



بررسی تاثیر پلی مورفیسم rs137852585 بر پاسخ سرطان پروستات به درمان با داروی انزالوتامید

مرجان حسینی: کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
حسین سازگار: استادیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (نویسنده مسئول). h.sazgar@iaushk.ac.ir
نوشا ضیاء چهرمی: استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

مقاومت دارویی،
سرطان پروستات،
پلی مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی،
داکینگ

زمینه و هدف: گیرنده‌ی آندروژن، به خانواده‌ی فاکتورهای رونویسی گیرنده‌ی هورمون‌های استروئیدی تعلق دارد و بر اساس مطالعات انجام شده، جهش‌های تک نوکلئوتیدی موجود در ساختار این پروتئین می‌توانند بر عملکرد و پاسخ آن به داروهای مهارتی تأثیر بگذارند. بر همین مبنا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی rs137852585 موجود در ژن کد کننده گیرنده‌ی آندروژن، بر پاسخ این اشکال به درمان با انزالوتامید و مطالعه‌ی فراوانی آن در جمعیت ایرانی است.

روش کار: در این پژوهش موردی - شاهدی خون محیطی به میزان ۱۰ میلی لیتر از ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پروستات و ۵۰ فرد سالم گرفته شد. سپس DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج و جداسازی شد. برای بررسی وجود پلی مورفیسم مورد نظر از تکنیک ARMS-PCR و تعیین توالی مستقیم استفاده شد و داده‌های آزمایشگاهی به دست آمده با استفاده از پایگاه محاسبات آماری SISA و آزمون دقیق فیشر تجزیه و تحلیل شد. از سوی دیگر برای بررسی اثر جهش بر روی عملکرد گیرنده آندروژن از تکنیک داکینگ و نرم افزار اتوداک ۴.۲ استفاده شد و در نهایت تعیین فراوانی آلی، درجه هتروزیگوسیتی و بررسی وجود تعادل هاردی - وینبرگ با استفاده از سرور محاسباتی Genepop انجام شد و به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج از سرور SISA و آزمون دقیق فیشر استفاده شد ($p < 0.05$).

یافته‌ها: بررسی‌ها نشان دادند فراوانی آلی برای rs137852585 برای آلل جهش یافته در بیماران مبتلا به سرطان پروستات (۰/۲۴) نسبت به افراد سالم (۰/۰۸) افزایش یافت ($p=0.003$). از سوی دیگر بررسی نتایج داکینگ نشان داد که جهش در ساختار گیرنده آندروژن از لحاظ ترمودینامیکی فرایند اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن را نامطلوب ساخت. همچنین آنالیزهای جمعیتی نشان داد که این مارکر در جمعیت ایرانی در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشت.

نتیجه گیری: وجود چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با تغییر در جایگاه فعال گیرنده آندروژن باعث ایجاد مقاومت به داروی انزالوتامید می‌شوند. از سوی دیگر وجود آلل جهش یافته rs137852585 می‌تواند موجب افزایش احتمال ابتلا به سرطان پروستات گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منع حمایت کننده: دانشگاه آزاد شهرکرد

شیوه استناد به این مقاله:

Hoseini M, Sazgar H, Zia-Jahromi N. The effect of rs137852585 polymorphism on the response of prostate cancer to treatment with enzalutamide. Razi J Med Sci. 2019;26(10):19-27.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

The effect of rs137852585 polymorphism on the response of prostate cancer to treatment with enzalutamide

Marjan Hoseini, MSc, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Hosein Sazgar, PhD, Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (*Corresponding author). h.sazgar@iaushk.ac.ir

Noosha Zia-Jahromi, PhD, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Background: The androgen receptor belongs to the family of transcription factors of the steroid hormones receptor, and according to studies, single nucleotide mutations in the structure of this protein can affect its function and response to inhibitory drugs. In regard this purpose of this study was to investigate the effect of the single-nucleotide polymorphism rs137852585 presence in the androgen receptor-encoding gene on the response of this form to treatment with enzalutamide and to study its frequency in Iranian population.

Methods: In this case-control study, 10 ml peripheral blood was taken from 50 prostate cancer patients and 50 healthy people. Then the genomic DNA of the samples was extracted and isolated. ARMS-PCR and direct sequencing were used to determine the presence of polymorphism and the data were analyzed using SISA statistical database and Fisher's exact test. On the other hand, to evaluate the effect of mutation on the function of the androgen receptor, the Docking technique and the Autodock 4.2 software were used. Finally, determination of the allele frequency, heterozygosity and the investigation of the existence of Hardy-Weinberg equilibrium were performed using the Genepop computational server.

Results: Investigations showed that the allele frequency for rs137852585 increased for mutated allele in patients with prostate cancer (0.24) compared to healthy subjects (0.08) ($p=0.003$). On the other hand, reviewing the results of Docking showed that mutation in the androgen receptor structure makes enzalutamide-androgen receptor interactions thermodynamically undesirable. Demographic analyzes showed that this marker is at the Hardy-Weinberg equilibrium in the Iranian population ($p>0.05$).

Conclusion: The presence of single nucleotide polymorphisms induces resistance to enzalutamide by altering the active site of the androgen receptor. On the other hand, the presence of mutant allele of rs137852585 could increase prostate cancer risk.

Conflicts of interest: None

Funding: Islamic Azad University Shahrekord Branch

Keywords

Drug resistance,
Prostate cancer,
Single nucleotide
polymorphism,
Docking

Received: 13/07/2019

Accepted: 30/11/2019

Cite this article as:

Hoseini M, Sazgar H, Zia-Jahromi N. The effect of rs137852585 polymorphism on the response of prostate cancer to treatment with enzalutamide. Razi J Med Sci. 2019;26(10):19-27.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).



هستند که شامل آندروژن‌ها، استروژن‌ها و پروژسترون می‌باشند و به وسیله‌ی غده‌ی هیپوفیز تنظیم می‌شوند (۵ و ۶). هورمون‌های استروئیدی جنسی از طریق اتصال به گیرنده‌های هم‌ریشه خود، از قبیل گیرنده‌ی آندروژن و گیرنده‌های استروژن در سلول‌های هدف عمل می‌کنند (۷).

هورمون‌های آندروژنی (Androgen) با اتصال به گیرنده‌های آندروژنی خود باعث تحریک، کنترل، توسعه و یا نگهداری خصوصیات مردانگی در مهره‌داران می‌شوند. آندروژن سبب فعالیت اجزای اندام‌های جنسی نر و توسعه صفات جنسی ثانویه در مردان نیز می‌شود. برخی ترکیبات آندروژنیک به صورت طبیعی در بدن خانم‌ها نیز تولید می‌شود که افزایش تولید آن‌ها در برخی بیماری‌ها روی می‌دهد (۸).

ژن آندروژن رسپتور برروی کروموزوم Xq11-12 واقع شده است و شامل هشت اگزون می‌باشد. این ژن چهار موتیف عملکردی را کد می‌کند که شامل دومین انتهایی آمینی، دومین باند شونده به DNA (DNA binding domain)، ناحیه‌ی لولا و یک دومین اتصال به لیگاند می‌باشد (۹). آندروژن در حفظ فرآیند اسپرم‌زایی و بلوغ اسپرم‌ها ضروری است و سبب فعالیت اجزای اندام‌های جنسی نر و توسعه صفات جنسی ثانویه در مردان نیز می‌شود (۱۰). اختلال در رشد هورمون جنسی مردانه در انسان به دلیل نقص در آندروژن و گیرنده‌ی آن می‌باشد و تغییرات فنوتیپی ایجاد شده در گیرنده‌ی آن می‌تواند بدن را به سمت سرطانی شدن پیش ببرد (۱۱).

جهش‌های ایجاد شده در ژن گیرنده‌ی آندروژن عموماً با افزایش اندازه‌ی تکرار پشت سر هم کدون‌های مختلف همراه هستند که باعث بزرگ شدن تکرارهای کدون در ژن گیرنده‌ی آندروژن می‌گردد و احتمالاً ایجاد اختلال در بدن و سرطان به همین دلیل می‌باشد (۱۲). اخیراً انواع متعددی از جابه‌جایی‌های منفرد آمینواسیدهای تشکیل دهنده‌ی ساختمان گیرنده‌ی رسپتور آندروژن معرفی شده‌اند که می‌توانند بر عملکرد این پروتئین و نیز پاسخ آن به داروهای مهارتی تأثیر

پروستات غده‌ای در سیستم تناسلی مردان است و وظیفه‌ی اصلی آن تولید منی (مایعی حاوی اسپرم) می‌باشد. این غده بزرگ‌ترین غده ضمیمه (Accessory gland) دستگاه تناسلی مردان است که مجاری ادراری را در گردن مثانه احاطه می‌کند و در زیر مثانه و اطراف مجرای خروجی مثانه قرار دارد. وزن این غده در هنگام تولد چند گرم می‌باشد و در بیست سالگی به حدود بیست گرم می‌رسد. ترشح پروستات مایعی یکنواخت و کمی اسیدی (pH=۶/۶) خواهد بود و حاوی مقادیر کم پروتئین (کمتر از ۱ درصد) می‌باشد (۱). سرطان پروستات دومین سرطان متداول در بین مردان در جهان است. در سال ۲۰۰۷، ۷۸۲/۶۰۰ مورد جدید و ۲۵۴/۰۰۰ مرگ گزارش شد (۲).

سرطان پروستات ناشی از یک تومور بدخیم در سیستم ادراری همراه با خصوصیات زیست-ژنتیکی می‌باشد و میزان وقوع آن در آمریکا و اروپا بسیار بالا است (۳). علاوه بر نقش مهم عوامل ژنتیکی، عواملی مثل سن، نژاد و سابقه‌ی خانوادگی در بروز این سرطان تأثیرگذار می‌باشند. در میان عوامل نژادی و ژنتیکی مؤثر در بروز و پیشرفت این بیماری، تمرکز روزافزون بر نقش پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (Single-SNP - Nucleotide Polymorphism) در توسعه، پیش‌بینی و تشخیص این سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است. SNP‌ها تغییرات تک‌بازی هستند که در یک جایگاه ویژه در DNA ژنومی در بخشی از یک جمعیت بزرگ رخ می‌دهند. این پلی‌مورفیسم‌ها در سراسر ژنوم پراکنده‌اند و می‌توان گفت SNP‌ها شایع‌ترین نوع تنوع توالی DNA در ژنوم انسان هستند. گروهی از SNP‌ها در خارج ژن‌ها اتفاق می‌افتند، بنابراین بر عملکرد پروتئین‌ها بی‌تأثیر می‌باشند، در مقابل گروهی از آن‌ها بر عملکرد پروتئین‌ها تأثیرگذار هستند. با این حال نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که هر دو گروه در ارتباط با بیماری‌ها و پاسخ بیمار بر دارو و درمان نقش دارند (۴).

هورمون‌های جنسی، طبقه‌ی خاصی از استروئیدها

بگذارند (۱۳).

rs137852585 از جمله چند شکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در ناحیه‌ی کد کننده‌ی گیرنده‌ی آندروژن می‌باشند. در چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی rs137852585 جهش بد معنی سبب تبدیل اسید آمینه‌ی لوسین (Leucien) به آرژنین (Arginine) می‌شود (۱۴).

داروی انزالوتامید (Enzalutamide) یک مهارکننده‌ی گیرنده‌ی آندروژن رسپتور است که نسبت به داروهای دیگر، تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده‌ی آندروژن رسپتور نشان می‌دهد، اما از جایجایی هسته‌ای آندروژن رسپتور، اتصال به DNA و از جذب شدن توسط کمک فعال کننده‌ها جلوگیری می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که جهش در آندروژن رسپتور می‌تواند باعث مقاومت دارویی نسبت به انزالوتامید شود. برای مثال، وقتی جهش F876L در آندروژن رسپتور رخ دهد، انزالوتامید به عنوان یک آگونیست (Agonist) تشخیص داده می‌شود و مقاومت دارویی در محیط داخل بدن رخ خواهد داد (۱۵).

در این پژوهش سعی بر آن است تا تأثیر این چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی، بر پاسخ این اشکال به داروی انزالوتامید مورد بررسی قرار گیرد. به علاوه در این مطالعه فراوانی این چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی نیز در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

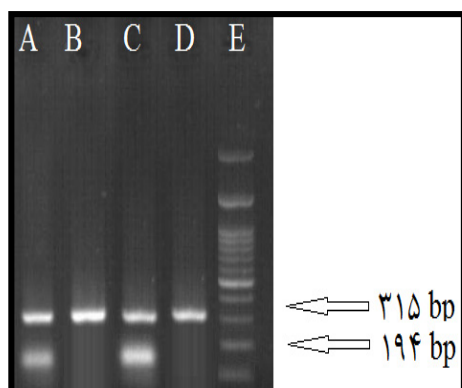
روش کار

جمع آوری نمونه: در مطالعه موردی - شاهدهی حاضر برای جمع‌آوری نمونه‌های خون، به میزان ۱۰ میلی لیتر خون از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد اخذ شد. این نمونه‌ها از بیمارستان‌های امید و الزهرا در استان اصفهان و همچنین بیمارستان کاشانی در شهرکرد در بازه زمانی دی ماه ۱۳۹۵ تا مرداد ماه ۱۳۹۶ پس از اخذ رضایت نامه شفاهی گرفته شد. به علاوه به علت حضور پلی مورفیسم بر روی کروموزوم جنسی، جهت انجام آنالیزهای جمعیتی به میزان ۱۰ میلی لیتر خون از ۲۵ نفر زن به صورت تصادفی گرفته شد. نمونه‌های خون درون لوله‌های که حاوی EDTA با غلظت ۵ درصد ریخته شد. لوله‌های حاوی نمونه‌های خون، جهت سالم

ماندن روی یخ گذاشته شدند و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به فریزر انتقال و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به علاوه این مطالعه با شماره IR.IAU.SHK.REC.1398.016 مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد قرار گرفت.

جهت طراحی پرایمرهای مورد نظر در این پژوهش ابتدا توالی ژن هدف از بانک‌های اطلاعاتی به دست آورده شد. بعد از مشخص کردن جایگاه این چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی در توالی ژن، پرایمرها توسط برنامه آنالیز PRIMER1 طراحی شدند و سپس توسط نرم‌افزار GeneRunner این پرایمرها از نظر دمای اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند و به منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن با قسمت‌های دیگر ژنوم از برنامه BLAST استفاده گردید و پرایمرهای مورد استفاده سفارش داده شد.

در ادامه جهت استخراج DNA از خون از کیت استخراج DNA سیناژن ساخت کشور ایران استفاده شد و سپس بررسی کیفی و کمی نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. برای بررسی واریانت‌های مختلف پلی‌مورفیسم rs137852585 از آنالیز ARMS-PCR استفاده شد. این روش تحت عنوان تکثیر اختصاصی آل‌ها با PCR نیز نامیده می‌شود که جهت تشخیص موتاسیون‌های نقطه‌ای به کار می‌رود. در ARMS-PCR دو واکنش PCR با استفاده از یک DNA الگو در دو ویال جداگانه انجام شد که یکی از آن‌ها حاوی پرایمر جهش یافته و دیگری حاوی پرایمر طبیعی بود و در هر واکنش پرایمرهای مشترک به همراهی یکی از دو پرایمر اختصاصی آل مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز ARMS-PCR برای حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR 1X، ۰/۲۵ میکرو لیتر Taq DNA پلیمرز، ۰/۷۵ میکرو لیتر (۵۰ میلی مول) MgCl₂، ۰/۵ میکرو لیتر (۱۰ میلی مول) dNTP، ۲/۵ میکرو لیتر پرایمر (Mix F& R 100PMol/ μl)، ۲ میکرو لیتر پرایمر فوروارد داخلی، ۲ میکرو لیتر DNA الگو و ۱۴/۵ میکرو لیتر آب دیونیزه صورت پذیرفت. جهت انجام PCR واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ سیکل PCR شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰



شکل ۱- بررسی نتایج PCR (پلی مورفیسم تکنوکلوتیدی rs137852585). چاهک A: پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و هم‌چنین پرایمر پیشرو داخلی سالم، چاهک B: پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و هم‌چنین پرایمر پیشرو داخلی جهش یافته، چاهک C: پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و هم‌چنین پرایمر پیشرو داخلی سالم، چاهک D: پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و هم‌چنین پرایمر پیشرو داخلی جهش یافته، چاهک E: مارکر (100bp).

rs137852585 مطابق شکل ۱ مشاهده شد. بررسی نتایج ARMS-PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که از بین ۵۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان پروستات ۱۲ نفر دارای واریانت جهش یافته برای rs137852585 بوده و ۳۸ نفر فاقد واریانت جهش یافته بودند. از سوی دیگر در افراد سالم ۴ نفر دارای واریانت جهش یافته برای پلی مورفیسم rs137852585 بوده و ۴۶ نفر فاقد واریانت جهش یافته بودند.

لازم به ذکر است که به دلیل قرار داشتن توالی گیرنده آندروژن بر روی ژن وابسته به جنس، بررسی میزان هتروزیگوتی و سایر آنالیزهای جمعیتی با استفاده از نمونه خون زنان انجام شد. نتایج بررسی جمعیت زنان مورد مطالعه نشان داد که برای rs137852585 تعداد ۱۸ نفر هموزیگوت طبیعی، ۲ نفر هموزیگوت جهش یافته و ۵ نفر هتروزیگوت بودند.

نتایج داکینگ: الف) اتصال انزوتامید به گیرنده آندروژن‌های جهش یافته: نتایج داکینگ انزوتامید با گیرنده آندروژن‌های جهش یافته حاکی از تغییر محل اتصال انزوتامید به گیرنده آندروژن و در نتیجه مقاومت گیرنده آندروژن جهش یافته‌ی rs137852585 به داروی انزوتامید می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳). از سوی دیگر با تغییر جایگاه اتصال انزوتامید در گیرنده آندروژن جهش یافته، اسیدآمین‌های درگیر در برهمکنش با انزوتامید تغییر می‌کنند و مشابهت کمی در الگوی

ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه صورت پذیرفت و در نهایت گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و نتایج حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

علاوه بر مطالعات تجربی، جهت بررسی ماهیت برهمکنش و بررسی میزان تمایل واریانت‌های مختلف گیرنده آندروژن به داروی انزوتامید از تکنیک محاسباتی داکینگ استفاده شد. محاسبات داکینگ در این پژوهش توسط نرم افزار AutoDock 4.2 و AutoDockTools 4.2 انجام شد. الگوریتم ژنتیک لامارک برای جستجوی سطح گیرنده مورد استفاده قرار گرفت. در هر یک از مدهای داکینگ تعداد ۲۰۰ اجرا گذاشته شد که در آن فاکتور جمعیت اولیه در جستجو بر پایه‌ی الگوریتم ژنتیک برابر ۱۵۰ بود و در مجموع ۲۷ هزار ساختار برای محاسبات ساخته شد. نهایتاً نمای اتصال لیگاند به گیرنده و اتصالات هیدروژنی و هیدروفوبی توسط نرم افزار لیگ پلات نمایش داده شد. برای آماده سازی ساختار گیرنده آندروژن، ساختار گیرنده آندروژن با کد دسترسی 2AXA از پایگاه اطلاعاتی پروتئین PDB (www.pdb.org) دریافت شد. در ادامه با استفاده از وب سرور Rosetta backrub با ایجاد جهش در اسیدآمین‌های لوسین ۷۰۸ و تبدیل آن به آرژنین ساختار پلی مورفیسم تک نوکلوتیدی به شماره rs137852585 و آماده سازی لیگاند ساختار داروی انزوتامید با استفاده از وب سرور DrugBank (www.drugbank.ca) به دست آمد و سپس ساختار برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفته شد.

در نهایت برای تعیین میزان فراوانی آلی، درجه هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی-وینبرگ از سرور GenePop و به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج از سرور SISA و آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

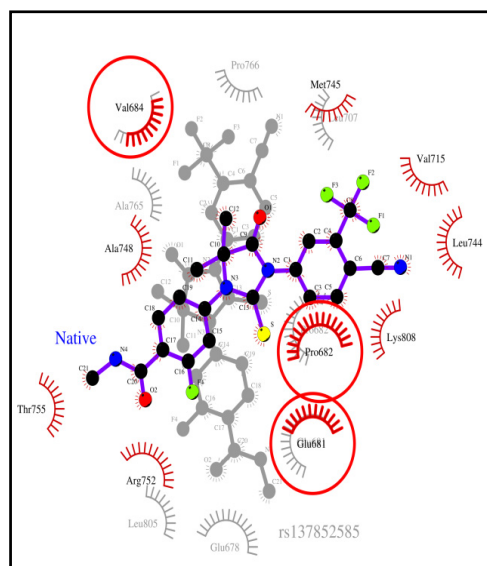
یافته‌ها

در این مطالعه نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از تکنیک ARMS PCR تکثیر شد، محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد و نتایج حاصل از آن به صورت باندهایی با طول ۳۱۵ و ۱۹۴ برای

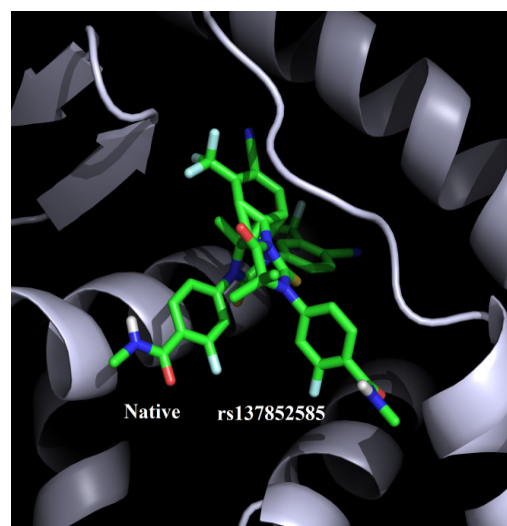
آنالیزهای جمعیتی: برای تعیین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و بررسی وجود تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه از سرور GeNePOP استفاده شد که این سرور به صورت آنلاین بوده و اطلاعات خواسته شده به این سرور داده می شود و نتایج حاصل از آن مورد بررسی قرار می گیرد. فراوانی آللی به دست آمده برای rs137852585 در جمعیت تصادفی زنان ۰/۸۲ برای آلل طبیعی و ۰/۱۸ برای آلل جهش یافته به دست آمد. از سوی دیگر بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای پلی مورفیسم مذکور نشان داد که واریانت های rs137852585 برای جامعه مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارند ($P.Val=0/28$). از سوی دیگر بررسی میزان هتروزیگوسیتی برای پلی مورفیسم rs137852585 در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم برابر با ۲۰ درصد می باشد که از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار کمتر است. در جدول ۳ میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای پلی مورفیسم rs137852585 نشان داده شده است.

به علاوه با توجه به وجود تعادل هاردی واینبرگ مقدار PIC برای پلی مورفیسم rs137852585 مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی حداکثر مقدار PIC برای پلی مورفیسم های دو آللی برابر با ۰/۳۷۵ می باشد. این در حالی است که مقادیر PIC بزرگ تر از ۰/۲۵ به عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن پلی مورفیسم در جامعه مورد مطالعه در نظر گرفته می شود. نتایج این بررسی نشان داد مقدار PIC برای پلی مورفیسم rs137852585 برابر با ۰/۲۵۱۶ است. بنابراین این پلی مورفیسم به عنوان یک مارکر گویا با اطلاع دهندگی بالا در جامعه آماری مورد مطالعه مطرح است.

مقایسه فراوانی ماکرها در گروه سالم و بیمار: بررسی فراوانی آللی برای واریانت های مختلف rs137852585 در بیماران مبتلا به سرطان پروستات و افراد سالم نشان داد که در افراد سالم فراوانی آللی برای آلل طبیعی ۰/۹۲ و برای آلل جهش یافته ۰/۰۸ و در بیماران مبتلا به سرطان پروستات فراوانی آللی برای آلل طبیعی ۰/۷۶ و برای آلل جهش یافته ۰/۲۴ می باشد و می توان با درجه اطمینان ۹۵ درصد بیان کرد که میزان



شکل ۲- برهمکنش گیرنده آندروژن جهش یافته و سالم با داروی انزالتامید (rs137852585)



شکل ۳- برهمکنش گیرنده آندروژن جهش یافته و سالم با داروی انزالتامید (rs137852585)

پراکنش اسیدآمینه های درگیر در گیرنده آندروژن طبیعی و گیرنده آندروژن جهش یافته وجود داشت. (ب) مقایسه انرژی اتصال انزالتامید به گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته: نتایج داکینگ انزالتامید به گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته در جدول ۲ نمایش داده شده است. این نتایج نشان می دهد که جهش در ساختار گیرنده آندروژن موجب مثبت شدن انرژی اتصال انزالتامید به گیرنده آندروژن می گردد.

جدول ۲- نتایج داکینگ انزالوتامید و گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته

ساختار	انرژی غیر اتصال	انرژی زاویه دو وجهی	انرژی درونی	انرژی درون مولکولی	ΔG باندینگ (کیلو کالری بر مول)
AR	-۱/۰۶	۱/۱۹	-۱/۰۶	-۹/۴۴	-۸/۲۵
rs137852585	-۱/۰۳	۱/۱۹	-۱/۰۳	-۶/۷۶	-۵/۶

جدول ۳- میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار rs137852585

هموزیگوسیتی		هتروزیگوسیتی	
مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
۰/۲۰	۰/۳۰۲	۰/۸۰	۰/۶۹۸

دارای میزان هتروزیگوسیتی پایینی است. در نهایت آنالیزهای بیوانفورماتیکی با بررسی مکانیسم تأثیر جهش بر روی اتصال انزالوتامید بر گیرنده‌ی آندروژن نشان داد که جهش ایجاد شده می‌تواند باعث تغییر الگوی اتصال و کاهش انرژی اتصال داروی انزالوتامید به گیرنده‌ی آندروژن گردد.

بررسی سایر مطالعات انجام شده در رابطه با نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف در بروز مقاومت‌های دارویی نشان می‌دهد که بسیاری از جهش‌ها می‌توانند به خوبی مانع از انجام عملکرد صحیح دارو شده و مقاومت دارویی ایجاد نمایند به عنوان مثال در سال ۲۰۱۳ چنگ و همکاران دریافتند که در ایجاد مقاومت به انزالوتامید SNP ها نقش به‌سزایی را ایفا می‌کنند برای نمونه ژن HSD3B1 که بیان محیطی ایزوآنزیم (3 β HSD1) را کد می‌کند دارای یک SNP ژرم‌لاین در موقعیت ۱۲۴۵ است که در آن A به C تبدیل می‌شود و آسپارازین را با ترئونین در موقعیت ۳۶۷ اسید آمینه‌ی 3 β HSD1 مبادله می‌کند و در ایجاد مقاومت دارویی در برابر داروی انزالوتامید نقش دارد (۱۶). در سال ۲۰۱۲ اسپر و همکاران در مطالعات خود روی ژن آندروژن دریافتند که بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به اخته که تحت درمان با داروی انزالوتامید قرار گرفته‌اند بعد از شیمی‌درمانی شانس بقای آن‌ها تا ۳۷ درصد افزایش خواهد یافت (۱۴). در سال ۲۰۱۲ گراسو و همکاران به بررسی جهش‌های W741C, T877A, L701H, H874Y در ایجاد مقاومت دارویی در گیرنده آندروژن پرداختند آن‌ها دریافتند که این جهش‌ها در مقاومت دارویی نقش مهمی دارند (۱۷). در سال ۲۰۱۵ پنینگ دریافت که سرطان پروستات پیشرفته‌ی مقاوم به اخته که در اثر بیان بیش از اندازه‌ی ژن گیرنده‌ی

فراوانی آلل جهش یافته برای این پلی‌مورفیسم در گروه بیمار به صورت معناداری افزایش پیدا کرده است ($p=0/003$).

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر شناخته شده در جهان شناخته می‌شود و از تقسیم نامتقارن سلول‌های بدن ایجاد می‌گردد. سلول‌های سرطانی از ساز و کارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا می‌افتند و علت دقیق این پدیده نامشخص است ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا مواردی که موجب اختلال در فعالیت سلول‌ها می‌شوند در هسته سلول اشکال وارد کنند. با توجه به کاربرد فراوان داروهای شیمیایی در درمان سرطان و بروز مقاومت دارویی در برابر بسیاری از انواع داروهای مورد استفاده، شناسایی عوامل درگیر در بروز این نوع مقاومت‌های دارویی اهمیت زیادی دارد. یکی از مهم‌ترین عوامل درگیر در مقاومت دارویی بسیاری از سرطان‌ها، تنوعات ژنتیکی موجود در ژنوم افراد است. علاوه بر آن بررسی میزان شیوع چندشکلی‌های تکنوکلوتیدی مؤثر در بروز مقاومت دارویی، می‌تواند به هدفمند نمودن داروهای مورد استفاده در درمان سرطان پروستات در جمعیت ایرانی کمک نماید. با توجه به موارد ذکر شده این مطالعه با هدف بررسی تأثیر چند شکلی تکنوکلوتیدی rs137852585 موجود در ژن کد کننده گیرنده‌ی آندروژن بر پاسخ به درمان با انزالوتامید طراحی و اجرا شد. نتایج حاصل حاکی از افزایش معنادار فراوانی آللی برای آلل جهش یافته در گروه بیمار بود. به علاوه آنالیزهای جمعیتی نشان داد که این پلی‌مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشته و

3. Zhai XL, Qu XW, Guo L, Ha QH. Correlation study between the polymorphism of repetitive sequence in gene CAG of androgen receptor and the occurrence and progression of prostate cancer. *Asian Pac J* 2014;7(4):301-4.

4. Allard P, Atfi A, Landry F, Chapdelaine A, Chevalier S. Estradiol activates p60src, p53/56lyn and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 126(1):25-34.

5. Lavery DN, Bevan CL. Androgen receptor signalling in prostate cancer: the functional consequences of acetylation. *Biomed Res Int* 2011;23(2):43-55.

6. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, Moo-Young AJ. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 2000; 63(2):368-76.

7. Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004;131(2):459-67.

8. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Human mutation* 2004;23(6):527-33.

9. Van den Broeck T, Joniau S, Clinckemalie L, Helsen C, Prekovic S, Spans L, et al. The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. *Biomed Res Int* 2014;23(1):12-15.

10. Boisselle A, Tremblay RR. New therapeutic approach to the hirsute patient. *Fertil Steril* 1979; 32(3):276-9.

11. Ober KP, Hennessy JF. Spironolactone therapy for hirsutism in a hyperandrogenic woman. *Ann Intern Med* 1987;89(5_Part_1):643-4.

12. Janne OA, Bardin W. Androgen and antiandrogen receptor binding. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; 46(1):107-18.

13. Kagawa C. Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with an orally active steroidal spiro lactone. *Endocrinology* 1960;23(34):67125-32.

14. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *NEJM* 2012;367(13):1187-97.

15. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D. et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer discovery* 2013;43(1):43-45.

آندروژن است می‌تواند با داروی انزالوتامید و ابیراترون استات کنترل شود (۱۸) در سال ۲۰۱۵ لابی دریافت انزالوتامید و ابیراترون هیدروکسیلاز دو داروی مهم در کاهش یا مهار گیرنده‌های آندروژنی هستند و می‌تواند باعث کنترل سرطان پروستات در دراز مدت و هم‌چنین درمان سرطان پروستات قبل از متاستاز شود (۱۹). در سال ۲۰۱۵ بامبوری و همکاران دریافتند که انزالوتامید و ابیراترون از جمله داروهای مؤثر در جهت مهار یا کاهش گیرنده‌های آندروژنی در حال حاضر به حساب می‌آید و می‌تواند نقش مهمی در درمان سرطان پروستات داشته باشد (۲۰). در نهایت در سال ۲۰۱۶ ابیناتا و همکاران دریافتند (ABHD2 Abhydrolase domain containing) که ژن گیرنده‌ی آندروژنی است نقش مهمی را در سرطان پروستات ایفا می‌کند و بیان این ژن می‌تواند باعث پیشرفت سرطان پروستات شود (۲۱).

مطالعه‌ی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در گیرنده‌ی آندروژن نشان داد که این چندشکلی می‌تواند باعث مقاومت دارویی به انزالوتامید در سرطان پروستات می‌شود. بنابراین بررسی فراوانی‌های آللی برای پلی مورفیسم rs137852585 موجود در ژن گیرنده آندروژن در بیماران مبتلا به سرطان پروستات می‌تواند در انتخاب داروی شیمی درمانی مناسب برای این بیماران بسیار کمک کننده باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می‌باشد. همچنین از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References

1. Kumar V, Majumder P. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol* 1995;27(3):231-43.
2. Crawford ED. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* 2009;73(5):S4-S10.

16. Chang KH, Li R, Kuri B, Lotan Y, Roehrborn CG, Liu J, et al. A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell* 2013;154(5):1074-84.
17. Grasso CS, Wu, YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2012;487(7406):239.
18. Penning TM. Mechanisms of drug resistance that target the androgen axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;45(1):153105-13.
19. Labrie F. Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: a highly significant medical progress based upon intracrinology. *J Steroid Biochem* 2015;12(1):145144-56.
20. Bambury, R.M. Rathkopf, D.E., editors. Novel and next-generation androgen receptor-directed therapies for prostate cancer: beyond abiraterone and enzalutamide. *Urologic Oncology* 2016; ;32(1):123-156.
21. Obinata D, Takada S, Takayama KI, Urano T, Ito A, Ashikari D, et al. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer* 2016;43(32):5739-49.