مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر تالیدومایید و سدیم بوتیرات در القای تمایز سلول‌های بنیادی خون بندناف به سمت رده اریتروئیدی

علی دهقانی فرد[۱]، سعید کاویانی[۱]*، مهرداد نوروزی نیا[۲،۳]، مسعود سلیمانی[۱]، سعید آبرون[۱]، زهرا ذنوبی[۴]، محمد احمدوند[۵]

۱- گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، بیمارستان صارم، تهران
۴- گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۵- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان

چکیده

استفاده از داروهای القاکننده هموگلوبین جنینی در رویکرد نوین درمانی در بیماران مبتلا به β-تالاسمی و بیماری داسی شکل حائز اهمیت می‌باشد. این داروها با مکانیسم‌های مختلف از جمله افزایش تکثیر و تمایز پیش سازهای اریتروئیدی سبب تولید هموگلوبین جنینی می‌گردند. تالیدومایید و سدیم بوتیرات دو داروی مؤثر در القای بیان هموگلوبین جنینی می‌باشند که به صورت تیمار تک دارویی و ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند. این تحقیق بر روی سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های بنیادی $CD133^+$ جدا شده از خون بند ناف انجام شد. از تکنیک فلوسیتومتری جهت ارزیابی هموژن بودن سلول‌های $CD133^+$ جداشده استفاده شد. سپس با استفاده از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئتیک، قدرت کلونی زایی در گروه‌های تیمار دارویی تعریف شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از فلوسیتومتری حاکی از هموژن بودن سلول‌های بنیادی $CD133^+$ جداشده از خون بندناف به میزان بیش از ۹۵٪ می‌باشد. همچنین نتایج بدست آمده از آزمون سنجش کلونی بیانگر تأثیر تالیدومایید در افزایش تعداد کلونی‌های هماتوپوئتیک و کلونی‌های اریتروئیدی (به ترتیب افزایش ۱/۳ و ۱/۵ برابری) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد($p<0/05$). نتایج بدست آمده حاکی از توان بالای تالیدومایید در افزایش کلون زایی و عدم وجود تأثیرات سیتوتوکسیک در استفاده از این دارو در مقایسه با سدیم بوتیرات و ترکیب دارویی می‌باشد($p<0/05$).

واژگان کلیدی: β-تالاسمی؛ بیماری داسی شکل؛ سلول‌های بنیادی $CD133^+$؛ هموگلوبین جنینی؛ تالیدومایید؛ سدیم بوتیرات.

مقدمه

بتا تالاسمی و بیماری داسی شکل [۱] (SCD) از جمله اختلالات وراثتی شایع در سرتاسر جهان بویژه در مناطق مدیترانه ای، خاور میانه و آسیای جنوب شرقی بوده که میلیون‌ها نفر را مبتلا نموده است. بتا تالاسمی در نتیجه طیف وسیعی از جهش‌های نقطه ای و حذفی در ژن β-گلوبین ایجاد می‌گردد و منجر به کاهش و یا عدم تولید محصول گلوبینی این ژن می‌گردد. در نتیجه به دنبال رسوب زنجیره‌های α-گلوبینی باند نشده در پیش سازهای اریتروئیدی، اریتروپوئز غیر مؤثر ایجاد می‌گردد(۱). در SCD نیز هموگلوبین S ایجاد شده در اثر جهش در ژن β-گلوبین، به دنبال ایجاد شرایط هیپوکسی در گلبول‌های قرمز رسوب کرده و عوارض مرتبط با بیماری شکل می‌گیرند(۲).

دیده شده است که القای بیان ژن γ-گلوبین و در نتیجه افزایش

* سعید کاویانی، PhD
دکتری تخصصی هماتولوژی، استادیار گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس،
بزرگراه جلال ال احمد، دانشگاه تربیت مدرس ، ساختمان ۵ پزشکی
تلفن: ۸۲۸۸۳۸۳۲-۰۲۱
پست الکترونیک: kavianis@modares.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۱۴

1. Sickle Cell Disease

Archive of SID
www.SID.ir

سطح هموگلوبین جنینی [۲] (HbF) در دوران پس از تولد، می‌تواند به عنوان یک راه کار درمانی مؤثر در درمان β-تالاسمی و SCD مطرح گردد. در حقیقت القای بیان HbF در بیماران مبتلا β-تالاسمی سبب مهار رسوب زنجیره‌های α-گلوبین اضافی که قادر به شرکت در ساختار هموگلوبین نیستند، می‌شود(۳, ۴). در سال‌های اخیر استفاده از داروهایی که با تغییر در الگوی اپی ژنتیکی ژن‌ها سبب افزایش بیان ژن‌های γ_G و γ_A می‌گردند، مورد توجه قرار گرفته اند. از جمله این داروها می‌توان به آزاسیتیدین (۵)، دسی تابین (۶)، بوتیرات (۷)، پمالیدومایید (۸) و تالیدومایید (۹) اشاره داشت. برخی از این داروها از طریق کاهش متیلاسیون در ناحیه CpG اختصاصی که بالادست ناحیه شروع رونویسی ژن‌های γ_G و γ_A قرار گرفته اند، سبب افزایش بیان HbF می‌گردند. برخی دیگر از داروها با مکانیسم افزایش استیلاسیون بویژه H۳ و H۴ در پروموتر ژن‌های γ_G و γ_A که سبب کاهش برهم کنش بین DNA و هیستون‌ها می‌گردند، در این افزایش بیان ایفای نقش می‌کنند (۱۰, ۱۱). دیده شده است که تغییر در الگوی متیلاسیون هیستون‌ها نیز می‌توانند در القای بیان ژنی مؤثر باشند (۱۱).

همچنین دیده شده است که استفاده از داروهای محرک اریتروپوئز می‌تواند به دنبال افزایش تولید پیش سازهای اریتروئیدی، سبب افزایش بیان HbF در invitro گردد. در حقیقت رابطه تنگاتنگی میان افزایش بار تکثیر و تمایز در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی و افزایش تولید HbF وجود دارد (۱۲). در تحقیق حاضر اثر تالیدومایید و سدیم بوتیرات به عنوان دو داروی القا کننده اپی ژنتیکی بیان HbF، در افزایش تولید پیش سازهای رده اریتروئیدی در invitro مورد بررسی قرار گرفته است. داروهای مذکور به منظور افزایش تولید پیش سازهای رده اریتروئیدی مشتق از سلول‌های $CD۱۳۳^+$ خون بندناف، به صورت تیمار تک دارویی و ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند.

روش بررسی

داروها و فاکتورهای رشد تمایز اریتروئیدی

به منظور تمایز سلول‌های بنیادی $CD۱۳۳^+$ به رده اریتروئیدی، از اریتروپوئتین نوترکیب (EPO; R&D systems, Minne-apolis, MN, USA) و اینترلوکین ۳ (IL-۳; stem cell Technology, Vancouver, BC, Canada) استفاده شد. همچنین به منظور القای بیان ژن γ-گلوبین در پیش سازهای اریتروئیدی و بررسی تغییر الگوی متیلاسیون هیستونی، از دو داروی تالیدومایید (Tocris Bioscience, Missouri, USA) و سدیم بوتیرات (Sigma, Saint Louis, MO, USA) استفاده شد.

جداسازی سلول‌های $CD۱۳۳^+$ از خون بندناف

در ابتدا خون بندناف از مادران سالم پس از انجام زایمان طبیعی و از اخذ رضایت نامه کتبی، در کیسه خون حاوی ضدانعقاد اسید سیترات دکستروز جمع‌آوری شد. سپس در مرحله اول به‌منظور جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای، نمونه خون بندناف که حجمی حدود ۱۰۰ میلی لیتر داشت با محلول هیدروکسی اتیل استارچ با نسبت یک به شش رقیق شد. سپس با نسبت یک به دو (نسبت فایکول به خون بندناف) روی فایکول (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) با دانسیته ۱/۰۷۷ اضافه شد. بعد از آن سانتریفیوژ به مدت ۴۰ دقیقه و در دور 400G (1410 rpm) انجام شد. در پایان سانتریفیوژ به دلیل تفاوت چگالی سلولی، به ترتیب از بالا به پایین چهار بخش گلبول قرمز، فایکول، لایه سلول‌های تک هسته ای و پلاسما تشکیل شد. لایه سلولی تک هسته ای جمع آوری شده و با سه حجم فسفات بافر سالین (PBS) (pH=7.2) حاوی EDTA مخلوط شد و مجددا سانتریفیوژ این بار در دور 300G (1200 rpm) به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. این کار سبب حذف فایکول و پلاکت باقی مانده می‌شود. در پایان مرحله اول، رسوب سلولی حاوی سلول‌های تک هسته ای دو بار با PBS حاوی EDTA شستشو شد. در مرحله دوم نیز جداسازی سلول‌های بنیادی $CD۱۳۳^+$ از سلول‌های تک هسته ای انجام گرفت. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد CD۱۳۳ نشاندار شده با ذرات آهن به سلول‌های تک هسته‌ای افزوده، سپس حدود ۱ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و یا ۳۰ در دمای $C۴^\circ$ انجام می‌شود. بعد از آن سانتریفیوژ به مدت حدود ۷دقیقه و در دور 400G (1410 rpm) انجام می‌شود. پس از خارج کردن مایع رویی، حدود ۵۰۰ میکرولیتر PBS حاوی EDTA به رسوب سلولی اضافه شده و پیپتاژ تا حد یکنواخت شدن سوسپانسیون سلولی انجام می‌گیرد. حال سوسپانسیون سلولی از ستون MACS

2. Fetal Hemoglobin

Archive of SID
www.SID.ir

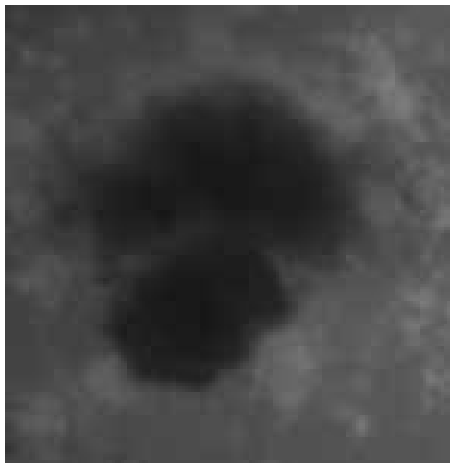
Miltenyi) (Magnetic Activated Cell Sorting) Biotech, Germany) و بر اساس دستورالعمل کیت عبور داده می‌شود. در پایان سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$از سایر سلول‌های تک هسته ای تخلیص می‌گردند. به منظور بررسی تعداد سلول‌های تخلیص شده، حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با یک قطره تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شده و به کمک لام نئوبار، شمارش سلولی انجام گرفت. در پایان حدود ۵×۱۰^{۴} سلول زنده شمارش شد. سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ جداشده به منظور انجام تکثیر سلولی، به محیط StemSpan حاوی فاکتورهای رشد SCF، TPO و Flt۳-L اضافه شده و به مدت حدود یک هفته تحت شرایط تکثیر باقی ماندند.

فلوسیتومتری

به منظور بررسی هموژنیسیته و درجه خلوص سلول‌های جدا شده از نظر مارکر CD۱۳۳، از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر PBS به حدود $۱۰^{۴}$ سلول اضافه شد. پس از پیپتاژ کردن با سمپلر و ایجاد سوسپانسیون سلولی یکنواخت، حدود ۷ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال CD۱۳۳ نشاندار با فیکو اریترین (PE) (clone, AC141; Miltenyi Biotech, Germany) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $۴\ C^{\circ}$ انکوبه شده و سپس به آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول پارافرمالدهید ۱٪ افزوده شد. به منظور از بین بردن اثر اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی‌ها، از ایزوتیپ IgG۱ موشی نشاندار شده با FITC به عنوان کنترل منفی (IQ-Products, the Netherlands; IQP-191F)استفاده شد.

آزمون سنجش کلونی هماتوپوئتیک

به منظور ارزیابی قدرت کلونی زایی سلول‌های بنیادی و همچنین ارزیابی قدرت تمایز این سلول‌ها به سمت رده اریتروئیدی از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئتیک استفاده شد. برای این منظور سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ جدا شده از خون بند ناف ۳ اهداکننده، در محیط پایه متیل سلولز (MethoCult H4230, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) حاوی محیط کشت IMDM با ۲٪ FBS، ۵ng/ml اینترلوکین-۳، ۳U/ml



شکل ۱: کلونی اریتروئیدی در محیط کشت القاکننده تمایز (پایه متیل سلولز) در روز ۱۴ تمایز با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰×

اریتروپوئتین و غلظت‌های مشخص از داروها در گروه‌های تعریف شده (10T, 10S, 10T/S, DMSO)، در پتری دیش‌های ۳۵ میلی متری کشت شدند. سپس پتری دیش‌ها در انکوباتور کشت سلولی در دمای $۳۷^{o}C$ و به میزان ۵٪ $CO_{۲}$ با رطوبت بالا ان‌کوبه شدند. سپس در روز ۱۴ تمایز اریتروئیدی، رنگ بنزیدین درون پتری دیش‌ها اضافه شده و پس از حدود ۱۵ دقیقه محلول حاوی ۵۰٪ درصد متانول و ۵۰٪ درصد آب مقطر که حدود ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه شده است، به مدت حدود ۲۰ دقیقه به پتری دیش‌ها افزوده می‌گردد. در نهایت تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و تعداد کل‌ونی‌های اریتروئیدی بنزیدین مثبت با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست معکوس مورد شمارش قرار گرفتند. نمونه کلونی اریتروئیدی تشکیل شده در روز ۱۴ تمایز در شکل ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Microsoft® Excel 2007 و SPSS 15 و به‌کمک آزمون t انجام گرفت. نتایج بدست آمده حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت (±SD) می‌باشند. از نظر آماری نیز مقدار $p<۰/۰۵$ به صورت معنی‌دار بررسی شد.

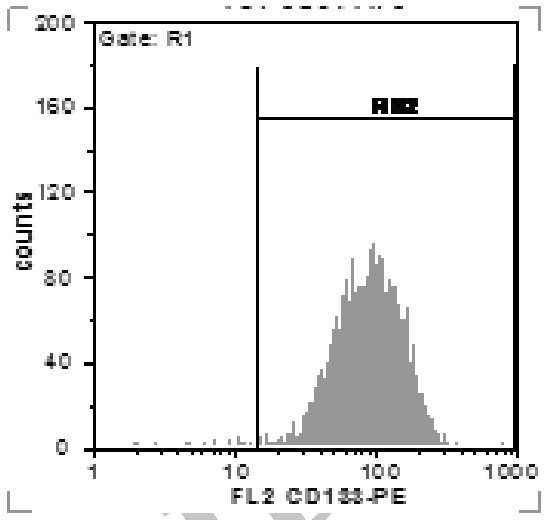
یافته‌ها

نتایج حاصل از فلوسیتومتری

همانطور که در شکل۲ نشان داده شده است، نتایج فلوسیتومتری

Archive of SID

www.SID.ir

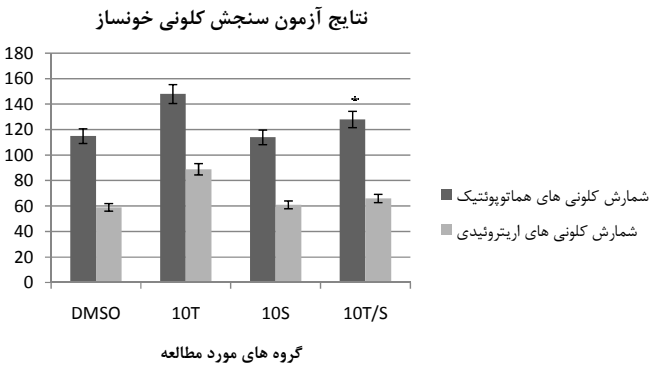


شکل ۲: نتایج حاصل از فلوسیتومتری سلول‌های جداسازی شده از نظر درجه خلوص جمعیت سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$

حاکی از درجه خلوص بالای سلول‌های جدا شده از نظر بیان مارکر CD۱۳۳ می‌باشد. بیش از ٪۹۵ از سلول‌های جدا شده با MACS پس از انجام تکثیر سلولی، $CD۱۳۳^{+}$ بودند.

نتایج حاصل از آزمون سنجش کلونی‌های هماتوپوئتیک

در پایان روز ۱۴ از تمایز سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ به رده اریتروئیدی در گروه‌های ۱۰T، ۱۰S، ۱۰T/S و DMSO شمارش کلونی‌های تشکیل شده انجام گرفت. شکل ۳ به بررسی و مقایسه تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و تعداد کلونی‌های اریتروئیدی بنزیدین مثبت در گروه‌های تعریف شده می‌پردازد. نتایج بدست آمده حاکی از تأثیر بیشتر تالیدومایید در افزایش تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و کلونی‌های اریتروئیدی در مقایسه با سدیم بوتیرات و ترکیب دارویی می‌باشد. همچنین نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که در گروه تالیدومایید افزایش ۱/۳ برابری در تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و افزایش ۱/۵ برابری در تعداد کلونی‌های اریتروئیدی در مقایسه با گروه کنترل (DMSO) وجود دارد. این در حالی است که در گروه سدیم بوتیرات و گروه ترکیب دارویی افزایش قابل توجهی در تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و تعداد کلونی‌های اریتروئیدی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد.



شکل ۳: نتایج مربوط به شمارش تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و تعداد کلونی‌های اریتروئیدی در گروه‌های تعریف شده در روز ۱۴ تمایز اریتروئیدی
نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت (±SD) می‌باشند
*P<۰.۰۵ در مقابل سلول‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو)
Abbreviations [10T: 10 μM Thalidomide; 10S: 10 μM Sodium butyrate; 10T/S: 10 μM Thalidomide/10 μM Sodium butyrate]

بحث

در این تحقیق در ابتدا جداسازی سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ با استفاده از تکنیک ایمونومگنتیک و توسط ستون MACS انجام پذیرفت. همانطور که قبلا اشاره شد، در هر بار انجام تکنیک MACS حدود ۵×۱۰^{۴} سلول با درجه خلوص حدود ٪۹۵ جداسازی شد. دیده شده است که سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ در مقایسه با سلول‌های $CD۳۴^{+}$ ابتدایی تر می‌باشند(۱۲).

در این تحقیق پس از جداسازی سلول‌های بنیادی $CD۱۳۳^{+}$ از خون بند ناف، تکثیر آنها در محیط کشت StemSpan و با استفاده از فاکتورهای رشد SCF، TPO و Flt۳-L در محیط آزمایشگاهی انجام شد. البته Oudenrijn و همکارانش طی مطالعه ای به اثرات مناسب دو فاکتور رشد TPO و IL-۳ در تکثیر سلول‌های $CD۱۳۳^{+}$ اشاره داشتند. آنها دریافتند که استفاده همزمان از فاکتورهای TPO و IL۳ باعث افزایش تکثیر سلولهای $CD۱۳۳^{+}$ می‌شود(۱۳).

همچنین نتایج حاصل از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئتیک نشان داد که تالیدومایید در غلظت مورد استفاده هیچ گونه تأثیر سیتوتوکسیکی به همراه ندارد. نتایج بدست آمده از تحقیق Aerbajinai و همکاران نیز این یافته را تأیید می‌نماید(۹). این در حالی است که سدیم بوتیرات تا حدی دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشد(۴). البته تحقیقات دیگر نشان می‌دهند که تجویز متناوب بوتیرات در مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir

با تجویز پیوسته می‌تواند سبب مهار اثرات سیتوتوکسیک دارو و در نتیجه افزایش تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی گردد(۱۴). در تحقیق حاضر مشاهده شد که قدرت کلونی زایی در گروه تالیدومایدبیشتر از گروه سدیم بوتیرات و گروه ترکیب دارویی می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از تالیدومایدبه دنبال افزایش تحریک اریتروپوئز، می‌تواند تأثیر مناسبی در القای بیان HbF نیز به همراه داشته باشد. همچنین با توجه به عدم بروز اثرات سیتوتوکسیک در استفاده از تالیدومایدبه، استفاده از این دارو در تحقیقات دیگری جهت القای بیان ژن γ- گلوبین می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری

به عنوان نتیجه گیری کلی به نظر می‌رسد که با توجه به عدم بروز اثرات سیتوتوکسیک در استفاده از تالیدومایدبه، استفاده از این دارو در تحقیقات بعدی جهت القای بیان ژن γ- گلوبین به منظور درمان بیماران می‌تواند بیشتر مورد توجه قرار گیرد. در استفاده از ترکیب دارویی تالیدومایدبه و سدیم بوتیرات نیز می‌بایست اثر سینرژیک این دو دارو در القای بیان ژن γ- گلوبین مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین استفاده از ترکیب دارویی سبب کاهش دوز مصرفی و در نتیجه کاهش اثرات سیتوتوکسیک دارو بخصوص در مورد سدیم بوتیرات خواهد شد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (شماره ثبت پایان نامه ۲۰۲۷۳۹۹) می‌باشد. همچنین بدینوسیله از همکاری مس‌ئولین پژوهشکده سلول‌های بنیادی و آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی صارم و همینطور سرکار خانم دکتر نیکوگفتار در سازمان انتقال خون ایران و جناب آقای دکتر آتشی در مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بن یاخته قدردانی و تشکر می‌نماییم.

References

1. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010;5(1):11.
2. Fathallah H, Taher A, Bazarbachi A, Atweh GF. Differences in response to fetal hemoglobin induction therapy in [beta]-thalassemia and sickle cell disease. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2009;43(1):58-62.
3. Ataga KI. Novel therapies in sickle cell disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:54-61.
4. Perrine SP, Castaneda SA, Chui DHK, et al. Fetal globin gene inducers: novel agents and new potential. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1202(1):158-64.
5. DeSimone J, Heller P, Hall L, Zwiers D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1982;79(14):4428-31.
6. DeSimone J, Koshy M, Dorn L, et al. Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia. Blood. 2002;99(11):3905-8.
7. Fathallah H, Weinberg RS, Galperin Y, et al. Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin. Blood. 2007;110(9):3391-97.
8. Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34 cells. J Clin Invest. 2008;118(1):248-58.
9. Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, et al. Thalidomide induces -globin gene expression through increased reactive oxygen species–mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. Blood. 2007;110(8):2864-71.
10. Atweh GF, DeSimone J, Sauntharajah Y, et al. Hemoglobinopathies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:14-39.
11. Kiefer CM, Hou C, Little JA, Dean A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. Mutat Res. 2008; 647(1-2):68-76.
12. Atashi A, Soleymani M, Kaviani S, et al. In vitro induction of fetal hemoglobin in erythroid cells derived from CD133+ cells by transforming growth factor-β and stem cell factor. Iranian Journal of Biotechnology. 2008;6(3):157-63.
13. Oudenrijn S, Borne V, Hass M. differences in megakaryocyte expansion potential between CD34+ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and childeren. Experimental Hematology 2000; 28:1054-61.
14. Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. Hematology. 2006;2006(1):58-62.

Archive of SID

www.SID.ir