مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۸ شماره ۳ مرداد و شهریور۱۳۹۳، ۲۵۷-۲۴۹

مقایسه داروهای تالیدومایدو بوتیرات سدیم در تکثیر و تمایز پیش سازهای اریتروئیدی حامل جهش β–تالاسمی در محیط آزمایشگاهی

زهرا کاشانی خطیب[۱]، علی دهقانی فرد[۲]، دکتر سعید کاویانی[۳]
دکتر مهرداد نوروزی نیا[۴]، مؤمنه محمدی[۵]، فاطمه محمد علی[۵]
الهام روشندل[۵]، سحر محمدی فاتح[۶]، دکتر شعبان علیزاده[۷]

چکیده

زمینه و هدف: شناخت مکانیسم مولکولی دخیل در افزایش سطح هموگلوبین جنینی(HbF) در استفاده از داروهای القاکننده می‌تواند به القای موثر آن کمک وافری نماید. هدف از انجام این تحقیق، تعیین اثر دو داروی تالیدومایدو سدیم بوتیرات به عنوان داروهای القاکننده‌ی بیان HbF، جهت شناخت مکانیسم مولکولی مرتبط با اثر دارویی در سلول‌های CD۱۳۳+ خون بند ناف حامل جهش هتروزیگوت β–تالاسمی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی، سلول‌های CD۱۳۳+ پس از جداسازی، در محیط کشت تمایز اریتروئیدی قرار گرفتند. پس از تیمار دارویی در روز ۶ از تمایز اریتروئیدی، بررسی بیان ژن‌های مارکرهای رده‌ی اریتروئیدی یعنی CD۷۱ و CD۲۳۵a انجام گرفت. برای این منظور پس از استخراج RNA از پیش سازهای اریتروئیدی در روزهای ۶ و ۱۲ تمایز اریتروئیدی و سنتز cDNA، بیان کمی این دو ژن با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تالیدومایدو سبب افزایش قابل توجهی در تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با سدیم بوتیرات و گروه کنترل، می‌گردد. همچنین تالیدومایدو سبب افزایش و کاهش قابل توجهی به ترتیب در بیان ژن‌های CD۷۱ و CD۲۳۵a در مقایسه با سدیم بوتیرات و گروه کنترل، گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به پتانسیل بالای تالیدومایدو در القای بیان HbF، به نظر می‌رسد مکانیسم‌های مولکولی دخیل در تکثیر پیش سازهای اولیه اریتروئیدی نقش موثری در القای بیان HbF داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: تالیدومایدو، سدیم بوتیرات، پیش ساز اریتروئیدی، CD۷۱، CD۲۳۵a

* نویسنده مسئول :
دکتر شعبان علیزاده ؛
دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email: alizadehs@sina.tums.ac.ir

- دریافت مقاله : اردیبهشت ۱۳۹۳ - پذیرش مقاله : تیر ۱۳۹۳

مقدمه

استفاده از داروهای اپی ژنتیکی القا کننده‌ی بیان هموگلوبین جنینی(HbF) موجب بهبود عوارض ناشی از اختلال در تولید زنجیره β- گلوبین در بیماری‌های β–تالاسمی و آنمی داسی شکل می‌گردد. در حقیقت افزایش سطح زنجیره γ–گلوبین می‌تواند مانع از رسوب زنجیره α–گلوبین اضافی در پیش سازهای

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس و عضو مرکز پژوهشهای دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] دانشجوی دکتری تخصصی هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس و عضو مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
[۳] دانشیار گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۴] دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۵] دانشجوی دکتری تخصصی هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۶] کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات سلولی–مولکولی و سلول های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
[۷] استادیار گروه هماتولوژی و انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اریتروئیدی شده و در نتیجه سبب بهبود وضعیت اریتروپوئز غیر موثر شود(۲و۱). در تحقیقات مختلف از داروهایی نظیر آزاسیتیدین، تالیدومایـد، پمالیدومایـد، دسی تابین و سدیم بوتیرات به عنوان داروهای موثر در القای بیان HbF، یاد شده است. این داروها از طریق مکانیسم‌های مختلف مولکولی سبب افزایش بیان HbF می‌گردند(۱). تالیدومایـد از طریق افزایش فعال سازی مسیر MAP P۳۸ کیناز(P38 MAPK) و همچنین افزایش استیلاسیون هیستون H۳ و H۴ در پروموتر ژن γ-گلوبین، می‌تواند سبب افزایش بیان ژنی گردد(۳). همچنین نقش تالیدومایـد در کاهش متیلاسیون هیستون H۳ لیزین ۲۷(H3K27) که به عنوان مارک هتروکروماتین شناخته می‌شود، نشان داده شده است(۴). سدیم بوتیرات نیز به عنوان ترکیب مهار کننده آنزیم هیستون داستیلاز(HDAC inhibitor) با مکانیسم‌های مختلفی شامل فعال سازی مسیر MAPK، مهار فعال سازی ERK، افزایش استیلاسیون H۳ و H۴ و همچنین کاهش متیلاسیون در نواحی غنی از CpG در پروموتر ژن γ-گلوبین می‌تواند سبب افزایش سطح HbF شود(۶و۵).

دیده شده است که ایجاد استرس اریتروپوئز و افزایش تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی در افزایش سطح HbF نیز دخیل می‌باشد. تالیدومایـد در مقایسه با سدیم بوتیرات دارای توان بیشتری در القای بیان HbF بوده که این امر با تاثیر بیشتر تالیدومایـد در افزایش کلونی‌های اریتروئیدی در مقایسه با سدیم بوتیرات طی تمایز اریتروئیدی سلول‌های +CD۱۳۳ جدا شده از خون بندناف افراد سالم در ارتباط است(۷). در این پژوهش نیز مقایسه‌ی اثر تالیدومایـد و سدیم بوتیرات در افزایش شمارش سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی و همچنین مقایسه اثر این دو دارو در افزایش بیان شاخص‌های اختصاصی رده اریتروئیدی CD۷۱ و CD۲۳۵a در پیش سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های +CD۱۳۳ خون بندناف فرد مبتلا به β-تالاسمی مینور مورد بررسی قرار گرفته است. در حقیقت روشن شدن مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در القای بیان HbF در بیماران مبتلا به β-تالاسمی و آنمی داسی شکل می‌تواند به هدف قرار دادن این مکانیسم های مولکولی جهت القای هدفمند بیان ژنی کمک نماید(۸).

هدف از انجام این تحقیق تعیین اهمیت مکانیسم‌های مولکولی دخیل در تکثیر و تمایز پیش سازهای اریتروئیدی در القای بیان HbF و بررسی ارتباط اثر تالیدومایـد و سدیم بوتیرات به عنوان دو داروی القا کننده HbF با افزایش تکثیر و تمایز پیش سازهای اریتروئیدی است.

روش بررسی

نمونه گیری از خون بند ناف بیمـار مبتـلا به β-تالاسمی مینور با اخذ رضایت نامه‌ی کتبی از والدین انجام گرفت. اثبات وجود جهش هتروزیگوت β-تالاسمی طی آزمایش‌های پیش از تولد(PND) و با استفاده از PCR انجام شد(۹). سپس جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و در ادامه جداسازی سلول‌های بنیادی +CD133 با توجه به روش کار توضیح داده شده در قبل انجام گرفت. سپس تمایز سلول‌های بنیادی +CD۱۳۳ در محیط کشت تمایز اریتروئیدی در حضور فاکتورهای رشد اریتروپوئتین (EPO; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) و اینترلوکین ۳ (IL-3; stem cell Technology, Vancouver, BC, Canada) به مدت ۱۲ روز انجام گرفت(۱). محیط کشت، هر ۳ روز یک بار تعویض شد. در روز ۶ تمایز اریتروئیدی، تیمار پیش سازهای

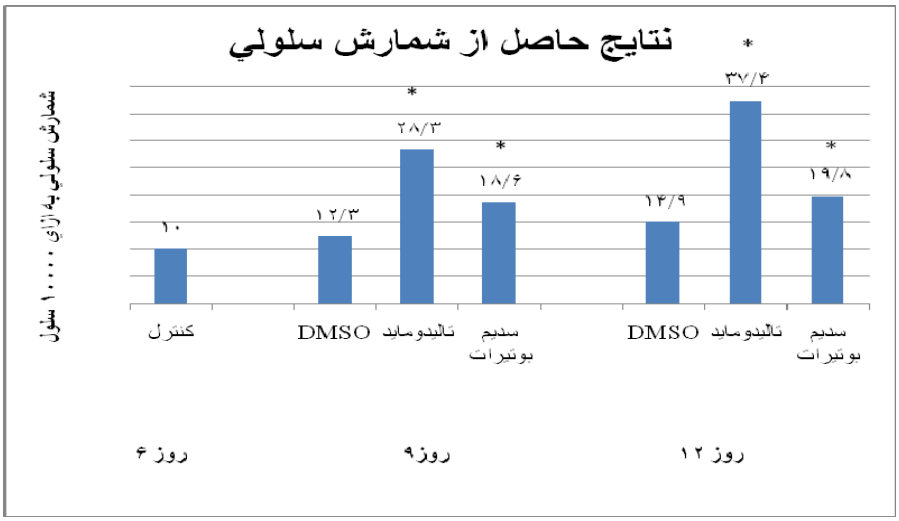
اریتروئیدی به تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول با تالیدومایدو (Tocris Bioscience, Missouri, USA) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و سدیم بوتیرات (Sigma, Saint Louis, MO, USA) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار صورت گرفت. در روز ۱۲ تمایز اریتروئیدی، شمارش سلولی با میکروسکوپ نوری انجام شد. در ادامه‌ی کار، پیش سازهای اریتروئیدی در روزهای ۶ و ۱۲ تمایز اریتروئیدی جمع آوری شده و طبق دستورالعمل کیت (Rneasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA)، تحت مراحل استخراج RNA قرار گرفتند. جهت استخراج RNA از حداقل ۱×۱۰^{۶} سلول استفاده شد. سپس سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت(Fermentas) انجام پذیرفت. در ادامه، به منظور بررسی کمی بیان ژن‌های CD۷۱ و CD۲۳۵a، از تکنیک Real-time PCR با استفاده از کیت SYBR Green Real-time PCR (Fermentas) و دستگاه ABI Step One بهره برداری شد. انجام واکنش Real-time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن‌های مذکور صورت پذیرفت. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. جهت نرمال کردن نتایج از ژن HPRT به عنوان ژن خانه دار یا(House Keeping Gene) استفاده گردید. همچنین مقادیر نسبی به دست آمده بر اساس آستانه‌ی دو برابر شدن(CT یا Cyclic Threshold) بوده و میزان نسبی بیان ژنی با فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. نتایج به دست آمده از بیان ژنی، حاصل تکرار ۳ نمونه از RNA بوده و با استفاده از نرم افزار REST و SPSS، تحلیل آماری شد. تحلیل آماری در گروه‌های مختلف دارویی با استفاده از روش t-test انجام پذیرفت.

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time PCR ژن‌های CD۷۱ و CD۲۳۵a و HPRT

پرایمر	رشته معکوس	رشته جلو	اندازه باند
CD71	GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT	AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC	۸۰
CD235a	GGCTAAGGTCAGACACTGAC	TGTGCATTGCCACCTCAGTG	۱۶۷
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	۹۴

یافته‌ها

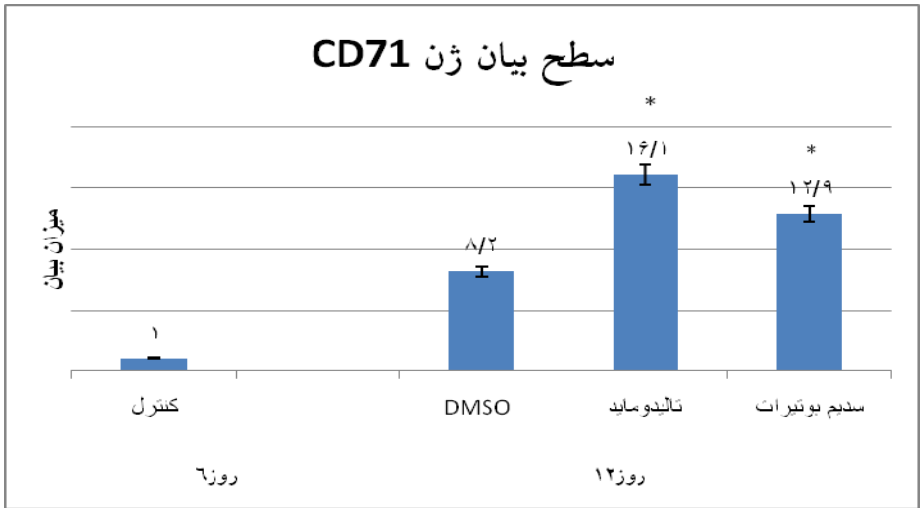
تالیدومایدو، سبب افزایش قابل توجهی در تعداد پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با گروه سدیم بوتیرات و گروه کنترل در روز ۱۲ تمایز اریتروئیدی می‌گردد($P<۰/۰۵$)(شکل ۱).



شکل۱: بررسی شمارش سلولی در گروه های مورد مطالعه در روزهای ۶، ۹ و ۱۲ از تمایز اریتروئیدی

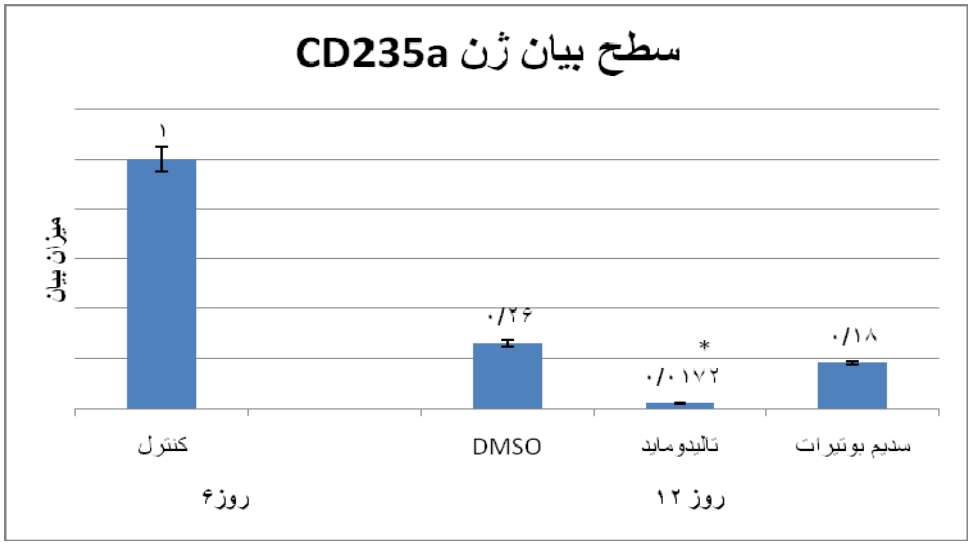
نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه(±SD) می‌باشد. در مقایسه با گروه کنترل بر اساس نتایج بدست آمده، تالیدومایند سبب افزایش ۲/۳۰ تعداد پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با گروه کنترل DMSO گردید(P<۰/۰۵). این در حالی است که در گروه سدیم بوتیرات، افزایش ۱/۳۲ برابری در تعداد پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با گروه کنترل DMSO حاصل شد.

به منظور بررسی و مقایسه‌ی اثر تالیدومایند و سدیم بوتیرات بر تمایز اریتروئیدی، بررسی کمی بیان ژن‌های CD۷۱ و CD۲۳۵a مورد ارزیابی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است، تالیدومایند سبب افزایش بیان ژن‌های CD۷۱ و ۲۳۵a CD در روز ۱۲ تمایز اریتروئیدی در مقایسه با گروه سدیم بوتیرات و گروه کنترل می‌گردد(P<۰/۰۵).



شکل۲: نتایج بررسی کمی بیان ژن CD۷۱ با استفاده Real-time PCR

نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه(±SD) می‌باشد. * (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تالیدومایدو سبب افزایش بیان ژن CD۷۱ به ترتیب به میزان ۱۶/۱ می‌گردد، در حالی که سدیم بوتیرات سبب افزایش بیان ژن CD۷۱ به میزان ۱۲/۹ می‌شود.



شکل۳: نتایج بررسی کمی بیان ژن CD۲۳۵a با استفاده از Real-time PCR

نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه(±SD) می‌باشد. *(P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تالیدومایدو سبب کاهش بیان ژن CD۲۳۵a به میزان ۰/۰۱۷۲ می‌گردد، در حالی که سدیم بوتیرات سبب کاهش بیان ژن CD۲۳۵a به ترتیب به میزان ۰/۱۸ می‌شود.

بحث

در این تحقیق به بررسی اثر دو داروی "تالیدومایدو" و "سدیم بوتیرات"، بر روی القای تمایز اریتروئیدی و افزایش تکثیر سلولی در محیط آزمایشگاهی و با استفاده از تمایز سلول‌های بنیادی CD۱۳۳+ خون بند ناف حامل ژن بتا تالاسمی مینور پرداخته شده است. به این منظور، شمارش سلولی و بیان کمی مارکرهای رده‌ی اریتروئیدی شامل CD۷۱ و CD۲۳۵a طی تمایز اریتروئیدی در روزهای مختلف و تحت تیمار دارویی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از شمارش سلولی حاکی از توان بالاتر تالیدومایدو در مقایسه با سدیم بوتیرات و گروه کنترل در تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تالیدومایدو سبب افزایش به ترتیب ۲/۵۱ و ۲/۳۰ برابری در تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با گروه DMSO در روزهای ۹ و ۱۲ از تمایز اریتروئیدی می‌گردد. این در حالی است که سدیم بوتیرات دارای پتانسیل افزایش تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی به میزان ۱/۵۱ برابری در مقایسه با گروه DMSO در روز ۹ از تمایز اریتروئیدی می‌باشد، در حالی که در روز ۱۲ از تمایز اریتروئیدی

افزایش چندانی در شمارش سلولی حاصل نشد. بنابراین تالیدومایدِ دارای پتانسیل بالاتری در القای تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با سدیم بوتیرات و گروه DMSO است.

همچنین به منظور بررسی اثر این دو دارو در تمایز اریتروئیدی، بررسی مارکرهای اختصاصی این رده در روز ۶ و ۱۲ از تمایز اریتروئیدی در گروه‌های مذکور انجام گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت، تالیدومایدِ سبب افزایش قابل توجهی، به میزان ۱/۹۶ برابری در بیان مارکر CD۷۱، در مقایسه با گروه DMSO گردید(P<۰/۰۵). این در حالی است که این افزایش بیانی در استفاده از سدیم بوتیرات کمتر بوده و به میزان ۱/۵۷ برابر در مقایسه با گروه DMSO مشاهده گردید(P<۰/۰۵). از آنجایی که مارکر CD۷۱ به عنوان یک مارکر اریتروئیدی در پیش سازهای نابالغ‌تر رده‌ی اریتروئیدی مطرح است، لذا مشخص می‌شود که اثر تالیدومایدِ در تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی بیشتر مربوط به افزایش تکثیر و تمایز پیش سازهای اولیه‌ی رده‌ی اریتروئیدی است.

نتایج نشان داد که تالیدومایدِ سبب کاهش بیان مارکر CD۲۳۵a به میزان ۱۵/۱ برابری در مقایسه با گروه DMSO می‌گردد(P<۰/۰۵). این در حالی است که سدیم بوتیرات سبب کاهش بیان این مارکر به میزان ۱/۴۴ برابری در مقایسه با گروه DMSO می‌شود(P<۰/۰۵). نتایج به دست آمده نشانگر اثر بسیار پایین تالیدومایدِ در القای تمایز اریتروئیدی به رده‌های بالغ‌تر این رده می‌باشد.

تالیدومایدِ یک داروی تعدیل کننده‌ی ایمنی و از مشتقات گلوتامیک اسید بوده که به دلیل ویژگی‌های تراتوژنیک، مصرف آن محدود شده است. این دارو جهت درمان تعدادی از بیماری‌ها مانند اختلالات پوستی، بیماری‌های اتوایمیون و اختلالات هماتولوژیک به ویژه مولتیپل میلوما مورد استفاده قرار می‌گیرد. تالیدومایدِ عملکرد مناسبی در درمان مولتیپل میلوما در فعالیت ضد رگ سازی دارد. مکانیسم عمل دقیق تالیدومایدِ کاملاً روشن نیست. Aerbajinai و همکاران در مقاله خود در سال ۲۰۰۷ عنوان کردند که تالیدومایدِ از طریق فعال شدن MAPK p۳۸ و همچنین افزایش استیلاسیون H۴ سبب افزایش بیان ژن γ گلوبین می‌شود. در واقع فعال شدن MAPK p۳۸، نقش مهمی در بقا و تمایز سلولها بر عهده دارد.

در واقع مسیر (Mitogen activated protein kinase) MAPK به عنوان یک مسیر سیگنالینگ مهم در القای بیان هموگلوبین جنینی محسوب می‌شود. داروهای مهار کننده آنزیم HDAC۲ مانند تیرکواستاتین A با این مکانیسم سبب افزایش بیان ژن γ گلوبین می‌گردند. Aerbajinai و همکاران برای انجام کار خود از سریالی از رقت‌های تالیدومایدِ از ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکرومولار جهت تیمار با سلول‌ها و بررسی اثر القایی در بیان ژن γ گلوبین استفاده کردند. آنها نشان دادند که بیشترین تأثیر تالیدومایدِ در القای بیان ژن γ گلوبین در فاصله روز ۶ تا روز ۱۴ از تمایز اریتروئیدی دیده می‌شود(۳). بررسی‌های ما نیز حاکی از توان بالای تالیدومایدِ در مقایسه با سدیم بوتیرات در افزایش شمارش سلول‌های رده اریتروئیدی می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که استفاده از ترکیب Vanadate به عنوان یک مهار کننده‌ی فسفاتاز، از طریق فعال سازی مسیرهای سیگنالی وابسته به اریتروپوئتین، می‌تواند سبب به تعویق انداختن بلوغ اریتروئیدی و القای بیان HbF گردد(۱۰). در مطالعه‌ی دیگری نیز نشان داده شده است که به دنبال استفاده از فاکتور رشد stem cell factor (SCF) در القای بیان HbF، افزایش

بیان گیرنده‌ی این فاکتور رشد(CD117) با افزایش بیان CD۷۱ و کاهش بیان CD۲۳۵a همراه است(۱۱). همچنین نشان داده شده است که دو داروی پمالیدومایدو لنالیدومایدو طی القای تولید HbF در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های +CD۳۴، سبب افزایش بیان CD۷۱ و کاهش بیان CD۲۳۵a می‌گردند(۱۲). در مقایسه‌ی اثر این دو دارو نشان داده شده است که پمالیدومایدو سبب کاهش بیانی موثرتر CD۲۳۵a در مقایسه با لنالیدومایدو می‌گردد. این در حالی است که بیان CD۷۱ در استفاده از لنالیدومایدو در مقایسه با پمالیدومایدو افزایش بیشتری دارد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که تالیدومایدو سبب افزایش تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی نابالغ به میزان قابل توجهی در پیش سازهای اریتروئیدی حامل ژن بتا تالاسمی می‌گردد. در یک مقایسه‌ی اجمالی مشخص می‌شود که وجود جهش ژن بتا تالاسمی می‌تواند مستعد کننده‌ی افزایش پتانسیل تکثیری در پیش سازهای اریتروئیدی در مقایسه با حالت نرمال ژنتیکی باشد. بنابراین القای تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی، می تواند به عنوان یک مکانیسم مهم دخیل در افزایش تولید هموگلوبین جنینی در وجود جهش در ژن بتا گلوبین مطرح باشد. لذا پیشنهاد می‌گردد مکانیسم‌های مولکولی و مسیرهای سیگنالی دخیل در تکثیر پیش سازهای اریتروئیدی و القای هموگلوبین جنینی مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز پژوهشهای دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره طرح ۱۹۰۷۷ انجام گرفته است و محققان و نویسندگان، نهایت قدردانی خود را از این مرکز اعلام می‌دارند. فرآیند عملی این پروژه نیز در مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی و سلولهای بنیادی صارم، و بیمارستان فوق تخصصی صارم، انجام شده است که بدین وسیله از مدیریت و کارکنان محترم این مراکز نیز تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Dehghanifard A, Kaviani S, Noruzinia M, Soleimani M, Abroun S, Hajifathali A, et al. Evaluation of synergistic effect of sodium butyrate and thalidomide on HbF induction in erythroid progenitors of cord blood CD133+ cells. Zahedan J Res Med Sci 2012; 14(7): 29-33.

2. Atashi A, Soleymani M, Kaviani S, Hajifathali A & Arefian E. 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.

3. Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, Chin K & Rodgers GP. Thalidomide induces gamma-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.

4. Dehghanifard A, Kaviani S, Noruzinia M, Soleimani M, Abroun S, Hajifathali A, et al. Changing the pattern of histone H3 methylation following treatment of erythroid progenitors derived from cord blood CD133+ cells with sodium butyrate and thalidomide. IJBC 2012; 4(2): 53-9.

5. Fathallah H & Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 2006(1): 58-62.

6. Witt O, Sand K & Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. Blood 2000 Apr; 95(7): 2391-6.

7. Dehghanifard A, Kaviani S, Noruzinia M, Soleimani M, Abroun S, Zonoubi Z, et al. Evaluation the effect of thalidomide and sodium butyrate on cord blood stem cell differentiation induction to erythroid lineage. Genetics in the 3rd millennium 2011; 9(3): 2457-61.

8. Atweh G & Fathallah H. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin production. Hematol Oncol Clin North Am 2010 Dec; 24(6): 1131-44.

9. Dehghanifard A, Shahjahani M, Galehdari H, Rahim F, Hamid F, Jaseb K, et al. Prenatal diagnosis of different polymorphisms of β-globin gene in Ahvaz. IJHOSCR 2013; 7(2): 17-22.

10. Amoyal I, Prus E & Fibach E. Vanadate elevates fetal hemoglobin in human erythroid precursors by inhibiting cell maturation. Exp Biol Med 2007 May; 232(5): 654-61.

11. Wojda U, Leigh KR, Njoroge JM, Jackson KA, Natarajan B, Stitely M, et al. Fetal hemoglobin modulation during human erythropoiesis: Stem cell factor has "late" effects related to the expression pattern of CD117. Blood 2003 Jan; 101(2): 492-7.

12. Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, Jensen-Pergakes K, Ferguson GD, Corral LG, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. J Clin Invest 2008 Jan; 118(1): 248-58.

Invitro Evaluation Of The Effect Of Fetal Hemoglobin Inducer Drugs On Proliferation And Differentiation Of Erythroid Progenitors With β -Thalassemia Gene Mutation

Kashani Khatib Zahra[1] (BSc.) – Dehghanifard Ali[2](MSc.) – Kaviani Saeid[3] (Ph.D)
Noruzinia Mehrdad[4] (Ph.D) – Mohammadi Momeneh[5] (MSc.)
Mohammad Ali Fatemeh[5] (MSc.) – Roshandel Elham[5] (MSc.)
Mohammadi Fateh Sahar[6] (BSc.) – Alizadeh Shaban[7] (Ph.D)

1 Master of Sciences Student in Hematology, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University & Students Scientific Research Center(SSRC), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Ph.D Student in Hematology, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University and Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
3 Associate Professor, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4 Associate Professor, Medical Genetics Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5 Ph.D Student in Hematology, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6 Bachelor of Sciences in Medical Laboratory, Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran
7 Assistant Professor, Hematology and Transfusion Medicine Department, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Apr 2014
Accepted : Jul 2014

*** Corresponding Author:**
Alizadeh Sh;
E -mail:
alizadehs@sina.tums.ac.ir

Background and Aim: Understanding the molecular mechanisms involved in the increased levels of HbF inducing drugs should be advised for effective induction. The aim of this study was to investigate the molecular effects of the drugs thalidomide and sodium butyrate considered as HbF inducer agents.

Materials and Methods: In this experimental study, CD133+ cord blood stem cells carrying mutations of heterozygous β-thalassemia were isolated and differentiated into erythroid lineage. In order to evaluate the expression of the erythroid markers, CD71 and CD235a, was analysed. For this purpose, the RNA extracted from erythroid precursors at days 6 and 12 of erythroid differentiation and cDNA synthesized, and then the expression of these genes was performed by quantitative Real-time PCR technique.

Results: The results of this study showed the significant effect of thalidomide on erythroid proliferation as compared to sodium butyrate and control group ($P<0.05$). Also, thalidomide significantly increased CD71expression and decreased CD235a expression as compared to sodium butyrate and control groups ($P<0.05$).

Conclusion: Thalidomide may play its role on HbF induction by increasing the proliferation of early erythroid precursors.

Key words: Thalidomide, Sodium Butyrate, Erythroid Precursors, CD71, CD235a