



Scan online to view this article

## The effect of single-nucleotide polymorphism rs141831067 in Dehydrofolate reductase gene on response to methotrexate in patients with prostate cancer

Farzane Nasehi, Hosein Sazgar\*, Noosha Zia Jahromi.

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

### Abstract

**Aim and Background:** The aim of this study was to investigate the effect of rs141831067 Single nucleotide Polymorphism existence on therapeutic response of patients diagnosed with Prostate Cancer to Methotrexate and investigation of the polymorphism Frequency in Iranian population.

**Material and methods:** In this study, peripheral blood samples were taken from 50 healthy individuals and 50 patients suffering from prostate cancer. Then genomic DNA of each sample was extracted and isolated. ARMS-PCR and direct sequencing techniques were used to determine the presence of the polymorphism in populations. Finally, the statistical analysis of the results was performed by analyzing allelic frequency, heterozygosity, PIC analysis and Hardy Weinberg equilibrium analysis.

**Results:** A comparative study of rs141831067 polymorphism existence showed that the allele frequency of this marker was significantly higher in the patients relative to healthy group (P-value = 0.002). In addition the bioinformatics analyzes of the interactions of the dihydrofolate reductase enzyme and methotrexate showed that existence of the polymorphism may alter the interaction patterns and result in the relative displacement of methotrexate position from the active site of dihydrofolate reductase.

**Conclusion:** Rs141831067 Single nucleotide Polymorphism in Dihydrofolate reductase gene plays an important role in the prostate cancer occurrence and this Single nucleotide Polymorphism can cause drug resistance to methotrexate in prostate cancer.

**Keywords:** Drug resistance, Prostate cancer, Single nucleotide polymorphism, docking.

Corresponding author:

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

Email: hoseinsazgar@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## بررسی اثر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs141831067 در ژن دی هیدروفولات ردوکتاز بر پاسخ به متوترکسات در مبتلایان به سرطان پروستات فرزانه ناصحی، حسین سازگار\*، نوشا ضیاء جهرمی

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

### چکیده

**سابقه و هدف:** هدف از این تحقیق بررسی تئوری تأثیر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs141831067 ژن دی هیدروفولات ردوکتاز بر پاسخ درمانی افراد مبتلا به سرطان پروستات به داروی متوترکسات و مطالعه فراوانی این پلی مورفیسم در جمعیت ایرانی است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش خون محیطی از ۵۰ فرد سالم و ۵۰ فرد مبتلا به سرطان پروستات گرفته شد. سپس DNA ژنومی استخراج و جداسازی شد. برای بررسی وجود پلی مورفیسم موردنظر در افراد مورد مطالعه، از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد. در نهایت بررسی آماری نتایج به دست آمده به واسطه بررسی فراوانی آلی، درجه هتروزیگوتی، آنالیز فاکتور PIC و بررسی تعادل هاردی واینبرگ صورت پذیرفت.

**یافته‌ها:** مقایسه فراوانی آلی برای پلی مورفیسم rs141831067 در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که فراوانی آلی این مارکر در گروه بیمار به صورت معناداری بیش تر از گروه سالم است ( $P\text{-Value}=0/002$ ). به علاوه آنالیزهای بیوانفورماتیکی برهم کنش آنزیم دی-هیدروفولات ردوکتاز و داروی متوترکسات نشان داد که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs141831067 ژن دی هیدروفولات ردوکتاز در برهم کنش با دارو تغییر ایجاد می کند و موجب خروج نسبی متوترکسات از جایگاه فعال دی هیدروفولات ردوکتاز می شود.

**نتیجه گیری:** چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs141831067 موجود در ژن دی هیدروفولات ردوکتاز در احتمال بروز سرطان پروستات نقش مهمی دارد و این چندشکلی تک نوکلئوتیدی می تواند باعث بروز مقاومت دارویی به متوترکسات در سرطان پروستات گردد.

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

### مقدمه

سرطانی از ساز و کارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا می‌افتند. علت دقیق این پدیده مشخص نیست ولی احتمال دارد عوامل ژنتیکی یا مواردی که موجب اختلال در فعالیت سلول‌ها می‌شوند در روند فرآیندهای سلولی دخالت کنند (۱۸).

سرطان تقسیم نامتقارن سلول‌های بدن است که سلول‌های

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد  
پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۷

غده پروستات غده‌ای کوچک، به اندازه یک گردو است که درست زیر مثانه قرار گرفته است. لوله میزراه که ادرار از طریق آن خارج می‌شود، از مرکز این غده عبور کرده و وارد پنیس می‌شود. اسفنکترهای کنترل کننده خروج ادرار نیز زیر این

سرطان پروستات به دو شکل دیده می‌شود: بالینی و پاتولوژیک. در سرطان پروستات بالینی، بیمار به علت علائمی که سرطان ایجاد کرده است به پزشک مراجعه می‌کند. در نوع پاتولوژیک بیمار علائمی ندارد و پس از بررسی و آزمایش‌های لازم مشخص می‌شود که فرد سرطان پروستات دارد. ده درصد از مردانی که به علت بزرگی خوش‌خیم پروستات تحت عمل جراحی قرار می‌گیرند، پس از جراحی و آزمایش پاتولوژی پروستاتی که با جراحی خارج شده است، مشخص می‌شود که سرطان پروستات دارند. به این نوع سرطان، سرطان پاتولوژیک می‌گویند (۱۹). معاینه غده پروستات از طریق معاینه مقعد ساده‌ترین روش بیماریابی برای سرطان پروستات است (۱۸). روش آزمایشگاهی آن، از طریق بافت‌برداری انجام می‌شود. تومورهای سرطانی آنتی‌ژن‌های مشخصی را تولید می‌کنند که ممکن است از طریق آزمایش خون کشف شوند. آنتی‌ژنی که تنها در غده پروستات تولید می‌شود، آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) <sup>۷</sup> است. PSA یک گلیکوپروتئین ۳۴ کیلو دالتونی است که از سلول‌های اپی‌تلیال مجاری پروستات ترشح می‌شود. PSA یک سرین پروتئاز است که عمل آن لیز کردن پروتئین سمینال وزیکول است. اگر چه بیش‌تر PSA در مجاری پروستات باقی می‌ماند، مقداری از آن جذب جریان خون می‌شود. میزان PSA در اغلب مردان سالم تا ۴ نانوگرم در میلی‌لیتر است. در سرطان پروستات میزان PSA به‌طور معمول بیش از ۴ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌شود، هر چند مقدار کم‌تر از ۴ نانوگرم در میلی‌لیتر به معنای عدم وجود سرطان نیست و حدود ۱۵ درصد مردان با PSA کم‌تر از ۴ با انجام بیوپسی، سرطان پروستات خواهند داشت. مردانی با PSA ۱۰-۴ نانوگرم در میلی‌لیتر، حدود یک چهارم شانس سرطان پروستات خواهند داشت. اگر PSA بیش از ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر شود، شانس داشتن سرطان پروستات بیش از ۵۰ درصد است (۲۰). روش حساس دیگر برای تشخیص سرطان پروستات، سونوگرافی از پروستات از راه مقعد است. اگر تمامی موارد فوق بیان‌گر وجود سرطان پروستات باشند، باید وجود سرطان تأیید شود. تأیید تشخیص با نمونه برداری از پروستات انجام می‌شود (۱). تصویربرداری پزشکی نیز ممکن است بعد از آن انجام شود تا مشخص شود که آیا سرطان به دیگر بخش‌های بدن سرایت کرده است یا نه (۴). متوترکسات آنالوگ آنتی‌نئوپلاستیک فولیک‌اسید است که با اتصال به آنزیم دی‌هیدروفولات ردوکتاز <sup>۸</sup> (DHFR) از تبدیل

غده قرار گرفته‌اند (۱۴). در پروستات نیز همانند سایر نقاط بدن، سلول‌های پیر و فرسوده، با سلول‌های جدید جایگزین می‌گردند. در سرطان، تعادل بین سلول‌ها از بین رفته، سلول‌های جدید بیش از اندازه ساخته شده و سلول‌های پیر نیز دیرتر از بین می‌روند، چرا که برنامه مرگ آن‌ها دچار آسیب شده است. رشد بدخیم <sup>۱</sup> سلول‌ها در غده پروستات، سرطان پروستات نامیده می‌شود. با این که در پروستات، انواع متفاوتی از سلول‌ها وجود دارند، اما بیش‌تر سرطان‌های پروستات از سلول‌های غده‌ای <sup>۲</sup> منشاء می‌گیرند. این سلول‌ها، در واقع مایع پروستات را ایجاد می‌کنند که به منی افزوده می‌شود. سرطان‌های با منشاء سلول‌های غده‌ای، آدنوکارسینوما <sup>۳</sup> نامیده می‌شوند. سایر انواع سرطان پروستات، عبارتند از سارکوماها <sup>۴</sup> (که از سلول‌های ماهیچه‌ای یا بافت پیوندی منشاء می‌گیرد)، کارسینوماهای با سلول‌های کوچک <sup>۵</sup> (که از سلول‌های نورواندوکراین پروستات منشاء می‌گیرد) و کارسینوماهای مربوط به سلول‌های ترانزیشنال <sup>۶</sup>. این انواع سرطان‌ها نادر بوده و در اغلب موارد، سرطان پروستات از نوع آدنوکارسینوما است. برخی از انواع سرطان پروستات می‌توانند بسیار سریع رشد کرده و منتشر شوند، اما اکثر آن‌ها اغلب آهسته رشد می‌کنند. به‌طوری‌که مطالعات کالبد شکافی نشان داده است که بسیاری از مردان مسن (و حتی برخی از افراد جوان) که در اثر بیماری‌های مختلف فوت می‌کنند، دارای سرطان پروستات نیز هستند که در دوران زندگی آن‌ها، نمایان نشده و زندگی آن‌ها را تحت تأثیر قرار نداده است (۱۶). چندین ژن در بازوی کوتاه کروموزوم هشت به‌عنوان نامزدی برای نقش سرکوب‌کنندگی تومور آزمایش شده‌اند که امیدبخش‌ترین آن‌ها NKX1-3 است. این ژن در اپی‌تلیوم پروستات طبیعی بیان می‌شود، اما در سلول‌های توموری پروستات بیان آن کاهش یافته است. هم‌چنین ژن PTEN بر روی کروموزوم ۱۰ در کمابیش یک سوم سرطان‌های پروستات جهش یافته است. هم‌چنین غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور مانند RB1, CDKN2A, TP53 در مراحل پیشرفت تومور و متاستاتیک دیده می‌شوند (۱۷).

<sup>1</sup>-Malignant

<sup>2</sup>- Gland cells

<sup>3</sup>-Adenocarcinoma

<sup>4</sup>- Sarcomas

<sup>5</sup>- Small cell carcinomas

<sup>6</sup>- Transitional cell carcinomas

<sup>7</sup>- Prostate Specific Antigen

<sup>8</sup>- Dihydrofolate reductase

دی‌هیدروفولات<sup>۱</sup> (FH2) به تتراهیدروفولات<sup>۲</sup> (FH4) جلوگیری می‌کند. فولات برای ساخت طبیعی پورین‌ها و پیریمیدین‌ها و در نتیجه ساخت DNA و RNA ضروری است. فولات برای ایفاء نقش خود به‌عنوان کوفاکتور باید به وسیله آنزیم DHFR به FH4 تبدیل شود. متوترکسات به آنزیم DHFR اتصال یافته و از تبدیل FH2 به FH4 جلوگیری می‌کند، در نتیجه، از ساخت پورین و پیریمیدین جلوگیری می‌شود. آنتی‌متابولیت‌ها در فاز S یا ساخت چرخه سلولی دخالت می‌کنند. آنتی‌متابولیت‌ها مانند آنتی‌فولات‌ها (نظیر متوترکسات) و آنالوگ‌های پورین و پیریمیدین این دارو بر روی تقسیم سلولی اثر می‌گذارد و یا مانع سنتز شدن DNA می‌شوند. بعضی از داروهای جدید به DNA وارد نمی‌شوند این‌ها شامل پادتن‌های مونوکلونال و مهارکننده‌های جدید تیروزین کیناز می‌شوند که به‌خصوص سلول‌های غیر طبیعی انواع خاصی از سرطان‌ها را مورد حمله قرار می‌دهد. علاوه بر این‌ها بعضی از داروها به‌منظور کنترل و تعدیل رفتار سلول‌های توموری بدون حمله مستقیم به این سلول‌ها به کار برده می‌شود. داروهای هورمونی از این نوع معالجه‌ها است (۶).

چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP)<sup>۳</sup> بسیاری در ژن دی-هیدروفولات ردوکتاز شناسایی شده است که نقش بسیار مهمی در توسعه، پیش‌بینی و تشخیص سرطان دارند. در واقع چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، یک تغییر در دنباله DNA است که در یک نوکلئوتید در ژنوم بین افراد یک گونه بیولوژیکی یا بین یک جفت کروموزوم در یک فرد، این نوکلئوتید فرق دارد. این تغییرها می‌تواند روی توسعه امراض و جواب به پاتوژن‌ها، مواد شیمیایی، داروها، واکسن‌ها، و دیگر عامل‌ها تأثیر بگذارند (۱۲).

rs141831067 از جمله چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز هستند. در چندشکلی تک-نوکلئوتیدی rs141831067 یک جهش بد معنی<sup>۴</sup> باعث تبدیل متیونین (Met)<sup>۵</sup> به لوسین (Leu)<sup>۶</sup> می‌گردد. در این پژوهش سعی بر آن است تا تأثیر این پلی‌مورفیسم بر پاسخ این اشکال به داروی متوترکسات مورد بررسی قرار گیرد. به

علاوه در این مطالعه فراوانی این دو نوع پلی‌مورفیسم نیز در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

## روش کار

### جمع‌آوری نمونه و طراحی پرایمرها

در این پژوهش ۵۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۵۰ نمونه خون سالم پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی و با رعایت نکات اخلاقی گرفته شد. پرایمرها توسط سرور پرایمر<sup>۷</sup> طراحی شد (۳) و توسط نرم‌افزار ژنراتر<sup>۸</sup> این پرایمرها از نظر دمایی اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند و به‌منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن با قسمت‌های دیگر ژنوم از برنامه بلاست<sup>۹</sup> استفاده گردید (۸). در جدول (۱) (۱) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

جدول ۱- پرایمرهای مناسب برای پلی‌مورفیسم (rs141831067) C/T

نام پرایمر	توالی	طول	دما (سانتی‌گراد)	GC
Forward Outer	ATATACTAAGGCA TACTTTGCAGCACC	۲۸	۶۱/۸۳	۳۹۸
Reverse Outer	GAACCCAATTTGTA GTCTGAAAAGACAT	۲۸	۶۰/۴۸	۳۹۸
Forward Inner (T)	GAACCCAATTTGTA GTCTGAAAAGACAT	۲۸	۶۰/۰۶	۱۹۰
Forward Inner (C)	CATCTTAAACTATT TGTGACAAGGACCC	۲۸	۶۰/۴۸	۱۹۰

### تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

در این پژوهش برای بررسی پلی-مورفیسم‌های ذکر شده از تکنیک ARMS-PCR استفاده گردید. برای انجام این تکنیک 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 به‌همراهی یکی از دو پرایمر

<sup>7</sup> PRIMER1

<sup>8</sup> GeneRunner

<sup>9</sup> BLAST

<sup>1</sup> - Dihydrofolate

<sup>2</sup> - Tetrahydrofolat

<sup>3</sup>- Single Nucleotide polymorphism

<sup>4</sup>- Missense

<sup>5</sup>- Methionine

<sup>6</sup>- Leucin

گیرنده و اتصالات هیدروژنی و هیدروفوبی توسط نرم افزار لیگ پلات نمایش داده شد (۱۵). برای آماده سازی ساختار دی هیدروفولات ردوکتاز، کمپلکس ساختار دی هیدروفولات ردوکتاز با لیگاند متوترکسات با کد دسترسی 1u72 از پایگاه اطلاعاتی پروتئین PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) دریافت شد. سپس ساختار دی هیدروفولات ردوکتاز جداسازی شد و با ایجاد جهش در اسید آمینه متیونین ۱۴۰ و تبدیل آن به لوسین ساختار SNP به شماره rs141831067 مدل سازی شد. ساختار سه بعدی داروی متوترکسات با استفاده از وب سرور DrugBank با آدرس اینترنتی ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)) به دست آمده و برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری نتایج به دست آمده به واسطه بررسی فراوانی آلی، درجه هتروزیگوتی، آنالیز فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی یا PIC و بررسی تعادل هاردی واینبرگ صورت پذیرفت. برای به دست آوردن فراوانی آلی، تعیین میزان هتروزیگوتی و بررسی تعادل هاردی واینبرگ از سرور GeNePop استفاده شد. به علاوه بررسی میزان اطلاع دهندگی پلی مورفیسم مورد نظر با استفاده از فاکتور PIC انجام شد. فاکتور PIC یکی از مهم ترین شاخص های اطلاع دهندگی در پلی مورفیسم های دارای تعادل هاردی واینبرگ است. در این مطالعه بررسی آماری فاکتور PIC با استفاده از نرم افزار Powermarker نسخه ۳/۲۵ استفاده شد (۱۰). برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ به طور معمول از دو روش آزمون خی دو و آزمون دقیق فیشر استفاده می گردد که در این مطالعه به علت کوچکی نمونه و وجود آلل نادر استفاده از آزمون خی دو می تواند با خطای آماری همراه باشد. بنابراین جهت بررسی تعادل هاردی واینبرگ از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. در نهایت بررسی ارتباط وجود پلی مورفیسم ها و گروه سالم و گروه بیمار مبتلا به سرطان پروستات با استفاده از آزمون دقیق فیشر و به واسطه سرور SISA مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته ها

پس از تکثیر نمونه ها به روش ARMS PCR محصول های PCR روی ژل ۲ درصد آگارز برده شد و نتیجه حاصل از آن به صورت باندهایی به طول ۳۹۸ bp و ۱۹۰ برای پلی مورفیسم rs141831067 مطابق با شکل (۱) مشاهده گردید. لازم به ذکر است که برای هر نمونه دو ویال تهیه شد که اندازه باند برای پرایمر خارجی در هر دو ویال مشترک بوده و تفاوت در

اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت نتایج حاصل از تکنیک ARMS-PCR بر روی ژل آگارز مشاهده شد.

جدول ۲- برنامه بهینه شده PCR

مرحله	rs141831067 دما (سانتی گراد)	زمان	سیکل
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال	۶۵	۳۵ ثانیه	
طویل سازی	۷۲	۴۰ ثانیه	
گسترش	۷۲	۵ دقیقه	۱

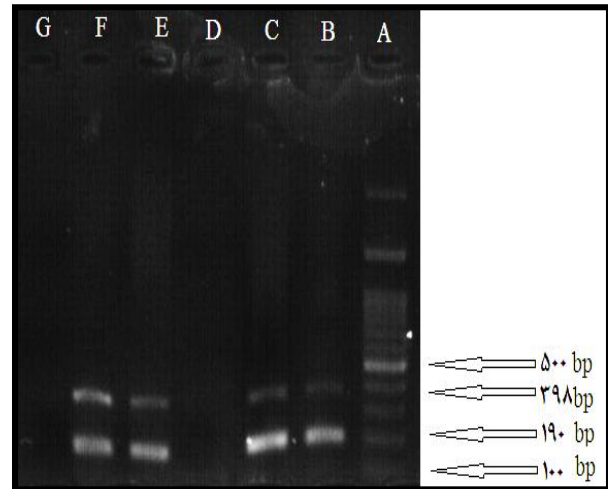
جدول ۳- مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر

مقدار	ماده
۰/۲۵	Taq DNA polymerase
۲/۵	Buffer PCR(10X)
۰/۷۵	Mgcl2 (50mM)
۰/۵	dNTP (10mM)
۲/۵ میکرو لیتر	Primer (Mix F& R 100PMol/ μl)
۲ میکرو لیتر	Primer F Inner
۲ میکرو لیتر	DNA Templat
۱۴/۵ میکرو لیتر	Deionised dH <sub>2</sub> O

### داکینگ

در پژوهش حاضر برای انجام محاسبات داکینگ از نرم افزار (free) AutoDock 4.2 و برای آماده سازی پارامترهای اولیه از MglTools 1.5.6 استفاده شد (۱۳). 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

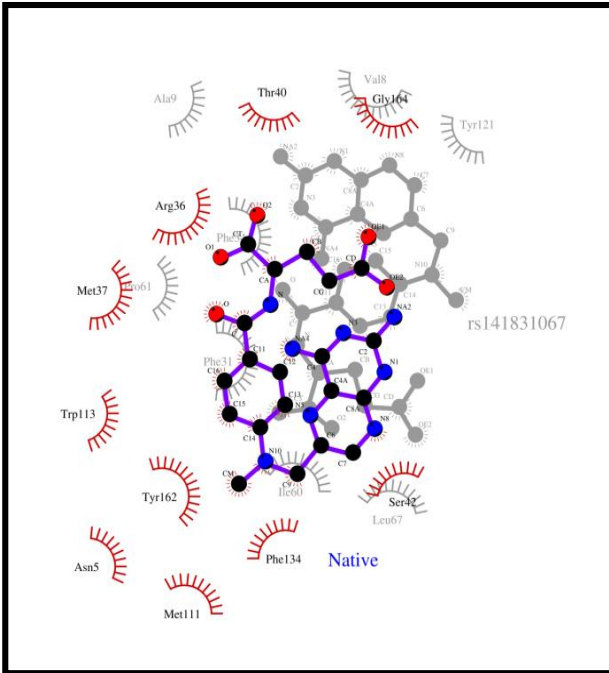
پرایمر داخلی است. اگر پرایمر داخلی در یک ویال باند تشکیل داد نمونه هموزیگوت خواهد بود (بستگی به پرایمر جهش یافته و سالم دارد) و اگر در هر دو ویال پرایمر داخلی باند تشکیل داد نمونه هتروزیگوت است.



شکل ۱- بررسی نتایج PCR (پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs141831067) چاهک A: مارکر 100 bp، چاهک B: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی سالم، چاهک C: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی جهش یافته. چاهک D: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی سالم، چاهک E: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی جهش یافته. چاهک F: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی سالم، چاهک G: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی جهش یافته.

### نتایج داکینگ

بررسی برهم کنش داروی متوترکسات و دی هیدروفولات ردوکتاز با استفاده از تکنیک داکینگ انجام شد. نتایج نشان داد که پلی مورفیسم های موجود در ژن دی هیدروفولات ردوکتاز می توانند در الگوی برهم کنش متوترکسات و دی-هیدروفولات ردوکتاز تغییر ایجاد کرده و هم چنین موجب خروج نسبی متوترکسات از جایگاه فعال دی هیدروفولات ردوکتاز شوند. نتایج بررسی برهم کنش داروی متوترکسات و دی هیدروفولات ردوکتاز طبیعی و جهش یافته در شکل های (۲) و (۳) به ترتیب برهم کنش پلی مورفیسم rs141831067 نشان داده شده است.



شکل ۲- مقایسه برهم کنش داروی متوترکسات با ساختار سالم و جهش یافته rs141831067



شکل ۳- نمای سه بعدی از مقایسه برهم کنش داروی متوترکسات با ساختار سالم و جهش یافته rs141831067

به علاوه بررسی انرژی اتصال داروی متوترکسات به دی هیدروفولات ردوکتاز طبیعی و جهش یافته نشان می دهد که جهش در ساختار دی هیدروفولات ردوکتاز می تواند موجب کاهش انرژی اتصال و در نتیجه مقاومت دارویی دی-

جدول ۵. میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار rs141831067

هموزیگوسیتی		هتروزیگوسیتی	
مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده
۰/۸۵۲	۰/۸۸	۰/۱۴۸	۰/۱۲

در تفسیر نتایج آنالیز PIC ذکر این نکته ضروری است که اگر مقدار محاسبه شده برای فاکتور PIC بزرگتر از ۰/۲۵ به دست آید نشان دهنده اطلاع دهنده گی بالای پلی مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه است. با توجه به این نکته بررسی مقدار PIC برای پلی مورفیسم rs141831067 نشان داد که این مارکر دارای اطلاع دهنده گی به نسبت پایینی در جمعیت انسانی استان اصفهان است ( $PIC=0/1364$ ). در این پژوهش علاوه بر آنالیزهای جمعیتی میزان فراوانی آلی در دو گروه بیمار و سالم با روش مربع کای مقایسه و بررسی شد. نتایج به دست آمده برای پلی مورفیسم rs141831067 نشان داد که فراوانی آلی این مارکر در گروه بیمار به صورت معناداری بیش تر از گروه سالم است ( $P\text{-Value}=0/002$ ). بنابراین نتایج مقایسه آماری فراوانی مارکر ذکر شده نشان می دهد که فراوانی آلی آن به صورت معناداری در گروه بیمار افزایش می یابد.

### بحث

در این مطالعه میزان فراوانی آلی و آنالیزهای جمعیتی بر روی پلی مورفیسم rs141831067 موجود بر پروتئین دی-هیدروفولات ردوکتاز بررسی شد و علاوه بر آن ارتباط این پلی-مورفیسم با بروز سرطان پروستات در مردان مورد مطالعه قرار گرفت. فراوانی آلی برای پلی مورفیسم rs141831067 در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب برابر با ۰/۲۴ و ۰/۰۸ به دست آمد. به علاوه بررسی تعادل هاردی واینبرگ برای پلی مورفیسم rs141831067 در گروه نشان داد که این مارکر با داشتن مقدار  $P\text{-Val}$  بزرگتر از ۰/۰۵ در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارند. از سوی دیگر بررسی درجه هتروزیگوسیتی برای پلی-مورفیسم rs141831067 نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این مارکر برابر با ۰/۱۲ بوده در حالی که میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای پلی مورفیسم های rs141831067 برابر با ۰/۱۴۸ به دست آمد. بنابراین نتایج بررسی درجه هتروزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم نشان می دهد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر

هیدروفولات ردوکتاز نسبت به متوترکسات شود. نتایج انرژی اتصال داروی متوترکسات به دی هیدروفولات ردوکتاز طبیعی و جهش یافته در جدول (۴) آورده شده است.

جدول ۴- نتایج انرژی اتصال برهم کنش داروی متوترکسات به دی-هیدروفولات ردوکتاز طبیعی و جهش یافته

انرژی	DHFR	rs141831067
Unbond Energy	-۰/۸۷	-۰/۸۵
Torsional Energy	۴/۵۲	۴/۷۲
Internal Energy	-۰/۸۷	-۰/۸۵
Intermolecular Energy	-۱۳/۵۸	-۹/۳۲
$\Delta G_{\text{Binding}}$ Kcal/mol	-۹/۰۶	-۵/۶۰

### بررسی های آماری

بررسی فراوانی آلی برای پلی مورفیسم rs141831067 با استفاده از سرور GeNePop انجام شد. فراوانی آلی برای پلی مورفیسم rs141831067 در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب برابر با ۰/۲۴ و ۰/۰۸ به دست آمد. در این مطالعه بررسی ویژگی های جمعیتی مارکر rs141831067 نیز با استفاده از سرور GeNePop انجام شد. در مرحله اول بررسی تعادل هاردی واینبرگ برای مارکرهای مذکور در گروه نشان داد که این مارکرها با داشتن مقدار  $P\text{-Val}$  بزرگتر از ۰/۰۵ در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارند. بررسی درجه هتروزیگوسیتی برای پلی مورفیسم rs141831067 نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این مارکر برابر با ۰/۱۲ بوده در حالی که میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای پلی مورفیسم rs141831067 برابر با ۰/۱۴۸ به دست آمد. بنابراین نتایج بررسی درجه هتروزیگوسیتی برای این پلی-مورفیسم نشان می دهد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکرهای ذکر شده از میزان مورد انتظار برای جامعه کم تر است. در جدول (۵) میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای پلی مورفیسم rs141831067 نشان داده شده است. از سوی دیگر برای بررسی میزان اطلاع دهنده گی پلی مورفیسم rs141831067 در جمعیت استان اصفهان با استفاده از آنالیز PIC صورت پذیرفت.

ذکر شده از میزان مورد انتظار برای جامعه کم تر است. هم- چنین بررسی میزان اطلاع دهنده گی پلی مورفیسیم های rs141831067 در جمعیت استان اصفهان نشان داد که این مارکر دارای اطلاع دهنده گی بسیار پایینی در جمعیت انسانی استان اصفهان است. در نهایت مقایسه فراوانی آلی برای پلی- مورفیسیم rs141831067 در دو گروه سالم و بیمار نشان داد که فراوانی آلی این مارکر در گروه بیمار به صورت معناداری بیش تر از گروه سالم است ( $P\text{-Value}=0/002$ ). بررسی سایر پژوهش های انجام گرفته در حوزه جهش های تکنوکلوتیدی آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز نشان می دهد که بسیاری از جهش های موجود در این آنزیم می توانند موجب بروز مقاومت های دارویی در این آنزیم گردند. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۷ Mishra و همکاران به بررسی پلی مورفیسیم ژن دی هیدرو ردوکتاز و داروی متوترکسات پرداختند و آن ها دریافتند که جهش تکنوکلوتیدی ۸۲۹ که در آن سیتوزین تبدیل به تیمین شده است می تواند باعث مقاومت متوترکسات شود (۱۱). در سال ۲۰۱۶ Agah و همکاران به طراحی پروتئین دی هیدروفولات ردوکتاز پرداختند و آن ها با بررسی انواع مختلف ساختار پروتئین دی هیدروفولات ردوکتاز و حذف سه حلقه از آن و ایجاد سه حلقه جدید در ساختار پروتئین به بررسی اتصالات آن با لیگاند پرداختند (۲) و در سال ۲۰۱۶ Hajian و همکاران به بررسی دی هیدروفولات ردوکتاز و مقاومت دارویی در بیماری سل پرداختند و آن ها دریافتند که PLA<sup>۱</sup> به عنوان مهار کننده قوی برای آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز عمل می کند و هم چنین PLA می تواند به غشاء خارجی مایکوباکتریوم نفوذ کند (۷). در نهایت کاویانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی تأثیر چندشکلی تک- نوکلوتیدی rs137852599 در ایجاد مقاومت دارویی به درمان با داروی انزالوتامید در بیماران مبتلا به سرطان پروستات در استان اصفهان پرداختند و دریافتند که ارتباط معناداری بین وجود مقاومت دارویی و پلی مورفیسیم تک نوکلوتیدی rs137852599 وجود دارد (۱۹).

## نتیجه گیری

چندشکلی تک نوکلوتیدی rs141831067 موجود در ژن دی هیدروفولات ردوکتاز در احتمال بروز سرطان پروستات نقش مهمی دارد و این چندشکلی تک نوکلوتیدی می تواند باعث بروز مقاومت دارویی به متوترکسات در سرطان پروستات

گردد. از سوی دیگر آنالیزهای بیوانفورماتیکی با محوریت برهم کنش های آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز و داروی متوترکسات نشان داد که پلی مورفیسیم موجود در ژن دی- هیدروفولات ردوکتاز می تواند در الگوی برهم کنش متوترکسات و دی هیدروفولات ردوکتاز تغییر ایجاد کرده و هم چنین موجب خروج نسبی متوترکسات از جایگاه فعال دی- هیدروفولات ردوکتاز شوند.

## سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است. بدین وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در جمع آوری نمونه های خون در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می- نمایند.



1. Almal SH, Padh H. Variation in Copy Number of MTUS1 Gene among Healthy Individuals and Cancer Patients from Gujarat. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;79(2):311-6.
2. Agah S, Protein rethreading: A novel approach to protein design. *Scientific reports*. 2016;65(5):6-10.
3. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *Open Bioinforma J*. 2012;6(4):55-58.
4. Dutta A, Le Magnen C, Mitrofanova A, Ouyang X, Califano A, Abate-Shen C. Identification of an NKX3. 1-G9a-UTY transcriptional regulatory network that controls prostate differentiation. *Science*. 2016; 352(6293):1576-80.
5. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The lancet oncology*. 2011 1;12(5):489-95.
6. Flavell R, Strowig T, Manz MG, Borsotti C, Dhodapkar M, Murphy AJ, Stevens S, Yancopoulos GD, inventors; INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE (IRB), Yale University, Regeneron Pharmaceuticals Inc, assignee. Genetically modified non-human animals and methods of use thereof. United States patent US 9,901,082. 2018;27(1): 3-12.
7. Hajian B, Scocchera E, Keshipeddy S, Narendran G, Shoen, C, et al. Propargyl-Linked Antifolates Are Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *PloS one*. 2016;11(8):9-20.
8. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*. 2008;36(2):5-9.
9. Kaviani B, Sazegar H, Zia-jahromi N, Mohamadi Farsani, F. Investigation of the Effects of rs137852599 Single-nucleotide Polymorphism Existence in Drug Resistance against Treatment with Enzalutamide in Individuals Diagnosed with Prostate Cancer in Isfahan Province. *Arak Medical University Journal*, 2018;20(128): 76-86.
10. Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 2005; 21(9):2128-2129.
11. Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(33):13513-8.
12. Mononen N, Seppälä EH, Duggal P, Autio V, Ikonen T, Ellonen P, Saharinen J, Saarela J, Vihinen M, Tammela TL, Kallioniemi O. Profiling genetic variation along the androgen biosynthesis and metabolism pathways implicates several single nucleotide polymorphisms and their combinations as prostate cancer risk factors. *Cancer research*. 2006 15;66(2):743-7.
13. 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.
14. Naik S, Doyle S, Feldman M, Tomaszewski J, Madabhushi A. Gland segmentation and computerized gleason grading of prostate histology by integrating low-, high-level and domain specific information. *InMIAAB workshop*. 2007; 2(2):1-8.

15. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*. 2015; 43(W1):W443-7.
16. Salmena L. PTEN: History of a tumor suppressor. In *PTEN Humana Press*, 2016; 2(1) : 3-11.
17. Van Broeck T, Joniau S, Clinckemalie L, Helsen C, Prekovic S, Spans L. The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. *BioMed research international*. 2014;7(12):1-16.
18. van Duin M, van Marion R, Vissers K, et al. High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm8q: Evaluation of genetic progression markers for prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44(6):438-449.
19. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Di Franco R, Romano FJ, Montanari M, La Mantia E, Piscitelli R, Nocerino F. Micrnas in prostate cancer: an overview. 2017;8(30):50240.
20. Zhou W, He MR, Jiao HL, He LQ, Deng DL, Cai JJ, Xiao ZY, Ye YP, Ding YQ, Liao WT, Liu SD. The tumor-suppressor gene LZTS1 suppresses colorectal cancer proliferation through inhibition of the AKT–mTOR signaling pathway. *Cancer letters*. 2015;360(1):68-75.