

## مقاله پژوهشی

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

علی دهقانی فرد<sup>۱</sup>، سعید کاویانی<sup>۱\*</sup>، مهرداد نوروزی نیا<sup>۲،۳</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۱</sup>، سعید آبرون<sup>۱</sup>، زهرا ذنوبی<sup>۴</sup>، محمد احمدوند<sup>۵</sup>

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  $\beta$ -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. تالیدوماید 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<sup>+</sup> جدا شده از خون بند ناف انجام شد. از تکنیک فلوسیتومتری جهت ارزیابی هموزن بودن سلول‌های CD133<sup>+</sup> جدا شده استفاده شد. سپس با استفاده از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئیتیک، قدرت کلونی زایی در گروه‌های تیمار دارویی تعریف شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از فلوسیتومتری حاکی از هموزن بودن سلول‌های بنیادی CD133<sup>+</sup> جدا شده از خون بندناف به میزان بیش از ۹۵٪ می‌باشد. همچنین نتایج بدست آمده از آزمون سنجش کلونی بیانگر تأثیر تالیدوماید در افزایش تعداد کلونی‌های هماتوپوئیتیک 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 تالیدوماید 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:  $\beta$ -تالاسمی؛ بیماری داسی شکل؛ سلول‌های بنیادی CD133<sup>+</sup>؛ هموگلوبین جنینی؛ تالیدوماید؛ سدیم بوتیرات.

### مقدمه

حذفی در ژن  $\beta$ -گلوبین ایجاد می‌گردد و منجر به کاهش و یا عدم تولید محصول گلوبینی این ژن می‌گردد. در نتیجه به دنبال رسوب زنجیره‌های  $\alpha$ -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  $\beta$ -گلوبین، به دنبال ایجاد شرایط هیپوکسی در گلبول‌های قرمز رسوب کرده و عوارض مرتبط با بیماری شکل می‌گیرند (۲).

دید شده است که القای بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین و در نتیجه افزایش

بتا تالاسمی و بیماری داسی شکل (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

\* سعید کاویانی، PhD

دکتری تخصصی هماتولوژی، استادیار گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس،

بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، ساختمان ۵ پزشکی

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۳۲

پست الکترونیک: kavianis@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۱۴

استفاده (Technology, Vancouver, BC, Canada) شد. همچنین به منظور القای بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در پیش سازهای اریتروئیدی و بررسی تغییر الگوی متیلاسیون هیستونی، از دو داروی تالیوماید (Tocris Bioscience, Missouri, USA) و سدیم بوتیرات (Sigma, Saint Louis, MO, USA) استفاده شد.

### جداسازی سلول‌های CD133<sup>+</sup> 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 ضد انعقاد اسید سیترات دکستروز جمع‌آوری شد. سپس در مرحله اول به منظور 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 هسته‌ای و پلاسما تشکیل شد. لایه سلولی تک هسته‌ای جمع‌آوری شده و با سه حجم فسفات بافر سالین (PBS) (pH=7.2) حاوی EDTA مخلوط شد و مجدداً 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 هسته‌ای دو بار با PBS حاوی EDTA شستشو شد. در مرحله دوم نیز جداسازی سلول‌های بنیادی CD133<sup>+</sup> از سلول‌های تک هسته‌ای انجام گرفت. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد CD133 نشاندار شده با ذرات آهن به سلول‌های تک هسته‌ای افزوده، سپس حدود ۱ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و یا ۳۰ در دمای ۴°C انجام می‌شود. بعد از آن سانتریفیوژ به مدت حدود ۷ دقیقه 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 پیتاژ تا حد یکنواخت شدن سوسپانسیون سلولی انجام می‌گیرد. حال سوسپانسیون سلولی از ستون MACS

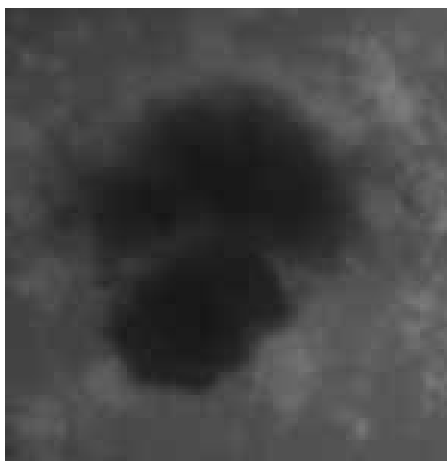
سطح هموگلوبین جنینی (HbF) <sup>۲</sup> در دوران پس از تولد، می‌تواند به عنوان یک راه کار درمانی مؤثر در درمان  $\beta$ -تالاسمی و SCD مطرح گردد. در حقیقت القای بیان HbF در بیماران مبتلا  $\beta$ -تالاسمی سبب مهار رسوب زنجیره‌های  $\alpha$ -گلوبین اضافی که قادر به شرکت در ساختار هموگلوبین نیستند، می‌شود (۳، ۴). در سال‌های اخیر استفاده از داروهایی که با تغییر در الگوی اپی ژنتیکی ژن‌ها سبب افزایش بیان ژن‌های  $\gamma_G$  و  $\gamma_A$  می‌گردند، مورد توجه قرار گرفته اند. از جمله این داروها می‌توان به آزاستیدین (۵)، دسی تابین (۶)، بوتیرات (۷)، پمالیدوماید (۸) و تالیوماید (۹) اشاره داشت. برخی از این داروها از طریق کاهش متیلاسیون در ناحیه CpG اختصاصی که بالادست ناحیه شروع رونویسی ژن‌های  $\gamma_G$  و  $\gamma_A$  قرار گرفته اند، سبب افزایش بیان HbF می‌گردند. برخی دیگر از داروها با مکانیسم افزایش استیلاسیون بویژه H<sup>۳</sup> و H<sup>۴</sup> در پرموتر ژن‌های  $\gamma_G$  و  $\gamma_A$  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 می‌تواند در القای بیان ژنی مؤثر باشد (۱۱).

همچنین دیده شده است که استفاده از داروهای محرک اریتروپوئیز 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 تالیوماید 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 CD133<sup>+</sup> 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 CD133<sup>+</sup> به رده اریتروئیدی، از اریتروپوئیتین نوترکیب (EPO; R&D systems, Minne-) (apolis, MN, USA) و اینترلوکین ۳ (IL-3; stem cell)



شکل ۱: کلونی اریترئوئیدی در محیط کشت القاکننده تمایز (پایه متیل سلولز) در روز ۱۴ تمایز با بزرگنمایی اولیه  $\times 100$

اریترئوپوئین 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  $37^{\circ}\text{C}$  و به میزان ۵٪  $\text{CO}_2$  با رطوبت بالا انکوبه شدند. سپس در روز ۱۴ تمایز اریترئوئیدی، 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 هماتوپوئیتیک و تعداد کل‌ونی‌های اریترئوئیدی بنزیدین مثبت با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست معکوس مورد شمارش قرار گرفتند. نمونه کلونی اریترئوئیدی تشکیل شده در روز ۱۴ تمایز در شکل ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 و SPSS 15 و به کمک آزمون t انجام گرفت. نتایج بدست آمده حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت ( $\pm\text{SD}$ ) می‌باشند. از نظر آماری نیز مقدار  $p < 0.05$  به صورت معنی‌دار بررسی شد.

#### یافته‌ها

#### نتایج حاصل از فلوسیتومتری

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، نتایج فلوسیتومتری

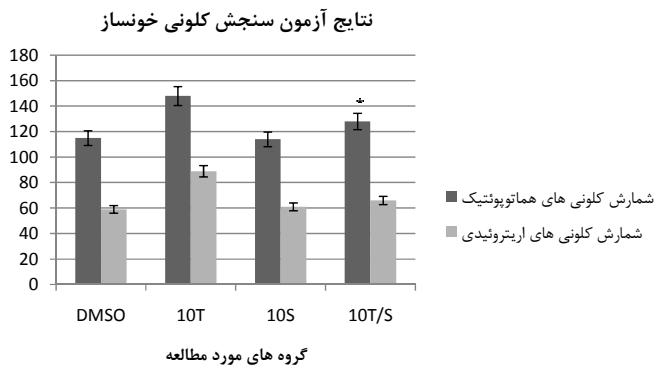
(Miltenyi) (Magnetic Activated Cell Sorting) و بر اساس دستورالعمل کیت عبور داده می‌شود. در پایان سلول‌های  $\text{CD}133^{+}$  از سایر سلول‌های تک هسته ای تخلیص می‌گردند. به منظور بررسی تعداد سلول‌های تخلیص شده، حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با یک قطره تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شده و به کمک لام نئوبار، شمارش سلولی انجام گرفت. در پایان حدود  $5 \times 10^4$  سلول زنده شمارش شد. سلول‌های  $\text{CD}133^{+}$  جداشده به منظور انجام تکثیر سلولی، به محیط StemSpan حاوی فاکتورهای رشد SCF، TPO،  $\text{Flt}3\text{-L}$  و اضافه شده و به مدت حدود یک هفته تحت شرایط تکثیر باقی ماندند.

#### فلوسیتومتری

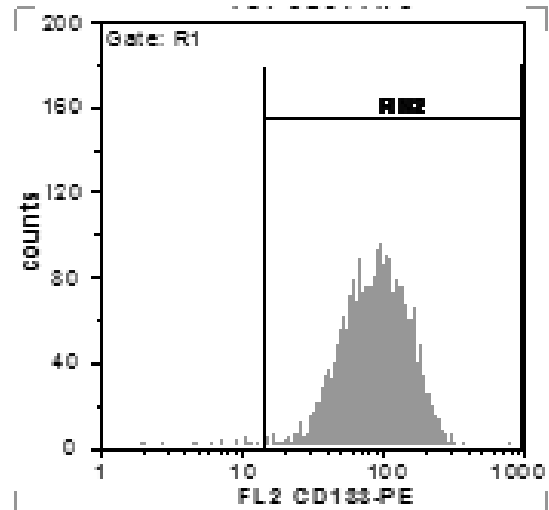
به منظور بررسی هموزنیسته و درجه خلوص سلول‌های جدا شده از نظر مارکر  $\text{CD}133$ ، از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر PBS به حدود  $10^4$  سلول اضافه شد. پس از پیپتاژ کردن با سمپلر و ایجاد سوسپانسیون سلولی یکنواخت، حدود ۷ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال  $\text{CD}133$  نشاندار با فیکو اریترین (clone, AC141; Miltenyi Biotech, Germany) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  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  $\text{IgG}1$  موشی نشاندار شده با FITC به عنوان کنترل منفی (IQ-Products, the Netherlands; IQP-191F) استفاده شد.

#### آزمون سنجش کلونی هماتوپوئیتیک

به منظور ارزیابی قدرت کلونی زایی سلول‌های بنیادی و همچنین ارزیابی قدرت تمایز این سلول‌ها به سمت رده اریترئوئیدی از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئیتیک استفاده شد. برای این منظور سلول‌های  $\text{CD}133^{+}$  جدا شده از خون بند ناف ۳ اهداکننده، در محیط پایه متیل سلولز (MethoCult H4230, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) کشت IMDM با ۲٪ FBS،  $5\text{ ng/ml}$  اینترلوکین-۳،  $3\text{ U/ml}$



شکل ۳: نتایج مربوط به شمارش تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئیتیک و تعداد کلونی‌های اریترئوئیدی در گروه‌های تعریف شده در روز ۱۴ تمایز اریترئوئیدی نتایج حاصل از تکرار ۳ نمونه متفاوت ( $\pm$ SD) می‌باشند ( $P < 0.05$ )\* در مقابل سلول‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) Abbreviations [10T: 10  $\mu$ M Thalidomide; 10S: 10  $\mu$ M Sodium butyrate; 10T/S: 10  $\mu$ M Thalidomide/10  $\mu$ M Sodium butyrate]



شکل ۲: نتایج حاصل از فلوسیتومتری سلول‌های جداسازی شده از نظر درجه خلوص جمعیت سلول‌های  $CD133^+$

## بحث

در این تحقیق در ابتدا جداسازی سلول‌های  $CD133^+$  با استفاده از تکنیک ایمونومگنتیک و توسط ستون MACS انجام پذیرفت. همانطور که قبلاً اشاره شد، در هر بار انجام تکنیک MACS حدود  $5 \times 10^4$  سلول با درجه خلوص حدود ۹۵٪ جداسازی شد. دیده شده است که سلول‌های  $CD133^+$  در مقایسه با سلول‌های  $CD34^+$  ابتدایی تر می‌باشند (۱۲).

در این تحقیق پس از جداسازی سلول‌های بنیادی  $CD133^+$  از خون بند ناف، تکثیر آنها در محیط کشت StemSpan و با استفاده از فاکتورهای رشد SCF، TPO، و Flt3-L در محیط آزمایشگاهی انجام شد. البته Oudenrijn و همکارانش طی مطالعه ای به اثرات مناسب دو فاکتور رشد TPO و IL-3 در تکثیر سلول‌های  $CD133^+$  اشاره داشتند. آنها دریافتند که استفاده همزمان از فاکتورهای TPO و IL3 باعث افزایش تکثیر سلول‌های  $CD133^+$  می‌شود (۱۳).

همچنین نتایج حاصل از آزمون سنجش کلونی هماتوپوئیتیک نشان داد که تالیدوماید 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

حاکمی از درجه خلوص بالای سلول‌های جدا شده از نظر بیان مارکر  $CD133^+$  می‌باشد. بیش از ۹۵٪ از سلول‌های جدا شده با MACS پس از انجام تکثیر سلولی،  $CD133^+$  بودند.

## نتایج حاصل از آزمون سنجش کلونی‌های هماتوپوئیتیک

در پایان روز ۱۴ از تمایز سلول‌های  $CD133^+$  به رده اریترئوئیدی در گروه‌های ۱۰T، ۱۰S، ۱۰T/S و DMSO شمارش کلونی‌های تشکیل شده انجام گرفت. شکل ۳ به بررسی و مقایسه تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئیتیک و تعداد کلونی‌های اریترئوئیدی بنزیدین مثبت در گروه‌های تعریف شده می‌پردازد. نتایج بدست آمده حاکمی از تأثیر بیشتر تالیدوماید در افزایش تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئیتیک و کلونی‌های اریترئوئیدی در مقایسه با سدیم بوتیرات و ترکیب دارویی می‌باشد. همچنین نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که در گروه تالیدوماید افزایش ۱/۳ برابری در تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئیتیک و افزایش ۱/۵ برابری در تعداد کلونی‌های اریترئوئیدی 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 هماتوپوئیتیک و تعداد کلونی‌های اریترئوئیدی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد.

دارویی تالیدوماید و سدیم بوتیرات نیز می‌بایست اثر سینرژیک این دو دارو در القای بیان ژن  $\gamma$ -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 یاخته‌پردانی و تشکر می‌نماییم.

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 تالیدوماید بیشتر از گروه سدیم بوتیرات و گروه ترکیب دارویی می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از تالیدوماید به 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 تالیدوماید، استفاده از این دارو در تحقیقات دیگری جهت القای بیان ژن  $\gamma$ -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 تالیدوماید، استفاده از این دارو در تحقیقات بعدی جهت القای بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین به منظور درمان بیماران می‌تواند بیشتر مورد توجه قرار گیرد. در استفاده از ترکیب

### References

- Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010;5(1):11.
- 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.
- Ataga KI. Novel therapies in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:54-61.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, et al. 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.
- Atweh GF, DeSimone J, Sauntharajah Y, et al. Hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:14-39.
- Kiefer CM, Hou C, Little JA, Dean A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. *Mutat Res*. 2008; 647(1-2):68-76.
- 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- $\beta$  and stem cell factor. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2008;6(3):157-63.
- 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 children. *Experimental Hematology* 2000; 28:1054-61.
- Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Hematology*. 2006;2006(1):58-62.