

An Assessment of the Increase in Fetal Hemoglobin Gene Expression in the K562 Cell Line Treated by Dendrosomal Nano-curcumin

Hadi Shirzad^{1*}, Maryam Poursangi², Hosein Maghsoudi³, Shirin Jalili¹

1- Assistant Professor, Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

2- M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, PNU Ray, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, PNU Ray, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 6516-19395, Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran
Email: hadi_shirzad@yahoo.com

Received: 16/Nov/2016, Accepted: 26/Jan/2017

Abstract

Objective: Fetal hemoglobin is the predominant hemoglobin expressed by gamma globin. However, in adults, fetal hemoglobin normally reduces to very low levels of the total hemoglobin. The increase in levels of fetal hemoglobin can ameliorate the severity of β -hemoglobin disorders such as sickle cell disease and beta-thalassemia. Currently, drugs that have been used for induction of Fetal hemoglobin (HbF) have short-term effects. Dendrosomal nano-curcumin (DNC), which has high solubility and absorption, is able to detect different targets in the cell and affect gene expression. LSD1 is one of the most important gamma globin inhibitors. In this study, we examine the capability of DNC to inhibit the expression of LSD1, GATA1, and FOG1 as well as the increase in gamma globin expression.

Methods: We used the K562 cell line for the MTT assay and treatment by DNC. Then the effect of DNC on the increase in expression level of γ -globin, decrease expression level of LSD1 and transcription factors, GATA1 and FOG1 was investigated by Real time PCR.

Results: Data acquired from gene expression assays indicated that DNC induced gamma globin expression and decreased expressions of LSD1, GATA1, and FOG1 in a time and dose-dependent manner.

Conclusion: Inhibition of LSD1, GATA1, and FOG1 expressions via DNC led to increased gamma globin expression. These results showed that DNC could be a promising treatment for beta-thalassemia and sickle cell disorders, and possibly reduce the severity of symptoms of these patients through the induction of fetal hemoglobin.

Keywords: Dendrosomal nano-curcumin, γ -globin, LSD1, K562 cell line

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.4, Pages: 55-69

ارزیابی افزایش بیان ژن هموگلوبین جنینی در رده سلولی K562 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی

هادی شیرزاد^{۱*}، مریم پورسنگی^۲، حسین مقصودی^۳، شیرین جلیلی^۱

۱-استادیار، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد ری، تهران، ایران

۳-استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد ری، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۱۶، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی

Email: hadi_shirzad@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۵/۰۸/۲۵

پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۰۶

چکیده

هدف: هموگلوبین جنینی، هموگلوبین غالب دوران جنینی است که توسط ژن گاما-گلوبین بیان می‌شود. هموگلوبین جنینی در افراد بالغ به میزان بسیاری کاهش می‌یابد. افزایش هموگلوبین جنینی می‌تواند شدت اختلالات بتاهموگلوبینوپاتی‌ها همچون سلول‌های داسی شکل و بتا-تالاسمی را کاهش دهد. در حال حاضر، به کارگیری داروهای القاکننده بیان ژن هموگلوبین جنینی، آثار درمانی محدودی دارند. نانوکورکومین دندروزومی که حلالیت و جذب بالایی دارد، می‌تواند اهداف مختلفی را در سلول شناسایی کند و بیان بسیاری از ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های بیان ژن گاما-گلوبین، LSD1 است. در مطالعه حاضر، توانایی نانوکورکومین دندروزومی در مهار بیان ژن‌های LSD1، GATA1 و FOG1 و اثر آن بر بیان هموگلوبین جنینی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: برای انجام آزمون MTT و نیز تیمار با نانوکورکومین دندروزومی از رده سلولی K562 (رده سلولی مناسب در مطالعات مربوط به القا بیان ژن هموگلوبین جنینی) استفاده شد. بررسی توانایی نانوکورکومین دندروزومی در افزایش بیان گاما-گلوبین و کاهش بیان LSD1 و عوامل رونویسی GATA1 و FOG1، به‌وسیله روش Real-Time PCR انجام شد.

نتایج: نتایج کسب‌شده از سنجش بیان ژن‌های یادشده نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی می‌تواند به‌طور معنی‌داری متناسب با زمان و غلظت تیماری، بیان ژن گاما-گلوبین را افزایش و بیان ژن‌های LSD1، GATA1 و FOG1 را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: با مهار بیان ژن‌های LSD1، GATA1 و FOG1 توسط نانوکورکومین دندروزومی، بیان ژن گاما-گلوبین افزایش می‌یابد. در نتیجه با انجام مطالعات تکمیلی، می‌توان این دارو را به‌عنوان یک کاندید درمانی امیدوارکننده و ایمن برای بیماری‌های بتا-تالاسمی و کم‌خونی سلول‌های داسی شکل و کاهش شدت بیماری از طریق القا بیان هموگلوبین جنینی در نظر گرفت.

کلیدواژگان: نانوکورکومین دندروزومی، گاما-گلوبین، LSD1، رده سلولی K562

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵، صفحات: ۵۵-۶۹

مولکول هموگلوبین از دو جفت زنجیره α و β و چهار مولکول هم (Heme) متصل به آهن تشکیل شده است که در انتقال اکسیژن نقش مهمی را ایفا می‌کند. در دوران جنینی، هموگلوبین جنینی (Fetal Hemoglobin: HbF)، هموگلوبین غالب است درحالی که پس از تولد، بیان آن کاهش یافته و هموگلوبین بالغ (Adult Hemoglobin)، جایگزین آن می‌شود. به طوری که میزان آن در افراد بالغ، کمتر از یک درصد کل هموگلوبین بدن است [۱]. بیماری‌های مرتبط با هموگلوبینوپاتی‌ها (Hemoglobinopathy) جز شایع‌ترین بیماری‌های ارثی اتوزوم مغلوب است که از مهم‌ترین آن‌ها، می‌توان به بیماری سلول‌های داسی شکل (Sickle Cell Dieses: SCD) و بتا-تالاسمی (Beta-thalassemia) اشاره داشت. این دو بیماری از امراض مزمنی هستند که میزان مرگ و میر افراد مبتلا به آن‌ها زیاد است. در کشورهای کم درآمد، اکثر افراد مبتلا در دوران کودکی جان خود را از دست می‌دهند. تخمین زده شده است که سالانه نزدیک به ۳۰۰ هزار نوزاد مبتلا به بیماری سلول‌های داسی شکل (بیشتر در آفریقا) متولد می‌شوند. همچنین بتا-تالاسمی در اکثر مناطق آسیا و خاورمیانه که اصولاً منابع درمانی محدودی دارند نیز به طور شایع دیده می‌شود [۲]. شدت بیماری افراد مبتلا به اختلالات هموگلوبینوپاتی، با میزان بیان هموگلوبین جنینی ارتباط مستقیم دارد. در افراد نادری که مبتلا به بتا-هموگلوبینوپاتی و پایداری ارثی هموگلوبین جنینی (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin: HPFH) هستند، عوارض بیماری کاهش می‌یابد. گاما-گلوبین دارای ساختار طبیعی، می‌تواند جایگزین مناسبی برای بتاگلوبین در بیماران مبتلا به بتا-هموگلوبینوپاتی باشد. به دلیل اینکه هموگلوبین جنینی نسبت به هموگلوبین بالغ، میل ترکیبی بیشتری با اکسیژن دارد، اما مشاهده شده است افراد با ژنوتیپ HPFH افرادی کاملاً سالم هستند [۳]. امروزه راهکارهای درمانی نوینی که مهارکننده‌های بیان گاما-گلوبین را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به افزایش بیان گاما-گلوبین و در

نتیجه افزایش سطح هموگلوبین جنینی می‌شود، بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴]. عوامل تنظیمی متعددی در خاموش‌سازی بیان گاما-گلوبین دخیل هستند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین (Lysine Specific Demethylase 1: LSD1) است که منجر به کاتالیز دمتیلاسیون اکسیداتیو، متیل لایزین ۴، هیستون ۳ (H3K4me1) و دی متیل لایزین ۴، هیستون ۳ (H3K4me2) می‌شود. متیله بودن لایزین و هیستون، باعث فعال شدن رونویسی ژن گاما-گلوبین شده و دمتیلاسیون آن به وسیله، هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین، باعث عدم بیان این ژن می‌شود [۵]. بیشترین تحقیقات صورت گرفته در خصوص عدم بیان ژن گاما-گلوبین، روی عوامل رونویسی ترانس-اکتینگ (Trans-acting) متمرکز بوده است که از این عوامل، می‌توان به عوامل رونویسی GATA1 و FOG1 اشاره داشت که با کمپلکس سازی نوکلئوزوم داستیلاز (Nucleosome Remodeling Deacetylase: NuRD) مرتبط هستند و نقش مؤثری در خاموش شدن بیان ژن گاما-گلوبین دارند [۶، ۷] از این رو، این فرضیه که مهارکننده‌های دارویی این مهارکننده‌های رونویسی، می‌توانند در فعال‌سازی مجدد ژن گاما-گلوبین و در نتیجه القا بیان هموگلوبین جنینی مؤثر باشند، می‌تواند صحیح باشد. در سال‌های اخیر، تعداد زیادی از القاکننده‌های دارویی برای افزایش بیان هموگلوبین جنینی آزمایش شده‌اند که می‌توان به هیدروکسی اوره (Hydroxyurea)، دسی-تاین (Decitabine)، آزاسیتیدین (Azacitidine)، بوتیرات (Butyrate) و... اشاره داشت [۸]. افزایش مقادیر کم هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به بیماری سلول‌های داسی شکل می‌تواند در کاهش عوارض این بیماری بسیار مؤثر باشد. همچنین در بتا-تالاسمی نیز افزایش هموگلوبین جنینی در خون این بیماران موجب بهبود عوارض این بیماری می‌شود. از این رو تهیه داروهایی که توان القاکنندگی بالایی برای هموگلوبین جنینی داشته باشند و از سویی آثار جانبی کمتری نسبت به سایر داروهای موجود داشته باشند بسیار اهمیت دارد [۹]. کورکومین (Curcumin)، کورکومینوید (Curcuminoid) اصلی گیاه زردچوبه است که دو تا پنج درصد از زردچوبه را تشکیل

می‌دهد و عامل رنگ زرد زردچوبه و آثار درمانی آن است [۹].
[۱۰]. کورکومین یک ترکیب پلی فنلی با فرمول شیمیایی $C_{21}H_{20}O_6$ است که دارای وزن مولکولی ۳۶۸/۳۸ گرم/مول با نقطه ذوب ۱۸۳ درجه سانتی‌گراد است و قابل انحلال در محلول‌های اتانول و متانول است [۱۱، ۱۲]. ساکین جنوب شرقی آسیا، از سالیان پیش، از زردچوبه نه تنها به عنوان ادویه بلکه به عنوان یک دارو برای ترمیم زخم‌ها، تسکین دردها و درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌کردند. از دیرباز، تأثیر این ترکیب گیاهی در بهبود آلرژی، زخم‌های پوستی، تسکین معده درد، درمان یرقان، اسهال خونی، بیماری‌های مزمن چون سرطان‌ها و مشکلات روانی مورد توجه طب سنتی بوده است. نکته جالب توجه در رابطه با استفاده از این ترکیب در مقادیر بالا این است که آثار جانبی قابل ملاحظه ندارد [۱۳]. در واقع نقطه عطف کورکومین، قابلیت تأثیرگذاری آن روی ژن‌های مختلف است که متعاقب آن، ترکیبات متفاوتی مانند سایتوکاین‌های التهابی، آنزیم‌ها، عوامل رشد، گیرنده‌ها، مولکول‌های چسبنده، پروتئین کینازها، عوامل رونویسی و ... را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۴] اما کاربرد دارویی این ترکیب به خاطر حلالیت کم و پایداری کمی که دارد، محدود است. برای رفع این محدودیت امروزه به کارگیری نانوذرات برای دارو رسانی هدفمند و پایداری داروها بسیار مؤثر بوده است [۱۵، ۱۶].

در این راستا، تولید نانوحامل‌های دندروزومی که در برگیرنده کورکومین هستند، این مشکل را تا حد زیادی حل کرده است [۱۷-۱۹]. از این رو در این تحقیق اثر نانوکورکومین دندروزومی در مهار بیان ژن هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین و سایر مهارکننده‌های بیان ژن گاما-گلوبین و در نهایت اثر آن در افزایش میزان بیان ژن هموگلوبین جنینی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت رده سلولی K562

با توجه به اینکه سلول‌های K562 مشابه سلول‌های

اریترویدی جنینی هستند و توانایی القا شدن با داروهای مختلف و تولید هموگلوبین جنینی را دارند، مدل مناسبی برای مطالعات القا گاماگلوبین در شرایط *in vitro* هستند [۲۰]. به همین دلیل این رده سلولی مدلی مناسب برای این تحقیق است. این رده سلولی از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد که حاوی نشان‌گرهای (Glycophorin A) GPA و CD36 است. برای کشت این رده سلولی، محیط RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Gibco، آلمان) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco، آلمان) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penicillin/Streptomycin) (BIO-IDEA، آلمان) استفاده شد. سلول‌ها درون انکوباتور و با شرایط ۵ درصد CO_2 ، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

آماده‌سازی نانوکورکومین دندروزومی

کورکومین به صورت تجاری از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. در این مطالعه از نانوحامل پلیمری (دندروزوم) برای رسانش کورکومین به سلول استفاده شد. به همین دلیل دندروزوم‌های OA-400 به عنوان نانو حامل برای افزایش حلالیت کورکومین انتخاب شد. حامل‌های دندروزومی OA-400 طی واکنش استریفیکاسیون (Esterification) اولئیل کلرید (۰/۳ گرم) و پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (Polyethylene Glycol: PEG) (۴ گرم)، در حضور تری اتیل آمین (۱/۲ گرم) و کلروفرم به عنوان حلال، ساخته شد. در نهایت، حاملین دندروزومی OA-400 پس از جداسازی نمک تری اتیل آمین هیدروکلرید از فاز آلی و تبخیر کلروفرم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلا به مدت ۴ ساعت به دست آمد [۲۱]. نسبت بهینه دندروزوم به کورکومین توسط اسپکتروفتومتری با نسبت وزنی ۱:۹ به دست آمد و در نهایت نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شد.

۱۰ میکرومولار و ۲۰ میکرومولار انتخاب شد. سلول‌ها در پلیت ۶ خانه‌ای با غلظت‌های تعیین‌شده نانوکورکومین تیمار شدند. بعد از زمان مورد نظر، با استفاده از واکنش گر RNX، RNA تام سلولی از گروه‌های کنترل و تیمار جدا گردید. نمونه کنترل در تمام موارد (تعداد سلول، زمان کشت، نوع محیط کشت، سرم و آنتی‌بیوتیک و همچنین محیط نگهداری) با نمونه تیمار مشابهت داشته است و تنها تفاوت آن با نمونه تیمار این است که داروی نانوکورکومین دندروزومی را دریافت نکرده و در واقع دوز تیمار آن، صفر است. در واقع نمونه کنترل حاوی سلول، محیط کشت، سرم (Fetal bovine serum: FBS) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین بود.

استخراج RNA تام سلولی

پس از تیمار سلول‌ها با دوز مناسب از داروی نانوکورکومین، لیز سلول‌ها طبق روش کیت واکنش گر RNX- Plus (سیناژن، ایران) انجام شد. بدین ترتیب که بعد لیز کامل سلول‌ها با بافر RNX و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور سانتریفوژ شدند. در این تحقیق از سانتریفوژ Dragon-lab (High Speed Micro Centrifuge D3024R) استفاده شد که دارای شعاع روتور (Rotor Radius) ۹ سانتی متر بود و برای این مدل، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در حدود ۱۴۴۸۹G است. سپس حدود ۸۰ درصد از فاز بالایی که حاوی RNA است به آرامی به میکروتیوپ جدید منتقل شد. پس از اضافه کردن ایزوپروپانول (Isopropanol) سرد و سانتریفوژ میکروتیوپ‌ها مایع روی تخلیه و سپس اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه و مجدداً سانتریفوژ شد. بعد از دور ریختن محلول روی و خشک شدن میکروتیوپ‌ها در دمای اتاق رسوب حاصل در آب تیمار شده با DEPC (Diethyl pyrocarbonate) و حل شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. حضور باندهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S، نشان‌دهنده سالم

آزمون MTT

حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. این سلول‌ها با غلظت‌های مشخصی (۰ تا ۷۰ میکرومولار) از نانوکورکومین دندروزومی تیمار شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر (۲۴ یا ۴۸ ساعت)، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (۵ میلی گرم در هر میلی لیتر بافر نمکی فسفات) به هر چاهک اضافه شد و پلیت برای مدت ۳-۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس به منظور رسوب سلول‌ها به کف پلیت، پلیت برای مدت ۵ دقیقه، با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با دور ۳۸۰ سانتریفوژ شد. پس از آن محلول رویی تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد و زیست مانایی (Biorevability) نسبی سلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا (ELIZA Plate Reader) اندازه‌گیری شد. نسب جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل، میزان بقا سلول‌ها در هر غلظت را نشان می‌دهد. غلظتی که در آن ۵۰ درصد از سلول‌ها توسط دارو کشته شدند، تحت عنوان غلظت کشنده (Lethal Dose) در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارایه شد.

تیمار سلول‌های K562 با نانوکورکومین

دندروزومی

از روی IC50 به دست آمده حاصل از آزمون MTT، در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، دوز مناسب برای تیمار سلول‌ها درون پلیت ۶ خانه‌ای محاسبه شد (طبق مطالعاتی که در گروه تحقیقاتی پروفیسور صادقی زاده صورت گرفته است، نشان داده شده است که کورکومین با یک الگوی وابسته به زمان و غلظت تأثیر خود را اعمال می‌کند و بهترین بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت است). برای تیمار سلول‌ها، در هر دو زمان، غلظت‌های

بودن نمونه RNA است.

میزان بیان ژن‌های مورد نظر، از واکنش Real-Time PCR با سیستم Eva green و دستگاه ABI-7500 استفاده شد. در جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش Real-Time PCR ژن‌های مذکور مشخص شده است. جدول ۲ شرایط دمایی و زمانی استفاده‌شده در واکنش Real-Time PCR را نشان می‌دهد. سنجش Real-Time PCR برای ژن‌های هدف و مرجع در مورد نمونه‌های مورد نظر، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. با اتمام تکثیر، چرخه آستانه تعیین شد.

بررسی کمی بیان ژن‌های گاما-گلوبین، LSD1، GATA1 و FOG1 به روش Real-Time PCR

با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت Fermentase (آلمان)، cDNA مورد نظر از RNAهای استخراج‌شده، ساخته شد. برای اطمینان از درستی واکنش رونویسی معکوس و اختصاصی بودن آغازگرها (Primers)، واکنش PCR روی محصولات مورد نظر انجام شد و سپس به‌منظور بررسی کمی

جدول ۱ آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

ژن	Tm (درجه سانتی‌گراد)	توالی	آغازگر	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
HBG1	۶۴	5'-ATGTGGATCCTGAGAACTTCAAGCT-3'	F	۱۳۶
		5'-GACAGGGCACTGGCCACTG-3'	R	
LSD1	۶۰	5'-TGGCCATTCTCAAAGGGATT-3'	F	۷۸
		5'-CAGCACGCCAACGAGACA-3'	R	
GATA1	۶۴	5'-TGGGATCACACTGAGCTTGCCA-3'	F	۲۸۶
		5'-GGCCTCAGCGTCCCTGTAGT AG-3'	R	
FOG1	۶۴	5'-GACTCCTGAGCGTGCTCCTCAC-3'	F	۳۰۳
		5'-TCTCTTTGGGCTTCTCGTCTGTGG-3'	R	
GAPDH	۶۴	5'-GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC-3'	F	۱۱۹
		5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-3'	R	

جدول ۲ شرایط دمایی و زمانی استفاده‌شده در واکنش Real-Time PCR

مرحله	چرخه	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
واسرشتگی اولیه	۱	۹۵	۱۵ دقیقه
واسرشتگی		۹۵	۱۵ ثانیه
اتصال	۴۰	۶۰ یا ۶۴ (اختصاصی برای هر ژن)	۳۰ ثانیه
گسترش		۷۲	۳۴ ثانیه
گسترش نهایی	۱	۷۲	۵ دقیقه

کنترل انجام شد. برای نرمال‌سازی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، از ژن کنترل داخلی GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) استفاده شد [۸، ۲۲، ۲۳]

این واکنش برای هر ژن به‌صورت چهار تکرار و همزمان انجام شده است. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 و با روش Unpaired T-test بین نمونه‌های تیمار و

نتایج

نتایج بررسی زیست‌مانایی سلول‌های K562 تحت

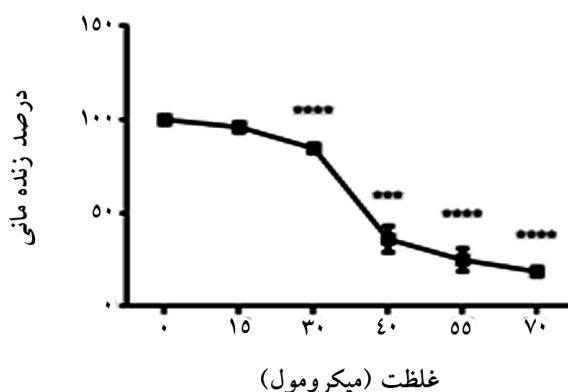
تیمار با نانوکورکومین دندروزومی با استفاده از

آزمون MTT

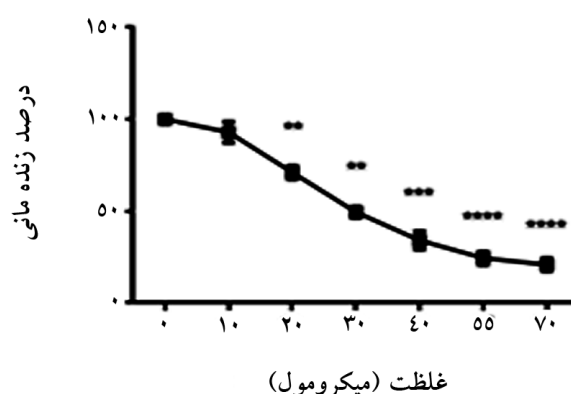
همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، نانوکورکومین دندروزومی، متناسب با زمان و غلظت داروی مورد استفاده،

تکثیر سلول‌های K562 را به‌طور معنی‌داری مهار می‌کند و در غلظت‌های کم دارو، اثر سمیتی بر سلول ندارد [کورکومین در غلظت‌های پایین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و در غلظت‌های بالاتر دارای خاصیت پرواکسیدانی و القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (Apoptosis) است]. نتایج کشت سلولی آزمون MTT نشان می‌دهد که مقدار IC_{50} برای نانوکورکومین در سلول‌های K562، حدود ۳۷ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت و ۳۰ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت است.

MTT ۲۴ ساعت



MTT ۴۸ ساعت



شکل ۱ نتایج MTT روی سلول‌های K562؛ اثر نانوکورکومین دندروزومی بر رده سلولی K562 در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد. (**): $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$

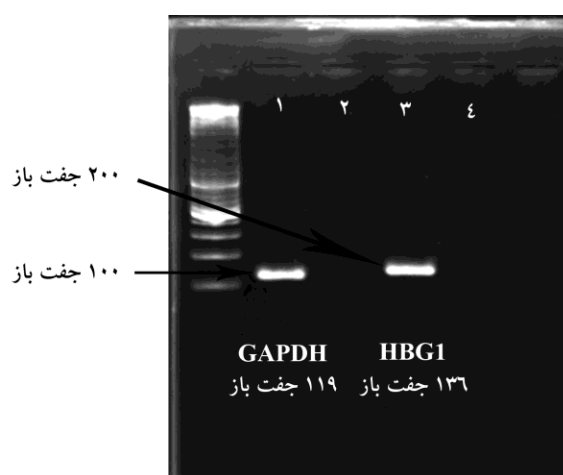
نتایج حاصل از واکنش RT-PCR برای ژن‌های

FOG1 و *GATA1*, *HBG1*, *LSD1*

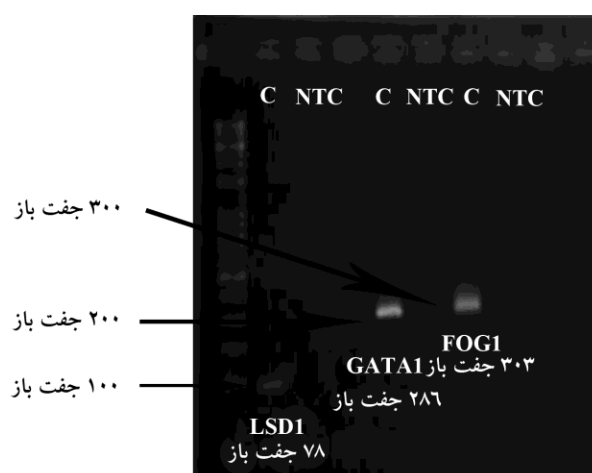
پس از ساخت cDNA مورد نظر از RNA‌های استخراج‌شده، برای اطمینان از درستی واکنش رونویسی معکوس و اختصاصی بودن آغازگرها برای ژن‌های مذکور، واکنش RT-PCR هر یک از ژن‌های مورد نظر انجام شد. نتایج این واکنش در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. ژن

GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی (Housekeeping gene) PCR انتخاب شد. اندازه قطعات تکثیرشده برای هر ژن، طبق جدول ۱ مطابق با اندازه مورد انتظار بود.

کنترل منفی ژن‌های مورد نظر نیز بررسی شده است به این ترتیب که تمامی مواد مورد نیاز واکنش برای کنترل منفی‌ها شبیه به هر کدام از ژن‌ها در واکنش است با این تفاوت که در این نمونه‌ها DNA مربوط اضافه نشده است.

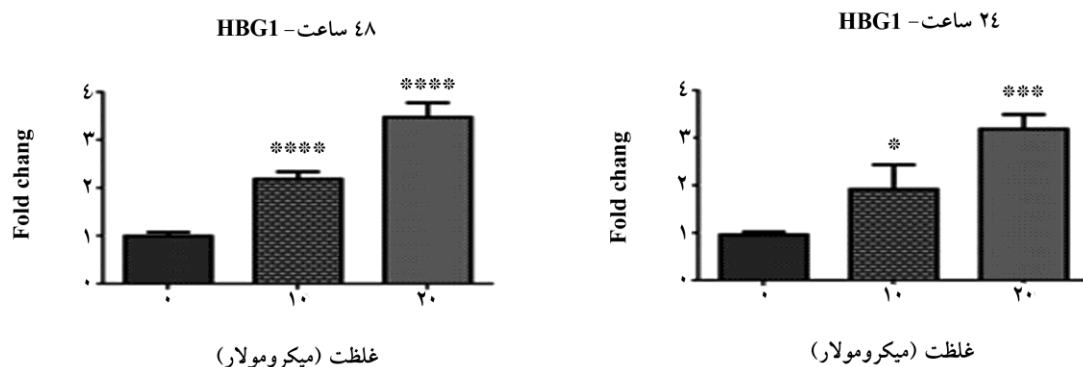


شکل ۲ بررسی بیان ژن گاماگلوبین (*HBG1*) به همراه ژن کنترل داخلی *GAPDH* در نمونه‌های کنترل رده سلولی K562 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه درون چاهک مربوط اضافه شد. (اعداد ۱ تا ۴ به ترتیب بیان گر نمونه کنترل ژن *GAPDH*، نمونه کنترل منفی ژن *GAPDH*، نمونه کنترل ژن *HBG1* و نمونه کنترل منفی ژن *HBG1* هستند)

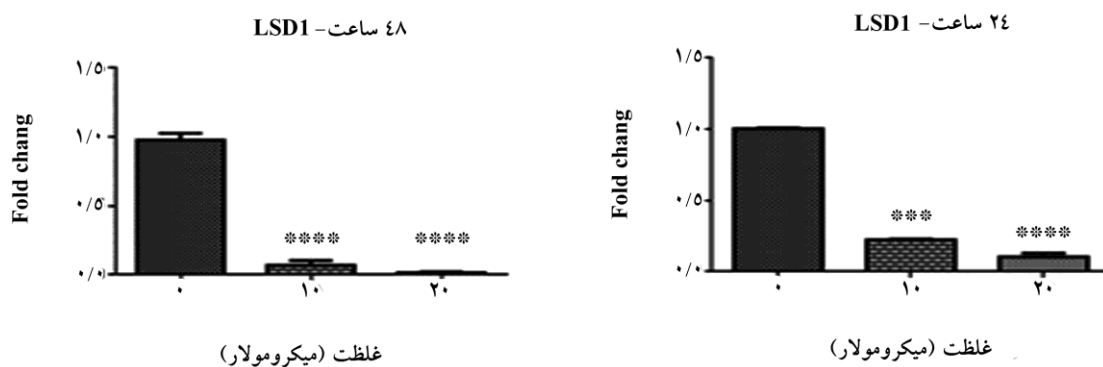


شکل ۳ بررسی بیان ژن‌های *FOG1* و *GATA1*, *LSD1* در نمونه‌های کنترل رده سلولی K562 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه درون چاهک مربوطه اضافه شد. (C نشان‌دهنده محصول PCR ژن مورد نظر روی نمونه کنترل و NTC نشان‌دهنده نمونه کنترل منفی است)

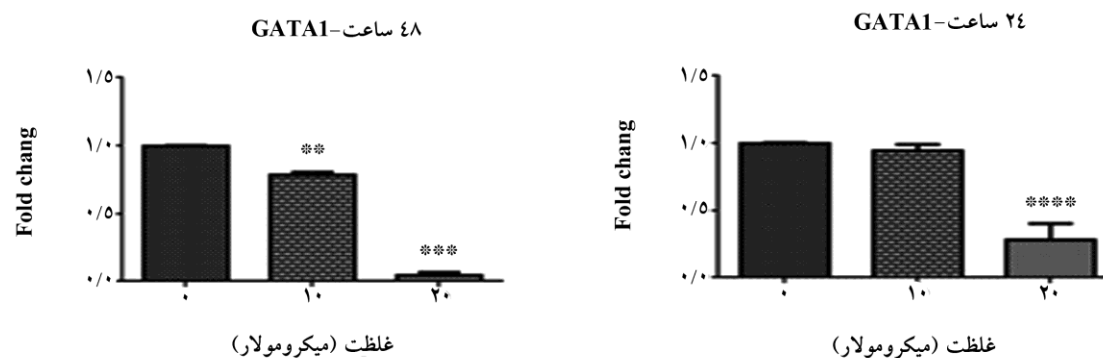
بررسی افزایش بیان ژن هموگلوبین جنینی



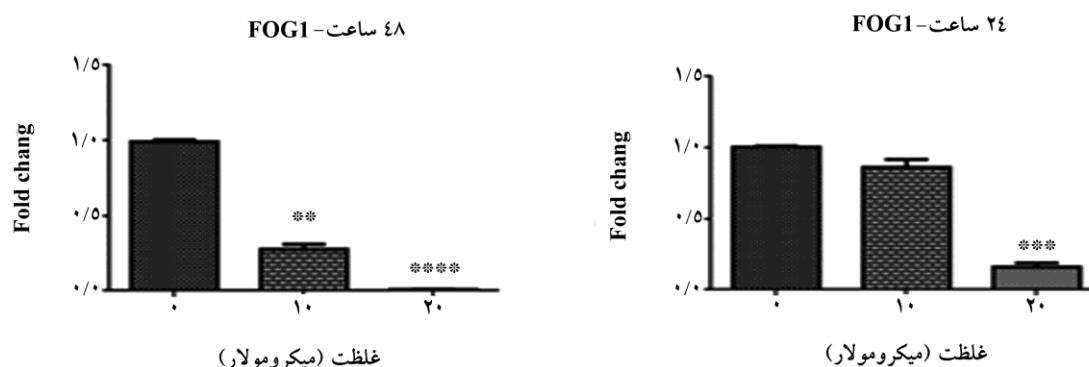
شکل ۴ نتایج تحلیل بیان ژن *HBG1* (گاما گلوبین) در نمونه‌های کنترل (غلظت ۰)، تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار و تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در رده سلولی K562، افزایش معنی‌داری را برای این ژن نشان می‌دهد. (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)



شکل ۵ نتایج تحلیل بیان ژن *LSD1* در نمونه‌های کنترل، تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار و تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در رده سلولی K562، کاهش معنی‌داری را برای این ژن نشان می‌دهد. (****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$)



شکل ۶ نتایج تحلیل بیان ژن *GATA1* در نمونه‌های کنترل، تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار و تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در رده سلولی K562، کاهش معنی‌داری را برای این ژن نشان می‌دهد. (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)



شکل ۷ نتایج تحلیل بیان ژن *FOG1* در نمونه‌های کنترل، تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار و تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار نانوکورکومین در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در رده سلولی K562. کاهش معنی‌داری را برای این ژن نشان می‌دهد ($P < 0.01$); (***) $P < 0.001$ و **** $P < 0.0001$.

جدول ۳ میزان تغییرات بیان ژن‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعت با رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ژن	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۱۰ میکرومولار)	تغییر بیان	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۲۰ میکرومولار)	تغییر بیان
<i>HBG1</i>	۱/۹۲	افزایش	۳/۱۹	افزایش
<i>LSD1</i>	۰/۲۲۵	کاهش	۰/۱۰۵	کاهش
<i>GATA1</i>	۰/۹۴۳	کاهش	۰/۲۸	کاهش
<i>FOG1</i>	۰/۸۶	کاهش	۰/۱۶	کاهش

جدول ۴ میزان تغییرات بیان ژن‌ها در بازه زمانی ۴۸ ساعت با رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ژن	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۱۰ میکرومولار)	تغییر بیان	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۲۰ میکرومولار)	تغییر بیان
<i>HBG1</i>	۲/۱۹۲	افزایش	۳/۴۸۲	افزایش
<i>LSD1</i>	۰/۰۶۷	کاهش	۰/۰۱۵	کاهش
<i>GATA1</i>	۰/۷۸۵	کاهش	۰/۰۴۵	کاهش
<i>FOG1</i>	۰/۲۷۵	کاهش	۰/۰۰۸	کاهش

بحث

بتاتالاسمی یک گروه از اختلالات اوتوزوم مغلوب است که به علت کاهش یا عدم تولید زنجیره‌های بتاگلوبین ایجاد می‌شود. هموزیگوت بودن برای بتاتالاسمی، معمولاً منجر به ایجاد تالاسمی ماژور (Major thalassemia) می‌شود. معمولاً در درمان این بیماری از انتقال خون منظم و درمان با هدف کاهش آهن بیش از حد انتقال یافته (از طریق داروهای شلاته‌کننده آهن به منظور دفع آهن اضافی) و همچنین پیوند

مغز استخوان یا پیوند خون بند ناف از یک خویشاوند دارای HLA (Human leukocyte antigen) همسان استفاده می‌شود. با این حال، با توجه به محدودیت‌ها و عوارض جانبی روش‌های درمانی فعلی، به گزینه‌های جایگزین برای درمان نیاز است. القای هموگلوبین جنینی به‌عنوان یک استراتژی امیدبخش برای درمان بتاتالاسمی در نظر گرفته شده است [۲۴]. ژن‌های γ و δ ، به‌صورت معمول، تنها در دوره تکامل جنینی در سطح بالا بیان می‌شوند. در پی تعویض گاماگلوبین به بتاگلوبین

کم خونی مگاکاریوبلاستیک حاد (Acute Megakaryoblastic Leukemia) کمک می کند [۲۸]. بنابراین ممکن است مهار ژن های GATA1 و FOG1، آثار جانبی مضر هم داشته باشد که نیاز به انجام بررسی های بیشتر و پژوهش های تکمیلی دارد. گزارش شده است که پلی فنول های طبیعی از جمله کورکومین، آثار سودمندی در بیماری های انسانی همچون سرطان و دیابت دارند. علاوه بر خصوصیات آنتی اکسیدانی آن ها، اهداف مولکولی این ترکیبات طبیعی، بسیار متنوع هستند. در یک مطالعه، هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین به عنوان یک هدف جدید برای این ترکیبات، شناسایی شد و سپس مشاهده شد که کورکومین، رسوراترول (Resveratrol) و کوئرستین (Quercetin) می تواند فعالیت آنزیمی هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین را مهار کنند. نکته جالب توجه این بود که تأثیر مهاری آن ها روی هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین، به احتمال زیاد مستقل از خصوصیات آنتی اکسیدانی آن ها بود چرا که سایر آنتی اکسیدان ها فاقد عملکرد مشابه بودند. در حال حاضر مشخص نیست که این پلی فنول ها چگونه و با چه مکانیسمی هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین را مهار می کنند. اما آنچه که مشخص است قابلیت آن ها به عنوان مهارکننده های جدیدی برای هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین است که تأثیر مهاری قوی تری نسبت به سایر مهارکننده های هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین از جمله ترانیل سپیرومین دارند [۱۹].

همچنین تاکنون در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است که کورکومین می تواند با تأثیر بر عوامل رونویسی همچون NF- κ B (Nuclear factor kappa b)، AP-1 (Activator protein 1) و STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) و مهار آن ها، بر بیان ژن ها تأثیر بگذارد [۱۴]. نشان داده شده است که کورکومین می تواند با تأثیر بر مسیرهای پیام رسانی سلولی، تأثیر خود را اعمال کند. عوامل رونویسی، پروتئین هایی است که به DNA متصل می شود و تأثیر خود را بر رونویسی از ژن مورد نظر اعمال می کند. کورکومین می تواند از اتصال یک عامل رونویسی به

نزدیک به زمان تولد، هموگلوبین جنینی تنها ۲-۱ درصد از هموگلوبین کل در افراد بالغ را تشکیل می دهد. یک استثنا در این مورد، افراد با پایداری ارثی هموگلوبین جنینی هستند. این افراد بیان افزایش یافته گاماگلوبین (۵-۸۰ برابر) را دارند و سطح هموگلوبین جنینی آن ها طی زندگی بزرگسالی، تا ۲۰ درصد می رسد. سطح هموگلوبین جنینی افزایش یافته می تواند برای بیماران مبتلا به بتاتالاسمی یا کم خونی سلول های داسی شکل، با بهبود شدت بیماری آن ها، مفید باشد [۲۵]. عوامل زیادی در مهار بیان گاماگلوبین در زمان پس از تولد دخیل است که از آن جمله می توان به هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین، GATA1 و FOG1 اشاره داشت. هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین یکی از مهارکننده های مهم بیان گاماگلوبین است که مهار آن موجب القا بیان گاماگلوبین می شود. هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین می تواند با حذف گروه متیل به صورت مونو یا دی متیل از H3K4، باعث خاموش سازی بیان گاماگلوبین شود [۲۶].

تاکنون نشان داده شده است که مهار هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین توسط RNAi (RNA interference) یا از طریق مهارکننده های مونوآمین اکسیداز، همچون ترانیل سپیرومین (Tranlylcypromine) در سلول های ارثرویدی انسانی یا در موش های تراریخته، موجب افزایش بیان گاماگلوبین شده است. به همین دلیل، هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین یک هدف درمانی امیدوارکننده برای القا بیان ژن گاماگلوبین است [۲۶].

با وجود تأثیری که مهار GATA1 در افزایش بیان ژن گاماگلوبین دارد، در مطالعات متعدد نشان داده شده است که برخی بیماران مبتلا به کم خونی وابسته به X مادرزادی (X-linked congenital anemia) و ترومبوسایتوپنی (Thrombocytopenia)، جهشی در ژن GATA1 دارند؛ به ویژه که یکی از جهش های نقطه ای در انتهای N از انگشت روی GATA1، باعث ایجاد اختلال در میان کنش بین GATA1 و FOG1 می شود [۲۷]. همچنین مشاهده شده است که جهش در ژن GATA1 می تواند باعث ایجاد یک پروتئین ناقص شود که به پیدایش

توالی DNA جلوگیری کند که این اتفاق احتمالاً به دلیل میانکنش مستقیم کورکومین با موتیف متصل شونده به DNA عامل رونویسی صورت می‌گیرد. همچنین کورکومین می‌تواند با القا ممانعت از فسفریلاسیون برخی از عوامل رونویسی، بر یک مسیر پیام رسانی تأثیر بگذارد.

با بررسی‌های آنزیمی در شرایط *in vitro* مشخص شده است که کورکومین می‌تواند مهارکننده‌ای قوی برای هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین باشد و این اثر مهار، حتی قوی‌تر از اثر مهار ترانریل سیپرومین بر هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین است [۱۹].

در این تحقیق برای بررسی بیان ژن‌های *LSD1* و *HBG1* *FOG1* و *GATA1* سلول‌های لوکمی انسانی K562 انتخاب شدند. سلول‌های K562 اگرچه از یک فرد بالغ به دست می‌آیند اما هموگلوبین‌های رویانی و جنینی را بیان می‌کنند و فاقد هموگلوبین بالغ هستند. با توجه به اینکه سلول‌های K562 مشابه سلول‌های اریترویدی جنینی بوده و توانایی القا شدن با داروهای مختلف و تولید هموگلوبین جنینی را دارند، مدل مناسبی برای مطالعات القا ژن گاماگلوبین در شرایط *in vitro* هستند [۲۰] همچنین از نانوکورکومین به جای کورکومین به علت افزایش حلالیت و جذب سلولی کورکومین استفاده شد [۱۷، ۱۸].

پس از انجام مراحل مختلف این تحقیق و بررسی کمی بیان ژن‌ها، مشاهده شد که داروی نانوکورکومین دندروزومی می‌تواند بیان ژن گاماگلوبین را در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت و در هر دو غلظت ۱۰ میکرومولار و ۲۰ میکرومولار از دارو، افزایش دهد که این افزایش بیان در غلظت ۲۰ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت حدود ۴ برابر نسبت به گروه کنترل (عدم دریافت دارو) است. پیش‌بینی می‌شود این افزایش بیان به علت تأثیر مهار نانوکورکومین دندروزومی بر مهارکننده‌های بیان گاما-گلوبین یعنی *LSD1*.

GATA1 و *FOG1* باشد. همچنین بیان ژن هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین در هر دو بازه زمانی و در هر دو غلظت از داروی نانوکورکومین دندروزومی کاهش یافت. علاوه بر افزایش بیان ژن گاماگلوبین و کاهش بیان ژن هیستون دمتیلاز وابسته به لایزین از طریق تیمار سلول‌های K562 با نانوکورکومین دندروزومی، فرضیه دیگر این تحقیق (تأثیر احتمالی نانوکورکومین دندروزومی در کاهش بیان عوامل رونویسی *GATA1* و *FOG1*) را بارزتر می‌کند. زیرا پس از تیمار سلول‌های K562 با نانوکورکومین، مشاهده شد که نانوکورکومین دندروزومی می‌تواند بیان این دو ژن را در تیمارهای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت کاهش دهد.

با توجه به اینکه کورکومین یک ترکیب گیاهی استخراج شده از ریشه گیاه زردچوبه است و مورد استفاده بسیاری از مردم در سراسر جهان است، نسبت به بسیاری از ترکیبات شیمیایی که برای درمان بتاتالاسمی و کم خونی سلول‌های داسی شکل استفاده می‌شود، می‌تواند ایمن‌تر باشد. جایگزینی زنجیره گاماگلوبین به جای زنجیره بتاگلوبینی که در این بیماران دچار نقص است، می‌تواند در انتقال اکسیژن و بهبود علایم بیماری نقش به‌سزایی داشته باشد. تحقیقات تکمیلی در آینده، می‌تواند نانوکورکومین را به‌عنوان یک عامل درمانی امیدوارکننده کم خطر و کم هزینه برای درمان بیماران مبتلا به بتا-تالاسمی و سلول‌های داسی شکل از طریق القا بیان هموگلوبین جنینی معرفی کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و حمایت جناب پروفیسور مجید صادقی‌زاده در دپارتمان ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس قدردانی و تشکر می‌گردد و تحقیق حاضر به کلیه تلاشگران در مسیر درمان بیماران مبتلا به بتا-تالاسمی تقدیم می‌شود.

- [1] Asgharian AM, Banan M, Najmabadi H. Evaluation of knocking down of the RNAi mediated gamma globin repressor into K562 cells, for gene therapy of beta-thalassemia. *Pejouhandeh* 2011; 16(5): 234-40.
- [2] Bauer DE, Kamran SC, Orkin SH. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood* 2012; 120(15): 2945-53.
- [3] Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23(1): 1-8.
- [4] Dehghanifard A, Kaviani S, Noruzinia M, Soleimani M, Abroun S, Hajifathali A, Pourfathollah A, Mortazavi Y, Ahmadvand M, Mahmoodinia-Meymand M, Kaviani Z, Farshdousti-Hagh M, Saki N. Synergistic effect of sodium butyrate and thalidomide in the induction of fetal hemoglobin expression in erythroid progenitors derived from cord blood CD133 + cells. *Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)* 2012; 14(7): 29-33.
- [5] Kumarasinghe IR, Woster PM. Synthesis and evaluation of novel cyclic peptide inhibitors of Lysine Specific Demethylase 1. *ACS Med Chem Lett* 2014; 5: 29-33.
- [6] Ginder GD. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res* 2015; 165(1): 115-25.
- [7] Amigo JD, Ackermann GE, Cope JJ, Yu M, Cooney JD, Ma D, Langer NB, Shafizadeh E, Shaw GC, Horsely W, Trede NS, Davidson AJ, Barut BA, Zhou Y, Wojiski SA, Traver D, Moran TB, Kourkoulis G, Hsu K, Kanki JP, Shah DI, Lin HF, Handin RI, Cantor AB, Paw BH. The role and regulation of friend of GATA-1 (FOG-1) during blood development in the zebrafish. *Blood* 2009; 114(21): 4654-63.
- [8] Finotti A, Gasparello J, Breveglieri G, Cosenza LC, Montagner G, Bresciani A, Altamura S, Bianchi N, Martini E, Gallerani E, Borgatti M, Gambari R. Development and characterization of K562 cell clones expressing BCL11A-XL: Decreased hemoglobin production with fetal hemoglobin inducers and its rescue with mithramycin. *Exp Hematol* 2015; 43(12): 1062-71.
- [9] Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1590-611.
- [10] Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2011; 10: 12.
- [11] Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer* 2007; 31(4): 243-305.
- [12] Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991; 57(1): 1-7.

- [13] Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 2008; 269(2): 199-225.
- [14] Fu S, Kurzrock R. Development of curcumin as an epigenetic agent. *Cancer* 2010; 116(20): 4670-6.
- [15] Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2007; 5: 3.
- [16] Sarbolouki MN, Parsaee S, Kosary P. Mixed micelle proliposomes for preparation of liposomes containing amphotericin B, in-vitro and ex-vivo studies. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54(3): 240-6.
- [17] Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2012; 12(1): 226-34.
- [18] Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, Najafi F, Babaei E. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 403-17.
- [19] Abdulla A, Zhao X, Yang F. Natural Polyphenols Inhibit Lysine-Specific Demethylase-1 in vitro. *J Biochem Pharmacol Res* 2013; 1(1): 56-63.
- [20] Deilami Khiabani Z, Banan M, Asgharian AM, Gharesouran J, Javadi G, Kahrizi K, Najmabadi H. Determination of γ -globin induction levels by different concentrations of hydroxyurea in K562 cell lines for β thalassemia treatment. *Medical Sciences* 2009; 19(3): 147-53.
- [21] Tahmasebi Mirgani M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Mowla SJ. Dendrosomal curcumin induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells. *Modares Journal of Medical Sciences (Pathobiology)* 2013; 16(1): 23-39.
- [22] Finotti A, Bianchi N, Fabbri E, Borgatti M, Breveglieri G, Gasparello J, Gambari R. Erythroid induction of K562 cells treated with mithramycin is associated with inhibition of raptor gene transcription and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) functions. *Pharmacol Res* 2015; 91: 57-68.
- [23] Alizadeh SH, Kaviani S, Soleimani M, Pourfathollah AA, Amirzadeh N, Kouhkan F, Abroun S, Noruzinia M. Effect On alpha hemoglobin chain expression in K562 cell line. *Payavard* 2011; 4(3 & 4): 9-17.
- [24] Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in β -thalassemias. *Pediatr Rep* 2011; 3(2): e17.
- [25] Langdon SD, Kaufman RE. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. *Blood* 1998; 91(1): 309-18.
- [26] Shi L, Cui S, Engel JD, Tanabe O. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for

- fetal hemoglobin induction. *Nat Med* 2013; 19(3): 291-4.
- [27] Zheng R, Blobel GA. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* 2010; 1(12): 1178-88.
- [28] Shimizu R, Engel JD, Yamamoto M. GATA1-related leukaemias. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(4): 279-87.