اثر هم افزایی سدیم بوتیرات و تالیدومايد در القای بیان هموگلوبین جنینی در پیش سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD133+ خون بندناف

علی دهقانی‌فرد،[۱] سعید کاویانی،[۲] مهرداد نوروزی‌نیا،[۳] مسعود سلیمانی،[۲] سعید آبرون،[۲] عباس حاجی فتحعلی،[۴] محمد احمدوند،[۵] مریم محمودی‌نیا میمند،[۶] زینب کاویانی،[۷] مجید فرشدوستی حق[۸]

۱. کارشناسی ارشد هماتولوژی ، دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیار هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۴. دانشیار هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۶. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، پژوهشکده سلول‌های بنیادی، بیمارستان تخصصی صارم
۷. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی البرز
۸. استادیار هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از داروهایی با توان القای تولید هموگلوبین جنینی به عنوان راه کار درمانی نوین در درمان β –هموگلوبینوپاتی‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد. داروهای القا کننده بیان ژن γ گلوبین از جمله سدیم بوتیرات و تالیدومايد می‌توانند سبب کاهش تجمع زنجیره‌های α گلوبین اضافی در پیش‌سازهای اریتروئیدی گردند.

مواد و روش‌کار: در این مطالعه تجربی از کیت MACS به منظور جداسازی سلول های CD133+ خون بندناف استفاده شد. هم‌چنین برای بررسی انجام تمایز اریتروئیدی، سنجش کلونی‌های هماتوپوئتیک انجام گرفت. در ادامه بررسی اثر دو داروی تالیدومايد و سدیم بوتیرات به صورت مجزا و ترکیبی روی القای بیان کمی ژن‌های β گلوبین و γ گلوبین در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD133+ در in-vitro انجام گرفت. برای این منظور از تکنیک SYBR green Real-time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج فلوسیتومتری نشان داد حدود ۹۵ درصد از سلول‌های تخلیص شده، CD133+ بودند. نتایج Real-time PCR نیز حاکی از افزایش سطح mRNA ژن γ گلوبین در گروه‌های سلولی تیمار شده با تالیدومايد، سدیم بوتیرات و ترکیب دارویی به میزان به ترتیب ۲/۶ و ۲/۱ و ۳/۵ برابری و در مورد ژن β گلوبین به میزان به ترتیب ۱/۴ و ۱/۳ و ۱/۶ برابری در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد ترکیب دارویی مذکور می‌تواند به عنوان یک ترکیب دارویی مؤثر در القای بیان هموگلوبین جنینی در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD133+ عمل نماید. [م ت ع پ ز، ( ):]

کلیدواژه‌ها: سلول‌های CD133+، ژن γ گلوبین، سدیم بوتیرات، تالیدومايد

مقدمه

بتا هموگلوبینوپاتی‌ها اختلالات ژنتیکی زنجیره بتا گلوبین بوده که می‌توانند سبب مرگ و میر قابل توجهی در مناطق مختلف دنیا گردند. بتا تالاسمی و بیماری داسی شکل (SCD) دو مورد شایع این گروه از اختلالات بوده که به دنبال موتاسیون‌های خاصی در ژن کدکننده زنجیره بتا گلوبین ایجاد می‌شوند. SCD به دنبال موتاسیون نقطه‌ای در کدون ششم ژن بتا گلوبین ایجاد می‌شود که سبب جایگزینی گلوتامیک اسید بجای والین می‌گردد.[۱] بتا تالاسمی نیز در نتیجه انواع مختلفی از موتاسیون ها در ژن بتا گلوبین ایجاد می‌شود و منجر به کاهش و یا عدم تولید زنجیره بتا گلوبین می‌گردد.[۲] راه کارهای نوین درمانی بر مبنای تغییر در الگوی اپی‌ژنتیکی ژن‌ها که سبب افزایش بیان ژن گاما گلوبین و در نتیجه افزایش سطح هموگلوبین جنینی (HbF) می‌شود، بسیار مورد توجه می‌باشند. دیده شده است که در بیماران مبتلا به SCD همراه با فنوتیپ HPFH (تداوم ارثی هموگلوبین جنینی)، سطوح بالای HbF می‌تواند سبب کاهش عوارض بیماری گردد.[۳،۱-۵] داروهای القا کننده بیان ژن گاما گلوبین شامل هیدروکسی اوره،[۶] داروهای مهارکننده آنزیم هیستون داستیلاز (HDAC inhibitors) مانند سدیم بوتیرات[۷] و آزاسیتیدین[۸] و دسی تابین،[۹] و همین‌طور داروهای تعدیل کننده سیستم ایمنی مانند پمالیدومايد و لنالیدومايد[۱۰] و تالیدومايد[۱۱] می‌توانند سبب کاهش تجمع زنجیره‌های آلفا گلوبین اضافی در پیش سازهای اریتروئیدی و بهبود وضعیت عدم تعادل نسبت زنجیره‌های آلفایی به زنجیره‌های غیر آلفایی گردند.[۱۲] تحقیقات مختلفی در زمینه استفاده از داروها و فاکتورهای رشد القاگر بیان HbF در پیش سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های بنیادی خونساز انجام گرفته است.[۱۳-۱۶] دیده شده است که سلول‌های بنیادی CD133+ در مقایسه با سلول‌های بنیادی CD34+ نابالغ‌تر بوده و دارای توان کلون‌زایی بالاتری می‌باشند.[۱۷] در حالی‌که افزایش مقادیر کم HbF در بیماران مبتلا به SCD می‌تواند بسیار مؤثر باشد، در بتا تالاسمی افزایش مقادیر قابل توجهی از HbF جهت بهبود عوارض بیماری مورد نیاز است.[۱۸] بنابراین استفاده از داروهای با توان بالا در القای HbF و با اثرات جانبی کم بسیار مورد توجه می‌باشد.[۱،۱۹] در این تحقیق از دو داروی سدیم

آدرس نویسنده مسئول: بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، ساختمان ۵ پزشکی، گروه هماتولوژی
email: kavianis@modares.ac.ir

بوتیرات و تالیدومايد به منظور القای بیان ژن بتا گلوبین و گاما گلوبین در پیش سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های بنیادی +CD133 خون بندناف استفاده شده و هم‌چنین اثرات هم افزایی این دو دارو نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌کار

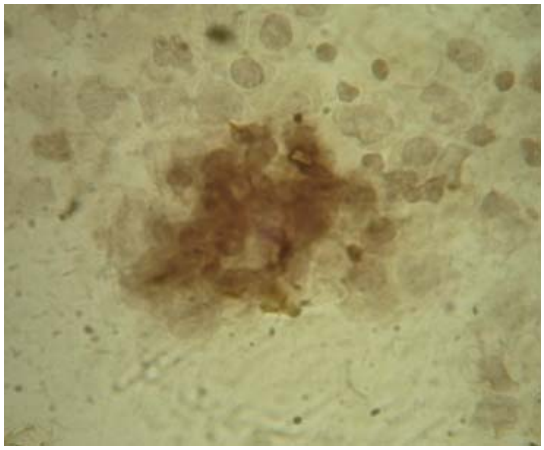
در این مطالعه تجربی از اریتروپوئتین نوترکیب (EPO; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)، اینترلوکین ۳ (IL-3; stem cell Technology, Vancouver, BC, Canada)، تالیدومايد (Tocris Bioscience, Missouri, USA) و سدیم بوتیرات (Sigma, Saint Louis, MO, USA) استفاده شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بندناف: خون بندناف انسانی بعد از تکمیل رضایت‌نامه توسط اهداکننده (بیمارستان صارم، تهران، ایران) در کیسه خون حاوی سدیم سیترات جهت جلوگیری از انعقاد خون جمع آوری شد و با نسبت یک به شش با محلول هیدروکسی اتیل استارچ (HES) رقیق گشته و سپس با نسبت یک به دو (نسبت فایکول به خون بندناف) به آرامی روی فایکول (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) با دانسیته ۱/۰۷۷ اضافه شد. سپس سانتریفیوژ در دور ۴۰۰G به مدت ۴۰ دقیقه انجام گرفت. تفاوت در چگالی سلولی سبب جدا شدن لایه گلبول‌های قرمز از لایه حاوی سلول‌های تک هسته‌ای شد. لایه سلول‌های تک هسته‌ای پس از جمع آوری، با سه حجم فسفات بافر سالین (PBS) با pH=۷/۲ مخلوط شد و سانتریفیوژ در دور ۳۰۰G به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت سلول‌های تک هسته‌ای پلت شده، دو بار با PBS شستشو شد.

جداسازی سلول‌های +CD133: فرایند جداسازی سلول‌های +CD133 از بقیه سلول‌های تک هسته‌ای توسط کیت MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) (Miltenyi Biotech, Germany) و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. به‌طور خلاصه حدود ۱۰۷ سلول تک هسته‌ای با ۴۰۰ میکرولیتر PBS حاوی ۳ درصد حجمی از سرم انسانی انکوبه شد. بعد از انجام شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی علیه شاخص +CD133 که کونژوگه با ذرات آهن می‌باشند، به مخلوط سلولی افزوده شده و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C انجام گرفت. سپس شستشوی سلول‌ها با PBS حاوی ۰/۵ درصد وزنی حجمی آلبومین سرم گاوی (BSA; Sigma Aldrich) و ۲ میلی مولار EDTA انجام شد. عبور سلول‌های تیمار شده با آنتی‌بادی از ستون MiniMACS انجام شد. سلول‌های +CD133 متصل به آنتی‌بادی در میدان مغناطیسی به دام افتاده و در دیواره ستون باقی می‌مانند. سپس شستشوی ستون به منظور خارج کردن سلول‌های باند نشده با آنتی‌بادی، سه مرتبه توسط PBS حاوی EDTA و BSA انجام گرفت. در مرحله بعد ستون از آهن‌ربا جدا شده و با استفاده از پیستونی که در بالای ستون تعبیه شده است، فشار ناگهانی برای خارج کردن سلول‌های متصل به دیواره ستون وارد آمد. سلول‌های +CD133 تخلیص شده در محیط Stemspan حاوی فاکتورهای رشد نگهداری شده و تعدادی از سلول‌ها نیز به منظور تعیین خلوص سلول‌های +CD133، تحت فلوسیتومتری قرار گرفت. در نهایت حدود ۳×۱۰۴ سلول +CD133 با درجه خلوص حدودا ۹۵ درصد از سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شد.

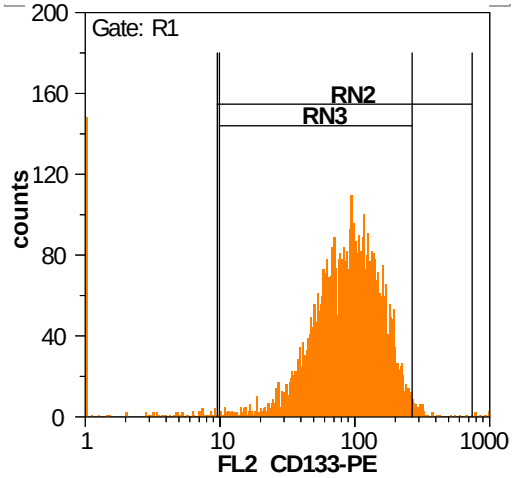
کشت سلولی و القای هموگلوبین جنینی: سلول‌های +CD133 حاصل از مرحله قبلی در محیط IMDM حاوی ۳۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Cambrex, Belgium)، ۷۰μg/ml ترانسفرین اشباع از آهن، ۲mM ال-گلوتامین، بتا مرکاپتواتانول (M ۵-۱۰) و ۱۰۰U/ml پنی-سیلین/استرپتومایسین کشت داده شد. سپس سلول‌ها با ۳U/ml اریتروپوئتین نوترکیب انسانی و ۵ng/ml اینترلوکین ۳ جهت تمایز به سمت رده اریتروئیدی تیمار گشتند. به منظور به‌دست آوردن حد مطلوبی از تولید ژن گاماگلوبین، سلول‌ها در روز ۶ از مرحله تمایز به ۴ گروه مختلف شامل گروه‌های تالیدومايد ۱۰μM، سدیم بوتیرات ۱۰μM، تالیدومايد ۱۰μM سدیم بوتیرات ۱۰μM و DMSO ۰/۱ درصد(Sigma, St Louis, MO) (به عنوان کنترل) تقسیم شده و با غلظت‌های مذکور داروها تیمار شدند. تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار انجام گرفت. در نهایت سلول‌ها در روز ۱۴ تمایز جمع‌آوری شدند. در این تحقیق، سلول‌های +CD133 از خون بندناف ۳ اهداکننده جداسازی شده و به‌طور جداگانه تحت کشت و تیمار دارویی قرار گرفتند.

سنجش کلونی‌های هماتوپوئتیک: محیط متیل سلولز (MethoCult H4230, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) در لوله‌های ۵ میلی‌لیتری تهیه شد. هریک از لوله‌ها حاوی ۵ ng/ml اینترلوکین-۳ و ۳U/ml اریتروپوئتین بودند. هم‌چنین به هریک از لوله‌ها رقت مشخصی از محلول تجاری آماده افزوده شد. در نهایت حدود ۱/۵×۱۰۳ سلول +CD133 که حاوی محیط کشت IMDM و ۳۰ درصد FBS می‌باشند، به هریک از لوله‌ها اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، ۱/۱ml از مخلوط‌های تهیه شده در پتری دیش‌های ۳۵ میلی‌متری (Stem Cell Technologies Inc.) کشت داده شدند. پتری دیش‌ها در انکوباتور کشت سلولی در شرایط رطوبت مطلوب، دمای ۳۷°C و به میزان ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. سپس کلونی‌های اریتروئیدی در روز ۱۴ با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست معکوس مورد مطالعه قرار گرفتند. تصویر ۱ نشان‌دهنده کلونی اریتروئیدی تشکیل شده در روز ۱۴ تمایز می‌باشد.



تصویر ۱: کلونی اریتروئیدی در محیط کشت القاکننده تمایز در روز ۱۴ تمایز، بزرگنمایی اولیه ×۱۰۰

فلوسیتومتری: پس از جداسازی سلول‌های CD133+ با ستون Mini MACS جهت بررسی هموژنیسیته جمعیت سلول‌های CD133+، از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. جهت آماده سازی، PBS 100µl به حدود ۱۰۴ سلول اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن با سمپلر، به آن ۷µl آنتی‌بادی CD133-PE (clone, AC141; Miltenyi Biotech, Germany) اضافه شد. انکوباسیون در دمای یخچال به مدت ۶۰ دقیقه انجام سپس به آن 100µl محلول پارافرمالدهید ۱ درصد اضافه شد. به عنوان کنترل منفی از ایزوتیپ IgG1-FITC موشی (IQ-Products, the Netherlands; IQP-191F) استفاده شد. بر اساس تصویر ۲، نتایج فلوسیتومتری نشان می‌دهد حدود ۹۵ درصد از جمعیت سلول‌های تخلیص شده با ستون Mini MACS، CD133+ می‌باشند.



تصویر ۲: نتایج فلوسیتومتری سلول های جداسازی شده با ستون Mini MACS از نظر هموژنیسیته جمعیت سلول های $CD133^+$

آنالیز کمی بیان ژنی با تکنیک Real-time PCR: جهت بررسی بیان ژن-های بتا گلوبین و گاما گلوبین از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. در ابتدا در روز ۱۴ تمایز، سلول‌ها جمع‌آوری و با PBS شسته شده و در نهایت مراحل استخراج RNA سلول‌ها به کمک کیت استخراج RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia,CA) انجام گرفت. به منظور استخراج RNA، از حدود ۳×۱۰۶ سلول استفاده شد. سپس سنتز مولکول cDNA با استفاده از تکنیک RT-PCR روی RNA های استخراج شده انجام گرفت. در ادامه به منظور بررسی کمی بیان ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین از روش SYBR green Real-time PCR (Qiagen Kit, Valencia,CA) استفاده شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده در انجام Real-time PCR ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین نشان داده شده است. به منظور نرمال کردن نتایج به‌دست آمده از بیان ژن بتا گلوبین و گاما گلوبین نیز از ژن β-actin به عنوان یک house keeping gene استفاده شد. مقادیر نسبی بدست آمده بر اساس روش CT بوده و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد محاسبه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نیز با استفاده از نرم افزار SPSS-15 و با استفاده از آزمون *t* انجام گرفت. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده حاصل تکرار ۳ نمونه متفاوت (Mean±SD) می‌باشند. از نظر آماری نیز مقدار $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای بتا گلوبین، گاما گلوبین و بتا اکتین

Gamma globin-F	GTCCTCTGCCTCTGCCATC
Gamma globin-R	CGGTCACCAGCACATTTCC
Beta Globin-F	CTCACCTGGACAACCTCAAG
Beta Globin-R	AGCCACCACTTTCTGATAGG
Beta actin-F	CCCTGGCGGCCTAAGGACTC
Beta actin-R	CACATGCCGGAGCCGTTGTC

یافته‌ها

نتایج مربوط به آزمون سنجش کلونی‌های هماتوپوئتیک سلول‌های CD133+:

نتایج حاصل از این آزمون حاکی از توانایی سلول‌های CD133+ در تمایز به سلول‌های رده اریتروئیدی می‌باشد. جدول ۲ به بررسی تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک و تعداد کلونی‌های اریتروئیدی (بنزیدین مثبت) تشکیل شده در محیط نیمه جامد متیل سلولز می‌پردازد.

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی تعداد کل کلونی های هماتوپوئتیک و تعداد کلونی های اریتروئیدی بنزیدین مثبت در آزمون سنجش کلونی های هماتوپوئتیک در روز ۱۴ از تمایز سلول های $CD133^+$ به سلول های رده اریتروئیدی

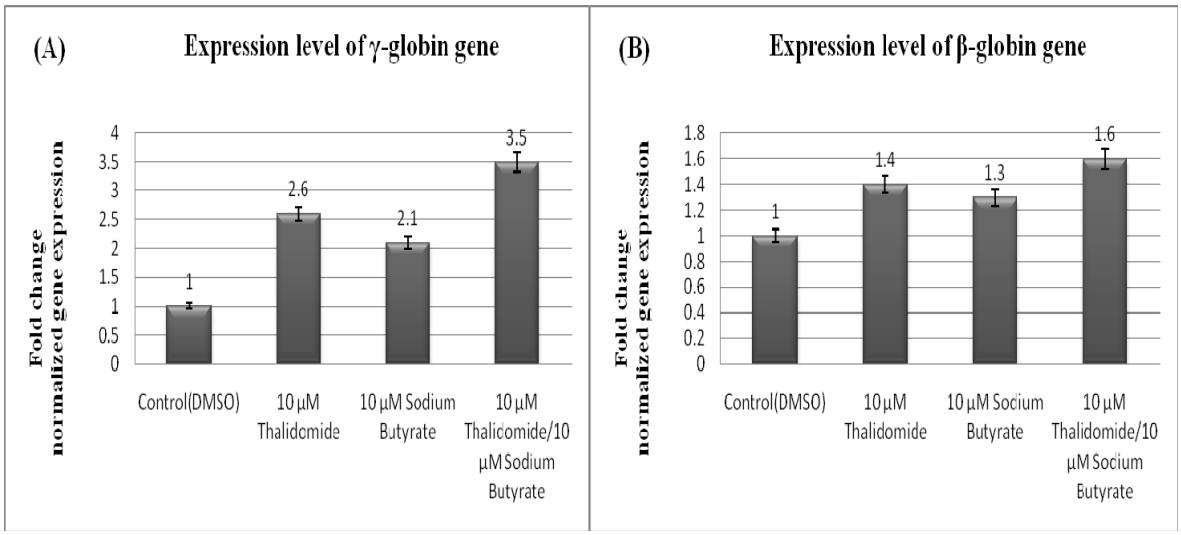
آزمایش	تعداد کل کلونی‌های هماتوپوئتیک	تعداد کلونی های اریتروئیدی بنزیدین مثبت
۱	۱۵۴	۸۴
۲	۱۱۱	۹۲
۳	۱۳۹	۷۹
جمع کل	۴۰۴	۲۵۵
Mean±SD	۱۳۴±۲۱/۸۲	۸۵±۶/۵۵

تأثیر تالیدومايد در مقایسه با سدیم بوتیرات در تکثیر پیش‌سازهای رده اریتروئیدی در In-vitro: به دنبال کشت سلول‌های CD133+ در گروه‌های تعریف شده، تفاوت‌های قابل توجهی از تأثیر داروها روی تکثیر پیش‌سازهای رده اریتروئیدی و توان کلونزایی سلول‌ها مشاهده شد. همان‌طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است، غلظت ۱۰µM تالیدومايد سبب افزایش ۱/۴ برابری تعداد سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در پایان روز ۱۴ تمایز در مقایسه با گروه کنترل شد. این در حالیست که غلظت ۱۰µM سدیم بوتیرات افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد. هم‌چنین بررسی ترکیب دارویی (تالیدومايد ۱۰µM/سدیم بوتیرات ۱۰µM) نیز نشاندهنده افزایش ۱/۲ برابری در تعداد سلول‌ها می‌باشد.

جدول ۳: نتایج مربوط به شمارش سلولی پس از کشت در محیط القا کننده تمایز سلول‌های $CD133^+$ به سلول های رده اریتروئیدی در روز ۱۴ و در گروه های مورد مطالعه

آزمایش	کنترل (DMSO)	تالیدومايد	سدیم بوتیرات	تالیدومايد/سدیم بوتیرات
۱	۱۰/۹×۱۰^۴	۱۵/۷×۱۰^۴	۱۱/۶×۱۰^۴	۱۳/۹×۱۰^۴
۲	۱۱/۵×۱۰^۴	۱۵/۱×۱۰^۴	۱۲×۱۰^۴	۱۴/۱×۱۰^۴
۳	۱۱/۳×۱۰^۴	۱۵/۵×۱۰^۴	۱۲/۱×۱۰^۴	۱۳/۶×۱۰^۴
جمع کل	۳۳/۷×۱۰^۴	۴۶/۳×۱۰^۴	۳۵/۷×۱۰^۴	۴۱/۶×۱۰^۴
Mean±SD	۱۱/۲×۱۰^۴±۰/۳	۱۵/۴×۱۰^۴±۰/۲۸	۱۱/۹×۱۰^۴±۰/۲۶	۱۳/۹×۱۰^۴±۰/۲۵

تأثیر تالیدومايد، سدیم بوتیرات و ترکیب تالیدومايد/سدیم بوتیرات درالقای بیان ژن‌های بتاگلوبین و گاماگلوبین در پیش‌سازهای رده اریتروئیدی: به منظور بررسی اثرات تالیدومايد و سدیم بوتیرات در افزایش بیان ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین، سلول‌های CD133+ در محیط‌های حاوی ۱۰μM تالیدومايد (10T)، ۱۰μM سدیم بوتیرات (10S) و ترکیب ۱۰μM تالیدومايد و ۱۰μM سدیم بوتیرات (10T/10S) برای دوره ۱۴ روزه کشت داده شدند. سپس بیان ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین با بررسی mRNA این دو ژن و با استفاده از تکنیک quantitative Real-time RT-PCR تعیین شد. با توجه به تصویر ۳، تالیدومايد در غلظت ۱۰μM، سدیم بوتیرات در غلظت ۱۰μM و ترکیب تالیدومايد در غلظت ۱۰μM و سدیم بوتیرات در غلظت ۱۰μM به دنبال تیمار با سلول‌های اریتروبلاست در روز ۶ تمایز، در روز ۱۴ تمایز سبب افزایش بیان ژن بتا گلوبین به میزان به ترتیب ۱/۴، ۱/۳ و ۱/۶ برابری و افزایش بیان ژن گاما گلوبین به میزان به ترتیب ۲/۶، ۲/۱ و ۳/۵ برابری در مقایسه با گروه نرمال شدند. این نتایج نشاندهنده وجود اثر هم افزایی تالیدومايد و سدیم بوتیرات در بیان ژن بتا گلوبین و گاما گلوبین می‌باشند. هم‌چنین مقایسه اثر تالیدومايد و سدیم بوتیرات در القای بیان ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین نشاندهند توان بالاتر تالیدومايد در افزایش بیان ژن این دو ژن می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که توان تالیدومايد در القای بیان ژن بتا گلوبین و گاما گلوبین به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۰۷ برابر بیشتر از سدیم بوتیرات است.



تصویر ۳: نتایج بررسی کمی بیان ژن‌های گاما گلوبین (A) و بتا گلوبین (B) با استفاده از تکنیک Real-time PCR در گروه‌های مورد مطالعه (اعداد محور عمودی بیانگر افزایش نسبی بیان ژنی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشند). *$p<0/05$ در مقابل سلول‌های گروه کنترل (تیمار دارویی نشده)

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که استفاده هم زمان از دو داروی تالیدومايد و سدیم بوتیرات دارای اثرات هم افزایی مناسبی در افزایش بیان ژن‌های بتا گلوبین و گاما گلوبین در مقایسه با گروه های تک دارویی و گروه کنترل در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول های CD133+ خون بندناف می‌باشند. ایجاد شرایط استرس هماتوپوئتیک در القای مؤثر هموگلوبین جنینی حائز اهمیت می‌باشد.[۱۳] دیده شده است که تالیدومايد از طریق افزایش تکثیر سلولی در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD34+[۱۱] و سدیم بوتیرات از طریق افزایش استیلاسیون هیستون‌ها در کلونی‌های مشتق از سلول‌های BFU-E این شرایط را فراهم می‌کنند.[۱۲] به هر حال انتخاب ترکیبات دارویی که مکانیسم‌های مولکولی و اپی ژنتیکی مختلفی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، می‌توانند سبب القای مؤثر هموگلوبین جنینی گردند.[۱]

بررسی‌های کلینیکی مختلف حاکی از توان بالای داروی هیدروکسی اوره در درمان بیماران مبتلا به SCD می‌باشد. این دارو علاوه بر افزایش سطح هموگلوبین جنینی به‌ویژه در کودکان، سبب کاهش قابل توجه عوارض ناشی از این بیماری از جمله بحران‌های دردناک و هم‌چنین سبب کاهش نیاز به تزریق خون در حالت‌های ملایم تا شدید بیماری می‌شود. با این وجود حدود ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به SCD به این دارو پاسخ نمی‌دهند.[۱،۲۰-۲۶] بنابراین توجه به راه کارهای درمانی نوین و بررسی اثر داروهای مختلف و ترکیبات دارویی در in-vivo و in-vitro به منظور ارزیابی توان القای بیان هموگلوبین

جنینی و بهبود عوارض ناشی از بیماری در درمان بتا هموگلوبینوپاتی‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

داروی تالیدومایدبه عنوان یک داروی ایمونومدولاتور با توان القای بیان هموگلوبین جنینی در in-vitro و توان کنترل اریتروپوئز شناخته می‌شود. در حقیقت این دارو با تأثیر روی پیش‌سازهای اریتروئیدی سبب افزایش تکثیر و کاهش تمایز این سلول‌ها می‌گردند. بنابراین از آن‌جایی که داروهای ایمونومدولاتور سبب تحریک و افزایش تعداد پیش‌سازهای اریتروئیدی و کاهش تخریب این سلول‌ها می‌شوند، استفاده از آن‌ها در درمان بتا تالاسمی مورد توجه می‌باشد.[11] این در حالی است که مشتقات بوتیرات تا حدودی دارای اثرات توکسیک روی مغز استخوان بوده و سبب کاهش تکثیر پیش ساز های اریتروئیدی می گردند.[1] بررسی‌های ما نیز نشان داد تالیدومایدبه دارای توان بالایی در تکثیر پیش‌سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD133+ در in-vitro در مقایسه با سدیم بوتیرات و ترکیب دارویی می‌باشد.

هم‌چنین در تحقیقات مختلف توان القای هموگلوبین جنینی توسط داروهای مشتق از بوتیرات مورد بررسی قرار گرفته است. بوتیرات یک داروی مهارکننده آنزیم هیستون داستیلاز بوده که با مکانیسمی نامشخص سبب افزایش بیان هموگلوبین جنینی در آنمی داسی شکل و بتا تالاسمی می‌شود. هم‌چنین بوتیرات می‌تواند سبب افزایش بیان ژن بتا گلوبین و کاهش بیان ژن آلفا گلوبین گردد. دیده شده است که حد نهایی تولید هموگلوبین جنینی در درمان مداوم و متناوب به یک اندازه می‌باشد. بنابراین احتمالا تأثیر بوتیرات در افزایش بیان هموگلوبین جنینی جنبه ارثی دارد.[7] در یک بررسی نشان داده شده است که داروی تالیدومایدمیزان هموگلوبین جنینی را حدود ۲ برابر بیشتر در مقایسه با بوتیرات در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی مشتق از سلول‌های CD34+ افزایش می‌دهد.[10] نتایج ما نیز حاکی از توان بالاتر تالیدومایدبه در القای هموگلوبین جنینی در مقایسه با سدیم بوتیرات می‌باشد.

بنابراین با توجه به توان بالای داروهای ایمونومادولاتور در افزایش بیان ژن گاماگلوبین و افزایش تکثیر سلولی،[10,11] به نظر می‌رسد استفاده از یک داروی ایمونومادولاتور در همراهی با دیگر داروهای مؤثر در القای بیان هموگلوبین جنینی می‌تواند سبب کاهش همولیز و بهبود وضعیت آنمی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی گردد.[27]

از کاستی‌های تحقیق حاضر این است که در این تحقیق به بررسی تأثیر داروهای تالیدومایدو سدیم بوتیرات در تغییر بیان سایر ژن‌ها مانند ژن آلفا گلوبین و ژن فاکتورهای رونویسی مؤثر در تولید هموگلوبین مانند GATA-1 و EKLF پرداخته نشده است. هم‌چنین از تأثیر داروهای مذکور در تغییر بیان ژن‌های پروتوانکوژن و ژن‌های سرکوب کننده تومور (TSG) صرف نظر شده است. در این تحقیق هم‌چنین از پرداختن به مقایسه تأثیر تیمار تک دارویی و ترکیبی در کلونی‌زایی به صورت جداگانه صرف نظر شده است. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات دیگری به بررسی تغییر الگوی بیان ژن‌های کلاستر بتا گلوبین، ژن‌های فاکتورهای رونویسی و ژن‌های دخیل در ایجاد تومور پرداخته شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود از سایر ترکیبات دارویی مؤثر در القای بیان هموگلوبین جنینی مانند دسی‌تابین به صورت تک دارویی و در همراهی با داروهای ایمونومادولاتور به منظور بررسی توان تولید هموگلوبین جنینی در پیش‌سازهای اریتروئیدی مشتق از سلول‌های بنیادی مختلف و همین‌طور پیش سازهای اریتروئیدی جداسازی شده از خون بیماران مبتلا به آنمی داسی شکل و بتا تالاسمی استفاده شود.

سپاسگزاری

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی آقای علی هقانی فرد در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با کد 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. Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. Hematology 2006; 2006(1): 58-62.
2. Babashah S, Jamali S, Mahdian R, et al. Detection of unknown deletions in beta-globin gene cluster using relative quantitative PCR methods. Eur J Haematol 2009; 83(3): 261-9.
3. Coleman E, Inusa B. Sickle cell anemia: targeting the role of fetal hemoglobin in therapy. Clin Pediatr 2007; 46(5): 386-91.
4. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. IUBMB Life 2008; 60(2): 94-111.
5. Perrine SP, Castaneda SA, Chui DHK, et al. Fetal globin gene inducers: Novel agents and new potential. Ann N Y Acad Sci 2010; 1202(1): 158-64.
6. Cao H, Jung M, Stamatoyannopoulos G. Hydroxamide derivatives of short-chain fatty acid have erythropoietic activity and induce [gamma] gene expression in-vivo. Exp Hematol 2005; 33(12): 1443-9.
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. DeSimone J, Heller P, Hall L, Zwiers D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(14): 4428-31.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. Fathallah H, Taher A, Bazarbachi A and Atweh GF. Differences in response to fetal hemoglobin induction therapy in [beta]-thalassemia and sickle cell disease. Blood Cells Mol Dis 2009; 43(1): 58-62.
13. 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 and stem cell factor. Iran J Biotechnol 2008; 6(3): 157-63.
14. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. J Clin Invest 2003; 111(2): 231-40.
15. Pace BS, Zein S. Understanding mechanisms of globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. Dev Dyn 2006; 235(7): 1727-37.
16. Fathallah H, Sutton M, Atweh GF. Pharmacological induction of fetal hemoglobin: Why haven't we been more successful in thalassemia? Ann N Y Acad Sci 2005; 1054(1): 228-37.
17. Jaatinen T, Hemmoranta H, Hautaniemi S, et al. Global gene expression profile of human cord blood–derived CD133+ Cells. Stem cell 2006; 24(3): 631-41.
18. Perrine SP. Fetal globin stimulant therapies in the beta-hemoglobinopathies: Principles and current potential. Pediatr Ann 2008; 37(5): 339-46.
19. Serjeant GR. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. Curr Opin Hematol 1995; 2(2): 103-8.
20. Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. Blood 1997; 89(3): 1078-88.
21. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. Blood 2004; 103(6): 2039-45.
22. Charache S, Terrin ML, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. N Engl J Med 1995; 332(20): 1317-22.
23. Charache S, Dover GJ, Moore RD, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. Blood 1992; 79(10): 2555-65.
24. Hankins JS, Ware RE, Rogers ZR, et al. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia : The HUSOFT extension study. Blood 2005; 106(7): 2269-2275.
25. Steinberg MH, Barton F, Castro O, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. JAMA 2003; 289(13): 1645-51.
26. Wang WC, Wynn LW, Rogers ZR, et al. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. J Pediatr 2001; 139(6): 790-6.
27. Masera M, Tavecchia L, Capra M, et al. Optimal response to thalidomide in a patient with thalassaemia major resistant to conventional therapy. Blood Transfus. 2010; 8(1): 63-65.

Evaluation of synergistic effect of sodium butyrate and thalidomide on HbF induction in erythroid progenitors of cord blood CD133+ cells

Ali Dehghani-Fard,[1] Saeid Kaviani,[2] Mehrdad Noruzinia,[3] Masoud Soleimani,[2] Saeid Abroun,[2] Abbas Hajifathali,[4] Mohammad Ahmadvand,[5] Maryam Mahmoodinia-Meymand,[6] Zeinab Kaviani,[7] Majid Farshdoosti-Hagh[8]

***Background*:** Using γ-globin gene-inducer drugs consider as a novel approach in treatment of β-hemoglobinopathies. γ-globin gene inducers like sodium butyrate and thalidomide can reduce α-globin chain collections in erythroid progenitors.

***Materials and method*:** In this experimental study the MACS kit for the isolation of cord blood CD133+ cells was used. Also, hematopoietic colony assay were used for checking out the erythroid differentiation. By the way, the in vitro effects of single and combination of the thalidomide and sodium butyrate on γ-globin gene reactivation of erythroid progenitors derived from CD133+ stem cells were evaluated.

***Results*:** The purity of isolated CD133+ cells was estimated about 95% using flow cytometry. Real-time PCR analysis was used for this purpose. Real-time PCR analysis showed increased expression of the γ-globin transcript in cell culture groups containing either single of thalidomide and sodium butyrate and combination therapy as 2.6-, 2.1- and 3.5- fold, respectively and for β-globin as 1.4-, 1.3- and 1.6- fold, respectively as compared to control ($p < .05$).

***Conclusion*:** The results of this study suggest that combination of thalidomide and sodium butyrate can act as an effective fetal hemoglobin inducer in erythroid progenitor cells derived CD133+ cells.

***Keywords*:** CD133+ cells, γ-globin gene, sodium butyrate, thalidomide

1. **MSc of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.**
2. **Assistant Professor of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.**
3. **Assistant Professor of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.**
4. **Associate Professor of Hematology, School of Medical Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.**
5. **MSc of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.**
6. **MSc of Biology, Stem cell Research Center, Sarem Hospital, Tehran, Iran.**
7. **General Phisician, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.**
8. **Associate Professor of Hematology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.**