



Study of the frequencies of rs137852579 in Androgen receptor coding gene in patients suffering from prostate cancer and theoretical study of the association of this polymorphism with drug resistance to treatment with enzalutamide

Marjan Hoseini, Hosein Sazgar*, Noosha Zia Jahromi

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

Abstract

Aim and Background: Many single nucleotide polymorphisms have been identified in the androgen receptor coding gene that play an important role in the development, prediction, and diagnosis of cancer. In this regard, this study was designed to evaluate the allelic frequency of rs137852579 single-nucleotide polymorphism in the androgen receptor coding gene in patients suffering from prostate cancer.

Material and methods: In this study, peripheral blood was taken in 10cc out of 50 prostate cancer patients and 50 healthy individuals. Genomic DNA of the samples was extracted and isolated. ARMS-PCR and direct sequencing were used to determine the presence of the desired polymorphism in population.

Results: The results of this study showed that the allele frequency of rs137852579 for the C allele in the healthy group was 0.06 and in the patient group was 0.28. In addition, the heterozygosity rate showed that the Iranian population was in Hardy Weinberg equilibrium for this polymorphism ($p > 0.05$).

Conclusion: Based on the results of this study, it can be concluded that rs137852579 polymorphism in the androgen receptor gene can contribute to prostate cancer in the Iranian population.

Keywords: Drug Resistance, Prostate Cancer, Single-Nucleotide Polymorphism, Bioinformatics Analysis.

Corresponding author:

Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: hoseinsazgar@yahoo.com



بررسی فراوانی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852579 موجود در ژن کدکننده گیرنده آندروژن در بیماران مبتلا به سرطان پروستات و مطالعه نظری ارتباط این پلی مورفیسم با مقاومت دارویی به درمان با انزالوتامید مرجان حسینی، حسین سازگار*، نوشا ضیاء چهرمی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی بسیاری در ژن کدکننده گیرنده آندروژن شناسایی شده است که نقش مهمی در توسعه، پیش بینی و تشخیص سرطان دارند. در همین راستا، این تحقیق با هدف بررسی فراوانی آللی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852579 موجود در ژن کدکننده گیرنده آندروژن در بیماران مبتلا به سرطان پروستات طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه خون محیطی به میزان ۱۰ سی سی از ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پروستات و ۵۰ فرد سالم گرفته شد و DNA ژنومی نمونه ها استخراج و جداسازی شد. برای بررسی وجود پلی مورفیسم مورد نظر در افراد جمعیت، از تکنیک ARMS-PCR و تعیین توالی مستقیم استفاده شد. هم چنین جهت بررسی مکانیسم عمل داروی انزالوتامید در برهم کنش با گیرنده آندروژن از تکنیک بیوانفورماتیکی داکینگ مولکولی استفاده شد.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی آللی rs137852579 برای آلل C در گروه سالم برابر با ۰/۰۶ و در گروه بیمار برابر با ۰/۲۸ است. نتایج حاصل نشان می دهد که بروز آلل C در rs137852579 به صورت معناداری با بروز سرطان پروستات ارتباط دارد (Pvalue=۰/۰۲۹). به علاوه میزان هتروزیگوسیتی نشان داد که جمعیت ایرانی برای این پلی مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ است.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان نتیجه گرفت که پلی مورفیسم rs137852579 در ژن گیرنده آندروژن می تواند با ایجاد سرطان پروستات در جمعیت ایران نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، سرطان پروستات، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی.

مقدمه

پروستات بزرگ ترین غده ضمیمه دستگاه تناسلی مردان است

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۷

که در کپسولی از یک لایه نازک بافت فیبرو الاستیک قرار گرفته است و دیواره هایی از این کپسول به طرف داخل توسعه یافته و پروستات را به پنج لوپ شامل یک لوپ جلویی، یک عقبی، یک میانی و دو لوپ جانبی تقسیم کرده است (۱). براساس آمار ارائه شده توسط وزارت بهداشت، در سال ۱۳۸۲، ۳۰۳۲۱ نفر در ۲۳ استان کشور در اثر سرطان جان خود را از دست داده اند که از این میان ۷۵۲ نفر آن ها در اثر سرطان پروستات جان باختند. در یک مطالعه که در سطح ۵ استان کشور شامل استان های اردبیل، گیلان، گلستان، مازندران و

ضروری است و سبب فعالیت اجزای اندام‌های جنسی نر و توسعه صفات جنسی ثانویه در مردان می‌شود (۹). اختلال در رشد هورمون جنسی مردانه در انسان به دلیل نقص در آندروژن و گیرنده آن است و تغییرهای فنوتیپی ایجاد شده در گیرنده آن می‌تواند بدن را به سمت سرطانی شدن پیش ببرد (۱۰).

پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی تغییرهای تک بازی هستند که در یک جایگاه ویژه در DNA ژنومی در بخشی از یک جمعیت بزرگ رخ می‌دهند و در سراسر ژنوم پراکنده‌اند. این پلی‌مورفیسم‌ها در هر ۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰ باز در ژنوم انسان یافت می‌شوند و می‌توان گفت که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی شایع‌ترین نوع تنوع توالی DNA در ژنوم انسان است. گروهی از پلی‌مورفیسم‌ها بر عملکرد پروتئین‌ها تأثیرگذار بوده و در ارتباط با بیماری‌ها و پاسخ بیمار به دارو و درمان نقش دارند (۱۱). در میان پلی‌مورفیسم‌ها و جهش‌های مختلف موجود در ژن‌های دخیل در سرطان پروستات جهش‌های ایجاد شده در ژن گیرنده آندروژن به‌طور عمومی با افزایش اندازه تکرار پشت سر هم کدون‌های مختلف همراه هستند که باعث بزرگ شدن تکرارهای کدون در ژن گیرنده آندروژن می‌گردد و می‌تواند عامل ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی بدن باشند (۱۲). در همین راستا به‌تازگی انواع متعددی از جابه‌جایی‌های منفرد آمینواسیدهای تشکیل دهنده ساختمان گیرنده رسپتور آندروژن معرفی شده‌اند که می‌توانند بر عملکرد این پروتئین و نیز پاسخ آن به داروهای مهارتی تأثیر بگذارند (۱۳).

rs137852579 از جمله چند شکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در ناحیه کدکننده گیرنده آندروژن است. لازم‌به‌ذکر است که در چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs137852579 یک جهش بد معنی^۸ باعث تبدیل تیمین به سیتوزین می‌گردد. (۱۴). داروی انزالوتامید^۹ یک مهارکننده گیرنده آندروژن رسپتور است که نسبت به داروهای دیگر، تمایل بیش‌تری برای اتصال به گیرنده آندروژن رسپتور نشان می‌دهد، اما از جابه‌جایی هسته‌ای آندروژن رسپتور، اتصال به DNA و از جذب شدن توسط کمک فعال‌کننده‌ها^{۱۰} جلوگیری می‌کند. جهش در آندروژن رسپتور می‌تواند باعث مقاومت دارویی نسبت به انزالوتامید شود. برای مثال، وقتی جهش F876L در آندروژن رسپتور رخ دهد بیمار در برابر درمان با داروی انزالوتامید مقاومت نشان خواهد داد (۱۵).

8-Missense
9 - Enzalutamide
10-Coactivator

کرمان صورت گرفت ۷۰۳ مورد جدید سرطان پروستات در محدوده زمانی ۵ ساله (از سال ۱۹۹۶ تا سال ۲۰۰۰) در این استان گزارش شد (۲).

سرطان پروستات ناشی از یک تومور بدخیم در سیستم ادراری همراه با خصوصیات زیست-ژنتیکی است و میزان وقوع آن در آمریکا و اروپا بسیار بالا است (۳). علاوه بر نقش فاکتورهای ژنتیکی عواملی چون سن، نژاد و سابقه خانوادگی در بروز این سرطان تأثیرگذار هستند. در این میان عوامل نژادی و ژنتیکی مؤثر در بروز و پیشرفت این بیماری، تمرکز روز افزون بر نقش پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی^۱ (SNP) در توسعه، پیش‌بینی و تشخیص سرطان پروستات را بالا برده است.

هورمون‌های جنسی طبقه خاصی از استروئیدها هستند که شامل آندروژن‌ها^۲، استروژن‌ها^۳ و پروژسترون^۴ بوده و به‌وسیله غده هیپوفیز تنظیم می‌شوند. به‌طور کلی هورمون‌های استروئیدی جنسی از طریق اتصال به گیرنده‌های هم‌ریشه خود، از قبیل گیرنده آندروژن و گیرنده‌های استروژن در سلول‌های هدف عمل می‌کنند (۴). هورمون‌های آندروژنی با اتصال به گیرنده آندروژن باعث تحریک، کنترل، توسعه و یا نگهداری خصوصیات مردانگی در مهره‌داران می‌شوند. در حقیقت آندروژن سبب فعالیت اجزای اندام‌های جنسی نر و توسعه صفات جنسی ثانویه در مردان می‌شود. به‌علاوه برخی ترکیب-های آندروژنیک به‌صورت طبیعی در بدن خانم‌ها نیز تولید می‌شود که افزایش تولید آن‌ها در برخی بیماری‌ها روی می‌دهد (۵).

گیرنده آندروژن به خانواده فاکتورهای رونویسی گیرنده هورمون‌های استروئیدی تعلق دارد (۶، ۷). ژن گیرنده آندروژن شامل هشت اگزون است و در موقعیت ژنی Xq11-12 است. ژن گیرنده آندروژن چهار موتیف عملکردی را کد می‌کند که شامل دومین انتهای آمینی، دومین متصل‌شونده به DNA^۵، ناحیه لولا^۶ و یک دومین اتصال به لیگاند^۷ (LBD) است (۸). بررسی‌های پاتولوژیک اختلال‌های سطوح آندروژن نشان می‌دهد که آندروژن در حفظ فرآیند اسپرم‌زایی و بلوغ اسپرم‌ها

1-Single Nucleotide polymorphism
2-Androgen
3- Estrogen
4- Progesterone
5-DNA binding domain
6-Hinge area
7-Ligand binding domain

اسپکتروفتومتر صورت گرفت و در نهایت تا بررسی های بعدی مجدد در فریزر نگهداری شدند.

آنالیز ARMS-PCR

این روش تحت عنوان تکثیر اختصاصی آلل ها با PCR نیز نامیده می شود که برای تشخیص جهش های نقطه ای به کار می رود و برای تشخیص آلل های طبیعی و جهش یافته طراحی شده است. در این پژوهش 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 آلل مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که دما های بهینه برای انجام واکنش ARMS-PCR برای پلی مورفیسم rs137852579 در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱. برنامه بهینه شده PCR برای rs137852579

سیکل	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	دنا توره اولیه
۳۰	۳۰ ثانیه	۹۴	دنا توره ثانویه
	۳۵ ثانیه	۵۹	اتصال
	۴۰ ثانیه	۷۲	گسترش
۱	۵ دقیقه	۷۲	Final Extension

طراحی پرایمر مناسب برای تکنیک ARMS-PCR

برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی ژن هدف از بانک های اطلاعاتی به دست آورده شد. بعد از مشخص کردن جایگاه این چند شکلی تک نوکلئوتیدی در توالی ژن، پرایمرها توسط برنامه آنلاین PRIMER1 طراحی شدند و سپس توسط نرم افزار GeneRunner این پرایمرها از نظر دمایی اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند. در نهایت به منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن با قسمت های دیگر ژنوم از برنامه BLAST استفاده گردید. در جدول (۲) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش آورده شده است.

داکینگ روشی برای به دست آوردن بهترین ساختار اتصال لیگاند به رسپتور است. در این روش اتصال های قابل چرخش در لیگاندها محاسبه شده و در نتیجه آن انرژی اتصال لیگاند در جایگاه های مختلف رسپتور و همچنین حالت های مختلف چرخش پیوندهای لیگاند محاسبه می گردد. اساس تئوری کار بر مبنای محاسبه بارهای جزئی و حالت های چرخش برای لیگاند بوده و از طرفی در اطراف رسپتور شبکه ای طراحی شده که در هر نقطه از این شبکه انرژی اتصال لیگاند محاسبه می گردد. در نهایت اتصال لیگاند در نقاط مختلف این شبکه مقایسه شده و جایگاه دارای بهترین انرژی اتصال به عنوان بهترین جایگاه برای اتصال لیگاند معرفی می گردد (۱۶، ۱۷).

با توجه به مشکلات عدیده ناشی از بروز سرطان و با در نظر گرفتن نقش پلی مورفیسم های ژن گیرنده آندروژن در این پژوهش به بررسی تأثیر چند شکلی های تک نوکلئوتیدی rs137852579 در درمان به داروی انزولوتامید پرداخته شد و فراوانی این چند شکلی تک نوکلئوتیدی در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جمع آوری نمونه

در مطالعه موردی-شاهدی حاضر پس از اخذ رضایت نامه و با رعایت اصول اخلاقی به میزان ۱۰ سی سی خون از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۵۰ فرد سالم گرفته شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه به علت بررسی ژن وابسته به جنس برای انجام آنالیزهای جمعیتی ۲۵ نمونه خون از جمعیتی تصادفی از زنان اخذ شد. نمونه های خون درون لوله های که حاوی EDTA (غلظت ۵ درصد) ریخته و جمع آوری شد. لوله های حاوی نمونه های خون، جهت سالم ماندن روی یخ گذاشته شده و در کوتاه ترین زمان ممکن به فریزر انتقال داده شدند و در نهایت در دمای ۲۰- درجه سانت گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از خون و بررسی کمی و کیفی آن

در این پژوهش برای استخراج DNA از خون، از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده شد چراکه با استفاده از کیت علاوه بر زمان کم تر و دقت بیشتر مقدار DNAی استخراج شده نیز با کیفیت تر و بیش تر خواهد بود. سپس بررسی کیفی و کمی آن ها به ترتیب با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه

ساختار پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی به شماره rs137852579 مدل سازی شد. سپس آماده سازی لیگاند ساختار داروی انزالوتامید با استفاده از وب سرور DrugBank (www.drugbank.ca) به دست آمد و ساختار برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین میزان فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی-وینبرگ از سرور GenePop استفاده شد. برای بررسی آماری نتایج به دست آمده از سرور محاسباتی SISA استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه نمونه‌های استخراج DNA را با استفاده از تکنیک ARMS PCR تکثیر شده و محصول‌های PCR روی ژل آگارز برده شد و نتیجه حاصل از آن به صورت باندهایی به طول ۳۷۸ bp و ۲۰۱ bp برای rs137852579 مطابق شکل (۱) مشاهده شد. پس از بررسی نتایج محصول‌های PCR ARMS بر روی ژل آگارز ۲ درصد نتایج فراوانی برای rs137852579 نشان داد که از ۵۰ نفر بیمار ۱۴ نفر دارای آلل C بوده و ۳۶ نفر آلل T را نشان دادند. همچنین از ۵۰ فرد سالم ۳ نفر دارای آلل C و ۴۷ نفر دارای آلل T بودند.

لازمه 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 ۲۵ نفر از جمعیت تصادفی زنان برای وجود پلی-مورفیسم rs137852579 نشان داد که ۲۰ نفر دارای ژنوتیپ TT، ۱ نفر دارای ژنوتیپ CC و ۴ نفر هتروزیگوت داشته‌ایم.

جدول ۲. پرایمرهای مناسب برای پلی مورفیسم rs137852579

T/C		اندازه	دما	سایز	محصول
		(3' - 5') توالی			
Forward	GCATTGTGTGTTT	۲۸	۶۳.۳۴	۳۷۸	
Outer	TTGACCACTGATGAT				
Reverse	CTTATCTCATGCTCC	۲۸	۶۳.۵۴	۳۷۸	
Outer	CACTTCCCTTTTC				
Forward	AATGTCAGCCCATC	۲۸	۶۲.۷۹	۲۰۱	
Inner (T)	TTTCTGAATGTAAT				
Forward	AATGTCAGCCCAT	۲۸	۶۳.۵۴	۲۰۱	
Inner (C)	CTTCTGAATGTACC				

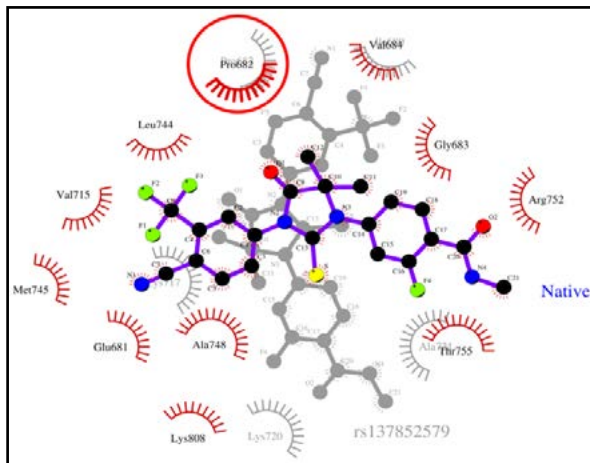
الکتروفورز

برای انجام این تکنیک ابتدا باید سینی حاوی ژل الکتروفورز که از قبل تهیه شده بود در تانک الکتروفورز قرار داده شد و به آرامی بافر TBE 1X به تانک اضافه گردید تا جایی که بافر تمام سطح ژل را پوشاند. در ادامه به چاهک اول ۱ میکرولیتر از مارکر DNA به همراه بافر بارگیری اضافه شد و در چاهک های بعدی ۱۰ میکرولیتر از DNAهای استخراج شده به همراه بافر سنگین کننده^۱ اضافه شد. سپس منبع تغذیه به تانک الکتروفورز متصل شد و ولتاژ دستگاه تنظیم گردید (۸۰-۷۰ میلی‌ولت). پس از انجام الکتروفورز، ژل از تانک و سینی خارج گردید و با دستگاه Gel document نتایج مشاهده شد.

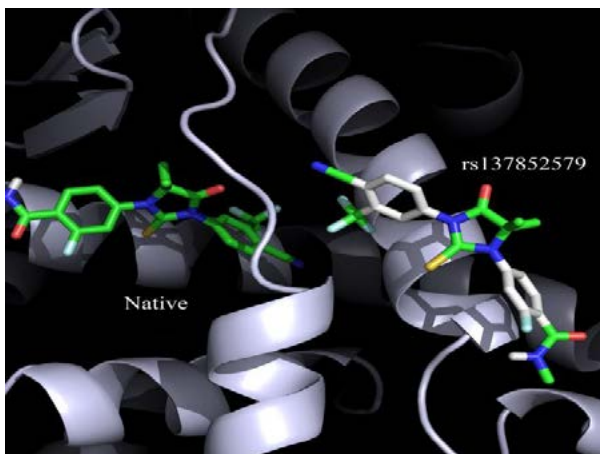
تکنیک داکینگ و آماده سازی ساختارها

محاسبات داکینگ در این پروژه توسط نرم افزار AutoDock 4.2 و AutoDockTools 4.2 انجام شد. الگوریتم ژنتیک لامارک برای جستجوی سطح رسپتور مورد استفاده قرار گرفت. در هر یک از مدهای داکینگ تعداد ۲۰۰ اجرا گذاشته شد که در آن فاکتور جمعیت اولیه در جستجو بر پایه الگوریتم ژنتیک برابر ۱۵۰ بود و در مجموع ۲۷ هزار ساختار برای محاسبات ساخته شد. در نهایت نمای اتصال لیگاند به رسپتور 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 اسیدآمینه لوسین ۶۷۸ و تبدیل آن به پرولین

انزوتامید به گیرنده آندروژن را نامطلوب می‌سازد. همین امر موجب کاهش اتصال و در نتیجه مقاومت دارویی گیرنده آندروژن جهش یافته مورد بحث به داروی انزوتامید می‌گردد.



شکل ۲. برهم‌کنش گیرنده آندروژن جهش یافته و سالم با داروی انزوتامید (rs13785257)



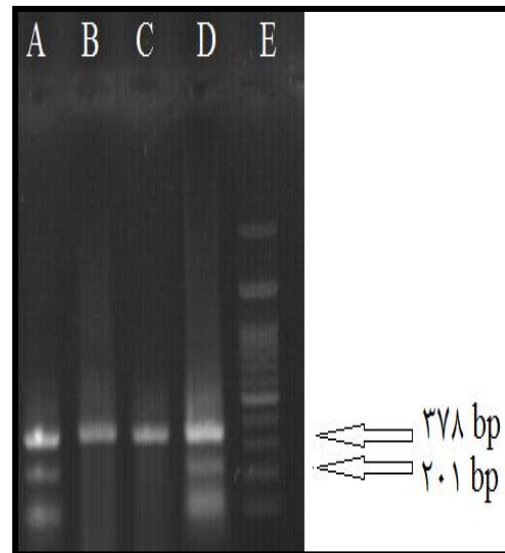
شکل ۳. برهم‌کنش گیرنده آندروژن جهش یافته و سالم با داروی انزوتامید (rs13785257)

جدول ۳. نتایج داکینگ انزوتامید و گیرنده آندروژن طبیعی و جهش

Binding	Intermolecular Energy	Internal Energy	Torsional Energy	Unbond Energy	ساختار
-8.25	-9.44	-1.06	1.19	-	AR
-4.14	-5.33	-1.10	1.19	-1.10	rs13785257 9

یافته

بررسی‌های آماری
به‌دست آوردن فراوانی‌ها



شکل ۱. بررسی نتایج PCR (پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs137852579). 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 (۱۰۰bp).

نتایج داکینگ

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 یافته rs13785257 به داروی انزوتامید است که در شکل‌های ۲ و ۳ نمای دو بعدی و سه بعدی آن نشان داده شده است. از سوی دیگر این نتایج نشان می‌دهد که با تغییر جایگاه اتصال انزوتامید در گیرنده آندروژن جهش یافته، اسیدآمین‌های درگیر در برهم‌کنش با انزوتامید تغییر می‌کنند و مشابهت کمی در الگوی پراکنش اسیدآمین‌های درگیر در گیرنده آندروژن طبیعی و گیرنده آندروژن جهش یافته وجود دارد.

مقایسه انرژی اتصال انزوتامید به گیرنده آندروژن

طبیعی و جهش یافته

نتایج داکینگ انزوتامید به گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته در جدول (۳) نمایش داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که جهش در ساختار گیرنده آندروژن موجب مثبت شدن انرژی اتصال انزوتامید به گیرنده آندروژن می‌گردد. بنابراین ایجاد جهش از لحاظ ترمودینامیکی فرآیند اتصال

با ۰/۰۶ و برای آلل T برابر با ۰/۹۴ است. هم‌چنین در گروه بیمار فراوانی آللی برای آلل T برابر با ۰/۷۲ و برای آلل C معادل ۰/۲۸ به‌دست آمد که در جدول (۵) نشان داده شده است.

مقایسه آماری فراوانی ماکرها در گروه سالم و بیمار

مقایسه آماری فراوانی پلی‌مورفیسم مذکور در دو گروه سالم و بیمار از طریق آزمون آماری مربع کای و به‌وسیله سرور SISA (Simple interactive statistical analysis) انجام شد. بررسی فراوانی آللی برای پلی‌مورفیسم rs137852579 در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که در گروه بیمار فراوانی آللی برای آلل C در پلی‌مورفیسم rs137852579 به‌صورت معناداری افزایش می‌یابد (P-value=۰/۰۲۹) که در جدول (۵) آورده شده است.

جدول ۵. فراوانی آللی در گروه سالم و بیمار و مقایسه فراوانی

P-value	فراوانی آللی گروه بیمار	فراوانی آللی گروه سالم	آلل
معنادار است (۰/۰۲۹)	۰/۷۲	۰/۹۴	T
	۰/۲۸	۰/۰۶	C

بحث

آندروژن‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۳۶ کشف شدند که آندروژن استروئید آنابولیک اصلی و منشأ همه استروژن‌ها است. آندروژن‌های درون زاد به‌طور عمومی در قشر غده فوق کلیوی با ساختار استروئیدی ۱۹ کربنه از پیش‌سازهایی نظیر کلاسترول تولید می‌شوند و به تستوسترون متابولیزه می‌شوند که اصلی‌ترین و شناخته شده‌ترین آندروژن، هورمون تستوسترون است. از جمله داروهای گیرنده آندروژن داروی انزالوتامید است که یک مهارکننده گیرنده آندروژن است که نسبت به داروهای دیگر شده تمایل بیش‌تری برای اتصال به گیرنده آندروژن نشان می‌دهد ولی از جابه‌جایی هسته‌ای گیرنده آندروژن، اتصال به DNA و از جذب شدن توسط کمک فعال‌کننده‌ها جلوگیری می‌کند. هم‌چنین جهش در گیرنده آندروژن می‌تواند باعث مقاومت دارویی نسبت به انزالوتامید شود. برای مثال، وقتی جهش F876L در گیرنده آندروژن رخ دهد، انزالوتامید به‌عنوان یک آگونیست تشخیص داده می‌شود و بدین ترتیب مقاومت دارویی در محیط داخل بدن رخ می‌دهد. با توجه به نقش جهش‌های ژنتیکی در

به‌طور کلی در بررسی‌های جمعیتی برای ژن‌های مرتبط با جنس به‌علت عدم وجود اطلاعات میزان هتروزیگوسیتی، نمونه‌گیری از جمعیت زنان انجام می‌گیرد. در همین راستا برای تعیین فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و بررسی وجود تعادل هاردی-وینبرگ^۱ در جمعیت مورد مطالعه از سرور GeNePOP استفاده شد و نتایج فراوانی آللی به‌دست آمده از این سرور برای rs137852579 نشان داد که فراوانی آللی برای آلل T در جمعیت زنان ۰/۸۸ و برای آلل C برابر با ۰/۱۲ است. از سوی دیگر بررسی تعادل هاردی-وینبرگ برای جمعیت مورد مطالعه نشان داد که جامعه آماری انتخاب شده برای پلی‌مورفیسم rs137852579 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارد (P-value = ۰/۱۴). از سوی دیگر بررسی میزان هتروزیگوسیتی برای پلی‌مورفیسم rs137852579 نشان داد که هتروزیگوسیتی برای این پلی‌مورفیسم برابر با ۰/۱۶ است که از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار کم‌تر است. در جدول (۴) میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای پلی‌مورفیسم نشان داده شده است.

جدول ۴. میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار rs137852579

هموزیگوسیتی		هتروزیگوسیتی	
مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
۰/۱۶	۰/۲۱۵	۰/۸۴	۰/۷۸۵

در ادامه با توجه به وجود تعادل هاردی-وینبرگ مقدار پارامتر PIC برای پلی‌مورفیسم rs137852579 مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی بررسی PIC برای پلی‌مورفیسم‌های مختلف نشان می‌دهد که حداکثر مقدار PIC در پلی‌مورفیسم‌های دو آللی برابر با ۰/۳۷۵ است. از سوی دیگر مقادیر PIC بزرگ‌تر از ۰/۲۵ به‌عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن پلی-مورفیسم در نظر گرفته می‌شود. در همین راستا نتایج این بررسی نشان داد مقدار PIC برای پلی‌مورفیسم rs137852579 برابر ۰/۱۸۸۹ است و این پلی‌مورفیسم دارای شاخص اطلاع‌دهندگی پایینی در جامعه استان اصفهان است.

در نهایت فراوانی آللی برای پلی‌مورفیسم مذکور در دو گروه مورد مطالعه به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که فراوانی آللی rs137852579 برای آلل C در افراد سالم برابر

1- Hardy-Weinberg Equilibrium

را کد می‌کند دارای یک پلی‌مورفیسم ژرم‌لاین^۱ در موقعیت ۱۲۴۵ است که در آن A به C تبدیل می‌شود و آسپاراژین^۲ را با ترئونین^۳ در موقعیت ۳۶۷ اسید آمینه 3βHSD1 مبادله می‌کند و در ایجاد مقاومت دارویی در برابر داروی انزالوتامید نقش دارد (۱۸). در سال ۲۰۱۲، Cabot و همکاران در مطالعه‌های 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، Grasso و همکاران به بررسی جهش‌های T877A، W741C، L701H، H874Y در ایجاد مقاومت دارویی در گیرنده آندروژن پرداختند آن‌ها دریافتند که این جهش‌ها در مقاومت دارویی نقش مهمی دارند (۱۹). در سال ۲۰۱۳، Joseph و همکاران به بررسی جهش در پلی‌مورفیسم F876L پرداختند. آن‌ها متوجه شدند جهش در این پلی‌مورفیسم می‌تواند موجب مقاومت دارویی گیرنده آندروژن در برابر انزالوتامید و ARN509 شود (۱۵). از سوی دیگر در سال ۲۰۱۵، Penning دریافت که سرطان پروستات پیشرفته مقاوم به اخته که در اثر بیان بیش از اندازه ژن گیرنده آندروژن است می‌تواند با داروی انزالوتامید و ابیراترون استات^۴ کنترل شود (۲۰). در سال ۲۰۱۵، Labrie 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 (۲۱). در سال ۲۰۱۵، Bambury 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 (۲۲). در سال ۲۰۱۶، Obinata و همکاران دریافتند ABHD2^۵ که ژن گیرنده آندروژنی است نقش مهمی را در سرطان پروستات ایفا می‌کند. آن‌ها دریافتند بیان این ژن می‌تواند باعث پیشرفت سرطان پروستات شود (۲۳). در سال ۲۰۱۸ Yagli و همکاران به بررسی پلی-مورفیسم (RS6152) در ژن گیرنده آندروژن در بیماران مبتلا به سرطان پروستات پرداختند. نتایج فراوانی آلل G در گروه

مقاومت دارویی گیرنده آندروژن این مطالعه با هدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs137852579 با ابتلا به سرطان پروستات و همچنین بررسی مقاومت دارویی گیرنده آندروژن جهش یافته طراحی و اجرا شد. در این پژوهش نتایج بررسی فراوانی آللی برای rs137852579 در گروه سالم برای آلل C برابر با ۰/۰۶ و برای آلل T برابر با ۰/۹۴ و در گروه بیمار برای آلل C برابر با ۰/۲۸ و برای آلل T برابر با ۰/۷۲ به دست آمد. از طرفی جهت بررسی ویژگی‌های جمعیتی فراوانی آللی برای پلی‌مورفیسم ذکر شده در گروه زنان محاسبه شد و نتایج به دست آمده برای فراوانی آللی در پلی‌مورفیسم rs137852579 برابر با ۰/۸۸ برای آلل T و ۰/۱۲ برای آلل C بود. در ادامه جهت مطالعه فاکتورهای جمعیتی، تعادل هاردی واینبرگ برای پلی‌مورفیسم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که مارکر مذکور در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد. همچنین بررسی میزان هتروزیگوسیتی برای پلی‌مورفیسم rs137852579 نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی برای این پلی‌مورفیسم برابر با ۰/۱۶ درصد است که از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار کم‌تر است. در ادامه مقدار PIC به عنوان شاخص اطلاع دهنده مارکر برای پلی‌مورفیسم rs137852579 برابر ۰/۱۸۸۹ به دست آمد. بررسی مقدار PIC برای این پلی‌مورفیسم نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم rs137852579 دارای شاخص اطلاع دهنده پایینی در جامعه استان اصفهان است. در نهایت مقایسه فراوانی پلی-مورفیسم rs137852579 در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که در گروه بیمار فراوانی آللی پلی‌مورفیسم مورد نظر به صورت معنا داری افزایش می‌یابد (Pvalue=۰/۰۲۹). علاوه بر نتایج آزمایشگاهی بررسی بیوانفورماتیکی پلی‌مورفیسم ذکر شده نشان داد که با ایجاد جهش در ساختار گیرنده آندروژن الگوی اتصال انزالوتامید به گیرنده تغییر کرده و در نتیجه قدرت مهارکنندگی و دارویی آن کاهش یافته و مقاومت دارویی نسبت به انزالوتامید ایجاد می‌گردد. در همین راستا بررسی سایر مطالعه‌های انجام شده در رابطه با نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف در 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 Chang و همکاران دریافتند که در ایجاد مقاومت به انزالوتامید پلی‌مورفیسم‌ها نقش به‌سزایی را ایفا می‌کنند برای نمونه ژن HSD3B1 که بیان محیطی ایزوآنزیم (3βHSD1)

1-Germline

2-Asparagine

3-Threonine

4- Abiraterone acetate

5- Abhydrolase domain containing

سالم ۹۵ درصد و در گروه بیمار ۸۳ درصد بود. از طرفی فراوانی آلی برای آلل A در گروه سالم ۵ درصد و در بیماران ۱۷ درصد بود و هم‌چنین اختلاف معناداری بین گروه سالم و بیمار به‌دست آمد. آن‌ها اظهار داشتند که پلی‌مورفیسم RS6152 در ژن گیرنده آندروژن در جمعیت ترکیه نقش دارد (۲۴). نتایج این مطالعه با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش برابری دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs137852579 در گیرنده آندروژن نشان داد که این چندشکلی می‌تواند باعث مقاومت دارویی به انزالوتامید در سرطان پروستات می‌شود. با بررسی این فراوانی‌ها در بیماران سرطان پروستات می‌توان بهترین داروی شیمی‌درمانی را برای آنان در نظر گرفت.

سپاسگزاری

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

- 1- Kumar v, Majumder P. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*. 2005; 27: 231-43.
- 2- Sadjadi A, Nooraie M, Ghorbani A, Alimohammadian, M, Zahedi, MJ, Darvish-Moghadam, S, et al. The incidence of prostate cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. *Arch Iran Med*. 2007; 10(4): 481-5.
- 3- Zhai XL, Qu XW, Guo L, Ha Q-H. 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 Trop Med*. 2014; 7(4):301-4.
- 4- Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*. 2014;131(2): 459-67.
- 5- Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*. 2012; 33(5): 887-894.
- 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. *Bio repro*. 2000;63(2):368-76.
- 7- Lavery DN, Bevan CL. Androgen receptor signalling in prostate cancer: the functional consequences of acetylation. *Bio Med res Int*. 2010; 201(34): 1-7.
- 8- 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. *Bio Med res int*. 2014; 20(14): 1-16.
- 9- Boisselle A, Tremblay RR. New therapeutic approach to the hirsute patient. *Clin Gent*. 2000; 32: 276-9.
- 10- Ober KP, Hennesey JF. Spironolactone therapy for hirsutism in a hyperandrogenic woman. *Int Med*. 2000;89(5): 643.
- 11- Allard P, Atfi A, Landry F, Chapdelaine A, Chevalier S. Estradiol activates p60 src, p53/56 lyn and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. *Mol cell endo*. 2005;126(1):25-34.
- 12- Janne, OA, Bardin, CW. Androgen and antiandrogen receptor binding. *Physiology*. 2005;46: 107-18.
- 13- Kagawa CM. Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with orally active spironolactone. *Endocrinology*. 2000;67(1): 125-9.
- 14- Cabot RC, Harris NL, Rosenberg ES, Shepard J-AO, Cort AM, Ebeling SH, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *New England J Med*. 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 discov*. 2013; 3(9): 1020-9.
- 16- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell D. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated dock. 2009.

- 17- Morris GM, Goodsell DS, Pique ME, Lindstrom W, Huey R, Forli S, et al. AutoDock 4.2 User guide. 2011.
- 18- Chang K-H, 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.
- 19- Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2013;487(7406): 239-43.
- 20- Penning, T. Mechanisms of drug resistance that target the androgen axis in castration resistant prostate cancer (CRPC) . *J Steroid Biochem Mol Bio*. 2015; 153(54): 105-13.
- 21- Labrie, F. Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: A highly significant medical progress based upon intracrinology. *J Steroid Biochem Mo Bio*. 2015;145(89): 144-56.
- 22- Bambury R, Rathkopf F. Novel and next-generation androgen receptor-directed therapies for prostate cancer: Beyond abiraterone and enzalutamide. *Urolo Onco*. 2015; 43(7): 543-49
- 23- Obinata D, Takada S, Takayama K, Uranob T, Itoa A, Ashikari D, et al. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Europ J Cancer*. 2016; 57(4): 39-49.
- 24- Yagli OF, Ozcan S, Karakan T, Arslan AO, Akkoc A, Duzenli S, Metin A. G1733A (RS6152) polymorphism of the androgen receptor gene in patients with prostate cancer. *exp biomed res*. 2018; 1(4): 128-134.

