

## مقاله پژوهشی

# القاء ژن گاما در سلولهای اریترئوئیدی مشتق از CD 133<sup>+</sup> بند ناف در محیط Invitro با استفاده از تالیدوماید و سدیم بوتیرات

محمد احمدوند<sup>۱</sup>، دکتر مهرداد نوروزی نیا<sup>۱\*</sup>، دکتر مسعود سلیمانی<sup>۱</sup>، دکتر سعید کاویانی<sup>۱</sup>، دکتر سعید آبرون<sup>۱</sup>،  
علی دهقانی فرد<sup>۱</sup>، مریم محمودی نیا میمند<sup>۲</sup>

۱- گروه خون شناسی و بانک خون، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
۲- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی و سلولهای بنیادی، بیمارستان صارم، تهران، ایران  
۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

القاء هموگلوبین جنینی (HbF) به علت پایدار بودن اثرات بالینی در درمان علائم بیماران مبتلا به تالاسمی، امیدوار کننده ترین روش برای درمان این اختلالات ژنتیکی می باشد عوامل فارماکولوژیک متعددی می توانند بیان ژن گاما را القاء نموده و سبب افزایش میزان هموگلوبین در بیماران بتا تالاسمی شوند. در این بین سدیم بوتیرات و تالیدوماید شناخته شده می باشند. این مطالعه بر روی سلولهای اریترئوئیدی تمایز داده شده از سلولهای CD133<sup>+</sup> جدا شده از خون بند ناف نوزادان سالم صورت گرفت. برای انجام این مطالعه ۴ گروه طراحی شد که به منظور القاء ژن گاما از داروهای تالیدوماید و سدیم بوتیرات در غلظت‌های ۱۰۰ M $\mu$  بکار برده شد. نتایج افزایش بیان ژن گاما با استفاده از تکنیک کمی Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در میان گروههای تیمار شده با تالیدوماید و سدیم بوتیرات نشان داده شد که این دو دارو اثر القا کنندگی بر روی ژن گاما و بتا داشته، و توان تالیدوماید در القاء ژنهای دسته بتا بیشتر از سدیم بوتیرات بود. نتایج ما نشان داد که ترکیب دارویی تالیدوماید و سدیم بوتیرات به دلیل القاء ژنهای دسته بتا می توانند کمک کننده مفیدی در درمان بیماران تالاسمی و کم خونی داسی شکل باشد. واژگان کلیدی: هموگلوبین جنینی؛ تالیدوماید؛ سدیم بوتیرات؛ بتا تالاسمی

### مقدمه:

بیماری بتا تالاسمی شایع ترین اختلال مونوژنیک در دنیا است. این بیماری با موتاسیون مولکولی در زنجیره بتای هموگلوبین بزرگسالان شناسایی شده که منجر به ایجاد اختلال از طریق کاهش زنجیره بتا

گلوبین می شود. همچنین در این بیماری زنجیره های آلفای اضافی نیز سبب آسیب به دیواره عروقی گلبولهای قرمز شده و منجر به آپوپتوز اریتروبلاستهای در حال تکامل و همولیز آنها (اریتروپوئز غیر موثر) می شود (۱). در بیماران بالغ مبتلا به بتا تالاسمی که بطور همزمان اختلال افزایش هموگلوبین جنینی پایدار ارثی<sup>۱</sup> را به ارث می برند، شدت بیماری کاهش یافته (۲) به طوریکه این بیماران دارای اختلالات خفیفی بوده گاه حتی نیاز به تزریق خون مزمن ندارند. برای اولین بار در سال ۱۹۷۶ مزایای بالینی افزایش هموگلوبین جنینی مورد بررسی قرار

### \* مهرداد نوروزی نیا، PhD

گروه خون شناسی و بانک خون، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، ساختمان ۱ پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی  
تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۲۳۸۶  
پست الکترونیک: noruzinia@modares.ac.ir  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۵  
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۲

1. Hereditary persistence fetal hemoglobin

DMSO برای تهیه محلول  $100 \mu\text{M}$  حل شدند.

### جداسازی سلولهای تک هسته ای از بند ناف نوزادان سالم:

خون بند ناف بعد از زایمان و با گرفتن رضایت نامه از والدین گرفته شده و در کیسه‌های خون حاوی ضد انعقاد سیترات، فسفات، دکستروز و آذنین نگهداری شد. به منظور جداسازی سلولهای بنیادی  $\text{CD}133^+$ ، ابتدا برای رسوب گلبولهای قرمز، خون بند ناف را با محلول هیدروکسی اتیل استارچ مجاور نموده و سپس با استفاده از محلول فایکول اقدام به جمع‌آوری سلولهای تک‌هسته‌ای شد (۱۳).

### انتخاب مثبت سلولهای $\text{CD}133^+$ :

جهت جداسازی و تخلیص سلولهای  $\text{CD}133^+$  سلولهای تک‌هسته‌ای حاصل از مرحله قبل با استفاده از ستون Mini-MACS و کیت جداسازی  $\text{CD}133^+$  (مطابق دستور شرکت سازنده) بکار برده شد. سلولهای جداسازی شده در محیط *Stemspan* که حاوی فاکتورهای رشد است نگهداری شده و برای تعیین خلوص سلولهای  $\text{CD}133^+$  جهت تعیین عمل فلوسایتومتری فرستاده شد که نهایتاً  $10^3 \times 30-20$  سلول  $\text{CD}133^+$  با خلوص ۹۴٫۵٪ از سلولهای تک‌هسته‌ای جدا شد (۱۳، ۱۴).

### کشت سلولی و القاء هموگلوبین جنینی

سلولهای  $\text{CD}133^+$  حاصل از مرحله قبلی در محیط IMDM حاوی ۳۰٪ سرم جنین گاو<sup>۵</sup>،  $70 \mu\text{g/ml}$  ترانسفرین<sup>۶</sup> اشباع از آهن،  $2 \text{ mM}$  آل-گلوتامین، بتا مرکاپتواتانول ( $10^{-5} \text{ M}$ ) و پنی سیلین/استرپتومایسین  $4 \text{ U/ml}$  کشت داده شد. سپس در مرحله بعد محیط با  $4 \text{ U/ml}$  اریتروپویتین نوترکیب انسانی و اینترلوکین ۳ جهت تمایز به سمت رده اریتروئیدی غنی گردید. به منظور بدست آوردن حد نهایی تولید ژن گاما در روز شش از مرحله تمایز به گروههای  $100 \mu\text{M}$  تالیدوماید،  $100 \mu\text{M}$  سدیم بوتیرات،  $100 \mu\text{M}$  تالیدوماید /  $100 \mu\text{M}$  سدیم بوتیرات و ۰٫۱٪ DMSO (به عنوان کنترل) تقسیم شده و با عوامل دارویی و غلظت‌های مذکور تیمار شدند (۱۵).

گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش هموگلوبین جنینی سبب عدم تعادل ناشی از کمبود زنجیره بتا در مقابل آلفا را کاسته و نهایتاً منجر به کاهش همولیز می‌شود (۳، ۴).

داروهای زیادی به عنوان القا کننده هموگلوبین جنینی در بیماران بتا تالاسمی و کم‌خونی داسی شکل مورد مطالعه قرار گرفته است. امروزه هیدروکسی اوره در فرم‌های خفیف تا شدید بیماری داسی شکل و در برخی از فرم‌های حد واسط (اینتر مدیا) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴، ۵). سایر القا کننده‌های هموگلوبین جنینی مانند سدیم بوتیرات<sup>۲</sup>، ۵-آزاسیتیدین<sup>۳</sup> و اخیراً دسیتابین<sup>۴</sup> برای القاء هموگلوبین جنینی در بیماران داسی شکل آزمایش شده است. با توجه به اثرات خفیف این القاء کننده‌ها بر روی هموگلوبین جنینی در اکثر بیماران بتا تالاسمی، از آنها به طور روتین در بالین استفاده نمی‌شود (۶، ۷). اخیراً تالیدوماید (دارویی که دارای خصوصیات Immunomodulatory و ضد رگ‌سازی می‌باشد) به منظور القاء بیان ژن گاما و افزایش تکثیر سلولهای اریتروئیدی مورد مطالعه قرار گرفته است، بطوریکه یک بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور با موفقیت با تالیدوماید درمان شده است (۸). بر اساس یافته‌های بدست آمده از بالین مشخص شد که ترکیب عوامل فارماکولوژیک با نقش‌های مکملی و با مکانیسم‌های مولکولی مختلف سبب ایجاد پاسخ‌های بهتر نسبت به حالت تک دارویی شده و نهایتاً می‌توان با کاهش دوزهای بکار رفته، اثرات جانبی داروهای بکار رفته را نیز کاهش داد (۹، ۱۰).

در مطالعه حاضر تلاش بر این شده است از سدیم بوتیرات و تالیدوماید که در مطالعات قبلی دارای بیشترین پاسخ‌ها بوده است استفاده شده و اثر تکی و ترکیبی آنها مورد بررسی قرار بگیرد (۱۱، ۱۲).

### روش کار

#### فاکتورهای رشد هماتوپویتیک:

در این تحقیق از اریتروپویتین نوترکیب (EPO; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)، اینترلوکین ۳ (IL-3; stem cell Technology, Vancouver, BC, Canada)، کیت سنتز cDNA (Fermentase) (Tocris Bioscience, SYBR Green (Qiagen)، تالیدوماید (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)، سدیم بوتیرات (MO, USA) استفاده شد. سدیم بوتیرات و تالیدوماید هر یک در

2. Sodium butyrate  
3. 5-Azacytidin  
4. Decitabin  
5. Fetal Bovine Serum  
6. Transferrin

GTCCTCTGCCTCTGCCATC	Gamma globin-F
CGGTCACCAGCACATTTCC	Gamma globin-R
CTCACCTGGACAACCTCAAG	Beta Globin-F
AGCCACCACTTTCTGATAGG	Beta Globin-R

جدول ۱. توالی پرایمر گاما و بتا گلوبین

### فلوسیتومتری:

بعد از جداسازی سلولهای  $CD133^+$  به منظور ارزیابی سلولهای جدا شده و داشتن جمعیتی یکسان از سلولهای  $CD133^+$  تکنیک فلوسیتومتری بکار رفت، بطوریکه بعد از جدا کردن سلولها،  $100 \mu\text{l}$  بافر فسفات به  $10^4$  سلول اضافه شد و با سمپلر مخلوط نموده و سپس به آن آنتی بادی  $CD133\text{-PE}$  اضافه شد، بعد در دمای یخچال بمدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه انکوبه شد. برای فیکس کردن سلولها  $100 \mu\text{l}$  محلول پارافرمالدیید ۱٪ اضافه شد.  $100 \mu\text{l}$  به عنوان نمونه کنترل منفی برای آنتی بادی  $CD133\text{-PE}$  استفاده شد (۱۶).

### تشکیل کلنی:

محیط متیل سلولز در لوله‌های ۵ ml که در هر یک  $8 \text{ ng/ml}$  اینترلوکین ۳،  $3 \text{ U/ml}$  اریتروپویتین به علاوه سدیم بوتیرات و تالیدوماید در گروههای مختلف که حاوی  $10^4 \times 1,5$  سلول  $CD133^+$  بودند تهیه شد. بعد از مخلوط نمودن،  $1.1 \text{ ml}$  از مخلوطهای تهیه شده را در پتری دیشهای  $3.5 \text{ cm}$  در شرایط کاملا مرطوب با  $5\% \text{ CO}_2$  و در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند (۲).

### آنالیز کمی ژن گاما با Real Time Polymerase Chain Reaction:

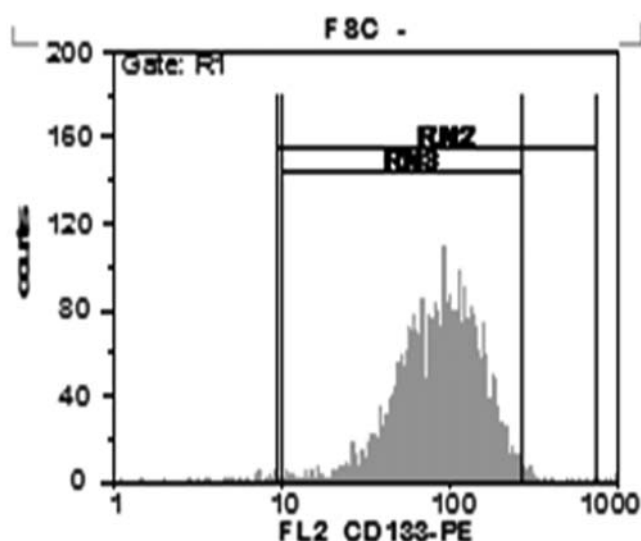
تکنیک Real Time Polymerase Chain Reaction به منظور بررسی بیان ژن گاما بکار برده شد. بعد سلولها در روز چهارده تمایز، به آرامی جمع آوری شده و در بافر فسفات شستشو و سریعاً RNA آنها استخراج شد. RNAهای استخراج شده جهت تولید زنجیره cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سپس به منظور بررسی کمی بیان ژن گاما از کیت SYBR green استفاده شد. جهت نرمال نمودن بیان ژن گاما و بتا از ژن

$\beta\text{-actin}$  استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن گاما و بتای انسانی در جدول ۱ نشان داده شده است (جدول ۱).  
در این مطالعه مقایسه بین دو پارامتر با استفاده از آزمون آماری Student paired t-test با سطح معنی داری کمتر از  $P < 0.5$ ، معنی دار بود.

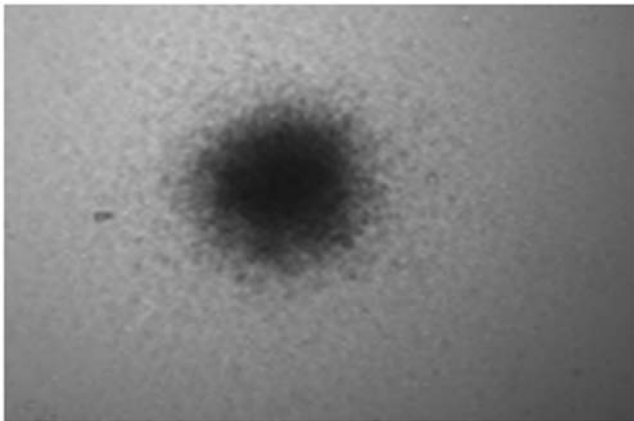
### یافته‌ها:

#### نتایج حاصل از فلوسیتومتری

بعد از جداسازی سلولهای  $CD133^+$  به منظور ارزیابی سلولهای جدا شده و داشتن جمعیتی یکسان از سلولهای  $CD133^+$  تکنیک فلوسیتومتری بکار رفت. نتایج فلوسیتومتری که در شکل ۱ نشان داده شده است خلوص  $94.5\%$  از سلولهای  $CD133^+$  را نشان می‌دهد. (شکل ۱)



شکل ۱. نتایج فلوسیتومتری سلولهای  $CD133^+$  با ستون mini MACS



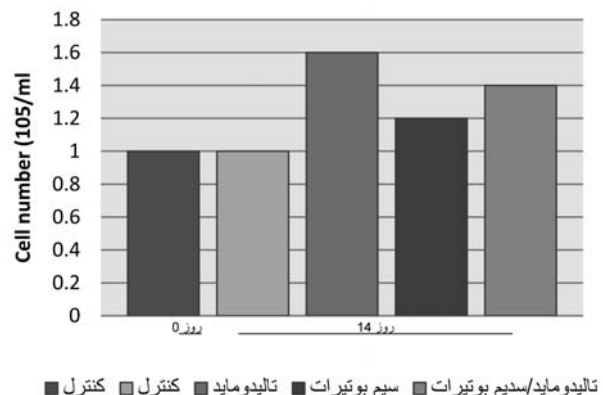
شکل ۳. کلنی اریتروئیدی بنزدین مثبت. بزرگ نمایی  $\times 40$

بوتیرات در غلظت  $100 \mu\text{m}$  برای دوره ۱۴ روزه کشت داده شد. سپس بیان mRNA گاما گلوبین با کمک تکنیک Real-Time RT-PCR به صورت کمی تعیین شد. همچنانکه در شکل ۴ نشان داده شده با تیمار سلول‌های بنیادی رده اریتروئیدی با تالیدوماید، سدیم بوتیرات و ترکیب این دو که در روز ششم تمایز هستند، در نهایت در روز چهاردهم تمایز در مقایسه با گروه کنترل (با  $p > 0.05$ ) افزایش بیان ژن گاما گلوبین به ترتیب به میزان ۳،۶، ۲،۳ و ۴،۱ برابر (شکل ۴ الف) و افزایش بیان ژن بتا گلوبین به ترتیب به میزان ۱،۶، ۱،۳ و ۱،۸ برابر (شکل ۴ ب) در مقایسه با گروه کنترل (با  $p > 0.05$ ) مشاهده می‌شود (شکل ۴). لازم به ذکر است که کنترل و روز صفر (قبل از تیمار دارویی) می‌توانند به عنوان سطح پایه از بیان ژنهای دسته بتا قلمداد شوند و افزایش بیانهای ایجاد شده توسط داروها می‌توانند با آنها مقایسه شوند.

### بحث

سدیم بوتیرات نسبت به عوامل شیمی درمانی مانند هیدروکسی اوره در مطالعات بیشتر مورد استفاده بالینی و تحقیقاتی قرار می‌گیرد به علت اینکه سدیم بوتیرات فاقد عوارض سیتوتوکسیک و جهش‌زایی می‌باشد (۱۷). سدیم بوتیرات علی‌رغم اینکه سبب القای بیان ژن گاما می‌شود دارای محدودیت‌های از جمله مهار اریتروپوئز می‌شود. رویکردی که امروزه در درمان بتا تالاسمی و سایر هموگلوبینوپاتی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، بکار بردن ترکیب‌های دارویی با مکانیسم‌های عملکردی مختلف و همچنین داشتن نقش مکملی همدیگر به منظور ایجاد پاسخ بهینه در این افراد می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های شناخته شده

اثر تالیدوماید بر رشد سلولی



شکل ۲. تاثیر تالیدوماید و سدیم بوتیرات بر رشد سلولی

### تالیدوماید سبب افزایش تکثیر سلولهای اریتروئیدیو تشکیل کلنی در *in vitro* شد

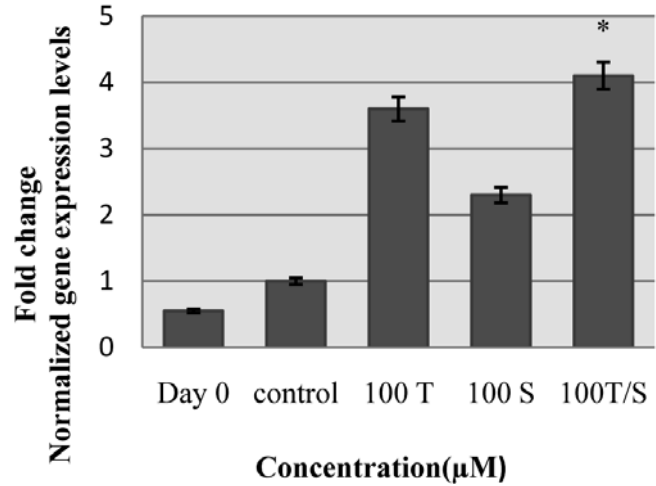
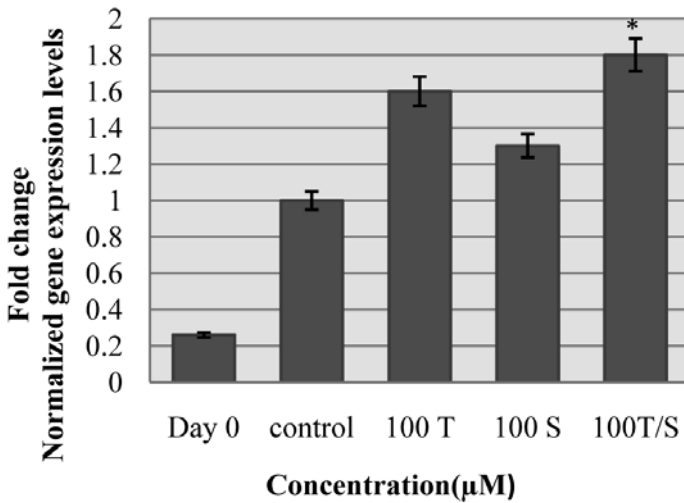
ما ابتدا تاثیر تالیدوماید را بر روی پیش‌سازهای اریتروئیدی با تعیین درصد زنده بودن سلولها و همچنین بکار بردن تکنیک تشکیل کلنی بررسی نمودیم. همچنان که در شکل ۲ نشان داده شده است تالیدوماید سبب افزایش ۱،۶ برابری تعداد سلولها در غلظت  $100 \mu\text{m}$  تالیدوماید نسبت به حالت نرمال شد. سدیم بوتیرات نسبت به شرایط کنترل افزایشی قابل توجهی در تعداد سلولهای رده اریتروئیدی نداشت. (شکل ۲)

### آزمون تشکیل کلنی:

آزمون تشکیل کلنی به منظور بررسی فعالیت عملکردی سلولهای بنیادی خونساز استفاده می‌شود. نتایج بدست آمده از این آزمون نشان می‌دهد که سلولهای بنیادی  $CD133^+$  جدا شده و تکثیر یافته دارای توانایی مناسب کمی و کیفی برای تمایز به سمت رده اریتروئیدی است و از این رو نتایج مربوط به مارکرهای سطحی مربوط به این سلولها را نیز تایید می‌کند. شکل ۳ یک کلنی اریتروئیدی را بعد از ۱۴ روز نشان می‌دهد. (شکل ۳)

### تالیدوماید و سدیم بوتیرات و ترکیب تالیدوماید/سدیم بوتیرات

سبب القاء بیان ژن گاما در پیش‌سازهای اریتروئیدی شدند به منظور افزایش بیان ژن گاما، سلولهای  $CD133^+$  در محیطهای حاوی  $100 \mu\text{m}$  تالیدوماید، سدیم بوتیرات و ترکیب تالیدوماید و سدیم



شکل ۴. نتایج بررسی کمی بیان ژن های بتا (الف) و گاما (ب) گلوبین با استفاده از تکنیک Real-time PCR در گروه های مورد مطالعه. نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت (±SD) می باشد.  $P < 0.05$ \* در مقابل سلول های کنترل (تیمار نشده).

رژیم درمانی تالیدوماید و سدیم بوتیرات، رژیم دارویی ارزشمند برای درمان بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور و کم خونی داسی شکل بوده و این رویکرد درمانی می تواند در آینده نزدیک تحت کارآزمایی بالینی یا در مدل های حیوانی آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج بدست آمده از القاء ژن های دسته بتا می تواند نتایج متفاوتی را در بالغین، مبتلایان به بتا تالاسمی یا کم خونی داسی شکل به دلیل تفاوت های که در ماهیت محیط های *In vivo* و *In vitro* و همچنین اختلاف در الگوی بیانی ژن های بالغین با سلول های مذکور، ایجاد نماید.

### نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که تالیدوماید القاء کننده ی قوی برای هموگلوبین جنینی (و به میزان کمتر ژن بتا گلوبین) بوده و در تمایز رده اریترئوئیدی از سلول های  $CD133^{+}$  بسیار تاثیر گذار می باشد. ما مشاهده کردیم که پروژنیاتورهای اریترئوئیدی در طول کشت با تالیدوماید علاوه بر بیان ژن گاما تعداد سلول های اریترئوئیدی شکل گرفته نسبت به گروه کنترل نیز بیشتر بودند. اثر تالیدوماید بر اریترئوپوئز با افزایش هموگلوبین جنینی و هموگلوبین تام در ارتباط می باشد، بنابراین پیشنهاد می شود که افزایش تعداد سلول های رده اریترئوئیدی یکی از مکانیسم هایی می باشد که در بهبود علائم بیمارانی وابسته به دریافت خون می باشند (مانند بیماران میلودیسپلاستیک) موثر می باشد. این اطلاعات نشان می دهد که تالیدوماید و سدیم بوتیرات دارای اثرات

تالیدوماید تحریک تکثیر در پیش سازهای رده اریترئوئیدی و متعاقباً تحریک اریترئوپوئز می باشد که می تواند دارای نقش مکملی با سدیم بوتیرات باشد (۱۸).

این مطالعه نشان می دهد که تالیدوماید علاوه بر نقش ایمونومدولاتوری شناخته شده (۲) تنظیم کننده ای قوی برای اریترئوپوئز و سنتز هموگلوبین در طول فرایند تمایز در *in vitro* می باشد. نتایج کلینیکی هیدروکسی اوره بر روی بیماران مبتلا به کم خونی داسی شکل نشان داده است که به طور قابل ملاحظه ای می تواند سبب بهبودی علائم در این بیماران شود، گرچه علی رغم این بهبود مصرف هیدروکسی اوره برای تمام بیماران موثر نبوده و می تواند به دلیل داشتن اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول های عامل سیتوپنی در افرادی که از این دارو استفاده می کنند شود (۱۹).

نتایج ما با نشان داد که تالیدوماید به تنهایی یا در اثر ترکیب با سایر القاء کننده ها مانند سدیم بوتیرات می تواند سنتز هموگلوبین جنینی را افزایش داده و همچنین سبب افزایش نسبت زنجیره گاما (و بتا) به آلفا شده که نهایتاً می تواند منجر به احیای اریترئوپوئز شود در این بیماران شود. علاوه بر این براساس مطالعات دیگر نشان داده شده است که تالیدوماید قابلیت مهار سایتوکاین های مهار کننده خون سازی مانند  $TNF-\alpha$  را داشته و می تواند منجر به کاهش واکنش های ایمنی ناشی از اریترئوپوئز غیر موثر در مغز استخوان شده که می تواند اریترئوپوئز موثر را بیش از پیش تحریک نماید (۲۰). این تحقیق نشان داد که

دانشجوی رشته هماتولوژی (کد رهگیری ۲۰۲۷۴۰۰) در دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس می‌باشد. همچنین بدینوسیله از همکاری مسئولین مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی صارم و همچنین سرکار خانم دکتر نیکوگفتار در سازمان انتقال خون ایران و جناب آقای آتشی در مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بن یاخته تشکر و قدردانی می‌نمایم.

هم افزایی با یکدیگر می‌باشند. همچنین مقایسه اثر تالیدوماید و سدیم بوتیرات در لقااء بیان ژن گاما و بتا گلوبین نشان دهنده توان بالاتر تالیدوماید در افزایش بیان ژن گاما و بتا گلوبین می‌باشد.

## سپاسگذاری

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای محمد احمدوند

## References:

- Bianchi N, Borgatti M, Gambari R, Lampronti I. Use of angelicin and of its structural analogues for the treatment of thalassemia. Google Patents; 2009.
- Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, Chin K, Rodgers GP. 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.
- Cao H, Stamatoyannopoulos G, Jung M. Induction of human globin gene expression by histone deacetylase inhibitors. *Blood*2004;103(2):701-9.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *Journal of Clinical Investigation*2003;111(2):231-40.
- Dover GJ, Brusilow S, Charache S. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood*1994;84(1):339-43.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*2004;429(6990):457-63.
- Gambari R, Fibach E. Medicinal Chemistry of Fetal Hemoglobin Inducers for Treatment of-Thalassemia. *Current medicinal chemistry*2007;14(2):199-212.
- Masera N, Tavecchia L, Capra M, Cazzaniga G, Vimercati C, Pozzi L, et al. Optimal response to thalidomide in a patient with thalassaemia major resistant to conventional therapy. *Blood Transfusion*;8(1):63-5.
- Han L, Lu J, Pan L, Wang X, Shao Y, Han S, et al. Histone acetyltransferase p300 regulates the transcription of human erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase gene. *Biochemical and biophysical research communications*2006;348(3):799-806.
- Han L, Zhong Y, Huang B, Pan L, Xu X, Wang X, et al. Sodium butyrate activates erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase gene through Sp1 elements at its promoter. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*2008;41(2):148-53.
- Kramer MF, Gunaratne P, Ferreira GC. Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase gene. *Gene*2000;247(1-2):153-66.
- Mabaera R, West RJ, Conine SJ, Macari ER, Boyd CD, Engman CA, et al. A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger. *Experimental hematology*2008;36(9):1057-72.
- Atashi A, Soleimani M, Kaviani S, Hajifathali A, Arefian E. In vitro induction of fetal hemoglobin in erythroid cells derived from CD133+ cells by transforming growth factor- and stem cell factor. *Iranian Journal of Biotechnology (IJB)*2008;6(3).
- Newmark HL, Lupton JR, Young CW. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer letters*1994;78(1-3):1-5.
- PERRINE SP, CASTANEDA SA, BOOSALIS MS, WHITE GL, JONES BM, BOHACEK R. Induction of Fetal Globin in Thalassemia: Cellular Obstacles and Molecular Progress. *Annals of the New York Academy of Sciences*2005;1054(1):257-65.
- Zuccato C, Bianchi N, Borgatti M, Lampronti I, Massei F, Favre C, et al. Everolimus is a potent inducer of erythroid differentiation and -globin gene expression in human erythroid cells. *Acta Haematologica*2006;117(3):168-76.
- Perrine, S.P. Fetal globin stimulant therapies in the beta-hemoglobinopathies: principles and current potential *Pediatr Ann*2008;(3): 339-46.
- Perrine, S., D.V. Faller, L. Shen. HQK-1001 has additive HbF-inducing activity in combination with hydroxyurea and decitabine. *Blood* 2009;(14): 973-7.
- Fucharoen, S., N. Siritanaratkul, P. Winichagoon, .. Hydroxyurea increases hemoglobin F levels and improves the effectiveness of erythropoiesis in beta-thalassemia/ hemoglobin E disease. *Blood* 1996;87: 887-92.
- Varghese J, Chattopadhyaya S, Sarin A. Inhibition of p38 kinase reveals a TNF-alpha-mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line. *J Immunol.* 2001;166:6570-6577.