مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی مقاومت دارویی به درمان با داروی انزالوتامید در افراد مبتلا به سرطان پروستات و مطالعه تأثیر پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852574 در ایجاد این مقاومت دارویی در جمعیت انسانی استان اصفهان

بیتا کاویانی، حسین سازگار*، نوشا ضیاء جهرمی، فرزانه محمدی فارسانی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی نقش پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852574 موجود در ژن کد کننده گیرنده آندروژن بر مقاومت دارویی بیماران دارای سرطان پروستات به داروی انزالوتامید است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از آنالیز ARMS-PCR بر روی ژن کد کننده گیرنده آندروژن در ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات دارای مقاومت به دارو و ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی انجام گرفت. نمونه‌های خون از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های امید و الزهرای استان اصفهان گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی آللی در rs137852574 برای آلل‌های T و G در گروه مقاوم به دارو برابر با ۰/۷۲، ۰/۲۸ و در گروه غیر مقاوم به دارو برابر ۰/۸۸، ۰/۱۲ می‌باشد. به‌علاوه، بررسی میزان هتروزیگوسیتی نشان داد که مارکر در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد.

بحث: نتایج این مطالعه نشان داد ارتباط معنا داری بین مقاومت دارویی و وجود پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852574 وجود دارد (P-Value = 0.039). به‌علاوه نتایج حاصل از تکنیک داکینگ نشان می‌دهد در افراد دارای این پلی‌مورفیسم اتصال صحیح دارو به جایگاه فعال گیرنده آندروژن صورت نمی‌پذیرد.

نتیجه‌گیری: وجود پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌تواند باعث ایجاد مقاومت‌های دارویی در افراد مبتلا به سرطان پروستات گردد. در نتیجه بررسی وجود این پلی‌مورفیسم‌ها می‌تواند در تجویز داروی مناسب در این بیماران تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: مقاومت دارویی، سرطان پروستات، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، داکینگ

مقدمه

پروستات غده‌ای در سیستم تناسلی و بزرگ‌ترین غده ضمیمه مردان است. رشد آن قبل از تولد می‌باشد و تا زمانی که فرد به بلوغ برسد، رشد آن توسط هورمون‌های مردانه (آندروژن) تحریک و ادامه می‌یابد (۱۴). سرطان پروستات یک بیماری چند عاملی است که عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن نقش دارند. سرطان پروستات در میان تمامی انواع سرطان-هایی که سبب مرگ در مردان می‌گردند، در رتبه دوم قرار دارد. هم‌چنین در میان مردان ۴۵ ساله سرطان پروستات پنجمین عامل مرگ و میر است (۲۵). در بیش‌تر موارد سرطان پروستات به آرامی پیشرفت می‌کند و در ابتدا محدود به غده پروستات است و در سایر قسمت‌های بدن پخش نمی-شود، در صورتی‌که بعضی از انواع سرطان پروستات به آهستگی پیشرفت کرده و به درمان خاصی نیاز ندارد. سایر انواع سرطان پروستات شدید بوده و به سرعت در بدن پخش می‌شوند (۳۴). تشخیص زود هنگام سرطان پروستات از طریق تست‌های خونی و به‌واسطه بررسی آنتی‌ژن اختصاصی پروستات می‌باشد که می‌تواند به کاهش نرخ مرگ و میر این سرطان کمک کند (۱). از پروتئین‌های مهم در بروز و پیشرفت سرطان پروستات گیرنده آندروژن است که ژن آن روی کروموزوم Xq11-12 واقع شده است و مهار آن نقش مهمی در کنترل سرطان پروستات دارد (۸). این ژن چهار موتیف عملکردی را کد می‌کند که شامل دومین انتهای

نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

آمینی، دومین متصل شونده به DNA، ناحیه لولا و یک دومین اتصال به لیگاند می‌باشد (۱۱). گیرنده آندروژن هدف بسیاری از داروهای کنترل سرطان از جمله انزالوتامید است. انزالوتامید یک داروی نسل دوم مهار کننده آندروژن است که با مهار آندروژن در بدن بر روی گیرنده آندروژن عمل می‌کند. انزالوتامید در درمان سرطان پروستات متاستاز داده شده مقاوم به درمان با داروی دوسه تاکسل به‌کار می‌رود (۲۸، ۲۴، ۱۲). یکی از روش‌های بیوانفورماتیکی مناسب جهت بررسی اثر جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها بر روی قدرت اتصال لیگاند به پروتئین استفاده از نکنیک داکینگ می‌باشد. در این روش اتصال‌های قابل چرخش در لیگاندها بررسی شده و در نتیجه آن انرژی اتصال لیگاند در جایگاه‌های مختلف گیرنده و هم‌چنین برای حالت‌های مختلف چرخش پیوندهای لیگاند محاسبه می‌گردد. اساس تئوری کار بر مبنای محاسبه بارهای جزئی و حالت‌های چرخش برای لیگاند بوده و از طرفی در اطراف گیرنده، شبکه‌ای طراحی شده که در هر نقطه از این شبکه انرژی اتصال لیگاند محاسبه می‌گردد. در نهایت اتصال لیگاند در نقاط مختلف این شبکه مقایسه شده و جایگاه دارای بهترین انرژی اتصال به‌عنوان بهترین جایگاه برای اتصال لیگاند معرفی می‌گردد (۲۰، ۱۹). در سال ۲۰۱۶ باستو و همکارانش با طراحی داروهای بیکالوتامید و انزالوتامید و شبیه سازی این داروها و با استفاده از داکینگ و دینامیک مولکولی به مطالعه جایگاه این دو دارو در گیرنده آندروژن پرداختند. نتایج نشان داد که این دو ساختار در گیرنده آندروژن به‌طور تقریب در یک موقعیت قرار دارند (۲).

تاکنون مطالعه‌های بسیاری در جهت بررسی نقش پلی‌مورفیسم‌های مختلف در مقاومت دارویی گیرنده آندروژن انجام گرفته است. اما با این وجود تأثیر بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن این گیرنده در مقاومت دارویی مشخص نشده است. در این راستا به بررسی نقش پلی‌مورفیسم rs137852574، در مقاومت دارویی افراد دارای سرطان پروستات پرداخته شد. بدین منظور ابتدا به آنالیز ژنی نمونه‌ها با استفاده از تکنیک ARMS-PCR پرداخته شد. سپس مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت صحت مطالعه‌ها با استفاده از آنالیز های آماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

جمع آوری نمونه و طراحی پرایمرها

در این پژوهش ۵۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پروستات دارای مقاومت به دارو و ۵۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی گرفته شد. نمونه‌های خون از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های امید و الزهرای استان اصفهان پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی و با رعایت نکات اخلاقی گرفته شد. هم‌چنین به‌علت وجود پلی‌مورفیسم در ژن وابسته به جنس، بررسی تعادل هاردی واینبرگ و تعیین درجه هتروزیگوتی به‌واسطه نمونه‌گیری خون از جمعیت زنان صورت گرفت. در این راستا تعداد ۲۵ نمونه زن به صورت تصادفی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرها توسط سرورPRIMER1 طراحی شد (۴). سپس توسط نرم افزار GeneRunner این پرایمرها از نظر دمایی اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند (۳۰) و به‌منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن با قسمت‌های دیگر ژنوم از برنامه BLAST استفاده گردید (۱۰). در جدول (۱) مشخصه‌های پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

آنالیز ARMS-PCR

در این پژوهش از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد (۱۸). برای انجام آنالیز ARMS-PCR دو آنالیز PCR با استفاده از یک DNA الگو در دو ویال جداگانه تحت شرایط ذکر شده در جدول (۲) و با استفاده از مقادیر ذکر شده در جدول (۳) انجام شد که یکی از آن‌ها حاوی پرایمر جهش یافته و دیگری حاوی پرایمر طبیعی بود. در هر واکنش پرایمرهای مشترک به همراهی یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از تکنیک ARMS-PCR بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

جدول ۱. پرایمر طراحی شده برای انجام آنالیز ARMS-PCR

	Sequence (5′ _ 3′)	Tm	Product size
Forward Outer	CTCAGTGACTCCATGG AGACCATTTCT	64.04	462
Reverse Outer	TGCAGAGGAGTAGTG CAGAGTTAT	61.12	---
Forward Inner (T Allele)	TTCTCCCTCTTATTGT TCCCTACAGGTG	63.20	272
Forward Inner (G Allele)	TTCTCCCTCTTATTGT TCCCTACAGGTG	63.69	272

داکینگ

در این مطالعه برای انجام محاسبات داکینگ از نرم‌افزار AutoDock 4.2 و برای آماده سازی پارامترهای اولیه از MglTools 1.5.6 استفاده شد (۲۱). 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 پایه الگوریتم ژنتیک برابر با ۱۵۰ بود و در مجموع ۲۷ هزار ساختار برای محاسبات ساخته شد. برای محاسبه شبکه انرژی در اطراف رسپتور اندازه شبکه به صورتی تعیین شد که جایگاه فعال رسپتور در داخل آن قرار بگیرد. در این راستا شبکه ای دارای ابعاد ۶۰×۶۰ ×۶۰ با فاصله ۰/۳۷۵ آنگستروم برای هر دو نقطه در اطراف رسپتور طراحی شده و انرژی تمامی نقاط درون این شبکه محاسبه شد. در نهایت نمای اتصال لیگاند به گیرنده و اتصال‌های هیدروژنی و هیدروفوبی توسط نرم افزار لیگ پلات نمایش داده شد (۳۲). برای آماده سازی ساختار گیرنده آندروژن، کمپلکس ساختار جهش یافته گیرنده آندروژن با لیگاند بیکالوتامید با کد دسترسی (PDB:1z95) از پایگاه اطلاعاتی پروتئین PDB (www.pdb.org) دریافت شد. سپس ساختار بیکالوتامید از کمپلکس خارج شده و فایل pdb گیرنده بدون لیگاند ذخیره شد. در ادامه با استفاده از وب سرور Rosetta backrub (۱۶) جهش در اسید آمینه شماره ۷۴۱ حذف شد و ساختار طبیعی گیرنده آندروژن با تبدیل اسید آمینه جهش یافته لوسین به تریپتوفان به‌دست آمد. هم‌چنین با جهش در اسید آمینه ایزولوسین ۸۶۹ و تبدیل آن به متیونین ساختار پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی به شماره rs137852574 مدل سازی شد. ساختار سه بعدی داروی انزالوتامید با استفاده از وب سرور DrugBank با آدرس اینترنتی (www.drugbank.ca) به‌دست آمده و برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲. برنامه بهینه شده PCR

Stage	Temperature	Time	Cycle
Primary denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	30 Sec	30
Annealing	50	35 Sec	
Extension	72	40 Sec	
Final Extension	72	5 min	1

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری نتایج به‌دست آمده به‌واسطه بررسی فراوانی آللی، درجه هتروزیگوتی، آنالیز فاکتور PIC و بررسی تعادل هاردی واینبرگ صورت پذیرفت. برای به دست آوردن فراوانی آللی، تعیین میزان هتروزیگوتی و بررسی تعادل هاردی واینبرگ از سرور GeNePop (۲۶) استفاده شد. به‌علاوه بررسی میزان اطلاع دهندگی rs137852574 با استفاده از فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی (PIC) انجام شد. فاکتور PIC یکی از مهم‌ترین شاخص‌های اطلاع‌دهندگی در پلی-مورفیسم‌های دارای تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد. در این مطالعه بررسی آماری فاکتور PIC با استفاده از نرم افزار Powermarker نسخه ۳/۲۵ استفاده شد (۱۷). برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ به‌طور معمول از دو روش آزمون خی دو و آزمون دقیق فیشر استفاده می‌گردد که در این مطالعه به علت کوچکی نمونه و وجود آلل نادر استفاده از آزمون خی دو می‌تواند با خطای آماری همراه باشد (۵ ،۳۳). بنابراین جهت بررسی تعادل هاردی واینبرگ از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. در نهایت بررسی ارتباط وجود پلی‌مورفیسم rs137852574 و مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات با استفاده از آزمون دقیق فیشر و به‌واسطه سرور SISA مورد بررسی قرار گرفت (۳۱).

جدول۳. مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر

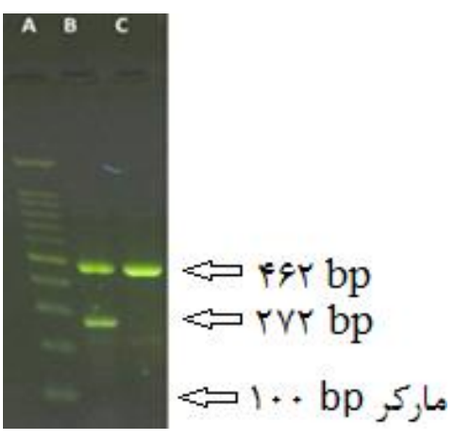
ماده	مقدار	غلظت در واکنش
Taq DNA polymerase	0.25	1.25 u/ µl
Baffer PCR(10X)	2.5	1X
MgcL2 (50mM)	0.75	1.5 mM
dNTP (10mM)	0.5	0.2 Mm
Primer (Mix F& R 100PMol/ µl)	2.5 µl	10 pmol
Primer F Inner	2 µl	10 pmol
DNA Tempelat	2 µl	2 µg
Deionised dH_2O	14.5 µl	-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

یافته‌ها

پس از انجام آنالیز ARMS PCR برروی نمونه‌های خون مردان دارای پلی‌مورفیسم و افراد سالم باندهای ۲۷۲ bp و ۴۶۲ برای rs137852574 مشاهده گردید شکل (۱). در rs137852574 باند ۴۶۲ bp در هر دو گروه سالم و جهش یافته مشترک بوده در حالی‌که باند ۲۷۲ bp تعیین کننده سالم و جهش یافته بودن فرد می‌باشد. نتایج آنالیز ARMS PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد که فراوانی جمعیتی افراد دارای rs137852574 برای گروه مقاوم به دارو برابر با ۲۸ درصد و برای افراد غیر مقاوم به دارو برابر با ۱۲ درصد می‌باشد. برای به‌دست آوردن درجه هتروزیگوتی، به‌علت حضور این پلی‌مورفیسم در ژن وابسته به جنس از آنالیز خون زنان هتروزیگوت استفاده شد. تحلیل داده‌های ARMS PCR برای تعیین هتروزیگوتی در زنان نشان داد که در بررسی ۲۵ نفر جمعیت زنان برای جستجوی rs137852574، ۷۲ درصد افراد هموزیگوت سالم، ۸ درصد هموزیگوت بیمار و ۲۰ درصد هتروزیگوت بودند.

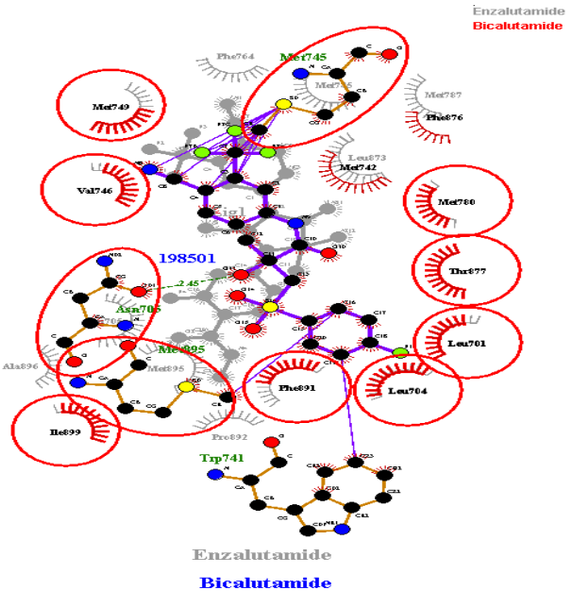


شکل ۱. بررسی نتایج PCR پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852574 چاهک A مارکر ۱۰۰ bp، چاهک B پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و همچنین پرایمر پیشرو داخلی سالم، چاهک C پرایمر پیشرو و معکوس خارجی و همچنین پرایمر پیشرو داخلی جهش یافته.

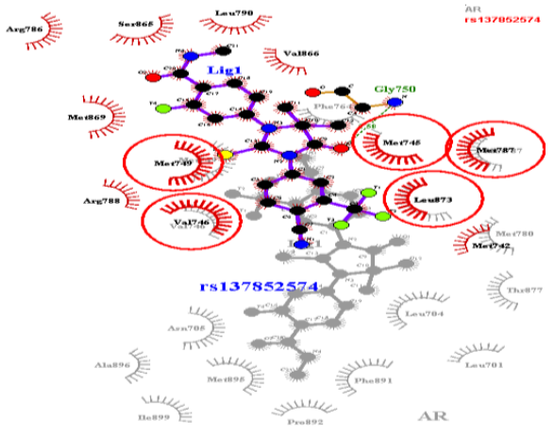
اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن طبیعی

بررسی نتایج داکینگ انزالوتامید با گیرنده آندروژن طبیعی و مقایسه آن با ساختار کمپلکس گیرنده آندروژن و بیکالوتامید نشان داد که جایگاه اتصال انزالوتامید و بیکالوتامید مشابه بوده و مکانیسم برهم‌کنش آن‌ها با گیرنده آندروژن یکسان است.

نمای شماتیک بر هم‌کنش انزالوتامید و بیکالوتامید با گیرنده آندروژن طبیعی در شکل (۲) نمایش داده شده است. بررسی بر هم‌کنش‌ها بیان‌گر نقش کلیدی اسید آمینه‌های موجود در جایگاه فعال گیرنده آندروژن، مانند اسید آمینه‌های لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱، متیونین ۷۴۵، متیونین ۸۹۵، آسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹ می‌باشد (شکل۲).



شکل ۲. نمای شماتیک برهم‌کنش انزالوتامید و بیکالوتامید. اسید آمینه-های لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱، متیونین ۷۴۵، متیونین ۸۹۵، آسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹ مهم‌ترین اسید آمینه‌ها در برهم‌کنش می‌باشد.



شکل ۳. نمای شماتیک برهم‌کنش انزالوتامید با آندروژن طبیعی و جهش یافته. درشکل برهم‌کنش انزالوتامید با گیرنده آندورژن طبیعی با رنگ خاکستری و برهم‌کنش‌های انزالتومید با ساختار جهش یافته با رنگ قرمز نمایش داده است. همچنین برهم‌کنش‌های مشترک در هر دو ساختار با رسم دایره‌های قرمز رنگ متمایز شده‌اند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

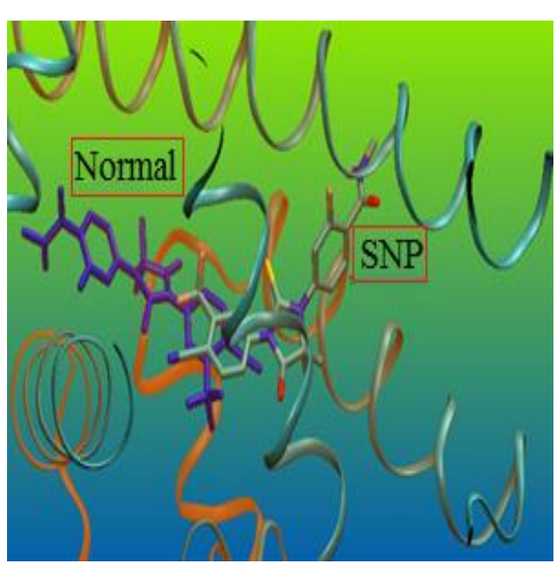
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

جدول ۴. نتایج داکینگ انزالوتامید و گیرنده ی آندروژن طبیعی و جهش یافته

ساختار	Unbond Energy	Torsional Energy	Internal Energy	Intermolecular Energy	$\Delta G_{Binding}$ Kcal/mol
AR	-0.35	1.19	-0.35	-2.33	-2.13
rs137852574	-0.58	1.19	-0.58	2.7	2.9

اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن جهش یافته

نتایج داکینگ انزالوتامید با گیرنده آندروژن جهش یافته حاکی از تغییر محل اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن و در نتیجه مقاومت گیرنده آندروژن جهش یافته rs137852574 به داروی انزالوتامید می‌باشد. در شکل (۳) برهم‌کنش داروی انزالوتامید با گیرنده آندروژن جهش یافته rs137852574 مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی نتایج داکینگ حاکی از آن است که با تغییر جایگاه اتصال انزالوتامید در گیرنده ی آندروژن جهش یافته، اسید آمینه‌های درگیر در برهم‌کنش با انزالوتامید تغییر می‌کنند و مشابهت کمی در الگوی پراکنش اسید آمینه‌های درگیر در گیرنده آندروژن طبیعی و گیرنده آندروژن جهش یافته وجود دارد. در نهایت مقایسه ساختار سه بعدی اتصال دارو به گیرنده طبیعی و جهش یافته نشان از جابه‌جایی کامل موقعیت دارو در حالت جهش یافته دارد (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه ساختار سه بعدی به‌دست آمده از داکینگ انزالوتامید با آندروژن طبیعی (Normal) و آندروژن جهش یافته (SNP). در شکل ساختار انزالوتامید در داکینگ با آندروژن طبیعی با رنگ بنفش متمایز شده است.

مقایسه انرژی اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته

نتایج داکینگ انزالوتامید به گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته در جدول (۴) نمایش داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که جهش در ساختار گیرنده آندروژن با افزایش دافعه بین مولکولی (به میزان ۵/۰۳ کیلو کالری برمول) موجب مثبت شدن انرژی اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن می‌گردد. بنابراین ایجاد جهش از لحاظ ترمودینامیکی فرآیند اتصال انزالوتامید به گیرنده آندروژن را نامطلوب می‌سازد. همین امر موجب کاهش اتصال و در نتیجه مقاومت دارویی گیرنده آندروژن جهش یافته مورد بحث به داروی انزالوتامید می‌گردد.

بحث

مطالعه‌های انجام شده بر روی پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در گیرنده آندروژن پیشنهاد می‌کند که این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند در تشخیص زود هنگام (۹)، پیشرفت (۲۲) و مقاومت دارویی (۱۱، ۷) در سرطان پروستات نقش داشته باشند. بر اساس مطالعه‌های اخیر جهش در گیرنده آندروژن می‌تواند باعث مقاومت دارویی نسبت به انزالوتامید شود. برای مثال، وقتی جهش F۸۷۶L در گیرنده آندروژن رخ دهد، انزالوتامید به‌عنوان یک آگونیست تشخیص داده می‌شود و بدین ترتیب مقاومت دارویی در محیط داخل بدن رخ می‌دهد (۱۳). در سال ۲۰۱۲ اسچر و همکاران در مطالعه‌های خود روی ژن گیرنده آندروژن دریافتند که بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به درمان که تحت درمان با داروی انزالوتامید قرارگرفته‌اند بعد از شیمی درمانی شانس بقای آن‌ها تا ۳۷ درصد افزایش خواهد یافت (۲۹). به‌علاوه در سال ۲۰۱۵ لابری دریافت انزالوتامید و ابیراترون هیدروکسیلاز دو داروی مهم در مهار گیرنده‌های آندروژنی هستند و می‌توانند باعث کنترل سرطان پروستات در دراز مدت و درمان سرطان پروستات قبل از متاستاز شوند (۱۵).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

ر سال ۱۹۴۰ مشخص گردید که مسدود کردن مسیر سیگنال‌رسانی ژن‌گیرنده آندروژن، یک راه درمانی برای سرطان پروستات می‌باشد که از طریق جراحی یا به شکل شیمیایی می‌تواند صورت بگیرد. بررسی‌های متعددی نیز نشان اده است که جهش‌های مختلف این ژن می‌توانند سبب بروز قاومت به داروهای مختلف گردند. در این راستا ساساکی و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اظهار داشتند که پلی‌مورفیسم تک وکلئوتیدی واقع در کدون ۲۱۱ که در بین تکرارهای CAG و GGN در اگزون شماره یک ژن گیرنده آندروژن قرار دارد و وسط آنزیم محدودکننده StuI قابل شناسایی است، در ایجاد سرطان پروستات نقش بسزایی دارد (۲۷). هم‌چنین گوتلیب و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اظهار داشتند گرچه جهش‌های گیرنده آندروژن در سرطان پروستات در دامنه‌های عمکردی ختلف شناسایی شده‌اند، اما به‌ندرت در مناطق '۵ و مناطق ۳ ترجمه نشده (UTRs) به چشم می‌خورند. بسیاری از این جهش‌ها از نوع جهش‌های جایگزینی تک نوکلئوتیدی هستند که ۵۱ درصد از این جهش‌ها در مناطق مربوط به دومین تصل شونده به DNA، ۴۱ درصد در مناطق مربوط به دومین انتهای آمینی و ۷ درصد در دومین اتصال به لیگاند رخ می‌دهد (۶). به‌علاوه در سال ۲۰۱۵ پنینگ دریافت که سرطان پروستات پیشرفته مقاوم به اخته که در اثر بیان بیش ز اندازه ژن گیرنده آندروژن ایجاد می‌گردد، می‌تواند با داروی نزالوتامید و ابیراترون استات کنترل شود اما این کنترل در صورتی ممکن خواهد بود که بیماران دارای پلی‌مورفیسم تک وکلئوتیدی در ژن این گیرنده نباشند، چرا که این پلی-ورفیسم‌ها باعث مقاومت دارویی شده و نمی‌توان نتیجه طلوب را مشاهده کرد (۲۳). در نهایت در سال ۲۰۱۵ هوانگ همکاران روی پلی‌مورفیسم‌های ژن آندروژن کار کردند. آن-ا چندین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی را پیدا کردند که در شخیص زود هنگام سرطان پروستات مؤثر است. از جمله این لی‌مورفیسم‌ها می‌توان به rs7201637، rs4243229 و rs1693464 اشاره کرد (۹). با توجه به اهمیت موضوع، این طالعه با هدف بررسی نقش پلی‌مورفیسم rs137852574 در قاومت دارویی گیرنده آندروژن در سرطان پروستات طراحی ردید.

جهت مطالعه فراوانی آللی، بررسی بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا ه سرطان پروستات و مصرف کننده داروی انزالوتامید صورت ذیرفت و فراوانی این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی مورد رسی قرار گرفت. بررسی فراوانی آللی در این افراد نشان داد که در گروه مقاوم به دارو، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته (آلل G) ۰/۲۸ و برای آلل سالم (آلل T) ۰/۷۲ و در گروه غیر مقاوم، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته ۰/۱۲ و برای آلل سالم ۰/۸۸می‌باشد. به‌علت حضور پلی‌مورفیسم rs137852574 در ژن وابسته به جنس، برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ از جمعیت زنان استفاده شد. در این راستا تعداد ۲۵ نمونه زن به صورت تصادفی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. در جمعیت زنان فراوانی آللی برای آلل سالم برابر ۰/۸۲ و برای آلل جهش یافته برابر ۰/۱۸ به‌دست آمد. بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که مقدار P-Value در این جمعیت برابر (۰/۱۴=Value-P) می‌باشد. این در حالی است که وجود P-Value بزرگ‌تر از ۰/۰۵ بیان‌گر وجود تعادل هاردی واینبرگ برای این پلی-مورفیسم در جمعیت اصفهان می‌باشد. به‌علاوه بررسی میزان هتروزیگوسیتی برای پلی‌مورفیسم rs137852574 نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی برای این پلی‌مورفیسم برابر با ۲۰ درصد می‌باشد که از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار کم‌تر است (جدول ۵).

جدول ۵. میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای پلی مورفیسم rs137852574

هتروزیگوسیتی		هموزیگوسیتی	
مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار
۰/۲۰	۰/۳۰۱	۰/۸۰	۰/۶۹۹

از سوی دیگر با توجه به وجود تعادل هاردی واینبرگ مقدار PIC برای پلی‌مورفیسم rs137852574 مورد بررسی قرار گرفت . بررسی مقدار PIC نشان می‌دهد که حداکثر مقدار PIC برای پلی‌مورفیسم‌های دو آللی حداکثر برابر با ۰/۳۷۵ می‌باشد. این در حالی است که مقادیر PIC بزرگتر از ۰/۲۵ به‌عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن پلی‌مورفیسم در نظر گرفته می‌شود (۳).

در مطالعه حاضر مقدار PIC برای پلی‌مورفیسم rs137852574 برابر با ۰/۲۵۱۶ است که بیانگر اطلاع دهندگی بالای این پلی‌مورفیسم می‌باشد. در نهایت بررسی ارتباط مقاومت دارویی و وجود پلی‌مورفیسم با استفاده از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان داد که در گروه مقاوم به دارو فراوانی آللی برای آلل جهش یافته به-صورت معناداری افزایش پیدا می‌کند (۰/۰۳۹= P- Value) و در نتیجه می‌توان بیان داشت ارتباط معناداری میان مقاومت دارویی و وجود پلی‌مورفیسم rs137852574 وجود دارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

علاوه‌بر کار آزمایشگاهی ارزیابی‌های تئوری با استفاده از تکنیک داکینگ نشان می‌دهد که وجود پلی‌مورفیسم در گیرنده آندروژن می‌تواند باعث عدم اتصال دارو به جایگاه مناسب و در نتیجه کم شدن قدرت اتصال دارو به گیرنده گردد. در این حالت انرژی اتصال دارو به گیرنده از ۲/۱۳- کیلو کالری برمول برای آندروژن طبیعی به ۲/۹+ کیلوکالری برمول برای rs137852574 افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه مبین وجود ارتباط معنادار بین مقاومت دارویی گیرنده آندروژن و پلی‌مورفیسم rs137852574 است که وجود تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه نشان از صحت اطلاعات به‌دست آمده دارد. به‌علاوه نتایج تئوری درک صحیحی از ماهیت اتصال دارو به گیرنده آندروژن، اسید آمینه‌های درگیر در واکنش و مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی به‌دست می‌دهد. در نهایت خصوصیت‌های ژنتیکی پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده از جمله درجه هتروزیگوسیتی مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند برای مطالعه‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

منابع

1. Bartsch G, Horninger W, Klocker H. Decrease in prostate cancer mortality following introduction of prostate specific antigen screening in the federal state of Tyrol. J Urol, 2000;163(88): 417-424.
2. Bassetto M, Ferla S, Pertusati F, Kandil S, Westwell AD, Brancale A, McGuigan C. Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer. Eur J Med Chem. 2016;118:230-43.
3. Chen H, He H, Zou Y, Chen W, Yu R, Liu X, Yang Y, Gao YM, Xu JL, Fan LM, Li Y. Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet. 2011; 123(6):869.
4. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. Open Bioinforma J. 2012;6:55-58.
5. Engels WR. Exact tests for Hardy–Weinberg proportions. Genetics. 2009; 183(4): 1431-1441.
6. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. Human mutation. 2012;33(5): 887-894.
7. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature. 2012;487(7406):239-243.
8. Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. Development, 2014; 131(2): 459-467.
9. Huang TY, Chien TM, Liu CC, Lee HY, Yu CC, Huang CY, Chang CF, Huang CH, Wu WJ, Bao BY, Huang SP. Prognostic significance of genetic polymorphisms in disease progression and survival in prostate cancer after androgen deprivation therapy. Urol Sci. 2015;26(2):81-84.
10. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic acids research. 2008;36(suppl 2):W5-9.
11. 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-50. Cancer Discov, 2013;1, 3(9):1020-1929.
12. Kim TH., Jeong JW, Song JH, Lee KR, Ahn S, Ahn SH, et al. Pharmacokinetics of enzalutamide, an anti-prostate cancer drug, in rats. Arch Pharm Res,2015; 38(11):2076-2082.
13. Korpal M, Korn JM, Gao X, Rakiec DP, Ruddy DA, Doshi S, Yuan J, Kovats SG, Kim S, Cooke VG, Monahan JE. An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide). Cancer Discov. 2013;3(9):1030-1043.
14. Kumar v, Majumder P. Prostate gland: structure, functions and regulation. Int Urol Nephrol, 1995; 27:231-243.
15. Labrie F. Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: a highly significant medical progress based upon intracrinology. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015;145:144-156.
16. Lauck F, Smith CA, Friedland GF, Humphris EL, Kortemme T. RosettaBackrub—a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. Nucleic Acids Res. 2010;38(suppl 2):W569-75.
17. Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 2005; 21(9):2128-2129.
18. Medrano RF, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. Mol Biotechnol. 2014;56(7):599-608.
19. Morris GM, Goodsell DS, Pique ME, Lindstrom W, Huey R, Forli S, et al. AutoDock 4.2 User guide. 2011.
20. Morris GM. Huey R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 2009;30:2785-2791.
21. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 2009; 30(16): 2785-2791.
22. Obinata D, Takada S, Takayama KI, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. Eur. J. Cancer. 2016; 57:39-49.
23. Penning T. Mechanisms of drug resistance that target the androgen axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2015; 153(54): 105-113.
24. Penson DF, Armstrong AJ, Concepcion R, Agarwal N, Olsson C, Karsh L, et al. Enzalutamide versus bicalutamide in castration-resistant prostate cancer: the STRIVE trial. J Clin Oncol, 2016; 34(18):2098-2106.
25. Prostate Cancer Screening, A Decision Guide. The U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (www.cdc.gov).
26. Raymond M. GENEPOP (version 1.2.): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered.. 1995;86:248-9.
27. Sasaki M, Nomoto M, Yonezawa S, Nakagawa M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll PR, Dahiya R. Distribution of a single nucleotide polymorphism on codon 211 of the androgen receptor gene and its correlation with human renal cell cancer in Japanese patients. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 321(2):468-471.
28. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Taplin M, Efstathiou E, Anand A, Hung D, Hirmand M, Fleisher M. Antitumor activity of MDV3100 in a phase I/II study of castration-resistant prostate cancer (CRPC). J Clin Oncol. 2009;27(15S):5011.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

29. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. N Engl J Med 2012;367(13):1187-1197.
30. Spruyt M, and F. Buquicchio. Gene Runner version 3.05. Website http://www. generunner.net/[accessed 10 2015] (1994).
31. Uitenbroek DG. SISA binomial. Southampton: DG Uitenbroek. Retrieved January. 1997;1:2004.
32. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein Eng. 1995;8(2): 127-134.
33. Weir B.S. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates Google Scholar. 1996.
34. Wolf A, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer. CA Cancer J Clin, 2010; 60(2):70-79.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.8.29.7.6]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-28]