پردیس بین الملل

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی تغییرات بیان ژن هیستون داستیلاز۱ در بیماران مبتلا به سرطان مثانه

از:

مجتبی علی وند

استاد راهنما:

دکتر فرزام عجمیان

(خرداد ۱۳۹۲)

بسم الله الرحمن الرحيم

پردیس بین الملل

گروه زیست شناسی

(گرایش ژنتیک)

بررسی تغییرات بیان ژن هیستون داستیلاز۱ در بیماران مبتلا به سرطان مثانه

از:

مجتبی علی‌وند

استاد راهنما:

دکتر فرزام عجمیان

اساتید مشاور:

دکتر علی حمیدی مدنی

دکتر حمید رضا وزیری

(خرداد ۱۳۹۲)

تقدیم به:

همسر نازنینم

که وجودش گرما بخش زندگیم بوده و هست

و

پدر عزیزم

به پاس حمایت‌ها و زحمات بی شائبه‌شان

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا بر منتهای همت خود کامران شده

ﷺ مشیت خدا برای من بر کوهساری استوار بنا شده و آن‌چه از ازل از آن من بود، اکنون نیز از آن من است و تا ابد از آن من خواهد بود.

ﷺ خدا را ستایش می‌کنم برای تحقق اهدافم و به اتمام رساندن نگارش این پایان نامه و یقین دارم که همراه با خدا انجام آن آسان است. هم اکنون که به این نقطه رسیده‌ام بر خود لازم می‌دانم که از عزیزانی که مرا در اندوختن علم و به اتمام رساندن این دوره یاری کردند تشکر و قدردانی کنم.

ﷺ از پدر مهربانم، به پاس زحمات بی‌شائبه شان سپاسگذارم. هم‌چنین محبت‌های سایر اعضای خانواده را هرگز فراموش نخواهم کرد. امید آنکه روزی بتوانم گامی را در راستای خشنودی آنان بردارم.

ﷺ از همسر عزیزم خانم دکتر پریسا حمامی که الگوی من در تلاش و کوشش بوده است صمیمانه تشکر می‌کنم.

ﷺ از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر فرزام عجمیان که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشته‌اند و همواره با کمک‌های ارزنده و بی‌دریغ خود مرا یاری نموده‌اند بی نهایت سپاسگزارم.

ﷺ از الطاف استاد مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر علی حمیدی مدنی صمیمانه قدردانی می‌کنم.

ﷺ از استاد مشاور گرانقدرم جناب آقای دکتر حمیدرضا وزیری کمال تشکر را دارم.

ﷺ از اساتید داور بزرگوار و آقای دکتر فرهاد مشایخی و آقای مهندس مهدی رسام که زحمت داوری پایان نامه را تقبل کردند و همچنین سرکار خانم دکتر زیور صالحی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشکده کمال تشکر را دارم.

ﷺ از جناب آقای دکتر سوهانی، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان بی‌نهایت سپاسگذارم.

«فهرست مطالب»

عنوان صفحه

چکیده فارسی ----------ط
چکیده انگلیسی ----------ی
فصل اول: مقدمه
۱- مقدمه ----------۱
۱-۱- اپیدمیولوژی ----------۳
۱-۲-پاتولوژی سرطان مثانه ----------۳
۱-۳- انواع سرطان مثانه ----------٤
۱-۳-۱- سرطان سلول‌های درونی ترین لایه پوششی دستگاه ادراری(ارتجاعی) ----------٤
۱-۳-۲- سرطان‌های غیرپوششی----------٤
۱-۳-۲-۱- سرطان سلول‌های غده ای مترشحه ----------٤
۱-۳-۲-۲- سرطان سلول‌های سنگ فرشی----------٥
۱-۳-۲-۳- سرطان مختلط ----------٥
۱-۳-۲-٤- تومورهای متاستاتیک ----------٥
۱-٤- علائم و نشانه‌های بالینی ----------٥
۱-٥- مرحله بندی تومور ----------٦
۱-٦- درمان ----------٦
۱-۷- عوامل خطر ایجاد سرطان ----------۷
۱-۷-۱- مواد سرطانزای شیمیایی ----------۷
۱-۷-۲- مصرف سیگار----------۷
۱-۷-۳- آب آشامیدنی ----------۸
۱-۷-٤- آرسنیک ----------۸
۱-۷-٥- سیستیت مزمن ----------۸
۱-۷-٦- سرطان‌های سیستم ادراری فوقانی ----------۹
۱-۷-۷-تقویت مثانه----------۹
۱-۷-۸- موارد یاتروژنیک ----------۹
۱-۷-۸-۱- رادیاسیون ----------۹
۱-۷-۸-۲ سیکلوفسفامید----------۱۰
۱-۷-۹- ضد دردها ----------۱۰
۱-۷-۱۰- قهوه و چای ----------۱۰

۱-۷-۱۱- وراثت ---------- ۱۱
۱-۷-۱۲- اثرات ژنتیکی ---------- ۱۱
۱-۸- تغییرات اپی ژنتیکی ---------- ۱۲
۱-۹- هیستون ---------- ۱٤
۱-۱۰- طبقه بندی هیستون‌ها ---------- ۱٤
۱-۱۰-۱- هیستون‌های اصلی ---------- ۱٤
۱-۱۰-۲- هیستون‌های فرعی ---------- ۱٤
۱-۱۱- سازمان نوکلئوزوم ---------- ۱٥
۱-۱۲- تنظیم بیان ژن ---------- ۱٦
۱-۱۳- ساختار کروماتین در تعیین الگوهای بیان ژن و تغییرات شیمیایی هیستون‌ها ---------- ۱٦
۱-۱٤- مدیفیکاسیون هیستون‌ها ---------- ۱۷
۱-۱٤-۱- استیلاسیون هیستون‌ها ---------- ۱۹
۱-۱٤-۲- داستیلاسیون هیستون‌ها ---------- ۲۰
۱-۱٤-۳- فسفریلاسیون هیستون‌ها ---------- ۲۱
۱-۱٤-٤- متیلاسیون هیستون‌ها ---------- ۲۲
۱-۱٤-٥- یوبیکویتینه شدن هیستون‌ها ---------- ۲۳
۱-۱٥- هیستون استیل ترانسفرازها ---------- ۲۳
۱-۱٦- مدیفیکاسیون پروتئین‌های غیر هیستونی ---------- ۲٥
۱-۱٦-۲- پروتئین p53 ---------- ۲٥
۱-۱٦-۲-$NF\text{-}kB^2$ ---------- ۲٥
۱-۱۷- مدیفیکاسیون پروتئین و پایداری ---------- ۲٦
۱-۱۸- هیستون داستیلازها ---------- ۲٦
۱-۱۹- مکانیسم عمل هیستون داستیلازها ---------- ۲۸
۱-۲۰- طبقه بندی هیستون داستیلازها ---------- ۲۹
۱-۲۰-۱- خانواده کلاسیک هیستون داستیلازی ---------- ۲۹
۱-۲۰-۲- خانواده SIR2 ---------- ۳۰
۱-۲۱- معرفی کلاس‌های هیستون داستیلازها ---------- ۳۰
۱-۲۱-۱- هیستون داستیلازهای کلاس I ---------- ۳۱
۱-۲۱-۲- هیستون داستیلازهای کلاس IIa ---------- ۳۲
۱-۲۱-۳- هیستون داستیلازهای کلاس IIb ---------- ۳۳
۱-۲۱-٤- هیستون داستیلاز کلاس IV ---------- ۳٤
۱-۲۲- محل استقرار هیستون داستیلازها ---------- ۳٥

۱-۲۳- مهارکننده‌های هیستون داستیلازها---۳۵
۱-۲٤- کنترل بیان ژن بوسیله هیستون داستیلازها ---۳۷
۱-۲۵- بیان هیستون داستیلاز۱ در سرطان ---۳۸
۱-۲٦- عملکرد هیستون داستیلاز۱ در سرطان---۳۹
۱-۲۷- هدف از انجام این تحقیق ---۳۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- دستگاه‌ها و مواد شیمیایی ---٤۲
۲-۱-۱- دستگاه‌ها ---٤۲
۲-۱-۲- مواد شیمیایی ---٤۳
۲-۲- نمونه گیری ---٤٤
۲-۳- استخراج Total RNA از بافت مثانه ---٤٤
۲-۳-۱- مواد لازم جهت استخراج RNA---٤٤
۲-۳-۲- پروسه استخراج RNA ---٤۵
۲-٤- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده ---٤۷
۲-٤-۱- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده توسط روش اسپکتروسکوپی ---٤۷
۲-٤-۲- ارزیابی RNA استخراج شده به کمک ژل آگارز ۱٪ (الکتروفورز افقی) ---٤۸
۲-۵- سنتز cDNA---٤۹
۲-٦- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر ژن هیستون داستیلاز ۱ ---۵۰
۲-٦-۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن هیستون داستیلاز ۱ ---۵۱
۲-٦-۲- پروفایل حرارتی PCR ---۵۲
۲-٦-۳- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز۱٪ ---۵۲
۲-٦-۳-۱- آماده سازی ژل آگارز ۱٪ ---۵۲
۲-۷- واکنش Real-Time PCR جهت تکثیر ژن هیستون داستیلاز۱ ---۵۳
۲-۷-۱- تهیه نمودار استاندارد ---۵۳
۲-۷-۲- واکنش Real-Time PCR نمونه‌های مجهول ---۵۵
۲-۷-۳- پروفایل حرارتی واکنش Real-Time PCR مربوط به دوژن هیستون داستیلاز۱،GAPDH و 18Sریبوزومی -۵۵
۲-۷-٤- بررسی منحنی ذوب Real-Time PCR ---۵٦
۲-۷-۵- الکتروفورز محصولReal-Time PCR روی ژل آگارز ---۵٦
۲-۸- نحوه محاسبه داده‌ها---۵٦
۲-۹- مطالعات آماری ---۵۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱- خصوصیات نمونه‌ها---------- ۵۸
۳-۲- نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی ---------- ۵۸
۳-۲-۱- نتایج بررسی استخراج Total RNA از بافت مثانه ---------- ۵۸
۳-۲-۱-۱- نتایج بررسی کیفیت Total RNA به وسیله اسپکتروفتومتری ---------- ۵۸
۳-۲-۱-۲- نتایج بررسی کیفیت Total RNA به وسیله الکتروفورز ---------- ۵۸
۳-۳- نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ---------- ۶۰
۳-۳-۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن هیستون داستیلاز۱ توسط ژل آگارز ۱٪(الکتروفورز افقی)----- ۶۰
۳-٤- نتایج حاصل از Real-Time PCR ---------- ۶۱
۳-٤-۱- آنالیز نموداراستاندارد ---------- ۶۱
۳-٤-۲- آنالیز منحنی ذوب ---------- ۶۲
۳-٤-۳-آنالیز اطلاعات با استفاده از روش $2^{\Delta\Delta ct}$ ---------- ۶۳
۳-٤-٤- نتایج الکتروفورز محصولات Real-Time PCRمربوط به ژن هیستون داستیلاز۱ توسط ژل آگارز ۱٪ ------- ۶۳
۳-٤-۵- بیان ژن هیستون داستیلاز۱ ---------- ۶۳

فصل چهارم: بحث

۱-٤- بحث ---------- ۶۵
نتیجه گیری ---------- ۷۱
پیشنهادات ---------- ۷۱
منابع ---------- ۷۲

«فهرست شکل‌ها»

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- مرحله بندی تومور ----------٦
شکل ۱-۲- نمای شماتیک از ساختار هیستون‌ها در نوکلئوزوم‌ها ----------۱۵
شکل ۱-۳- مدیفیکاسیون‌های معروف پروتئین‌های هسته‌ای هیستون ----------۱۹
شکل ۱-٤- یک مدل برای ایجاد دُومین‌های فعال از لحاظ رونویسی به وسیله مدیفیکاسیون(هیستون استیل ترانسفراز) -۲٤
شکل ۱-۵- محل اتصال SAHA به یون روی در ساختار هیستون داستیلاز ----------۲۷
شکل ۱-٦- جنبه‌های متنوع فرآیند رونویسی و تنظیم آن به وسیله مدیفیکاسیون هیستون----------۲۹
شکل ۱-۷-طبقه بندی خانواده هیستون داستیلازها و تعداد آمینواسیدها----------۳۱
شکل ۱-۸- کمپلکس‌های هیستون داستیلازها----------۳۲
شکل ۱-۹- ارتباط تکاملی بین هیستون داستیلازها ----------۳٤
شکل۱-۱۰- مهارکننده‌های انتخابی و غیرانتخابی هیستون داستیلازها ----------۳۷
شکل ۱-۱۱- بیان خانواده هیستون داستیلاز1 دربافت‌های سرطانی ----------۳۸
شکل۱-۱۲- کنترل و عملکرد سلول‌های سرطانی به توسط خانواده هیستون داستیلازها ----------۳۹
شکل ۲-۱- محل اتصال پرایمرها ----------۵۱
شکل ۲-۲- پروفایل حرارتی PCR ----------۵۲
شکل۲-۳- تصویر مربوط به منحنی استاندارد تهیه شده برای نمونه‌های mRNA هدف ----------٥٤
شکل ۲-٤- تصویر مربوط به نمونه‌های mRNA هدف ----------٥٤
شکل۲-۵- پروفایل حرارتی ژن‌های هیستون داستیلاز۱، GAPDH و 18S ریبوزومی در واکنش Real-Time PCR.۵۵
شکل ۳-۱- تصویر نمونه‌ای از Total RNA استخراج شده از بافت مثانه روی ژل آگارز ۱٪ باندهای الکتروفورزید ۵۹
شکل ۳-۲- ژل آگارز ۱٪ مربوط به الکتروفورز محصولات PCR ژن هیستون داستیلاز۱ مربوط به cDNA سنتز شده از بافت سرطانی اپتلیالی مثانه----------٦۰
شکل۳-۳- منحنی تکثیر Real time.PCR ژن‌های HDAC1، GAPDH،18s ----------٦۱
شکل۳-٤- منحنی بدست آمده برای ژن HDAC1 با روش سایبرگرین PCR----------٦۲
شکل ۳-۵- آنالیز منحنی ذوب ----------٦۲
شکل ۳-٦- ژل آگاروز ۱٪ مربوط به الکتروفورز محصولات Real-time PCR ژن هیستون داستیلاز۱ مربوط به cDNA سنتز شده از بافت سرطانی مثانه به همراه مارکر 100 bp ----------٦۳
شکل۳-۷- نمودار بیان هیستون داستیلاز۱ در نمونه‌های سرطانی و افراد سالم ----------٦٤

«فهرست جداول»

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- آب DEPC ---------- ٤٦
جدول ۲-۲- مواد مصرفی در سنتز cDNA---------- ٤٩
جدول ۲-۳- مواد مصرفی در واکنش PCR---------- ٥٠
جدول ۲-٤- مشخصات پرایمرهای ژن هیستون داستیلاز ۱---------- ٥١
جدول ۲-٥- بافر TAE ---------- ٥٣
جدول ۲-٦- مواد مصرفی در تهیه نمودار استاندارد Real-Time PCR. ---------- ٥٤
جدول ۲-۷- مواد مصرفی در Real-Time PCR نمونه‌های مجهول ---------- ٥٥

چکیده

بررسی تغییرات بیان ژن هیستون داستیلاز۱ در بیماران مبتلا به سرطان مثانه

مجتبی علی وند

سرطان مثانه چهارمین سرطان شایع در مردان و نهمین در زنان است. بیش از ۹۰٪ از تومورهای مثانه از نظر پاتولوژی سلول‌های پوششی دستگاه ادراری هستند و در ۷۵٪ موارد در زمان تشخیص در مرحله سطحی قرار دارند. شایع‌ترین علامت بیماران وجود خون در ادرار است و روش استاندارد برای تشخیص سرطان مثانه سیستوسکوپی می باشد. در تومور مثانه تغییرات ژنتیکی شامل تغییر در ژن سرکوب‌گر تومور P53، P21 و ژن رتینوبلاستوما رخ می‌دهد، که منجر به پیشرفت تومور به مراحل بالاتر می‌شود. در پیدایش سرطان مثانه، تغییرات اپی ژنتیکی نیز موثر هستند. این تغییرات شامل متیلاسیون DNA و مدیفیکاسیون هیستون‌ها می‌باشند که در فرآیند تومورزایی دخیل هستند. تغییرات اپی ژنتیک بر خلاف تغییرات ژنتیک، تغییرات ارثی و برگشت‌پذیر هستند که بدون ایجاد تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها بر روی عملکرد و بیان آن‌ها تاثیر می‌گذارند. بخشی از این اثرگذاری توسط آنزیم‌های هیستون داستیلاز(HDAC) انجام می‌گیرد. داستیلاسیون هیستون‌ها با برداشتن گروه استیل از آمینواسید لیزین در انتهای هیستون‌ها منجر به فشرده شدن ساختار کروماتین و خاموشی ژن می‌گردند. HDAC1 جزء کلاس ۱ هیستون داستیلازها می‌باشد که افزایش بیان آن در سلول‌های سرطانی باعث تحریک تکثیر، رگ‌زایی، ممانعت از آپوپتوزیس و از دست رفتن تمایز می‌شود. ما در این تحقیق، پس از استخراج RNA از نمونه‌ها بیان هیستون هیستون داستیلاز ۱ را در سرطان مثانه انسان و گروه کنترل با استفاده از RT-PCR مطالعه کردیم. برای این منظور ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۲۹ فرد سالم با یکدیگر مقایسه شدند. **در یافته‌های این مطالعه در روش RT-PCR بین افراد سالم و بیمار از نظر میزان بیان ژن هیستون داستیلاز۱ تفاوت معنی داری مشاهده گردید.**

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک، سرطان مثانه، هیستون داستیلازها(HDACs)، مدیفیکاسیون هیستون‌ها

Abstract

The study of HDAC1 gene expression alteration in patients with Bladder cancer

Mojtaba Alivand

Bladder cancer is the fourth prevalent cancer in men and the ninth one in women. The most prevalent symptom of patients is the existence of blood in urine and the standard method for recognizing the bladder cancer is cystoscopy. In bladder tumors, genetic changes occur like changes in P21 gene, tumor suppressor gene of P53 and retinoblastoma gene that result in tumor progression to higher levels. Epigenetic changes are effective in bladder cancer. These changes include DNA methylation and histone modifications that involve at the process of tumorigenesis. Epigenetic changes in contrast to other genetic changes are hereditary and reversible that are effective on expression and function of gene without changes in sequence of nucleotide. Part of this impact is done by enzymes of histone deacetylase (HDAC). Deacetylation of histones by removing acetyl group from amino acid lysine at the end of histones leads to compression of chromatin structure and gene silencing. HDAC1 is member of first class histone deacetylase that increase of its expression in cancerous cells causes stimulation of reproduction, angiogenesis, apoptosis and loss of differentiation. In this study, RNA extraction was performed on samples then the expression of HDAC1 evaluated in human bladder cancer and control group using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This case-control study was conducted comparing 32 patients diagnosed with bladder cancer to 29 disease free control subjects. **Our findings suggest that the expression of histone deacetylase1 mRNA evaluated by real time PCR is significantly different in patients and controls group .**

Key words: Epigenetics, bladder cancer, Histonedeacetylase(HDAC), Histones modification

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ و میرمحسوب می‌شود. سرطان مثانه چهارمین سرطان شایع در مردان و نهمین در زنان است. بیماران مبتلا به سرطان مثانه در زمان تشخیص در سه گروه سطحی(۷۵٪)، با تهاجم به عضله(۲۰٪) و با تظاهرات متاستاتیک(۵٪) قرار می‌گیرند. سرطان مثانه بر پایه‌ی الگوی رشد به دوصورت اگزوفیتیک[1] و کارسینوما در محل[2]می‌باشند. تقریباً نیمی از تومورهای تهاجمی از ضایعات سطحی منشا می‌گیرند. تومورهای مثانه از نظر پاتولوژی در سه گرید[3] ارزیابی می‌شوند. گرید۱ به طور نادر به مراحل پیشرفته سیر می‌کند، اما گرید ۳ تمایل بالایی به این سمت دارد. بیش از ۹۵٪ تومورهای اروتلیال با منشأ درونی‌ترین سلول‌های پوششی دستگاه ادراری هستند. هماچوری(مشاهده‌ی خون در ادرار) در ۸۰ تا ۹۰٪ بیماران رخ می‌دهد که اغلب منعکس کننده‌ی تومورهای اگزوفیتیک است. انجام غربالگری در افراد با هماچوری میکروسکوپیک و بدون علائم همراه، تشخیص را در مراحل اولیه افزایش می‌دهد. سیستوسکوپی استاندارد طلایی برای تشخیص سرطان مثانه بوده وحساسیتی معادل۷۳٪دارد(Shah and McKiernan, 2004Roupret *et al.*, 2011). درمان اصلی در بیماران مبتلا به سرطان مثانه جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی یا ترکیب رادیوتراپی و شیمی درمانی است اما کارآیی این درمان‌ها راضی کننده نیست(Tanagho., 2010). تغییرات ژنتیکی شامل تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها بوده که در سطح DNA یا RNA اتفاق می‌افتد. آنالیزهای مولکولی ژنتیکی اشاره می‌کنند که در ضایعات تهاجمی و سطحی تومور مثانه، تغییراتی در طول مسیرهای منحصر به فرد مولکولی در سطح ژنوم سلول‌های سرطانی اتفاق می‌افتند که منجر به پیشرفت سرطان به مراحل بالاتر می‌شوند(Huang *et al.*, 2012). تغییرات در ژن سرکوب‌گر تومورp53 و یا پروتئین سرکوب‌گر تومور رتینوبلاستوم(Rb) در بیشتر مراحل سرطان مثانه مشاهده شده است که می‌تواند منجر به متاستاز، عود و مرگ در این بیماری گردد. تغییرات کروموزومی در این سرطان شامل از بین رفتن ماده ژنتیکی کروموزوم شماره‌ی ۹، موتاسیون در ژن سرکوب‌گر تومور p53 در تومورهای اولیه و مراجعه، حذف در کروموزوم ۱۱p حاوی پروتوانکوژن C-Ha-ras و حذف کروموزوم ۱۷p می‌باشند(Witt *et al.*, 2009Huang *et al.*, 2012). در پیدایش سرطان مثانه، تغییرات اپی ژنتیکی نیز علاوه بر تغییرات

[1] exophytic
[2]Carcinoma in situ
[3]grad

ژنتیکی موثر هستند(Jones *et al.*, 1998). این تغییرات شامل مواردی چون متیلاسیون DNA، مدیفیکاسیون هیستون‌ها و الگوهای تنظیمی Micro RNAها می‌باشند که همگی در فرآیند تومورزایی دخیل هستند(Witt *et* Jones *et al.*, 1998 ; *al.*, 2009). تغییرات اپی ژنتیکی، تغییرات ارثی و برگشت پذیری هستند که بدون ایجاد تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها، عملکرد و بیان آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بخشی از این اثرگذاری توسط هیستون داستیلازها(HDACs) انجام می‌گیرد. استیلاسیون هیستون‌ها اغلب با فرم باز شده ساختار کروماتین و رونویسی فعال ژن همراه است. استیلاسیون هیستون‌ها بوسیله آنزیم هیستون استیل ترانسفراز(HAT) صورت می‌گیرد که باعث استیله شدن هیستون‌ها و کاهش واکنش متقابل آن‌ها با DNA می‌گردد. متیلاسیون و داستیلاسیون هیستون‌ها منجر به فشرده شدن ساختار کروماتین شده و به خاموشی ژن منتهی می‌گردند(Bird, 2007). عمل داستیلاسیون توسط آنزیم‌های HDAC صورت می‌گیرد. آنزیم‌های هیستون داستیلاز با فعالیت خود گروه استیل را از آمینواسید لایزین در انتهای هیستون برمی‌دارند(Shogren-Knaak *et al.*, 2006).

در بسیاری از موارد، آنزیم‌های هیستون داستیلاز بخشی از یک کمپلکس Co-receptor Transcription هستند که روی تنظیم رونویسی ژن‌های سرکوب‌گر تومور اثر می‌گذارند. علاوه بر آن، اخیراً مشخص گردیده است که آنزیم‌های هیستون داستیلاز در تنظیم استیلاسیون و تنظیم فعالیت پروتئین‌های سیتوپلاسمی و فاکتورهای رونویسی نیز موثر هستند. در مطالعات انجام شده بر روی محیط کشت سلولی و با استفاده از تکنیک RNA interference، مشخص گردیده است که بیان ژن مولد آنزیم‌های HDAC در تحریک تکثیر و رگ‌زایی، مهاجرت، ممانعت از آپوپتوزیس، از دست رفتن تمایز و مقاومت به شیمی درمانی دخالت دارد(Glozak and Seto, 2007). تاکنون ۱۸ عضو از خانواده آنزیم‌های HDAC شناسایی شده‌اند که به چهار کلاس I، II، III، IV، تقسیم می‌شوند و کلاس II خود از دو بخش IIA و IIB تشکیل شده است. کلاس I، II و IV را آنزیم‌های هیستون داستیلازکلاسیک می‌نامند که ۱۱ عضو را شامل می‌شوند. همچنین اعضای کلاس III به نام سیرتوئین‌ها[1] خوانده می‌شوند. تفاوت بین HDACهای کلاسیک و سیرتوئین در مکانیسم‌های کاتالیتیک آن‌هاست. HDACهای کلاسیک آنزیم‌های وابسته به روی هستند ولی HDACهای کلاس ۳ آنزیم‌هایی هستند که برای عملکرد خود نیاز به کوفاکتور NAD^+ دارند. آنزیم‌های هیستون داستیلازکلاس I شامل HDAC 1, 2, 3, 8 می‌باشند. آنزیم‌های هیستون داستیلاز کلاس IIA

[1] sirtuin

شامل HDAC 4, 5, 7, 9 و آنزیم‌های هیستون داستیلازکلاس IIB شامل HDAC 6, 10 هستند. آنزیم‌های هیستون داستیلاز کلاس IV تنها شامل HDAC11 می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده بر روی مدل‌های حیوانی یا رده‌های سلولی، آنزیم‌های HDAC1, 2, 3, 8 در تحریک تکثیر، آنزیم‌های HDAC4, 6, 7, 10 در رگ‌زایی، آنزیم HDAC6 در مهاجرت، آنزیم‌های HDAC1, 2 در ممانعت از آپوپتوزیس، آنزیم های HDAC3, 4, 5, 8 در تمایززدایی وآنزیم HDAC1 در مقاومت به شیمی درمانی موثرهستند، لذا اعضای این خانواده نقشی اساسی در ایجاد سرطان و پیشرفت آن دارا بوده‌اند(de Ruijter *et al.*, 2003 Gregoretti *et al.*, 2004).با بررسی میزان بیان ژن مولد این آنزیم‌ها در انواع سرطان و مقایسه آن با سلول‌های غیرسرطانی و یافتن نقش و نحوه تاثیر آن‌ها بر روی بافت سرطانی، ممکن است امکان ایجاد اهداف درمانی و بالاخص دارویی جدید(با استفاده از مهارکننده‌های آن) در درمان سرطان فراهم گردد(Qu *et al.*, 2010Ozawa *et al.*, 2010).

۱-۱-اپیدمیولوژی

سرطان مثانه، نهمین سرطان شایع در کل جهان است که دوسوم تمام سرطان‌های مجاری ادراری را شامل می‌شود. سرطان مثانه چهارمین سرطان شایع در مردان و نهمین در زنان است و دومین سرطان شایع سیستم ادراری تناسلی می‌باشد(Jacobs *et al.*, 2010). در مردان میانسال و مسن سرطان مثانه دومین علت شایع بدخیمی پس از سرطان پروستات است(Pelucchi *et al.*, 2006). بروز سرطان مثانه در مردان ٤ برابر زنان و در سفیدپوستان ۲ برابر سیاه پوستان است. از نظر جغرافیایی، تفاوت‌های وسیعی در بروز سلول پوششی سطحی[1] مثانه بین کشورهای غرب اروپا و شمال آمریکا که بالاترین شیوع را دارند با کشورهای اروپای شرقی و آسیا که کمترین شیوع را دارند وجود دارد(Pelucchi *et al.*, 2006).

۱-۲-پاتولوژی سرطان مثانه

تقریبا ۹۰٪ تومورهای اپی تلیالی مثانه، سرطان سلول‌های پوششی دستگاه ادراری هستند و ۱۰٪ بقیه غیرپوششی یا مزانشیمال هستند(Sharma *et al.*, 2009). تومورهای سلول‌های پوششی از دو گروه عمده سطحی و مهاجم به عضله تشکیل شده‌اند. در بیش از ۷۵ ٪ بیماران، تظاهر ابتدائی بصورت تومورهای سطحی است. حدود ۸۰٪ تومورهای سطحی محدود به موکوس و ساب موکوس باقی می‌مانند. تومورهای مهاجم‌تر در ابتدای تظاهر تهاجم نشان می‌دهند و با نتیجه وخیم‌تری همراه

[1] urothelial

هستند. تومورهای سلول‌های پوششی بر طبق الگوی رشد(دو دسته پاپیلری[1] و توپر[2])، مهاجم یا غیر مهاجم بودن(مرحله بیماری[3]) و درجه تمایز تقسیم بندی می‌شوند. تومورها ممکن است منفرد یا متعدد باشند. اکثر نئوپلاسم‌های مثانه از نوع درونی‌ترین سلول‌های دستگاه ادراری می‌باشند. شایع‌ترین موارد متاستازدهنده به مثانه شامل ملانوما، لنفوما و تومورهای معده، پستان، کلیه و ریه می‌باشند(Cheng *et al.*, 2009).

۱-۳- انواع سرطان مثانه

۱-۳-۱- سرطان سلول‌های موجود در درونی‌ترین لایه پوششی دستگاه ادراری(TCC)[4]

شایع‌ترین سرطان مثانه، سرطان سلول پوششی(TCC) است که ۹۰٪ سرطان مثانه را شامل می‌شود. شایع‌ترین نوع سرطان سلول پوششی، نوع اگزوفیتیک (پاپیلاری[5]) است. بیش از ۷۵٪ درصد موارد این بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده می‌شود(در مرحله Ta و T1). ۵۰٪ بیماران مبتلا به سرطان که در مراحل پیشرفته تشخیص داده شده‌اند(T2یا بیشتر) دچار متاستاز می‌گردند(Crawford, 2008).

۱-۳-۲- سرطان‌های غیر پوششی

۱-۳-۲-۱- سرطان سلول‌های غده‌ای مترشحه[6]

آدنوکارسینوما مثانه کمتر از (۲٪) تومورهای مثانه را تشکیل می‌دهد. ممکن است پیش از ایجاد سیستیت[7](عفونت مثانه) و متاپلازی[8] وجود داشته باشد(Cheng *et al.*, 2009).

[1]Papillary
[2]solid
[3]Grad
[4]Transitional cell carcinoma(TCC)
[5]papillary
[6]Adeno carcinoma
[7]cystits
[8]Metaplasia

۱-۳-۲-۲- سرطان سلول‌های سنگ فرشی[1]

SCC یک نئوپلاسم بدخیم مشتق شده از اپیتلیوم سنگ فرشی مثانه است که ۵-۱۰٪ سرطان مثانه را شامل می‌شود و به طور معمول با تاریخچه عفونت مزمن و سنگ مثانه همراه است. SCC می‌تواند با عفونت شیستوزومیا هماتوبیوم[2] نیز همراه باشد(Kallioniemi *et al.*, 1992Gryseels, 2012).

۱-۳-۲-۳- سرطان مختلط

ترکیبی از سرطان پوششی دستگاه ادراری و سرطان سنگ فرشی است(Crawford, 2008).

۱-۳-۲-٤-تومورهای متاستاتیک

شایع‌ترین تومورهایی که به مثانه متاستاز می‌دهند به ترتیب شامل ملانوم، لنفوم، سرطان معده، سینه، کلیه و ریه می‌باشد(Crawford, 2008).

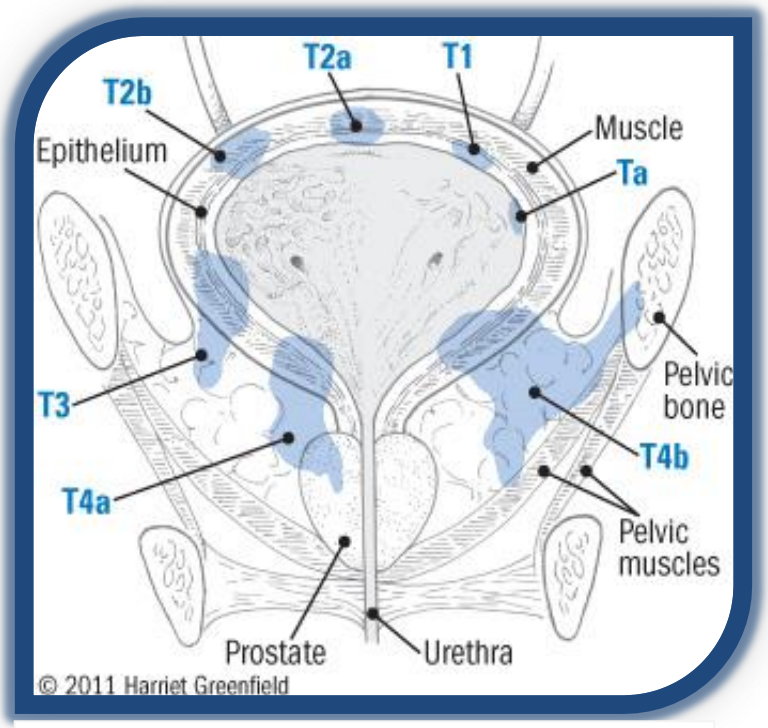
۱-٤- علائم و نشانه‌های بالینی

از نشانه‌های بالینی در سرطان مثانه می‌توان مشاهده خون در ادرار (۹۰-۸۵ ٪)، علائم تحریکی مثانه از قبیل تکرر[3]، فوریت[4] و سوزش ادرار[5] و درد استخوانی و پهلو ناشی از متاستاز را نام برد. اغلب در معاینه یافته‌ای وجود ندارد مگراینکه گسترش تومور زیاد باشد و به صورت توده قابل لمس شود(Matalka *et al.*, 2008).

[1]Squamous cell carcinoma
[2]Schistosoma haematobium
[3]Frequency
[4]Urgency
[5]Dysuria

۱-۵- مرحله بندی تومور:

برای مرحله‌بندی سرطان مثانه از سیستم تومور، گره لنفی، متاستاز TNM استفاده می‌شود و برنامه درمانی بستگی به تهاجم تومور به عضلات و گسترش آن به گره‌های لنفی یا نواحی دوردست دارد. مرحله تومور(stage)، مهم‌ترین متغیر مستقل پیش‌گویی کننده[1] در پیشرفت بیماری و بقای کلی بیمار در سرطان مهاجم مثانه است(Cheng *et al.*, 2009).



شکل ۱-۱- مرحله بندی تومور
(WWW.Harvard Health Publications.,2011)

CIS: محدود به اپیتلیوم- دیس پلازی با درجه بالا

TA: پاپیلاری، تومور محدود به اپیتلیوم

T1: تومور مهاجم به لامینا پروپریا

T2: تومور مهاجم به موسکولاریس پروپریا

T3: تومور درگیر کننده چربی اطراف مثانه

T4a: تومور درگیرکننده ارگان‌های مجاور مثانه از قبیل پروستات و قسمت انتهایی روده بزرگ

T4b: تومور چسبنده به شکم یا لگن

+N: گسترش به گره لنفاوی لگن

+M: گسترش به گره لنفاوی یا ارگان‌های دوردست

۱-۶- درمان:

بطور خلاصه در درمان تومورهای سطحی از برداشتن با اندوسکوپ و درمان داخل مثانه‌ای(اغلب با BCG[2])، در درمان موارد مهاجم از برداشتن مثانه[1] با یا بدون شیمی درمانی سیستمیک و در درمان انواع متاستاتیک از شیمی درمانی تسکینی یا قطعی با یا بدون جراحی استفاده می‌شود(Gomella *et al.*, 2001).

[1] prognostic
[2] Bacillus Calmette-Guerin