مطالعه اپی ژنتیک سرطان ریه

شهلا محمدگنجی[1*]، ماسیمو نگرینی[2]، محمدتقی خطیبی[3]، محمود تولایی[3]، زهرا محمدی آبگرمی[4]، مهسا عالمی[1]، شهرام شفیع پور [1]

۱. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، تهران، ایران

۲. گروه پاتولوژی و انکولوژی، دانشگاه فرارا، فرارا، ایتالیا

۳. مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه بقیه الله عج، تهران، ایران

٤. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۵)

چکیده

مرگ و میر ناشی از سرطان ریه می تواند به طور قابل توجهی با تشخیص زودهنگام بیماری کاهش یابد. با این حال، فقط حدود ۱۵٪ از تومورهای ریه که اکثرا در مرحله پیشرفته قرار دارند، در هنگام تشخیص تعیین مکان می شوند. بقای پنج ساله برای بیماران مبتلا به مراحل ابتدایی سرطان ریه به طور چشمگیری بیش از ۷۰٪ مشاهده شده است اما برای بیماران در مراحل پیشرفته کمتر از ۱۰٪ است. روش تومورگرافی محاسبه شده مارپیچی (CT) برای تشخیص زود هنگام سرطان ریه استفاده می شود که دارای مثبت کاذب بالایی است و برای افزایش اختصاصیت نیاز به توسعه نشانگرهای دیگری است. بررسی هایپرمتیلاسیون پروموتر در سرطان زایی ریه می تواند ، یک رویداد اولیه باشد و نیز در تشخیص زود هنگام بیماری مفید باشد. به عنوان مثال، بررسی متیلاسیون نابجای DNA در در نمونه‌های خلط، bronchoalveolar aspirate/lavage و بزاق بیماران مبتلا به سرطان ریه، می تواند به شناسایی بیماری و یا توسعه بیماری کمک کند. علاوه بر آن، متیلاسیون هیستونی نابجا نیز یکی در مبتلایان به NSCLC مشاهده شده است. در این مقاله مروری، معرفی و بحث در مورد عوامل اپی ژنتیک و نقش آن‌ها در پیشرفت و توسعه سرطان ریه است. که می تواند راهگشایی برای تشخیص‌های آینده باشد.

کلیدواژگان

اپی ژنتیک، سرطان ریه، NSCLC.

* نویسنده مسئول، رایانامه: shahlamg@yahoo.com

مقدمه

سرطان سلول‌های غیر سلولی کوچک: از اصول اولیه به درمان

سرطان ریه در واقع سرطان انسان مدرن است زیرا تا قبل از قرن بیست و یکم، تنها چند مورد ابتلا از آن مشاهده شد درحالی که در اواسط قرن بیستم، احتمالاً با توجه به افزایش مصرف دخانیات در جهان، دنیا را تحت تأثیر قرار داد. طوریکه حتی پس از آگاهی رسانی گسترده در مورد مصرف سیگار در طول ۴-۵ دهه گذشته، شیوع سرطان ریه حتی در کشورهای توسعه یافته به سطح پلاتو رسید و تقریبا ۲۵٪ مرگ و میرهای مربوط به سرطان را شامل می شود. تشخیص سرطان ریه در مراحل اولیه منجر به پیش آگهی بهتر خواهد شد. بقای ۵ ساله برای سرطان موضعی ریه و برونش حدود ۵۴/۸٪ است، در مقایسه با بقای ۲۷,۴٪ برای منطقه، و ۴,۲٪ برای بیماری در حالت گسترده در دنیا.

سرطان ریه به دو دسته سرطان سلول‌های کوچک ریه و سرطان سلول‌های غیرکوچک سلولی ریه (NSCLC) تقسیم می شود. تقریبا 80٪ انواع سرطان‌های ریه را NSCLCها تشکیل می دهد که خود از نظر تومور هیستولوژی به زیر گروههای آدنوکارسینوما(ADC)، آدنواسکواموس کارسینوما، کارسینوم سلول سنگفرشی (SQCC) و کارسینوم سلول‌های بزرگ دسته بندی می شود. بیش از ۸۰٪ NSCLC را ADC یا SQCC تشکیل می دهد. بر اساس الگوهای پاتوژنز مولکولی و طبقه بندی بافت شناسی، گروه ADC شایع ترین نوع برای عود مجدد از دست دادن و گرفتن ژنتیکی و جهش‌های سوماتیکی می باشد. این جهش‌ها بطور گسترده در ADCها مورد مطالعه قرار گرفته است و شایع ترین آن‌ها عبارتست از: جهش گیرنده فاکتور رشد اپیدرم(EGFR)، KRAS و انکوژنهای آناپلاستیک لیمفوما کیناز (ALK). در طی دهه گذشته تغییرات اپی ژنتیک به طور فزاینده ای مطالعه شده است و به عنوان نشانگرهای تشخیص سرطان اولیه مورد استفاده قرار گرفته است. مفهوم اپی ژنتیک اولین بار حدود ۲۰۰ سال پیش توسط Jean-Baptiste Lamarck در کتاب فلسفه زولوژیک معرفی شد و او آن را «ارثی نرم» نامید .سپس Waddington در سال ۱۹۳۹، اپی ژنتیک را اینگونه تعریف کرد که: اثرات متقابل بین ژن‌ها و محصولات آنها، طوریکه فنوتیپ را به وجود می آورد.

در ادامه Holiday اپی ژنتیک را به این صورت تعریف می کند که: تغییرات ارثی در بیان ژن طوری که دلیل این تغییرات، جابجایی توالی DNA نمی باشد. او گفت اپی ژنتیک شامل اصلاحات ارثی کروماتین است که بر بیان ژن و سایر فرآیندهای وابسته به DNA تأثیر می گذارد بدون اینکه اثری بر تغییر مستقیم توالی‌های کدینگ DNA بگذارد. این فرایندهای پیچیده شامل متیلاسیونDNA ، تنظیم میکرو RNA و تغییرات هیستون / نوکلئوزوم است. جهش در مکانیزم‌های تنظیم کننده اپی ژنتیکی و الگوی اختلالات اپی ژنتیکی در بسیاری از تومورها از جمله سرطان ریه نقش دارند. این نقش از طریق خاموش کردن ژن سرکوب کننده تومور و فعال سازی انکوژن رخ می دهد. تغییرات اپی ژنتیکی در مراحل بعدی به مقاومت شیمی درمانی ارتباط پیدا خواهد کرد. برخلاف جهش‌های ژنتیکی، اختلالات اپی ژنتیکی برگشت پذیر می باشد و می تواند از طریق روش‌های مختلف فارماکولوژیک معکوس گردد. شایع ترین آن عوامل هایپومتیلاسیون و مهار کننده‌های هیستون داستیلاز (HDACIs) می باشد. نکته جالب توجه این است که در حالی که هتروژنیتی تومور یک چالش عمده در درمان‌های هدفمند مولکولی می باشد، مداخله مجدد و وسیع اپی ژنوم ممکن است از طریق تأثیر چندین مسیر سیگنالینگ به این مشکل برسد.

مشخصات شش دارو تایید شده توسط FDA که اپی ژنوم را هدف قرار می دهند، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- لیست درمان‌های اپی ژنتیکی تایید شده توسط FDA . هیستون داستیلاز (HDAC)، DNA متیل ترنسفراز (DNMT)

Agent	Class	Approval date	Indication
Azacitidine	DNMT inhibitor	2004	Myelodysplastic syndrome
Decitabine	DNMT inhibitor	2006	Myelodysplastic syndrome
Vorinostat	Pan-HDAC inhibitor	2006	Cutaneous T-cell lymphoma
Romidepsin	Class I HDAC inhibitor	2009	Cutaneous T-cell lymphoma
Panobinostat	Pan-HDAC inhibitor	2015	Multiple myeloma
Belinostat	Pan-HDAC inhibitor	2014	Peripheral T-cell lympho

اختلالات اپی ژنتیکی در NSCLC

شروع سرطان ریه و پیشرفت این بیماری در نتیجه تغییرات ژنتیکی دائمی مانند موتاسیون‌های نقطه ای، حذفها، جابجایی‌ها، تقویت و تغییرات اپی ژنتیک است که بر جنبه‌های مختلف فرآیندهای وابسته به کروماتین ازجمله تغییرات هیستون، الگوهای متیلاسیونDNA ، و تنظیم میکرو RNA اثر میگذارد. در این میان متیلاسیون DNA نقش مهمی در سرکوب بیان ژن و حفظ ثبات ژنوم با جلوگیری از اتفاقات نوترکیب در توالی‌های تکراری ایفا میکند. محل رخداد پدیده متیلاسیونDNA در یوکاریوت‌ها، در جزایر CpG می باشد که تقریبا ۱٪ از ژنوم انسان را تشکیل می‌دهد اما در بیش از نیمی از تمام توالی پروموتر ژن انسان پخش شده اند. در سلول‌های سرطانی، کاهش قابل ملاحظه ای در متیلاسیون سیتوزین در توالی‌های تکراری مشاهده می شود که باعث افزایش نوترکیب میتوزی و در ادامه بی ثباتی کروموزومی می شود. علاوه بر آن، جزایر CpG پروموترهای ژن‌های سرکوب کننده تومورباشدت متیله می شود که خود منجر به سرکوب رونویسی میگردد در حالی که تنظیمات سایر ژن‌های دیگر درگیر در فرآیندها مانند تعمیر DNA، آپوپتوز، انتقال اپیتلیال مزانشیم(EMT)، حرکت سلولی و حمله و متاستاز با متیلاسیون سیتوزین ناسازگار می‌شود. علاوه بر این، هیپومتیلاسیون عناصر DNA قابل انتقال می تواند باعث افزایش جابجایی درون ژنوم، فعال شدن آنکوژن‌ها و افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی از طریق موتاژنز Insertional شود. Selamat و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که وضعیت متیلاسیون DNA در ۲۷۵۷۸ جزیره CpG اینگونه است که ۱۴۴۷۵ ژن را پوشش می دهد و بیش از ۷۰۰ ژن متیله مختلف را شناسایی کردند. همچنین تجمع مارکرهای سرکوبگر هیستون یکی دیگر از نشانه‌های کارسینوژنز است که منجر به تراکم کروماتین و سرکوب بیان ژن می شود. هیستون داستیلازها HDAC) اغلب در سرطان‌ها بیش از حد بیان می شوند و در سال‌های اخیر تبدیل به یک هدف اصلی درمانی شده اند. بیان بیش از حد HDAC می تواند باعث خاموش شدن ژنهای سرکوبگر تومور و رونویسی نابجا شود. به علت تغییر بیان و یا جهش در ژن‌های رمزگذاری هیستون استیل ترانسفراز (HAT) یا آنزیم‌های HDAC و یا اجزای قابل اتصال آنها که به طور واضح به سرطان زایی مرتبط است. این پدیده در بسیاری از سرطان‌های انسانی اتفاق می افتد، که نشان می دهد فعالیت استیلاسیون اپی ژنتیکی با پیشرفت سرطان همراه است. (Ansari ، ۲۰۱۶)

متیلاسیون DNA

بیشترین مطالعات بر روی متیلاسیون DNA سرطان، بعنوان یک مکانیسم تنظیمی اپی ژنتیک انجام شده است. متیلاسیون جزیره CpG توسط آنزیم‌های DNA متیل تترانسفرازهای مختلف (DNMTs) انجام می شود و منجر به خاموش شدن ژن‌ها می گردد. سه تا از مهمترین این آنزیم‌ها بنام‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b انتقال یک گروه

متیل از S-adenosyl-L-metionineبه کربن '5 سیتوزین در جزایرCpG میانجی گری می کنند. DNMT1 به DNA همی متیله متصل شده و درگیر نگهداری متیلاسیون پس از همانند سازی DNA می شود. DNMT3aو b به ترتیب به DNA غیرمتیلیه یا همی متیله متصل می شوند و مسئول متیلاسیون DNA جدید هستند. در این زمینه مطالعات مشابهی بر روی جمعیت ایرانی مبتلا به سرطان‌های مری، سرطان کولورکتال، سرطان پستان، و سرطان ریه نیز انجام شده است و نتایج ازشمندی نیز حاصل گردیده است.

(Ardakani ،۲۰۱۷ samei ،۲۰۱۳ mahboodi،۲۰۱۴ Mohammad Ganji ، ۲۰۱۰، ۲۰۱۵)

متیلاسیون DNA در سرطان ریه

مطالعات حاکی از این است که بسیاری از ژنها در سرطان ریه هایپرمتیله شده اند مانند p16, PAK3, NISCH, KIF1A,DOK1, OX15, TCF21, DAPK, CDKN2A,RAR, RASSF1. (جدول۲)

جدول ۲- مکانیسم عملکرد برخی از ژنهای منتخب در سرطان ریه که بصورت هایپرمتیله درآمده اند(Ansari1, ۲۰۱۶)

Mechanism	Gene	Encoded protein	Gene function
DNA repair	*MGMT*	O-6-methylagunaine DNA methyltransferase	Removes alkyl from the O6 position of guanine
	hMLH1	DNA mismatch repair protein MLH1	Involved in DNA repair
	MSH2	DNA mismatch repair protein MSH2	Involved in DNA repair
Apoptosis	*DAPK*	Death associated protein kinase	Pro-apoptotic
	CASP8	Caspase-8	Effector of extrinsic apoptosis. Occurs selectively in small cell lung cancer
	TNFRSF6	FAS receptor	Part of TNF-receptor superfamily, mediates extrinsic apoptosis. Silenced in 40% of SCLC
	DR4, DR5	Death receptor 4 and 5	Part of TNF-receptor superfamily, mediates extrinsic apoptosis. Silenced in 40% of SCLC
Cell cycle	*P16*	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A	CDK4/6 inhibitor involved in cell cycle arrest at G1/S checkpoint
	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Negative regulator of AKT/MTOR pathway, and cell cycle
	RASSF1A	Ras association domain family 1	Involved in cell cycle regulation, and ras-induced apoptosis
Cell adhesion and invasion	*CDH1*	E-cadherin	Promotes cell-cell adhesion, inhibits cell motility, invasion and metastasis
	CDH13	H-cadherin	Involved in regulation of cell proliferation
	TSLC1	Tumor suppressor in lung cancer 1	Involved in cell-cell adhesion
Transcription regulation	*APC*	Adenomatosis polyposis coli	Negative regulator of WNT pathway, and β-catenin
	RARβ-2	Retinoic acid receptor β	Involved in cell growth and differentiation
	SHOX2	Homeobox family gene	Transcriptional regulator involved in cell growth and differentiation
	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	Transcription factor that acts as tumor suppressor gene and is pro-apoptotic

SCLC, small cell lung cancer.

بیان بیش از حد DNMT در پاتوژنز سرطان ریه نقش دارد. افزایش سطح DNMT در سرطان ریه ممکن است در نتیجه یکی از عوامل زیر باشد: بیان بیش از حد فعال کننده رونویسی، از دست دادن میکرو

RNAهایی که DNMTها را بطور منفی تنظیم می‌کند، و یا اختلال پروتئازومال تجزیه DNMT توسط hsp90. از نقطه نظر بالینی شواهدی وجود دارد که بیان بیش از حد DNMT1 با کاهش بقا در مبتلایان به سرطان ریه که تحت عمل جراحی قرار گرفته اند، مرتبط است. مطابق این یافته‌ها، ژنهای مختلف سرکوبگر سرطان (TSG) در سرطان ریه، با مکانیسم هایپرمتیلاسیون پروموترها خاموش می شوند. بسیاری از این‌TSG ها در عملکرد عادی سلول دخالت دارند مانند تنظیم کننده چرخه سلولی (P16)، تعمیر DNA (MGMT)، آپوپتوز(DAPK, caspase-8)، تنظیم Wnt سیگنالینگ(APC)، چسبندگی و تهاجم سلولی (E-Cadherin, H-CADHERIN و مهارکننده‌های بافت متالوپروتئیناز-۳) و سرکوب تهاجم (CDH13, TIMP-3). بعنوان مثال Brock و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشاهده کردند که متیلاسیون ژنهای cdk2A ، p16، CDH13، RASSF1Aو APC با عود مجدد پس از جراحی و برداشتن تومور NSCLC مرحله یک، بدون در نظر گرفتن فاکتورهای هیستولوژی، stage، جنسیت و سابقه مصرف سیگار، مرتبط می باشد. (Brock, 2008) همچنین یک مطالعه دیگر نشان داد که متیلاسیون p16و کاهش بیان p16 مرتبط است با کاهش بقای پس از برداشتن مراحل ابتدایی تومور NSCLC. (Sterlacci، ۲۰۱۱) به موازات آن، ارتباط متیلاسیون IGFBP-3 با مقاومت سیس پلاتین در NSCLC مشخص شد.(Ibanez de Caceres ، ۲۰۱۰).

متیلاسیون DNA علاوه بر سایر نقش‌های بسیار شناخته شده ای مانند بیومارکر پیش آگهی و پیش بینی کننده سرطان، بعنوان یک هدف درمانی از طریق مهار آنزیمی DNMT نیز عمل می کند. در یکسری مطالعات کلینیکی، دو مهارکننده اصلی DNMT یعنی azacitidine-۵ و decitabine در سطح وسیع مورد آزمایش قرار گرفت. azacitidine-۵ پس از فسفوریلاسیون، از طریق تله گذاری کووالانتی آنزیمهای DNMTها به DNA و RNA متصل شده و منجر به تخریب پروتئازومال و کاهش متیلاسیون DNA می شود. آسیب DNA و اختلال در سنتز DNA ناشی ازاتصال مرکزی DNA-DNMT است که مسئول سمیت مستقیم این عوامل در هنگام استفاده در دوزهای بالاتر است. برعکس آن‌decitabine ، به درون RNA وارد نمیشود و برای DNA اختصاصی می باشد. بهترین اثرات هیپومتیلاسیون این عوامل، در دوزهای پایین تر و تجویز طولانی مدت بدست آمد. مدل‌های پیش بالینی نشان دهنده فعالیت ضد توموری برای هر دو عامل از طریق دمتیلاسیون و حذف سرکوب در TSGهای متعدد، از جمله p16 می باشد. متاسفانه، استفاده از آنها به عنوان یک عامل واحد در آزمایشات بالینی موفقیت‌های محدودی در سرطان ریه داشته است. (Liu SV ، ۲۰۱۳).

بطور مثال در یک آزمایش، 15 بیمار مبتلا به NSCLC مرحله پیشرفته که تحت هیچ درمانی قرار نگرفته بود، با دوز بالای decitabine (۲۰۰ تا ۶۶۰ mg/m2) ، بیش از ۸ ساعت تحت درمان تزریق مداوم قرار گرفتند. اگر چه هیچ پاسخ عینی مشاهده نشد، چهار بیمار در طی بیش از ۶ ماه در معرض بیماری پایدار قرار داشتند و سه بیمار بقای حداقل ۱۵ ماهه و یک بیمار بقای ۸۱ ماهه نشان داد. جالب توجه است، مطالعات فارماکودینامیک حاکی از افزایش بیان‌p16، MAGE-3و NY-ESO-1 در یک سوم از بیماران بود. با تحقیقات بیشتر مطمئناً بهترین نتایج از نقطه نظر دوز، مدت درمان، و ترکیب با سایر داروهای ضد انعقادی، مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهد گرفت و در ادامه علائم پاسخ دارویی و بیومارکرهای پیش بینی کننده بالینی را می توان جستجو کرد. (Schrump، ۲۰۰۶)

اپی ژنتیک به ناهمگنی سرطان ریه کمک می‌کند

اپی ژنتیک، محرک اصلی جهش زایی سرطان می‌باشد. در زمان تومورزایی، جهت رونویسی DNA،

جزایر CpG پروموتر به طور معمول غیرمتیله یا نسبتا هیپومتیله می‌شوند. در سرطان ریه در پروموتر ژنهای p16INK4a، CDKN2A، ASSF1A، FHIT، TSLC1، APC، RARβ ، CDH1، CDH13، DAPK و MGMT متیلاسیون صورت می‌گیرد. بطور مثال در ۶۰ حدود٪ از NSCLCها و ۱۰٪ از SCLCها، p16INK4a متیله یا حذف شده است.

فراوانی متیلاسیون CDKN2A در مدل موشی و طی پیشرفت سرطان ریه، نشان می دهد که هیپرپلازی سلول پایه مسیر هوایی ریه (۱۷٪)، متاپلازی سلول‌های سنگفرشی (squamous metaplasia) (۲۴٪) و کارسینوم در محل (۵۰٪) متیلاسیون اتفاق افتاده است. متیلاسیون CDKN2A می تواند توسط مواد سرطان زای مربوط به دخانیات (4-methylnitrosaminno-1-(3-pyridyl-1-butanone القا شود. علاوه بر این، میزان هیپومتیلاسیون DNA ژنومی با شدت سرطان ریه مرتبط است، به طوری که با پیشرفت تومور از توده خوش‌خیم به سرطان مهاجم متاستاتیک، متیلاسیون گسترده DNA ژنومی کاهش می‌یابد.

بررسی‌ها نشان می دهد که ژن FHIT در ۴۰ تا۷۰٪ از NSCLC و ۵۰ تا ۸۰٪ از SCLC متیله می شود. فراوانی متیلاسیون ژن RASSF1در ۳۰ تا ۴۰٪ از موارد NSCLCو ۷۰ تا ۱۰۰٪ ازSCLC است و ژن TSLC1 در ۸۵٪ NSCLCها متیله شده یا موتاسیون یافته یا حذف شده‌است. ارتباطی بین متیلاسیون پروموترهای CDKN2A، RASSF1A، APC، ESR1، ABCB1، MT1G یا HOXC9 در NSCLC با مرحله یک سرطان ریه مشاهده شده است.

hDAB2IP هایپرمتیله‌شده، H-CADHERIN، DAL-1، یا FBN2، به شدت با مراحل پیشرفته و فازهای پایانی NSCLC مرتبط اند. علاوه بر متیلاسیون DNA، تغییرات (Modifications) باقیمانده‌های (رزیدوهای) ویژه هیستونها، به‌وسیله پروتئین‌های متصل شونده ثانویه، برساختار (کانفورماسیون) کروماتین و رونویسی، یا ترانسفورماسیون سلولی و رشد بدخیم سلولی تأثیر می‌گذارد. گزارش شده است که سلول‌های سرطانی با از دست دادن تری متیلاسیونH4K20، الگوی اشتباهی از تغییرات هیستون[1] H4 را نشان می‌دهند. تری متیلاسیون H4K20در اپیتلیوم نرمال ریه دیده می‌شود، در ضایعات اولیه سلول‌های سنگفرشی، تری متیلاسیون به طور مخنصری نسبت به حالت نرمال کمتر است و با پیشرفت ضایعات، به شدت کاهش می‌یابد.

استیلاسیون نابجای قسمت انتهایی[2] هیستون با سرطان زایی به شدت مرتبط است وHDAC های بیش بیان شده در سرطان ریه با اندازه تومور ارتباط دارند. بیان HDAC1، HDAC2 و HDAC3 در سرطان ریه انسان افزایش می یابد. HDAC3 در بیماران مبتلا به SCCریه بیش بیان شده و با پیش آگهی ضعیف برای ریه AD همراه است.

HDAC6 ممکن است در بلوغ پروتئین شوک حرارتی۹۰(heat shock protein 90) اختلال ایجاد کند و برتنظیم چرخه سلولی تأثیر بگذارد .علاوه بر این، در سرطان ریه miR-196a و miR-200 به ترتیب بیش از ۲۳ یا ۳۷ برابر بیش بیان می‌شوند. وضعیت متیلاسیون DNA ی آنتاگونیستWnt SFRP5 می‌تواند پاسخ به درمان EGFR-TKIs را در NSCLC پیش بینی کند، که این موضوع نشان دهنده رابطه بین جهش ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی در جهش‌زایی سرطان NSCLC است. مطالعه حاضر نشان داد که بیان گیرنده هورمون تیروئید بتا ۱ (thyroid hormone receptorβ1) که در منطقه 3q24.2 قرار دارد به فراوانی در لاین‌های سلولی SCLC (۶۱ درصد) و NSCLC (۴۸ درصد) از دست رفته است و وضعیت

1. modification
2. tail

بیان TRβ1 به شدت به متیلاسیونTRβ1 در منطقه پروموتری مرتبط است.

استعمال سیگار و متیلاسیونDNA

برخی از تغییرات اپی ژنتیکی در سرطان ریه با فراوانی بیشتری در افراد سیگاری رخ می دهد (به عنوان مثال، جهش‌های P16، FHIT، RASSF1A) و با افزایش مدت سیگار کشیدن و تعداد سیگارها، شدت آن افزایش می یابد. بیان DNMT1در افراد سیگاری مبتلا به سرطان ریه افزایش می یابد، احتمالا به علت نیتروزامین‌های خاص تنباکو که باعث یوبی کویی تینیشن و تخریب DNMT1 می باشد. علاوه بر آن التهاب مزمن ناشی از سیگار کشیدن و افزایش تولید ROSهای اختصاصی منجر به افزایش متیلاسیون DNAمی گردد.

Damiani و همکاران در سال ۲۰۰۸ با توسعه مدلی شبیه سازی شده از سرطان مزمن بصورت in vitro، نتیجه گرفتند که تغییرات اپی ژنتیکی مختلف در افراد سیگاری مزمن مشاهده می شود. در این آزمایش سلول‌های اپیتلیال مربوط به برونش انسان سالم (HBECs) ، بمدت ۱۲ هفته در معرض دو ماده سرطان زا بنام‌های (MNU) methylnitrosureaو بنزو (a) پریانیدیلوکسید ۱(BPDE) قرار داده شد. HBEC ها پس از ۴ هفته که در معرض این ماده‌ها بودند، ظاهری شبیه مزانشیم فیبروبلاستی را نشان دادند. کاهش معنی داری در miR-200b و miR-200c در طول تیمار ۴ هفته ای مشاهده شد و پس از ۱۲ هفته، تحرک سلولی ادامه یافت. جالب توجه است، این microRNAها در تنظیم و مهار EMT دخیل هستند. مطالعات بیشتر نشان داد که بیان اینmicroRNA های تنظیم کننده EMT ابتدائاً با استفاده از کروماتین غیر فعال در ۴ هفته کاهش یافته و بعد از آن این روند کاهشی با سرکوب سیتوزین متیله میانجی در پروموترها ادامه می یابد. (Damiani، ۲۰۰۸)

تغییرات هیستون در سرطان ریه

یکی دیگر از تغییرات اپی ژنتیک در سرطان، الگوی نابجای تغییرات پس از ترجمه هیستون‌هاست. استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها به شکل مستقیم بر فرآیندهای گوناگون هسته ای همچون رونویسی ژن، تعمیر DNA، و سازماندهی کروموزوم‌ها تاثیرگذار است. به طور کلی تعمیر استیلاسیون هیستون با فعال شدن رونویسی مرتبط است اما اثر متیلاسیون هیستون بستگی به نوع اسید آمینه و جایگاه آن دارد. (علی ملکی، ۱۳۹۰)

تغییرات اپی ژنتیکی در هیستونها می تواند به عنوان بیومارکرهای سرطانی ریه محسوب شود. تغییرات(modifications) هیستونی و تغییرالگوی بیانی HATها و HDAC ها ممکن است در تشخیص اولیه تومور ، پیش آگهی و درمان‌های هدفمند اپی ژنتیکی ارزشمند باشد. اگر چه در حال حاضر تغییرات هیستونی و HAT ها و HDAC ها در درمان سرطان ریه استفاده می شود، تحقیقات تکمیلی جهت رسیدن به این هدف که استفاده بالینی از آنها به عنوان نشانگرهای سرطان ریه در درمان هدفمند لازم است.

در طی دهه گذشته، مطالعات زیادی اختلالات اپی ژنتیکی درگیر در تغییرات هیستون در سرطان ریه را نشان داده است. بعنوان مثال Miyanaga و همکاران، ۱۶ رده سلولی NSCLC را با مهارکننده‌های HDAC مانند TSA و ورینوستات آزمایش کردند و فعالیت ضد توموری هر دو را در ۵۰٪ از رده‌های سلولی NSCLC نشان دادند. آنها همچنین با بررسی پروفایلینگ بیان ژنها، مجموعه ای از نه ژن را که حساسیت‌های دارویی مهارکننده‌های HDAC را پیش بینی می کرد، معرفی کردند.(Miyanaga ، ۲۰۰۸)

Van Den Broeck نیز نشان داد که تغییرات اپی ژنتیک هیستونها نقش مهمی در سرطان زایی ریه ایفا می کند. در مقایسه با سلول‌های ریه نرمال، سلول‌های

سرطانی ریه الگوهای تغییرات هیستونی H4 همراه با هایپراستیلاسیون H4K8 / H4K5، هیپواستیلاسیون H4K16/ H4K12 و از دست دادن تری متیلاسیون H4K20 را نشان دادند. یافته‌های آنها نشان دهنده نقش مهمی در اصلاح هیستون H4 و برجسته سازی H4K20me3 به عنوان یک نشانگر بالینی برای تشخیص زودهنگام و روش‌های درمانی برای سرطان ریه است.(Van Den Broeck ، ۲۰۰۸)

سلول‌های NSCLC تیمار شده با HDI باعث کاهش سطح mRNA رسپتور TNF-1، میزان پروتئین، بیان پروتئین سطحی و در نتیجه پاسخ به درمان با TNF می شود. بنابراین HDI ها می توانند به طور مطلوب در درمان تومور کمک کنند. این کمک از طریق کاهش پاسخ سلول‌های تومور با فعال شدن واسطه‌های TNF در مسیر NF-B می باشد.

تیمار با TSA منجر به کاهش وابسته به دوز سلول‌های H157 سرطانی ریه از طریق آپوپتوزیس، تکه تکه شدن هسته و افزایش جرم قطعه G0 / G1 می شود. TSAبا فعال سازی مسیرهای مرگ و میر داخلی میتوکندری و مسیر خارجی سیستم Fas / FasL، آپوپتوز را آغاز می کند. TSAهمچنین یک حسگر سنجنده سلول NSCLC سلولی است که باعث افزایش arrestمرحله G2 / Mچرخه سلولی، ترویج آپوپتوز و دخالت در تعمیر آسیبDNA می شود. همچنین بصورت سینرزیست و ترکیب با سایر مهارکننده‌های HDAC مانند vorinostat باعث مرگ سلولی می شود. Vorinostat فعالیت تلومراز را از طریق کاهش بیان H-tert در سلول‌های سرطانی A549 مهار می کند.

برای بررسی مکانیزم‌هایی که Vorinostat رشد سلول‌های سرطانی ریه را کند می کند، تغییرات چندین پروتئین کلیدی در چرخه سلولی و آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. مهارکننده p21 ، یک مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین، در سلول‌های NCI-H520و NCI-H460 تیمار شده با Vorinostat، upregulate شد و می توان گفت که این القاء برجسته p21 با arrest مرحله G0-G1 چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی ریه مرتبط بود. میزان p53 در سلول‌های NCI-H520 افزایش یافت که میتواند با افزایش p21م بروط باشد. میزان C-myc در هر دو رده سلولی بالا کاهش یافت که این نشان می دهد که Vorinostat فعالیت ضد تمایزی دارد Vorinostat. همچنین بیان BCL-2 در سلول‌های NCI-H460 را کاهش داد.(رفرنس ,Ansari1، ۲۰۱۶).

سیگار کشیدن و تغییرات هیستون histone modification

قرار گرفتن اپیتلیوم تنفسی در معرض دود سیگار ممکن است بر تغییرات هیستونی تأثیر بگذارد. کاتیونهای نیکل موجود در دود سیگار باعث القای داستیلاسیون هیستون و افزایش دی متیلاسیون H3K9می شود. Zhou و همکارانش و دیگران دریافتند که عناصر سرطان زای سیگار، از جمله نیکل، کرومات و آرسنیت نیز باعث القای متیلاسیون H3K4 می‌شوند.

مهار کننده‌های جدید HDAC

SL142 و SL325 که بازدارنده‌های HDAC مبتنی بر cyclic amide-bearing hydroxamic هستند، فعالیت‌های مهار کنندگی بیشتری بر HDAC داشته و نسبت به vorinostat اثر مهاری بیشتری را بر بقای سلول‌های سرطانی ریه نشان داده اند. این مولکول‌های کوچک باعث القای چشمگیر فعالیت caspase3 می‌شوند بدین معنی که می توانند آپوپتوز سرطان ریه را تحریک کنند. N-Hydroxy-4-(4-phenylbutyryl-amino) benzamide (HTPB)، یکی دیگر از مهار کننده‌های جدید HDAC است که از طریق القای توقف چرخه سلولی، آپوپتوز با واسطه میتوکندری، از بین رفتن دینامیک F-actin (F-actin dynamics) و

مهار پتانسیل غشایی میتوکندریایی MMP2 وMMP9، باعث سرکوب قابل توجه رشد سلول‌های سرطانی در in vitro وin vivo می شود. CG0006 یک مهار کننده سنتزی جدید HDAC است که در سلول سرطانی NCI-60 بررسی شده و دیده شده که با افزایش بیان p21 و p27 باعث القای مرگ سلولی شده است. عوامل جدید دیگر مانند MGCD0103 ، OSU-HDAC 44، CI-944، MS-275و LAQ824 مورد آزمایش قرار گرفتند و اثرات سیتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی ریه داشتند.

مفهوم بالینی ناهمگنی(هتروژنیتی) اپی‌ژنتیکی در سرطان ریه

ممکن است اصلاح کننده‌های کروماتین[1] بر اساس برگشت پذیری تغییرات اپی ژنتیک، به عنوان اهداف بالقوه برای کشف و توسعه دارو برای سرطان عمل کنند. برای درمان بالینی اختلالات اپی‌ژنتیکی شایع در انواع مختلف بیماری‌ها، درمان اپی‌ژنتیکی نوید بزرگی محسوب می‌شود. دو گروه اصلی درمان‌های اپی‌ژنتیکی شامل مهارکننده‌های DNA متیل ترانسفراز و مهار کننده‌های HDAC هستند که عموماً باعث گسترش یک ساختار بازتر در کروماتین شده و در نتیجه بیان ژن را تقویت می کنند. یک نوع مقاومت دارویی برگشت پذیر می تواند با دوزهای پایین مهارکننده‌های هیستون داستیلاز از بین برود و با انتخاب یا القاء CSCها از جمعیت سلول‌های توموری ناهمگن همراه است.

همانطور که در بالا ذکر شد، سلول‌های سرطانی دارای یک وضعیت متیلاسیونی نابجا، از جمله هایپرمتیلاسیون سراسری و هایپرمتیلاسیون ژن‌های سرکوب کننده تومور هستند. هایپرمتیلاسیون سراسری معمولاً با بی ثباتی ژنومی و بیش بیان نابجای ایزوفرم‌های ژن‌های انکوژنیک در فاز پایانی پیشرفت سرطان ریه همراه است. در مقابل، هایپرمتیلاسیون DNA معمولا در مرحله اولیه تومورزایی ریه رخ می دهد. از جمله مثال‌های هایپرمتیلاسیون اولیه شامل p16 ، RASSF1A، APC، RARβو MGMT است که می توانند بعنوان نشانگرهای زیستی (بیومارکرهای) تشخیصی در سرطان ریه درنظرگرفته شود. اثبات شده است که متیلاسیون پروموتر BRMS1 با سابقه سیگار کشیدن و بقاء کم در NSCLC (poor survivalin NSCLC) همراه است.

در حال حاضر، به نظر می رسد متیلاسیون DNA به عنوان یکی از امیدبخش ترین نشانگرهای زیستی اپی ژنتیک است که می تواند تشخیص زود هنگام و مدیریت بعدی بیماران مبتلا به سرطان ریه را بهبود بخشد .متیلاسیون DNA می تواند در تعدادی از مایعات بدن بیماران مبتلا به سرطان ریه، مانند خلط، bronchoalveolar lavage و پلاسما یا بیوپسی بافت و بافت‌های پارافینه مشخص شود. با این حال، برای اکثریت وسیع بیومارکرهای کاندید انتخاب شده، داده‌ها فقط در حد اثبات اصل است و دارای اعتبار کافی نمی‌باشد. نشانگرهای احتمالی و بیومارکرهای اپی ژنتیکی پیش آگهی سرطان ریه در جدول ۲ آمده است. (Nian Dong ، ۲۰۱۷)

بیومارکرهای اپی ژنتیکی در سرطان ریه

اخیرا تغییرات اپی ژنتیکی به عنوان بیومارکرهای احتمالی برای تشخیص زود هنگام سرطان ریه، تشخیص، پیش آگهی و هدایت گزینه‌های درمانی برای تشخیص سریع سرطان ریه به شدت مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالات بر روی متیلاسیون سیتوزین DNA، تغییرات میکروسکوپی و تغییرات هیستون تمرکز عمیق نموده است. هر یک از این تغییرات اپی ژنتیک دارای روش‌های آزمایشگاهی اختصاصی و

1. modifiers

درجات مختلف کاربرد بالینی است. در حال حاضر بیشتر بیومارکرهای اپی ژنتیکی سرطان ریه در حال تحقیق و توسعه هستند و شاید تا چندین سال آینده نیز کاربرد بالینی نداشته باشد.

MicroRNA و خاموش سازی microRNA

MicroRNAs (miRs)، RNAهای کوچک غیرکدشونده درونزاد (endogenous) تک رشته ای هستند که دارای ۲۰-۲۲ نوکلئوتید بوده و بیان ژن را تنظیم می کنند. بیش از ۱۰۰۰ miR شناسایی شده اند و بیش از یک سوم از mRNA های کدکننده را تنظیم می کنند و هر کدام می توانند صدها رشته mRNAهدف را تنظیم کنند. بنابراین خاموش کردن miRها توسط متیلاسیون می تواند به شدت گسترش و پیشرفت تومور را تنظیم کند. Heller و همکارانش ۳۳ miR را در سلول‌های A549 (AdC ریه) شناسایی کردند که پس از درمان دمتیلاسیونی افزایش بیان داشتند. miR-9-3، miR-34b و miR-126 در NSCLC ، متیله شده و این موضوع با یک پیش آگهی تغییر یافته (altered prognosis)همراه است.

در تومورهای ابتدایی ریه، با قرار گرفتن در معرض دود سیگار ، miR-487b معمولا از طریق متیلاسیون خاموش می شود و در سلول‌های اپیتلیال تنفسی ولاین‌های سلولی‌های مشتق شده از تومورهای ریه کاهش می یابد. این یافته تقویت کننده داده‌های گذشته است که نشان می دهد که سیگار کشیدن بر متیلاسیون اثر گذاشته و باعث افزایش سرطان ریه می شود.

miRها به عنوان نشانگر زیستی(بیومارکر) در سرطان ریه

microRNA در چرخش (Circulating microRNA) مانند miRهای گرفته شده از خون و پلاسما می تواند بیومارکرهای مفیدی برای سرطان ریه بوده و با پیش آگهی در ارتباط باشند. زیرا در پلاسمای انسانی بسیار پایدار بوده و در تشخیص اولیه سرطان ارزشمند هستند. به طور خاص، به طور مداوم گزارش شده است که میزان بالای miR-21 با سرطان ریه همراه است. Bianchi و همکاران یک آزمایش مبتنی بر گروه miR-34 انجام دادند که سرطان ریه را در ۸۰٪ افراد پر خطر بدون علامت و سیگاری‌های سالم تشخیص می‌دهد. مشخص شده است که این کلاس از miRs در پیش بینی عود سرطان ریه ارزشمند هستند، به طوریکه بیان کم این miRs پیش بینی کننده عود بسیار بیماری است. به همین ترتیب، miR-30a، miR-107، miR-138، miR-204، miR-32، miR-148b، miR-145، miR-224، miR-200c، miR-125bو miR-375 ، یک نتیجه بالینی ضعیف(a poor clinical outcome) و وقایعی مانند افزایش متاستاز غدد لنفاوی و اندازه بزرگتر تومور را پیش بینی می کنند ، در حالی که مقادیر بالای miR-126 ، miR-21، miR-197، mi-150و miR-141 نیز پیش بینی کننده یک نتیجه بالینی ضعیف (a poor clinical outcome) است.

همچنین نشان داده شده است کهmiR ها در پیش بینی پاسخ‌های درمانی ارزش دارند. به عنوان مثال، Zhao و همکاران دریافتند که miR های در چرخش، در پیش بینی جهشEGFR ، حساسیت به gefitinib و پیش آگهی بیمار ارزشمندند. در آخر، ممکن است در سرطان ریه، miRs-33a و miR-124 به ترتیب از طریق میزان بالاتر مهار انتقال EMT (EMT transition) و متاستاز تومور در پیش آگهی ارزشمند باشند. miRs معمولا با تکثیر از طریق PCR اندازه گیری می شوند. در حال حاضر تغییرات در miRs به ندرت به صورت بالینی مورد استفاده قرار می گیرد وایجاد پانل‌های معتبر و قابل اعتماد miR برای استفاده بالینی در تشخیص، پیش آگهی، و درمان سرطان ریه چندین سال طول می کشد. (Ansari ، ۲۰۱۶)

تعدادی از پروفایل‌های miRNA با اندازه و ترکیب متفاوت در بافت توموری گزارش شده است. به خصوص، mir-21 و mir-155 اغلب به عنوان مارکرهای پیش آگهی مطالعه شده است. در یک متاآنالیز جدید، بیان بالای miR-21 درNSCLC با بقای کلی کم تر (metaHR = 2.32، 95٪ CI: 1.17-4.62 ؛ ۶ مطالعه) و بقای بدون عود مجدد در آدنوکارسینوم با بقای کم تر (۶ مطالعه: metaHR = 2.32, 95% CI: 1.17–4.62) و در آدنوکرسینوما با بقای بدون عود (۳ مطالعه: metaHR = 2.43, 95% CI: 1.67–3.54) همراه است. به همین ترتیب، در همان متاآنالیز، گزارش شده است که در NSCLC ، miR-155 با بقای بدون عود کمتری (۵ مطالعه: metaHR = 1.42, 95% CI: 1.10–1.83) همراه است .علاوه بر این، در بیماران NSCLC، بیان lncRNA MALAT1 با متاستاز و بقای کمتر همراه است و بیان HOTAIRبا رفتار تهاجمی و نتایج بدتر در NSCLC همراه است. MicroRNAاغلب در طی آپوپتوز یا در اگزوزومها ها یا میکرووزیکل‌ها از بافت آزاد می شود و می تواند در جریان خون شناسایی شود.

متیلاسیون DNA در چرخش نیز ممکن است در پیش بینی نتایج استفاده شود، اگر چه مهم است که DNA در گردش آزاد را از DNA لکوسیتیک متمایز کنیم، زیرا مارکرهای متیلاسیونی DNA با تمایز سلولی مرتیط است و بسته به نوع سلول متفاوت است. بنابراین، بدون طراحی مطالعه دقیق، پروفایل‌های متیلاسیون مبتنی بر خون می تواند با تغییر در نسبت انواع لکوسیتهای در گردش مثلا هنگام پاسخ ایمنی، گیج کننده باشد. Ramirez و همکارانش دریافتند که متیلاسیون sigma 3-3-14 در سرم پیش تیمارشده ممکن است یک پیش بینی کننده مهم نتیجه NSCLC در بیماران تحت درمان با شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین باشد. به همین ترتیب، Ponomaryova و همکارانش دریافتند که افزایش متیلاسیون RARβ2 در DNA در گردش، با پیشرفت سرطان ریه همراه است.

شواهد اخیر نشان می دهد که مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی، حداقل در بعضی موارد، می تواند نقش مهمی در مقاومت درمانی داشته باشد. تعدادی از مطالعات، ارتباط بین بیان تغییریافته انواعی از miRNAها و حساسیت به gefitinib، erlotinib، cisplatin و پرتودرمانی را گزارش کرده اند. افزایش بیان هریک از HOTAIR و EZH2 نیز با مقاومت به cisplatin مرتبط است. در یک Sharma و همکارانش نشان دادند که یک مجموعه کوچک از سلول‌های مشابه سلول‌های بنیادی در دو لاین سلولیNSCLC برای بدست آوردن مقاومت درمانی می توانند پس از درمان با erlotinib و cisplatin متحمل chromatin remodeling شوند. نویسندگان دریافتند که سلول‌های تومور مقاوم به درمان هیستون دمتیلاز ، KDM5A را بیش بیان کرده وکاهش دی و تری متیلاسیون H3K4 را نشان می‌دهند و این سلول‌های مقاوم ، به مهار کننده‌های HDAC حساس هستند. این یافته‌ها بسیار مهم هستند، زیرا اولاً نقش مهم پلاستیسیتی اپی ژنتیک را در کسب مقاومت دارویی اثبات می‌کنند و دوماً تغییرات بعد از ترجمه هیستونی را به عنوان اهداف درمانی در سلول‌های NSCLC مقاوم به دارو نشان می دهد.

ناهمگونی داخل توموری (Intratumoral heterogeneity) و انتخاب کلون‌ها از زیر جمعیتهای سلولی توموری مقاوم به درمان، به عنوان مکانیسم احتمالی دیگری درنظر گرفته می شود که می تواند ایجاد مقاومت به درمان را در تومور کنترل کند. نگرش ناهمگونی ژنتیکی درون توموری اخیرا در کارسینوم سلولی کلیه تایید شده است و به احتمال زیاد در سایر انواع تومورهای جامد نیز وجود دارد .علاوه بر این، اگر چه در مطالعه ای مورد بررسی قرار نگرفته است، ولی احتمالا سلول‌های سرطانی نیز دارای ناهمگونی اپی‌ژنتیکی داخل توموری هستند، زیراتغییرات اپی ژنتیکی، رویدادهای فعال / غیر فعال کننده رایج در

سرطان زایی هستند، و به همین دلیل نیز می توانند بطور تصادفی انتخاب شوند.

نتیجه گیری و چشم انداز آینده

اپی ژنتیک نقش مهمی در پیشرفت و توسعه سرطان ریه دارد. مطالعات نشان داده است که متیلاسیون ژنهای TSG با پیش آگهی سلول‌های NSCLC در مراحل اولیه ارتباط دارد و این موضوع می تواند برای تشخیص‌های آینده مورد استفاده قرار گیرد. مثلاً اینکه چه کسی می تواند از درمان اپی ژنتیک adjuvant بهره مند شود تا خطر ابتلا به عود بعد از جراحی کمتر شود. اپی ژنوم ممکن است در درمان سرطان ریه موثر باشد زیرا می تواند مسیرهای متعددی که ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی را تنظیم می کنند، هدف قرار دهد. علیرغم برخی نتایج بالینی ناامید کننده، که فقط درمان اپی ژنتیکی انجام شده بود، این زمینه از علم همچنان در حال تکامل است. خوشبختانه اخیراً محققین برای کشف عوامل اپی ژنتیکی عامل ایجاد سرطان ریه که نسبت به سمیت شیمی درمانی و ایمنوتراپی حساسیت بیشتری دارند، تمایل زیادی نشان داده اند. پیدا کردن بیومارکرهای پیش بینی برای انتخاب بیمارانی که ممکن است از مزایای تغییرات اپی ژنتیکی و تعیین مارکرهای فارماکودینامیک منتفع شوند. برای ارزیابی اثربخشی این عوامل اپی ژنتیکی، چالش‌های عمده ای باید مورد بررسی قرار گیرد مانند بهینه سازی اثرات آنها و انتقال توالی آنها در کانجوگاسیون، رابطه با سایر عوامل آنتی نئوپلاستیک.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می دانند از مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین المللی (CISSC) قدردانی نمایند زیرا این مقاله و نتایج برخی آزمایش‌های انجام شده توسط گروه پژوهشی حاضر، با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین المللی انجام شده است.

منابع و مآخذ

1. Ali M. Ardekani, Mahsa Shirani, Ahmad Hashemi, Zihre Basiri, Yazdan Rahmati, Novin Nikbakhsh, Sahar Edrisi, Shahla Mohammad Ganji. Evaluation of methylation status of Nanog1, RASSF1A, SFN, Casp8, WiF1, CTSL2 genes in Iranian patients with breast cancer. Accepted in the "Iran South Med Journal". 2017; 19(6):940-950
2. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. N Engl J Med 2008;358:1118-28.
3. Damiani LA, Yingling CM, Leng S, et al. Carcinogeninduced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. Cancer Res 2008;68:9005-14.
4. Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. Oncogene 2010;29:1681-90
5. Junaid Ansari, Rodney E. Shackelford, Hazem El-Osta. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. Translational lung cancer research. 2016; 5(2): 155-171. http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2016.02.02
6. Liu SV, Fabbri M, Gitlitz BJ, et al. Epigenetic therapy in lung cancer. Front Oncol 2013;3:135.
7. Miyanaga A, Gemma A, Noro R, et al. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. Mol Cancer Ther 2008;7:1923-30.
8. Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, et al. Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. Clin Cancer Res 2006;12:5777-85.
9. Scott M. Langevin, Robert A. Kratzke, Karl T. Kelsey. Epigenetics of Lung Cancer. *Transl Res*. 2015 January ; 165(1): 74–90. doi:10.1016/j.trsl.2014.03.001
10. Selamat SA, Chung BS, Girard L, et al. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. Genome Res 2012;22:1197-211.
11. S Mohammad Ganji, Elena Miotto, Elisa Callegari, Forouzandeh Fereidooni, Mansour Yazdanbod, Ferdous Rastgar-Jazii, Massimo Negrini. Associations of risk factors obesity and occupational airborne exposures with CDKN2A/p16 aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients. Disease of Esophagus Journal, April 2010. Vol. 3. Issue 7. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2010.01059.x.
12. S Mohammad Ganji, Elham Samei, Ahmad Hashemi, Amir Rezagholizadeh, Anooshirvan Kazemnejad, Zahra Mostakhdemin Hosseini. Investigation of the E-cadherin Promoter Methylation in Patients with Colorectal Cancer in Iran. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology, 16(2), Summer 2013: 75-83
13. S Mohammad Ganji, Elham Samei, Ferdous Rastgar-Jazii, Mansour Yazdanbod, Massimo Negrini. *E-cadherin* Promoter Methylation Comparison and Correlation with the Pathological Features of the Squamous Cell Carcinoma of Esophagus in the High Risk Region .Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. 2014.25(1):19-26
14. S Mohammad Ganji, Sadaf Mahboudi, Ferdous rastgar-Jazii. Investigation of the aberrant DNA methylation of p14, p15, p16 genes in patients with ESCC in Iran. Accepted for published in the "Journal of Molecular Cell Biology", 2015, 28(3): 403-412
15. Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. J Thorac Oncol 2011;6:1649-57.
16. Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, et al. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14:7237-45.

۱۷. علی ملکی، سعید کاویانی، مهرداد نوروزی نیا، مجید فرشدوستی حق، زینب کاویانی، کامران منصوری. مکانیسم‌های اپی ژنتیک و نقش آنها در بروز سرطانهای خونی. مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان، ۱۳۹۰۱۳(۵): ۱-۷.