خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۴ زمستان ۹۵ (۳۰۳-۲۹۱)

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده با سکرتوم حاصل از سلول‌های بنیادی دست‌ورزی شده با *Nrf2* بر روی آسیب حاد کلیوی در موش صحرایی

فاطمه ژاله[۱]، فاطمه امیری[۲]، مژگان دهقان هراتی[۳]، مهریار حبیبی رودکنار[۴]، محمد علی جلیلی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

کاهش شدید بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند، از چالش‌های اساسی استفاده از این سلول‌ها است. در این مطالعه با هدف افزایش بقای این سلول‌ها پس از پیوند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی نشده تحت تیمار با سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* قرار گرفتند. سپس اثرات درمانی این سلول‌ها در مدل حیوانی آسیب حاد کلیوی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1-*Nrf2* به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ترانسفکت شد و سکرتوم سلول‌ها جمع‌آوری گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* کشت داده شدند. سلول‌های مجاور شده با سکرتوم، به موش‌های صحرایی (گروه ۱۰ تایی) دچار آسیب حاد کلیوی تزریق شد و اثر درمانی این سلول‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

۱۴ روز پس از درمان، کاهش BUN در گروهی که تزریق سلول‌های کشت داده شده در سکرتوم داشتند (۳/۵ ± ۴۸ mg/dL) نسبت به گروهی که سلول‌های طبیعی دریافت کرده بودند(۹/۹ ± ۱۰۰ mg/dL) تفاوت معناداری داشت(p< ۰/۰۰۱). تعداد کست(۰/۲۶) مشاهده شده در مقاطع بافتی این گروه نیز کمتر از گروه دریافت‌کننده سلول‌های طبیعی(۰/۵۱) بود.

نتیجه گیری

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* ، اثرات ترمیمی این سلول‌ها را در بهبود آسیب حاد کلیوی افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: **سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آسیب حاد کلیوی، کاندیشن مدیوم**

تاریخ دریافت: ۹۴/ ۴/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۴

۱- کارشناس ارشد زیست فن‌آوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- کارشناسی ارشد زیست فن‌آوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی(Mesenchymal Stem Cells) گروهی از سلول‌های کلونی‌زا و چند توان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلف سلولی از جمله استخوان، چربی، غضروف و سلول‌های عضله قلبی و اسکلتی تمایز یابند(۳-۱). این سلول‌ها در انجام روش سلول درمانی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارند(۶-۴).

یکی از مشکلات عمده در استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاهش بقای سلول‌ها به دنبال پیوند می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد یافتن راهکاری جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند حائز اهمیت باشد (۸، ۷).

دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عوامل محافظت‌کننده سلولی از راه‌کارهای مؤثر در جهت افزایش بقای آن‌ها است. از این عوامل محافظت‌کننده سلولی می‌توان-(NF-E2) [Nuclear factor-erythroid2 Related Factor2] را نام برد. *Nrf2* نقش مهمی در حفاظت علیه استرس‌های اکسیداتیو، آسیب‌های سلولی ناشی از مواد شیمیایی، حفاظت از تشکیل سرطان و ترمیم زخم دارد(۱۰، ۹). تقویت ویژگی ضد آپوپتوز و ضد اکسیداتیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دنبال آلودگی با آدنو ویروس‌های محتوی ژن *Nrf2* می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های محافظت سلول‌های پیوندی در برابر مرگ سلولی به کار رود(۱۱).

اما دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها با هدف استفاده در درمان در مرحله بالینی مورد تائید سازمان بهداشت جهانی و سازمان‌های معتبری هم چون سازمان غذا و داروی آمریکا نیست.

مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های مزانشیمی، بسیاری از فاکتورهای رشد، سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را به محیط ترشح می‌کنند که این مواد فعال زیستی ترشح شده ضمن افزایش بقای این سلول‌ها می‌توانند باعث افزایش اثرات ترمیم بافتی آن‌ها شوند(۱۵-۱۲).

بیماری‌های کلیوی مانند آسیب حاد کلیوی (Acute kidney injury: AKI)، به عنوان یکی از مشکلات تهدیدکننده سلامت جامعه مطرح می باشند. در حالی که روش‌های درمانی موجود(دیالیز و پیوند کلیه) تنها باعث افزایش طول عمر بیمار شده و علاوه بر هزینه‌های بالای درمان، موفقیت آن‌ها مستلزم مراقبت مستمر پزشکی می‌باشد(۱۶). بنابراین در این مطالعه به منظور مرتفع نمودن مشکل ممانعت استفاده از سلول‌های بنیادی دست‌ورزی شده در سطح بالینی و با هدف افزایش بقای این سلول‌ها پس از پیوند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی نشده تحت تیمار با سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* قرار گرفتند. پس از کشت این سلول‌ها در مجاورت سکرتوم به منظور افزایش مقاومت سلولی در برابر شرایط نامناسب محیطی، این سلول‌ها به موش‌های صحرایی مدل آسیب حاد کلیوی تزریق شدند و اثرات درمانی آن‌ها در روزهای مختلف ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان موجود در ذخیره سلولی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون که قبلاً مارکرهای سطحی و توانایی تمایز آن‌ها به سه رده چربی، استخوان و غضروف بررسی و تأیید شده بود، استفاده شد(۱۱). پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-*Nrf2*) که با روش‌های PCR ، هضم آنزیمی و توالی‌یابی DNA تأیید شده بود، به صورت ذخیره(Stock) در باکتری اشرشیاکولی نوع DH5α در مرکز تحقیقات مذکور موجود بود(۱۱).

آماده‌سازی و استخراج پلاسمید نوترکیب:

باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1-*Nrf2* از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج شد. به اندازه یک لوپ از این باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار(شرکت ایوی من استرالیا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پلاسمیدها با استفاده از کیت اختصاصی استخراج پلاسمید(شرکت رُوش آلمان) و بر اساس روش کار توصیفی کیت، استخراج شدند. سپس غلظت پلاسمیدهای استخراج شده و کیفیت آن‌ها با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ(شرکت‌های تک آمریکا) ارزیابی شد.

آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد یا تانک ازت خارج شده، پس از یخ‌زدایی با محیط کشت سلولی DMEM-Low glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین(هر سه ماده از شرکت اینویتروژن آمریکا) مخلوط شدند. مخلوط حاصل به ظروف کشت مناسب و استریل منتقل و در انکوباتور استاندارد کشت سلولی کشت داده شدند. سپس تعداد ۲۰۰ هزار عدد از این سلول‌ها در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، از آن‌ها جهت انجام مراحل ترانسفکشن(ورود DNA پلاسمیدی به داخل سلول) استفاده شد.

ترانسفکشن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه از ماده فیوژن اچ‌دی(شرکت رُوش آلمان) جهت وارد کردن pcDNA3.1-*Nrf2* به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان استفاده شد. نسبت‌های مناسب از فیوژن اچ‌دی با pcDNA3.1-*Nrf2* ، (۴ به ۱، ۶ به ۲ و ۵ به ۱/۵) مخلوط شده و پس از گذشت ۰/۵ ساعت به محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در چاهک‌های مختلف پلیت‌های ۶ خانه‌ای اضافه شد. پس از گذشت ۵-۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها با استفاده از محیط کشت سلولی DMEM-Low glucose حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین تازه تعویض شد.

تأیید بیان ژن‌های Nrf2 به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس(RT-PCR) و وسترن بلات:

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن بیان *Nrf2* در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-*Nrf2* (که MSC-*Nrf2* نامیده شدند) به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس (Reverse transcriptase-PCR) و وسترن بلات بررسی شد. RNA سلول‌های MSC-*Nrf2* و سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی نشده(MSC) به عنوان گروه کنترل با استفاده از ماده ترایزول(شرکت اینویتروژن آمریکا) و طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. cDNA آن‌ها با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت بیونیر آمریکا) و بر اساس روش کار توصیفی کیت ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی ژن *Nrf2* با استفاده از سایت NCBI طراحی و بلاست شدند. توالی آغازگرهای طراحی شده بدین شرح بود:
آغازگر جلوبرنده: 5'GTT GGC AGA TCC ACT GGT TTC TG3
و
آغازگر معکوس: 5´ GCG ACG GAA AGA GTA TGA GCT GG 3´.

واکنش‌های PCR با استفاده از دوره‌های دمایی و زمانی مناسب ایجاد شده توسط دستگاه PCR (شرکت تاکارای ژاپن) و همانند مطالعه‌های قبلی انجام شد(۱۵، ۱۱). محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. باندهای ایجاد شده با دستگاه ترانس لومیناتور(شرکت تتروی انگلیس) مشاهده و تفسیر گردید. هم چنین جهت تأیید بیان پروتئین Nrf2 در سطح پروتئین از روش وسترن بلات استفاده شد. بدین منظور ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، لیزات سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pcDNA3.1-*Nrf2* با استفاده از بافر لیزکننده M (شرکت رُوش آلمان) تهیه شد. لیزات سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت نشده نیز به عنوان گروه کنترل تهیه گردید. به منظور جدا کردن پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی، ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد(SDS-page). به دنبال الکتروفورز، نمونه‌ها به غشاء PVDF منتقل شده و با استفاده از آنتی‌بادی اولیه خرگوشی علیه پروتئین Nrf2انسانی(شرکت ابکم انگلیس) و آنتی‌بادی ثانویه پلی‌کلونال بز بر علیه خرگوش متصل شده به آنزیم پراکسیداز(شرکت سل سیگنالینگ)، بیان پروتئین Nrf2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

جمع‌آوری و تغلیظ سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با پلاسمید نوترکیب ذکر شده و به روش توصیف شده ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد محیط کشت آن‌ها با محیط کشت دارای ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین فاقد سرم تعویض شد و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لوله‌های دارای فیلتر ۳ کیلودالتون(شرکت سارتوریوس آلمان) و سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه تغلیظ شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مجاورت سکرتوم سلول‌های دست ورزی شده:

تعداد ۲۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در پلیت ۶ خانه‌ای در محیط DMEM-LG دارای ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین کشت داده شدند. بعد از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت پلیت‌ها تخلیه شده و سلول‌ها در محیط کشت تازه حاوی ۷٪ سکرتوم حاصل از سلول‌های ترانسفکت شده با *Nrf2* (۷۰ میکرولیتر سکرتوم به اضافه ۹۳۰ میکرولیتر محیط کشت ذکر شده) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور استاندارد کشت سلولی نگهداری شدند. این گروه، S-Nrf2 نامیده شدند. هم زمان گروه کنترل (MSC) که شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون دست‌ورزی ژنتیکی و تیمار سکرتومی بودند نیز کشت داده شدند.

بهینه‌سازی القای آسیب حاد کلیوی و ارزیابی آسیب با دو روش بیوشیمیایی و پاتولوژی:

به منظور تعیین دوز بهینه برای القای آسیب حاد کلیوی(AKI) ، موش‌های صحرایی نر از گونه رتوس نروژیکوس با سن ۱۲-۸ هفته و وزن ۲۵۰-۱۸۰ گرم به مدت ۱۸ ساعت در شرایط بی‌آبی قرار داده شدند در حالی که مواد غذایی طبق دستورالعمل استاندارد در اختیار حیوان قرار داده شد. مقادیر مختلف از محلول گلیسرول (۵، ۸، ۱۰، ۱۳ و ۱۵ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن حیوان) به صورت درون ماهیچه‌ای به حیوان تزریق شد. سپس در بازه‌های زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، میزان آسیب ایجاد شده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بهترین مقدار و مناسب ترین زمان برای ایجاد آسیب تعیین شود.

گروه‌بندی موش‌های صحرایی و بررسی اثر درمانی سلول‌های بنیادی کشت داده شده در سکرتوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن Nrf2 بر بهبود آسیب حاد کلیوی:

پس از تزریق درون ماهیچه‌ای گلیسرول و القای موفقیت‌آمیز آسیب حاد کلیوی، موش‌های صحرایی به ۴ گروه اصلی ۱۰ تایی تقسیم شدند و سلول‌های مورد نظر به طور سیستمیک با استفاده از سرنگ انسولین به سیاهرگ دمی حیوان تزریق شدند. خصوصیات ۴ گروه تحت مطالعه بدین شرح بود:

گروه ۱: هیچ تزریقی صورت نگرفت (.Cont)

گروه ۲: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PBS)

گروه ۳: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی بافر فسفات و تعداد ۲ میلیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC)

گروه ۴: تزریق ۳۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی بافر فسفات و تعداد ۲ میلیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در مجاورت سکرتوم (S-Nrf2).

بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن Nrf2 بر میزان اوره و کراتینین موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی:

بر اساس گروه‌بندی انجام شده، در روزهای ۳، ۱۰ و ۱۴ پس از تزریق، میزان اوره و کراتینین نمونه سرم مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب نمونه‌های خون تهیه شده در دور rpm ۴۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از آن سرم خون از محتویات سلولی خون جدا شد. میزان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

اوره و کراتینین سرم تهیه شده در آزمایشگاه بیوشیمی سازمان انتقال خون ایران اندازه‌گیری شد.

بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سکرتوم حاصل از سلول‌های دست ورزی شده با ژن Nrf2 در بهبود شاخص‌های ریخت‌شناسی بافت کلیه:

۱۴ روز پس از سلول درمانی و به دنبال معدوم کردن موش‌های صحرایی طبق دستورالعمل استاندارد، مقاطع بافت کلیه تهیه گردید و رنگ‌آمیزی شد. به طور خلاصه مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۵ میکرون، با استفاده از میکروتوم دوار(Rotary) از بافت کلیه تهیه شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از الکل ۲۰٪ فیکس‌شده و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت.

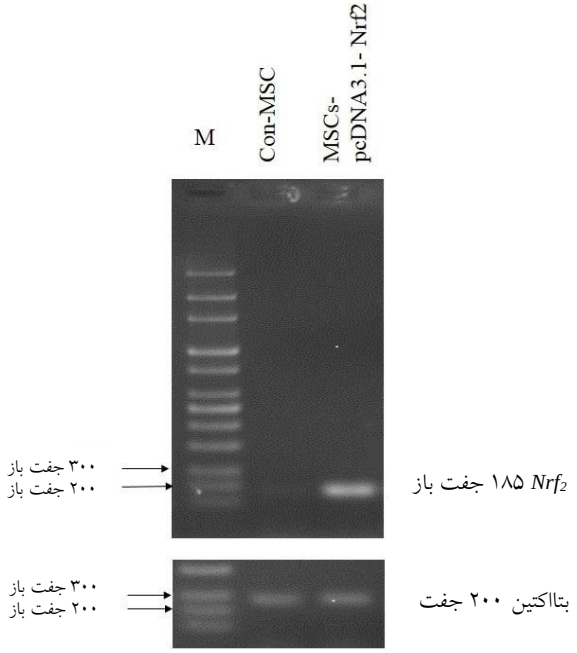
بررسی‌های آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات:

داده‌ها و اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار آماری ۱۹ SPSS version و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. دامنه طبیعی سازی و اختلاف معنادار با ارزش p کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد.

یافته‌ها

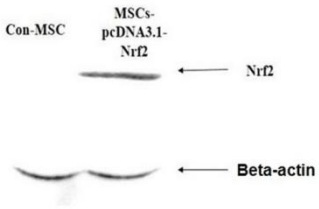
سلول‌های ترانسفکت شده ژن Nrf2 را بیان می‌کنند:

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها با pcDNA3.1-*Nrf2* ، بیان ژن *Nrf2* به روش PCR ترانس کریپتاز معکوس و وسترن‌بلات در سلول‌های ترانسفکت شده در مقایسه با سلول‌های کنترل بررسی شد. سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1-*Nrf2* ، که MSC-*Nrf2* نامیده شدند، ژن *Nrf2* را بیان کردند(شکل ۱). در حالی که در سلول‌های دست‌ورزی نشده بیان این ژن مشاهده نشد. جهت کنترل مراحل آزمایش، بیان ژن بتااکتین نیز مورد بررسی قرار گرفت و هر دو گروه مورد بررسی این ژن را به میزان مناسب بیان کردند(شکل ۱). نتایج وسترن بلات و حضور باند مورد نظر در سلول‌های MSC-*Nrf2* نشان داد که این سلول‌ها پروتئین Nrf2 را نیز بیان می‌کنند. سلول‌های مزانشیمی که ترانسفکت نشده بودند، این پروتئین را بیان نکردند (شکل۲).

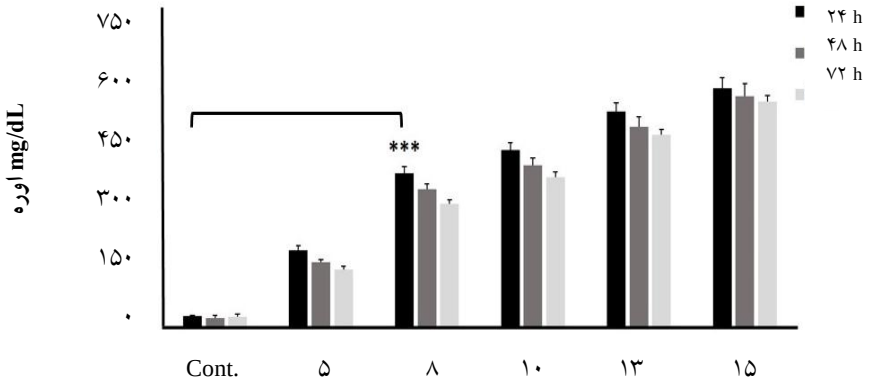


شکل ۱: بررسی بیان ژن *Nrf2* در سلول‌های MSCs ترانسفکت شده. شکل بالا: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل اگارز ۲٪ . M : مارکر ۱۰۰bp ، MSCs-pcDNA3.1- *Nrf2* : MSC ترانسفکت شده حاوی ژن *Nrf2* ، Con-MSCs : MSC ترانسفکت نشده. شکل پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین مربوط به همان گروه‌های سلولی.

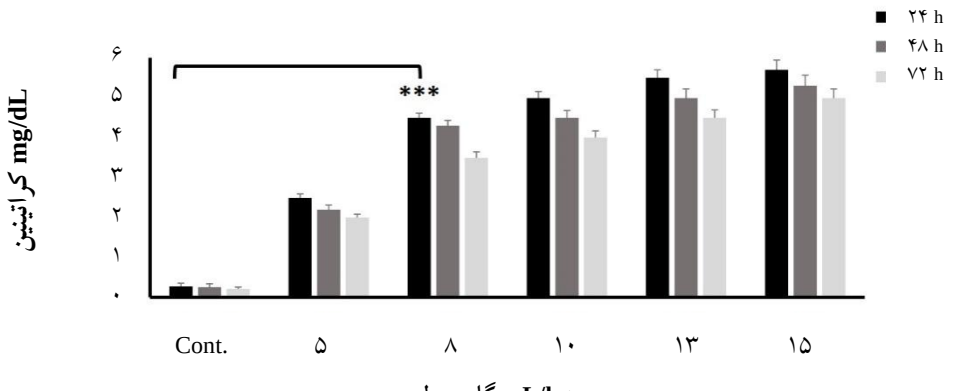
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]



شکل ۲: بررسی بیان پروتئین Nrf2 در سلول‌های MSCs ترانسفکت شده: شکل بالا: Con-MSCs : MSC ترانسفکت نشده، MSCs-pcDNA3.1-*Nrf2* : MSC ترانسفکت شده حاوی ژن *Nrf2* . شکل پایین: بیان پروتئین بتا اکتین مربوط به همان گروه‌های سلولی.



نمودار ۱: بررسی میزان اوره سرم ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف گلیسرول. میزان اوره پس از تزریق mL/kg ۸ گلیسرول افزایش داشت (۱۸ ± ۳۸۸). تزریق مقادیر۱۰ تا ۱۵ mL/kg گلیسرول باعث افزایش مرگ و میر حیوانات می‌شد. مقدار mL/kg ۸ به عنوان مقدار بهینه جهت القای آسیب کلیوی تعیین شد(p< ۰/۰۰۱ : *).**



نمودار۲: بررسی میزان کراتینین سرم ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق مقادیر مختلف گلیسرول. میزان کراتینین پس از تزریق mg/kg ۸ افزایش داشت(۰/۶ ± ۴/۳). تزریق مقادیر ۱۰ تا ۱۵ mg/kg گلیسرول باعث افزایش مرگ و میر حیوانات می‌شد. مقدار mL/kg ۸ به عنوان مقدار بهینه جهت القای آسیب کلیوی تعیین شد(p< ۰/۰۰۱ : *).**

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

تایید آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی:

به منظور تعیین مقدار بهینه گلیسرول برای القای آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی، مقادیر مختلفی از گلیسرول به حیوانات تزریق شد و در بازه‌های زمانی مختلف میزان آسیب القا شده با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی نشان داد که مقدار ۸ mL/kg (میلی لیتر به کیلوگرم وزن حیوان) از محلول گلیسرول، ۲۴ ساعت پس از تزریق منجر به ایجاد آسیب حاد کلیوی در موش‌های صحرایی می‌گردد. نمودار ۱ و ۲ به ترتیب نتایج بیوشیمیایی میزان اوره و کراتینین سرم خون را به عنوان دو شاخص اصلی آسیب حاد کلیوی نشان می‌دهد. میزان اوره و کراتینین به طور قابل ملاحظه‌ای در این مدل از آسیب حاد کلیوی افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نکروز پیش رونده بافتی و کاهش ناگهانی میزان قابلیت فیلتراسیون گلومرول بافت کلیه می‌باشد.

نتایج تزریق مقادیر بالاتر گلیسرول نیز آسیب حاد کلیوی را نشان می‌داد اما میزان مرگ حیوانات در مقادیر گلیسرول ۱۰ به بالا بسیار زیاد بود. هم چنین نتایج بافت‌شناسی آسیب‌های توبولی همانند فقدان حاشیه، فقدان سلول‌های اپی‌تلیال، بقایای سلولی در ناحیه لومن و کست‌های هیالینی را نشان می‌دهد که القای آسیب را در سطح بافتی تایید می‌کند(شکل ۳). بنابراین مقدار ۸ mL/kg از محلول گلیسرول بعد از گذشت ۲۴ ساعت به عنوان مقدار و زمان بهینه برای القای آسیب حاد کلیوی تعیین شد.

سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن Nrf2 باعث بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آسیب حاد کلیوی می‌شود:

بر اساس گروه‌بندی انجام شده، گروه‌های مختلف سلول‌های بنیادی مزانشیمی به موش‌های صحرایی تزریق شدند. میزان اوره و کراتینین نمونه سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان در گروه‌های مختلف ارزیابی شد.

طبق نتایج به دست آمده، در روز ۳ تفاوت معناداری در میزان اوره و کراتینین بین موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی دریافت‌کننده S-Nrf2 ، گروه MSC و گروه کنترل مشاهده نشد.

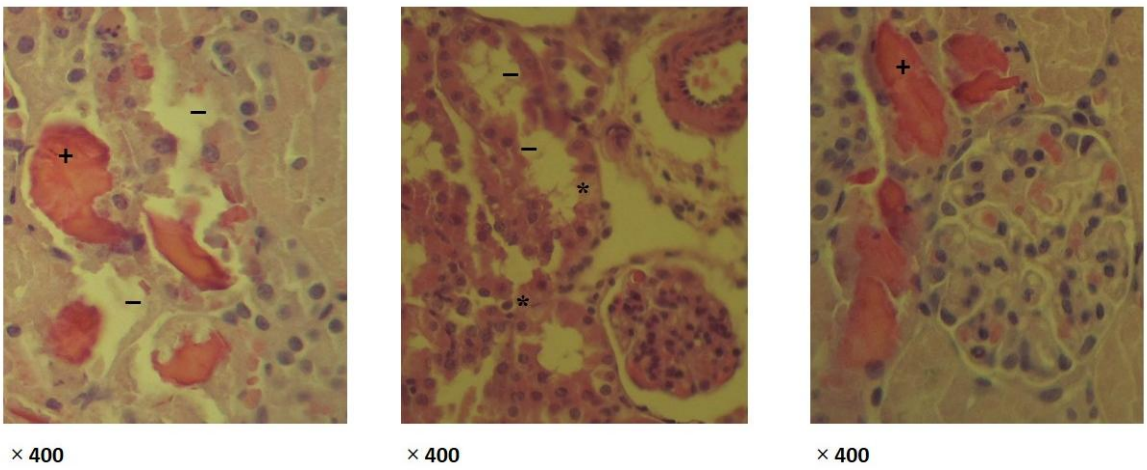
در روز ۷ میزان اوره سرم(۹ ± ۱۲۳ mg/dL) در گروه S-Nrf2 نسبت به گروه MSC (۱۴ ± ۲۰۹ mg/dL) به طور معناداری کاهش پیدا کرد(p< ۰/۰۱)(نمودار ۳). هم چنین پس از گذشت ۱۴ روز، اوره سرم(۳/۵ ± ۴۸ mg/dL) در گروه S-*Nrf2* کاهش بیشتری در مقایسه با گروه MSC (۹/۹ ± ۱۰۰ mg/dL) نشان داد(p< ۰/۰۰۱ : ***). از طرفی از نظر کاهش کراتینین سرم نیز در روزهای ۷ و ۱۴ پس از درمان، تفاوت معنادار بین گروه S-*Nrf2* نسبت به گروه MSC مشاهده شد. کاهش مقادیر به ترتیب در روز ۷ ، ۱/۰۵ ± ۰/۳۵ mg/dL نسبت به ۱/۹۷ ± ۰/۴۳ mg/dL و در روز ۱۴ ، ۰/۴۹ ± ۰/۱۵ mg/dL نسبت به ۰/۹۷ ± ۰/۲۶ mg/dL بود(نمودار ۴)(به ترتیب p< ۰/۰۰۵ و p< ۰/۰۰۱). این شواهد نشان‌دهنده تاثیر سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* بر روی بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی بود.

۱۴ روز پس از سلول درمانی، ترمیم بافت کلیه با بررسی مقاطع بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروهی که سلول دریافت نکرده بودند آسیب کلیوی، از دست رفتن انسجام توبولی و پهن شدن سلول‌های اپی‌تلیال به وضوح دیده شد. در گروه MSC آسیب بافتی کمتر و بقایای سلولی مشاهده گردید. در حالی که در گروه دریافت‌کننده S-Nrf2 ، انسجام توبول‌ها مشابه حالت طبیعی بوده و آثار چندانی از آسیب بافتی مشاهده نشد(شکل A۴ ، B ، C).

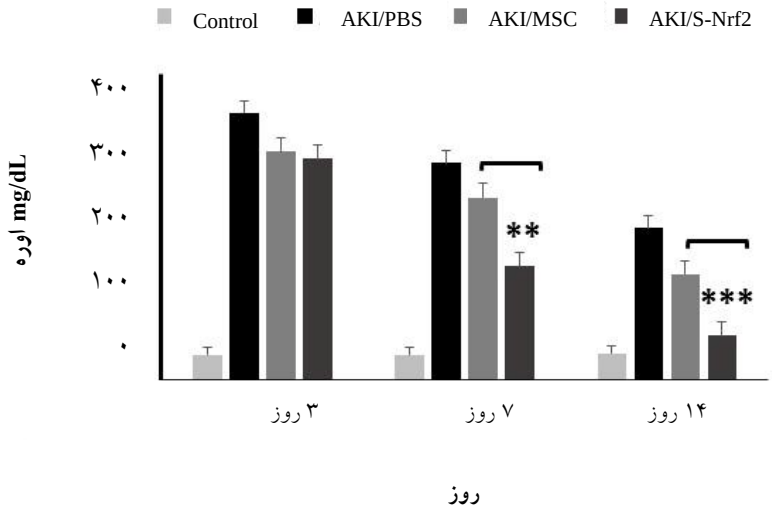
هم چنین بررسی مقاطع بافت‌شناسی در روز ۱۴ پس از درمان و کمی‌سازی تعداد کست و میزان نکروز توبولی، تفاوت معناداری را بین تعداد کست‌های مشاهده شده در مقاطع بافت کلیه موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی تحت درمان با S-Nrf2 (تعداد کست: ۰/۲۶) و گروه MSC (تعداد کست: ۰/۵۱) در مقایسه با گروه AKI که هیچ نوع سلولی دریافت نکرده بودند(تعداد کست: ۳/۶) نشان داد(p< ۰/۰۰۱). بررسی کمی میزان نکروز توبولی در همان روز نیز مبین بهبود بیشتر بافت کلیه در گروه S-Nrf2 (میزان نکروز توبولی: ۰/۹۷) در مقایسه با گروه MSC

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

(میزان نکروز توبولی: ۱/۹۳) بود(p< ۰/۰۰۱)(شکل ۴). در مجموع نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مؤید تاثیر سکرتوم حاصل از سلول‌های دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* بر بهبود اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود(شکل 4D).

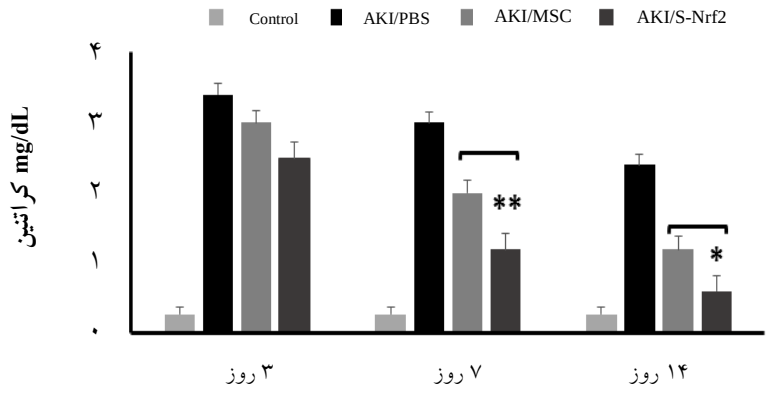


شکل ۳: نتایج ارزیابی پاتولوژی مقاطع بافت کلیه در موش‌های صحرایی ۲۴ ساعت پس از تزریق درون ماهیچه‌ای ۸ mL/kg گلیسرول. (+) : cast ، (–) : بقایای سلولی(Cell debries) و (*): از دست دادن هسته. وجود این مشخصات ریخت‌شناسی در مقاطع بافتی از علائم اصلی آسیب حاد کلیوی می‌باشند.

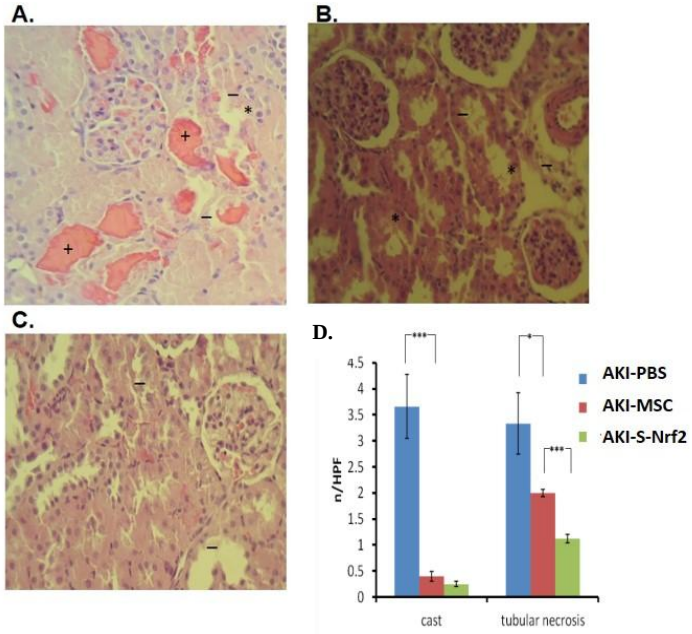


نمودار ۳ : ارزیابی میزان اوره سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان. ۷ روز پس از درمان کاهش مقدار اوره در گروه S-Nrf2 (۹ ± ۱۲۳) نسبت به گروه MSC (۱۴ ± ۲۰۹) معنادار بود(p< ۰/۰۱ **). پس از گذشت ۱۴ روز، اوره سرمی در گروه S-Nrf2 کاهش بیشتری (۳/۵ mg/dL ± ۴۸) در مقایسه با گروه MSC ((۹/۹ mg/dL ± ۱۰۰) نشان داد(p< ۰/۰۰۱ : *).**

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]



نمودار ۴: ارزیابی میزان کراتینین سرم در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از درمان. در روز ۷ کاهش مقدار کراتینین در گروه S-Nrf2 (۰/۳۵ ± ۱/۰۵) نسبت به گروه MSC (۰/۴۳ ± ۱/۹۷) معنادار بود(p< ۰/۰۱ :). پس از گذشت ۱۴ روزکراتینین سرمی در گروه S-Nrf2 کاهش بیشتری (۰/۱۵ ± ۰/۴۹) در مقایسه با گروه MSC (۰/۲۶ ± ۰/۹۷) نشان داد(p< ۰/۰۰۱ : ***).**



شکل ۴: بررسی پاتولوژی بافت کلیه در موش‌های صحرایی دچار آسیب حاد کلیوی ناشی از تزریق گلیسرول ۱۴ روز پس از درمان سلولی: A) گروه AKI (بدون دریافت سلول): توبول‌های کلیوی انسجام خود را از دست داده‌اند، سلول‌های اپی‌تلیال پهن‌تر شده‌اند و بقایای سلولی مشاهده می‌گردند. B) گروه MSC : توبول‌ها منسجم‌تر می‌باشند، بقایای سلولی مشاهده می‌گردد و آسیب بافتی کمتری به نظر می‌رسد. C) گروه S-Nrf2 : انسجام توبول‌ها طبیعی می‌باشند و آثار چندانی از آسیب بافتی مشاهده نمی‌گردد. نمودار شمارش کست و نکروز توبولی در زمینه میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× . تعداد کست‌ها در گروه S-Nrf2 (میانگین ۰/۲۶) و گروه MSC (میانگین ۰/۵۱) در مقایسه با گروه AKI که هیچ نوع سلولی دریافت نکرده بودند(میانگین۳/۶) تفاوت معنادار داشت(p< ۰/۰۰۱). میزان نکروز توبولی در گروه S-Nrf2 (میانگین: ۰/۹۷) در مقایسه با گروه MSC (میانگین: ۱/۹۳) کاهش بیشتری داشت(p< ۰/۰۰۱).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهم‌ترین سلول مورد استفاده در سلول درمانی می‌باشد(۳-۱). با وجود فواید متعدد، میزان بقای سلولی پایین MSCs در روزهای ابتدایی پس از پیوند، بعنوان چالش اساسی در کاربرد آن‌ها در سلول درمانی مطرح می‌باشد(۷).

به نظر می‌رسد مجهز کردن این سلول‌ها به ابزارهایی که باعث افزایش مقاومت سلولی می‌شوند، راهکاری نویدبخش در افزایش کارآیی آن‌ها باشد. یکی از عوامل محافظت‌کننده سلولی، فاکتور رونویسی *Nrf2* می‌باشد که نقش مهمی را در بیان القایی بسیاری از ژن‌های محافظت‌کننده سلولی در برابر استرس اکسیداتیو و سایر تحریکات محیطی ایفا می‌کند(۱۷، ۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتوم ترشحی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن *Nrf2* ، اثرات درمانی بیشتری در بافت کلیه آسیب دیده داشته و منجر به کاهش معنادار کراتینین و اوره سرم در روزهای ۷ و ۱۴ پس از سلول درمانی می‌شوند. از طرفی نتایج پاتولوژی مشخص کرد که در گروه دچار آسیب کلیوی دریافت‌کننده بافر فسفات، توبول‌های کلیوی انسجام خود را از دست داده، سلول‌های اپی‌تلیال پهن‌تر شده یا کاملاً از بین رفته‌اند. در گروه دریافت‌کننده MSC ، توبول‌ها منسجم‌تر بوده و آسیب بافتی کمتری مشاهده شد. اما در گروه دریافت‌کننده S-Nrf2 ، توبول‌ها مشابه حالت طبیعی انسجام یافته بوده و آسیب بافتی چندانی مشاهده نمی‌گردد. کمی‌سازی نتایج پاتولوژی و شمارش کست و نکروز توبولی بیانگر ترمیم بیشتر بافت کلیه در گروه دریافت‌کننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتوم بود.

به نظر می‌رسد بیشتر اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ناشی از اثرات پاراکرین و وجود فاکتورهای رشد یا مولکول‌های فعال زیستی مترشحه آن‌ها باشد. این سلول‌ها پس از تزریق به بافت آسیب دیده مهاجرت کرده و باعث افزایش سرعت ترمیم بافتی می‌شوند(۱۹، ۱۸). در صورت به کارگیری مکانیسمی جهت افزایش بقای این سلول‌های جادویی و جمع‌آوری سکرتوم مربوطه، می‌توان از اثرات پاراکرین و ترشحی آن‌ها استفاده نموده و باعث افزایش اثرات درمانی و ترمیمی آن‌ها شد(۲۰).

به این منظور مطالعه‌هایی جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا کاربرد آن‌ها در درمان بیماری‌های کلیوی انجام شده است. سلطانی و همکاران مقاومت و بقای سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شده با سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با ژن‌های *Nrf2* و *HIF-1α* را در شرایط استرس اکسیداتیو، فقر غذایی و کمبود اکسیژن بررسی کردند و چنین نتیجه گرفتند که سکرتوم ترشحی سلول‌های دست‌ورزی شده با *Nrf2* ، باعث افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط سرشار از استرس می‌گردد(۱۵).

طبق مطالعه انجام شده توسط محمدزاده و همکارانش در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث تقویت ویژگی‌های ضدآپوپتوز و ضداکسیداتیو آن‌ها شده و بقای سلولی MSCs را در برابر استرس‌هایی که به ناچار با آن‌ها مواجه می‌شوند افزایش و میزان آپوپتوز سلول‌ها را کاهش می‌دهد(۱۱). از طرفی محمدزاده و همکاران طی مطالعه‌ای دیگر، پس از افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از سیستم آدنوویروس، از آن‌ها در درمان آسیب حاد کلیوی ناشی از تزریق سیس‌پلاتین استفاده کردند. وی اثرات درمانی سلول‌ها را طی ۱۱ روز بررسی کرد و این طور نتیجه گرفت که سلول‌های دست‌ورزی شده دارای توان ترمیمی بیشتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی معمولی بوده و باعث ترمیم سریع‌تر بافت کلیه پس از آسیب می‌شوند(۲۱).

مسعود و همکاران در سال ۲۰۱۲ ، جهت افزایش قدرت تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آن‌ها را با متیلن‌بلو و نیترو استیل پنی‌سلین آمین پیش شرطی کردند. پس از تزریق این سلول‌ها به موش‌های صحرایی دچار آسیب ایسکمیک کلیوی، این طور گزارش کردند که تزریق این سلول‌ها باعث کاهش فیبروز کلیوی، بهبود عملکرد بافت و افزایش بیان فاکتورهای رگزایی و التیام سریع‌تر می‌شود(۲۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌های ما، راه‌کار جدیدی را برای افزایش بقا و بهبود عملکرد MSCs در راستای افزایش کارآیی و کیفیت سلول درمانی این سلول‌ها در زمینه درمان بیماری‌های کلیوی، بدون نیاز به دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌ها در آینده ارائه می‌دهد و گام نوینی به منظور امکان استفاده از سلول درمانی در مرحله بالینی را فراهم می‌آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح پژوهشی مصوب شده در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. کلیه حقوق مربوط به این کار پژوهشی به این مؤسسه باز می‌گردد.

References :

1- Amiri F, Halabian R, Dehgan Harati M, Bahadori B, Mehdipour A, Mohammadi Roushandeh A, *et al*. Positive selection of Wharton's jelly-derived CD105+ cells by MACS technique and their subsequent cultivation under suspension culture condition: A simple, versatile culturing method to enhance the multipotentiality of mesenchymal stem cells. Hematology 2015; 20(4): 208-16.
2- Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. Cytotherapy 2013; 15(3): 330-43.
3- Li Q, Wang Y, Deng Z. Pre-conditioned mesenchymal stem cells: a better way for cell-based therapy. Stem Cell Res Ther 2013; 4(3): 63.
4- Amiri F, Molaei S, Bahadori M, Nasiri F, Deyhim MR, Jalili MA, *et al*. Autophagy-modulated Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Liver Restoration in Mouse Models of Acute Liver Failure. Iran Biomed J 2016; 20(3): 135-44.
5- Nasiri F, Amiri F, Mohammadipour M, Molaei S, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. H_2O_2-preconditioned mesenchymal stem cell regenerative effects on acute liver failure mice. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(2): 111-24. [Article in Farsi]
6- Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. Cell Transplant 2016; 25(5): 829-48.
7- Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L and Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol 2005; 46(7): 1339-50.
8- Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments: *In vitro* augmentation of mesenchymal stem cells viability. Cell Stress Chaperones 2015; 20(2): 237-51.
9- Lee JM, Johnson JA. An important role of *Nrf2*-ARE pathway in the cellular defense mechanism. J Biochem Mol Biol 2004; 37(2): 139-43.
10- Mehrabi Habibabadi H, Amiri F, Moslemi E, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. Overexpression of *Nrf2* in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells upregulating cytoprotective genes, TXNRD1 and GCLC. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(3): 255-65. [Article in Farsi]
11- Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, *et al*. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. Cell Stress Chaperones 2012; 17(5): 553-65.
12- Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, *et al*. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. Mol Ther 2011; 19(1): 196-203.
13- Xiang MX, He AN, Wang JA, Gui C. Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. J Zhejiang Univ Sci B 2009; 10(8): 619-24.
14- Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. Tissue Eng Part A 2012; 18(13-14): 1479-89.
15- Soltani F, Amiri F, Kheirandish M, Mohammadipour M, Jalili M, Habibi Roudkenar M, *et al*. Cell survival evaluation of mesenchaymal stem cells cultivated in the presense of secretome of HIF-1α/*Nrf2*-engineered-MSC. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 12(4): 318-30. [Article in Farsi]
16- Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, *et al*. Chronic kidney disease as global public health problem: approaches and nitiatives a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. Kidney Int 2007; 72(3): 247-59.
17- Murakami S, Motohashi H. Roles of *Nrf2* in cell proliferation and differentiation. Free Radic Biol Med 2015; 88(Pt B): 168-78.
18- Bianchi F, Sala E, Donadei C, Capelli I, La Manna G. Potential advantages of acute kidney injury management by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells 2014; 6(5): 644-50.
19- Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(1): 17-24.
20- Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, *et al*. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. Cell Transplant 2011; 20(5): 693-706.
21- Mohammadzadeh-Vardin M, Habibi Roudkenar M, Jahanian-Najafabadi A. Adenovirus-Mediated Over-Expression of *Nrf2* Within Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Protected Rats Against Acute Kidney Injury. Adv Pharm Bull 2015; 5(2): 201-8.
22- Masoud MS, Anwar SS, Afzal MZ, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Pre-conditioned mesenchymal stem cells ameliorate renal ischemic injury in rats by augmented survival and engraftment. J Transl Med 2012; 10: 243.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 13(4): 291-303

Original Article

Evaluation of the repair effects of MSCs cultivated with secretome of *Nrf2* engineered MSCs on acute kidney injury in rats

Jaleh F.[1], Amiri F.[1], Dehghan Harati M.[1], Habibi Roudkenar M.[1], Jalili M.A.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine,Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The decrease in mesenchymal stem cells (MSCs) survival rate after transplantation is a major challenge in MSC-cell-therapy. Hence, it is promising to employ some proper strategies for addressing this problem. This study was conducted to assay the therapeutic effects of MSCs treated with *Nrf2*-manipulated-MSC conditioned medium in acute kidney injury (AKI)-induced animal models.

Materials and Methods

In an experimental study, recombinant plasmid pcDNA3.1-*Nrf2* was transfected into bone marrow-derived MSCs and the resulted conditioned medium was harvested. The MSCs was cultivated with *Nrf2*-manipulated-derived conditioned medium. The conditioned medium-treated-MSCs were transplanted to AKI-induced rats (each group containing 10 rats) and the therapeutic potentialities of these MSCs were evaluated using biochemical and pathological methods.

Results

Fourteen days after MSCs transplantation, there was a significant difference in BUN decreasing in rat groups injected with conditioned medium-treated-MSCs (48 ± 3.5 mg/dL) in comparison with those injected with normal MSCs (100 ± 9.9 mg/dL) ($p < 0.001$). The number of observed casts (0.26) in kidney tissue sections of these rat groups were also less than (0.51) the groups transplanted with normal MSCS.

Conclusions

Cultivation of MSCs in the presence of *Nrf2*-manipulated-derived conditioned medium increase the therapeutic effects of these cells in AKI-induced models.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Acute Kidney Injury, Conditioned Medium

Received: 26 Jun 2015
Accepted: 5 Oct 2016

Correspondence: Jalili MA., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *m.jalili@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-08-01]