت که بر احتمال تفاوت آنتی‌ژنیک سلول‌های *P388D1* با سلول‌های مغز استخوان مطالعه کنیم (۳). این مطالعه از طریق تولید آنتی‌بادی علیه سلول‌های *P388D1* صورت گرفت. کارایی آنتی‌بادی تولید شده جهت واکنش اختصاصی با سلول‌های *P388D1* با استفاده از دو روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم<sup>۲</sup> و سمیت وابسته به آنتی‌بادی کمپلمان<sup>۳</sup> مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### الف- فرایند تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال

ایمن‌سازی خرگوش: سلول‌های *P388D1* به تعداد  $2 \times 10^6$  در هر تزریق در شش نوبت به خرگوش تزریق شدند. فاصله هر تزریق با تزریق دیگر ۱۰ روز بود. تزریق در نوبت اول و دوم به صورت داخل صفاقی همراه ادجوانت کامل فروند، نوبت سوم و چهارم بصورت داخل صفاقی بدون ادجوانت و نوبت ششم بصورت داخل وریدی انجام شد. یک هفته پس از آخرین تزریق، خونگیری از طریق قلب خرگوش انجام شد (۴).

مشکل اساسی در ارزیابی سیستم‌های هم‌کشت<sup>۱</sup>، قابلیت افتراق سلول‌های هم‌کشت شده از هم می‌باشد. افتراق جمعیت‌های مختلف سلولی از هم می‌تواند بر مبنای خصوصیات مختلف آنها صورت گیرد. به طور مثال خصوصیت ریخت‌شناسی یک سلول می‌تواند مبنای افتراق آن از سلول‌های دیگر قرار گیرد. همین‌طور وجود آنزیم‌های مختلف درون سیتوپلاسم سلول‌ها می‌تواند مبنایی برای افتراق آنها با استفاده از روش‌های سیتوشیمی باشد. وجود آنتی‌ژن‌های مختلف بر سطح سلول‌ها نیز می‌تواند به افتراق سلول‌ها از هم کمک کند. البته وجود آنتی‌ژن افتراق دهنده به وسیله واکنش آنتی‌ژن با آنتی‌بادی اختصاصی آن مشخص می‌شود.

سلول‌های *P388D1* از گروه سلول‌های شبه ماکروفاژی هستند، با این حال ظاهری شبیه لنفوبلاست‌ها دارند (۲ و ۱). هم‌کشت سلول‌های *P388D1* با سلول‌های مغز استخوان می‌تواند به دو دلیل حائز اهمیت باشد: ۱- این سلول‌ها قادر به تولید اینترلوکین ۱ که از فاکتورهای موثر در خونسازی می‌باشد، هستند. ۲- سلول‌های *P388D1* به عنوان سلول‌های بدخیم، خونسازی طبیعی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. سلول‌های *P388D1* از معدود سلول‌های سرطانی با منشاء سلول‌های خونی هستند که به صورت چسبنده رشد کرده، بنابراین در کشت طولانی مدت مغز استخوان در ارتباط نزدیک با سلول‌های خون‌ساز و استرومایی قرار می‌گیرند.

در صورت هم‌کشت سلول‌های *P388D1* با سلول‌های مغز استخوان سوال اساسی این است که از کدام خصوصیت سلول‌های *P388D1* باید جهت افتراق آنها از سلول‌های مغز استخوان استفاده

2 - Indirect Immunofluorescence Technique

3 - Antibody Dependent Complement Cytotoxicity

<sup>1</sup> - Co-Culture

شده، غلظت باند ایمونوگلوبولین بر اساس تعیین درصد این باند تخمین زده شد.

#### حذف آنتی‌بادی‌های دارای واکنش متقاطع با

سلول‌های مغز استخوان: آنتی‌بادی‌های دارای واکنش متقاطع با سلول‌های مغز استخوان جذب سلول‌های مغز استخوان شده و بنابراین از مجموعه آنتی‌بادی‌های استخراج شده حذف می‌شدند. به این ترتیب که محلول آنتی‌بادی بر روی سلول‌های مغز استخوان ( $10^8$  سلول مغز استخوان به ازای هر میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بادی) اضافه می‌شد و سوسپانسیون سلول‌های مغز استخوان در محلول آنتی‌بادی بر روی یخ به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه شیکر قرار داده می‌شد. بعد از رسوب سلول‌ها به وسیله سانتریفوژ، عمل جذب به وسیله سلول‌های دیگر مغز استخوان تکرار می‌شد.

#### ب- تعیین کارایی محلول آنتی‌بادی تولید

##### شده علیه سلول‌های P388D1

#### تعیین آنتی‌بادی با روش ایمونو فلورسانس

غیر مستقیم: حضور آنتی‌بادی‌های اولیه بر سطح سلول‌های مغز استخوان، بعد از مراحل جذب به کمک واکنش ثانویه آنتی‌بادی بز که بر ضد ایمونوگلوبولین‌های خرگوش تهیه شده و با ماده فلورسانس نشاندار شده بود،<sup>۴</sup> تعیین می‌گردید. به همراه نمونه مورد آزمایش یک نمونه کنترل مثبت، جهت تایید عملکرد آنتی‌بادی ثانویه و یک نمونه کنترل منفی، جهت نفی واکنش آنتی‌بادی ثانویه با سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. در محلول آنتی‌بادی که واکنش متقاطع آن علیه سلول‌های مغز استخوان حذف شده بود، حضور آنتی‌بادی علیه سلول‌های P388D1 مورد بررسی قرار گرفت.

#### رسوب دهی و تغلیظ ایمونوگلوبولین‌های

سرم: ایمونوگلوبولین‌های سرم به وسیله رسوب آنها در محلول سولفات آمونیوم ۳۳٪ استخراج شدند. پس از هر بار استخراج، پروتئین‌ها در بافر بورات سالین حل می‌شدند. عمل تغلیظ پروتئین‌ها با حل کردن پروتئین‌های رسوب یافته و استخراج سوم در یک چهارم حجم اولیه، صورت گرفت. در نهایت محلول حاصل در مقابل بافر بورات سالین برای خروج یون‌های سولفات آمونیوم دیالیز شد (۵).

#### سنجش پروتئین‌ها: جهت سنجش پروتئین‌ها

پس از مراحل استخراج و تغلیظ، از روش برادفورد استفاده شد (۴).

#### غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم در

میلی‌لیتر از آلبومین سرم به عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده شد. جهت قرار گرفتن در محدوده استاندارد، نمونه‌ها ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر رقیق می‌شدند. ۱ میلی‌لیتر محلول کوماسی بلو G-250 را به ۱۰۰ میکرولیتر محلول پروتئین افزوده و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm در مقابل شاهد خوانده می‌شد (۵).

#### الکتروفورز پروتئین‌ها و تخمین غلظت

ایمونوگلوبولین‌ها: قبل و بعد از رسوب دهی به دفعات متعدد، الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل‌های SDS-Polyacrylamide انجام می‌شد. غلظت آکریل آمید در ناحیه جداکننده ۱۰٪ و ولتاژ ۱۶۵ ولت و غلظت در ناحیه تغلیظ‌کننده ۵٪ و ولتاژ ۸۸ ولت بود (۵). به منظور تعیین محل قرارگیری ایمونوگلوبولین‌ها از یک محلول استاندارد ایمونوگلوبولین استفاده شد. رنگ آمیزی پروتئین‌ها در کوماسی برلیانت بلو و رنگ بری ژل توسط محلول اسیداستیک و متانول انجام شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Totalab از روی اسکن باندهای ایجاد

<sup>4</sup> -Goat Anti Rabbit Antibody

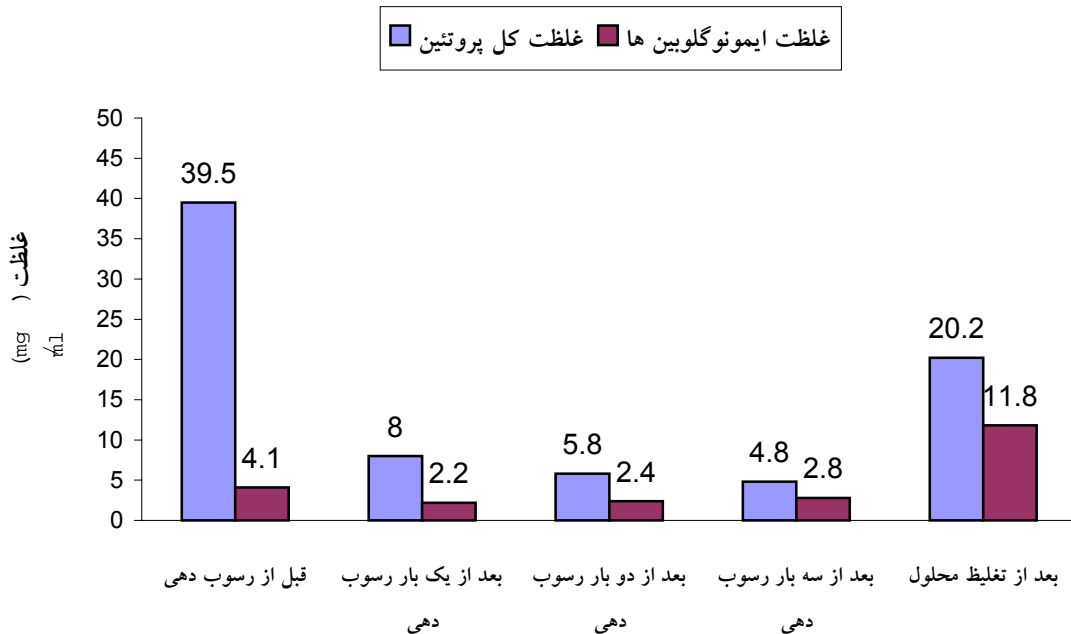
و (B) شمارش سلول‌های زنده در نمونه آزمون می‌باشد.

### یافته‌ها

یافته‌ها امکان تولید آنتی‌بادی پلی‌کلنال با کارایی مناسب علیه سلول‌های *P388D1* را تایید می‌کند. نمودار ۱ تغییرات غلظت کل پروتئین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها در مراحل رسوب‌دهی و هم‌چنین تغلیظ پروتئین‌ها را نشان می‌دهد. جهت تعیین غلظت ایمونوگلوبولین‌ها، درصد باند ایمونوگلوبولین به وسیله نرم‌افزار *Totalab* از اسکن تصویر ژل الکتروفورز (شکل ۱) تعیین شد و سپس غلظت تقریبی ایمونوگلوبولین‌ها محاسبه شد. با تغلیظ پروتئین‌ها غلظت ایمونوگلوبولین‌ها به حدی می‌رسد که می‌توان با این غلظت در آزمایش سمیت اختصاصی وابسته به آنتی‌بادی کمپلمان اقدام به کشتن صد در صد سلول‌های *P388D1* نمود.

تعیین آنتی‌بادی‌ها با استفاده از روش سمیت سلولی وابسته به کمپلمان: در این آزمایش‌ها از سرم خوکچه هندی که سمیت غیراختصاصی آن به وسیله جذب با آگارز کاهش یافته بود به عنوان منبع کمپلمان استفاده شد (۶). تعیین آنتی‌بادی‌ها با این روش به صورت دو مرحله‌ای انجام می‌شد. در مرحله اول، تعداد مشخصی از سلول‌ها با محلول آنتی‌بادی (نمونه آزمون)، و همان تعداد سلول با سرم نرمال خرگوش (به عنوان شاهد) در دمای  $4^{\circ}C$  به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه می‌شدند. در مرحله بعد رقتی از منبع کمپلمان که سمیت غیر اختصاصی پائین و فعالیت کمپلمان مناسب داشت بر روی رسوب سلول‌ها اضافه می‌شد.

پس از نیم‌ساعت انکوباسیون در  $37^{\circ}C$  تعداد سلول‌های زنده شمارش و سمیت اختصاصی مطابق فرمول  $\{A-B/A \times 100\}$  درصد سمیت اختصاصی سلولی محاسبه می‌گردید که در این فرمول (A)، شمارش سلول‌های زنده در نمونه شاهد



نمودار ۱- غلظت کل پروتئین و ایمونوگلوبولین‌های سرم قبل و بعد از مراحل متعدد رسوب‌دهی و تغلیظ نمونه

شکل ۱- ژل SDS-Page مربوط به نمونه ها؛ شماره ۱ (استاندارد)، شماره ۲ (قبل از رسوب دهی بوسیله سولفات آمونیوم)، شماره ۳ (پروتئین های استخراج شده در رسوب دهی اول)، شماره ۴ (پروتئین های استخراج شده در رسوب دهی دوم، شماره ۵ (پروتئین های استخراج شده در رسوب دهی سوم) با هر بار جذب محلول آنتی بادی تولید شده علیه سلول های P388DI به وسیله سلول های مغز استخوان، واکنش متقاطع علیه سلول های مغز استخوان در روش آزمایش ایمنو فلورسانس غیرمستقیم کاهش می یافت. واکنش متقاطع محلول آنتی بادی با سلول های مغز استخوان پس از ۶ بار و ۱۵ بار جذب در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. پس از ۲۶ بار عمل جذب، آنتی بادی های دارای واکنش متقاطع با سلول های مغز استخوان کاملاً حذف شدند (شکل ۴). در حالیکه این محلول دارای واکنش مناسبی علیه سلول های P388DI بود (شکل ۵).

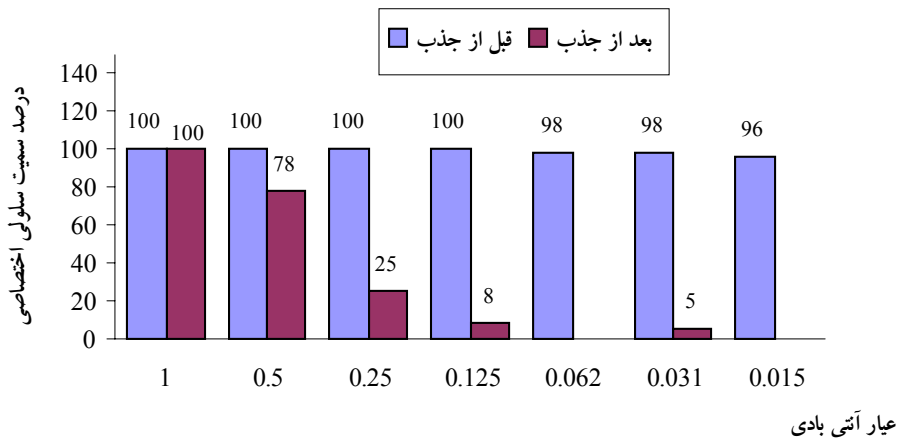
شکل ۲- واکنش سلول های مغز استخوان با محلول آنتی بادی که ۶ بار به وسیله سلول های مغز استخوان جذب شده است (میکروسکوپ فلورسانس)

شکل ۳- واکنش سلولهای مغز استخوان با محلول آنتی بادی که ۱۵ بار به وسیله سلولهای مغز استخوان جذب شده است  
(میکروسکوپ فلورسانس)

شکل ۴- واکنش سلولهای مغز استخوان با محلول آنتی بادی که ۲۶ بار به وسیله سلولهای مغز استخوان جذب شده است  
(میکروسکوپ فلورسانس)

شکل ۵- واکنش سلولهای P388D1 با محلول آنتی بادی که واکنش متقاطع آن با سلولهای مغز استخوان به وسیله ۲۶ بار جذب با سلولهای مغز استخوان حذف شده است (میکروسکوپ فلورسانس)

آنتی بادی های ضد سلولهای P388D1 که کمپلمان نیز بودند. میزان فعالیت کشندگی این سلولها در غلظت های مختلف آنتی بادی در نمودار دارای خاصیت سمیت اختصاصی سلولی وابسته به ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲. درصد سمیت سلولی اختصاصی قبل و بعد از حذف واکنش متقاطع با سلول های مغز استخوان به تفکیک عيار آنتی بادی

P388D1 دارد، جهت افتراق از سلولهای مغز

استخوان استفاده نمود. کارایی و عملکرد اختصاصی

این آنتی بادی در دو روش ایمونو فلورسانس

## بحث

این تحقیق نشان داد که می توان از آنتی بادی

پلی کلونال که عملکرد اختصاصی علیه سلولهای

مکانیسم‌های پدیده فوق هستند (۹ و ۱۰). به علاوه مدت‌ها تلاش، محققان را به این نتیجه رسانده است که حضور سلول‌های استرومایی مغز استخوان نظیر سلولهای اندوتلیال، فیروبلاستها، ماکروفاژها و سلول‌های چربی در کنار سلول‌های خونساز، در ایجاد یک مدل خونسازی در *Invitro* نقش اساسی دارد (۱۱).

سیستم کشت طولانی مدت مغز استخوان نوع دکستر، یک مدل خونسازی در آزمایشگاه است که وابسته به حضور سلول‌های استرومایی می‌باشد. انتقال نقش استروما به دودمانهای سلولی (*cell line*) این مزیت را دارد که سلول‌های خونساز توسط سلول‌هایی همگون حمایت شده و در نتیجه تکرارپذیری آزمایش‌هایی که با استفاده از مدل کشت طولانی مدت مغز استخوان انجام می‌شوند را افزایش می‌دهد (۱۲).

کشت دودمان‌های سلولی تولیدکننده فاکتورهای خاص که فاکتور مورد نظر را در طبیعی‌ترین شکل آن به سلول‌های خونساز و استرومایی عرضه می‌کنند، از دیگر کاربردهای تکنیک هم‌کشت در مطالعات خونسازی است (۱۴ و ۱۳).

از آنجایی که آنتی‌بادی‌های تولیدشده در این تحقیق خاصیت سمیت سلولی وابسته به کمپلمان را نیز علیه سلول‌های *P388DI* دارند، می‌توان به وسیله این آنتی‌بادی‌ها سلول‌های *P388DI* موجود در یک هم‌کشت را از بین برد. تغلیظ آنتی‌بادی‌ها برای رسیدن به غلظتی که بتواند برای صد در صد سلول‌ها کشنده باشد ضروری است. بنابراین در فرایند تولید آنتی‌بادی، ما محلول آنتی‌بادی را ۴ برابر میزان اولیه تغلیظ کردیم. از آنجایی که سلول‌های *P388DI* می‌توانند مانند سلول‌های پیش‌ساز مغز

غیر مستقیم و سمیت اختصاصی وابسته به آنتی‌بادی کمپلمان به اثبات رسید. علت واکنش اختصاصی آنتی‌بادی با سلول‌های *P388DI* احتمالاً مربوط به حضور آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌هایی بر سطح سلول‌های *P388DI* می‌باشد که بر روی سلول‌های مغز استخوان وجود ندارد. وجود یک آنتی‌ژن بر سطح سلول‌های *P388DI* گزارش شده است که بر سطح سلول‌های ماکروفاژ طبیعی وجود ندارد (۳). این آنتی‌ژن بر سطح ماکروفاژهای تحریک‌شده به وسیله پیران یا کوری نه باکتریوم پارووم نیز ظاهر می‌شود. احتمالاً آنتی‌ژن فوق نقش مهمی در مشاهدات ما داشته است. محققان هنگامی متوجه حضور این آنتی‌ژن بر سطح سلول‌های *P388DI* شدند که قبلاً آنتی‌بادی‌های دارای واکنش متقاطع با سلول‌های تیموس را حذف کرده بودند. در بررسی‌های ما، پس از جذب آنتی‌بادی‌های دارای واکنش متقاطع با سلول مغز استخوان، آنتی‌بادی‌های باقی‌مانده هیچ واکنش مثبتی با سلول‌های تیموس نشان ندادند. لذا احتمال آنکه آنتی‌ژنی مختص به سلول‌های *P388DI* سلول‌هایی از بافت تیموس بوده و از نظر پنهان مانده باشد متنفی می‌شود. با به کارگیری آنتی‌بادی با عملکرد اختصاصی علیه سلول‌های *P388DI* می‌توان مدل هم‌کشت سلول‌های مغز استخوان و سلول‌های *P388DI* را مطالعه نمود. اهمیت ایجاد مدل‌های هم‌کشت در مطالعات خونسازی این است که در آسیب‌شناسی سرطان خون، سرکوب خونسازی طبیعی و گسترش خونسازی سرطانی را پدیده‌ای وابسته به تاثیرات متقابل سلول‌های سرطانی با سلول‌های خونساز طبیعی و سلول‌های استرومایی می‌دانند (۸ و ۷). محققان به وسیله تهیه هم‌کشت سلول‌های سرطانی با سلول‌های مغز استخوان به دنبال یافتن



به کشتن سلول‌های P388D1 نمود. تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال با واکنش اختصاصی علیه سلول‌های P388D1 با زحمت زیادی همراه می‌باشد. تولید آنتی‌بادی منوکلونال می‌تواند این آنتی‌بادی را در دسترس محققان قرار دهد.

استخوان در یک محیط کشت نیمه جامد کلونی ایجاد کنند، تشخیص کلونی‌های خونساز را مشکل می‌کنند. از خصوصیت سمیت وابسته به آنتی‌بادی کمپلمان می‌توان در آزمایش تعیین تعداد سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان استفاده نمود. به این ترتیب که قبل از انجام آزمایش با استفاده از آنتی‌بادی اقدام

#### References:

1. Van Loveren H, Hilgers J, De Bakker JM, et al. Macrophage-like cell lines: endogenous peroxidatic activity, cell surface antigens, and colony-stimulating factor production. *J Reticuloendothel Soc Mar.* 1983; 33:221-229.
2. Koren HS, Handwerker BS, Wunderlich JR. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol.* 1975;114:2894-2897.
3. Kaplan AM, Bear HD, Kirk L, et al. Relationship of expression of A cell-surface antigen on activated murine macrophages to tumor cell cytotoxicity. *Immunol.* 1976;120:2080-2085.
4. Goliaei B, Deizaji A, Rabbani A. Heterogeneity of macrophage populations: antibodies detecting various populations of macrophages. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran.* 1991;5:49-54.
5. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:47-58.
6. Mishell BB, Shiigi SM. *Selected Methods in Cellular Immunology.* W. H. Freeman and Company; 1989: 446-447.
7. Broxmeyer HE, Moore MA. Communication between white cells and the abnormalities of this in leukemia. *Biochim Biophys Acta.* 1978;516:129-166.
8. Litchman, MA. Interrupting the inhibition of normal hematopoiesis in myelogenous leukemia: a hypothetical approach to therap. *Stem Cells.* 2000;18(5):304-306.
9. Jiang H, Sugimoto R, Sawada H, et al. Mutual education between hematopoietic cells and bone marrow stromal cells through direct cell-to-cell contact: factors that determine the growth of bone marrow stroma-dependent leukemic HB-1 cells. *Blood Aug.* 1998;92:834-834.
10. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, et al. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood.* 1995;85:3636-3645.
11. Allen TD, Dexter TM, Simmons PJ. Marrow biology and stem cells. *Immunol Ser.* 1990;49: 1-38.
12. Nadali G, de Wynter EA, Perandin F, et al. Regulation of the proliferative potential of cord blood long-term culture-initiating cells (LTC-IC) by different stromal cell lines: implications for LTC-IC measurement. *Haematologica.* 1998;83(12):1059-1065.
13. Sutherland HJ, Eaves PM, Lansdorp JD, et al. Differentiation of primitive human hematopoietic cells in Long-Term Cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. 1991;78(3):666-672.
14. Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, et al. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood.* 1996;87(10): 4149- 4157.