

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

Bitra Kaviani¹, Hossein Sazegar^{2*}, Noosha Zia-jahromi², Farzane Mohamadi Farsani³

1. MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

3. PhD Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Received: 31 Oct 2017, Accepted: 18 Dec 2017

Abstract

Background: The aim of this study is to investigate the role of rs137852599 single-nucleotide polymorphism in the androgen receptor coding gene on drug resistance against treatment with Enzalutamide in individuals diagnosed with prostate cancer.

Materials and Methods: In this case-control study, the ARMS-PCR analysis was conducted on androgen receptor coding gene in 50 patients diagnosed with prostate cancer with drug resistance and on 50 patients diagnosed with prostate cancer without drug resistance. The statistical analyses were performed using the GeNePop server and then the results were investigated by the SISA server.

Results: The allele frequencies of A and C alleles in rs137852599 were 0.78 and 0.22 for drug resistant and 0.94 and 0.06 for non-drug resistance groups. The results indicated that there is a meaningful relationship between drug resistance and rs137852599 single-nucleotide polymorphism ($p = 0.020$).

Conclusion: The existence of single-nucleotide polymorphisms may result in drug resistance in individuals diagnosed with prostate cancer. Therefore, investigation of the existence of such polymorphisms can be effective in prescription of suitable drugs for these patients.

Keywords: Docking, Drug resistance, Prostate cancer, Single nucleotide polymorphism

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Email: hoseinsazgar@yahoo.com

بررسی تأثیر چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی rs137852599 در ایجاد مقاومت دارویی به درمان با داروی انزالتامید در بیماران مبتلا به سرطان پروستات در استان اصفهان

بینا کاویانی^۱، حسین سازگار^{۲*}، نوشا ضیاء جهرمی^۲، فرزانه محمدی فارسانی^۳

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه، بررسی نقش پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs137852599 موجود در ژن کدکننده‌ی گیرنده‌ی آندروژن بر مقاومت دارویی بیماران دارای سرطان پروستات به داروی انزالتامید است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش مورد-شاهدی حاضر، آنالیز ARMS-PCR بر روی ژن کدکننده‌ی گیرنده‌ی آندروژن در ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات دارای مقاومت به دارو و ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی انجام گرفت. تحلیل‌های آماری با استفاده از سرور GenPop صورت گرفت و نتایج به دست آمده از طریق سرور SISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی آللی در rs137852599 برای آلل‌های A و C در گروه مقاوم به دارو برابر با ۰/۷۸ و ۰/۲۲ و در گروه غیر مقاوم به دارو برابر با ۰/۹۴ و ۰/۰۶ بود. نتایج نشان می‌دهد که ارتباط معناداری بین وجود مقاومت دارویی و پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs137852599 وجود دارد ($p = ۰/۰۲$).

نتیجه‌گیری: وجود پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی 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.

واژگان کلیدی: مقاومت دارویی، سرطان پروستات، پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی، داکینگ

*نویسنده مسئول: ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

Email: hoseinsazgar@yahoo.com

مقدمه

آندروژن نقش مهمی در مقاومت دارویی این گیرنده دارند (۷). با وجود مطالعات فراوان انجام شده، تاکنون تأثیر بسیاری از پلی مورفیسم‌های موجود در ژن این گیرنده در مقاومت دارویی مشخص نشده است. در این راستا، به بررسی نقش پلی مورفیسم rs137852599 در مقاومت دارویی افراد دارای سرطان پروستات پرداختیم. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ها از لحاظ ژنی با استفاده از تکنیک ARMS-PCR تحلیل شدند. سپس مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی با استفاده از تحلیل‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً صحت مطالعات با استفاده از تحلیل‌های آماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و طراحی پرایمرها
در این پژوهش، آزمایش روی ۵۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پروستات مقاومت به دارو و ۵۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی صورت گرفت. پس از اخذ رضایت نامه کتبی و با رعایت نکات اخلاقی، نمونه‌های خون از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های امید و الزهرا استان اصفهان گرفته شد. به علاوه، برای بررسی داروی تجویز شده به بیماران پرسش نامه‌هایی تهیه شد که توسط بیماران و پزشک معالجه تکمیل گردید تا بهبودی بیماران و یا عدم بهبودی بیماران توسط داروی انزالتامید بررسی گردد. هم چنین به علت وجود پلی مورفیسم در ژن وابسته به جنس، بررسی تعادل هاردی واینبرگ و تعیین درجه هتروزیگوتی به واسطه نمونه گیری خون از جمعیت زنان صورت گرفت. در این راستا، تعداد ۲۵ نمونه‌ی زن به صورت تصادفی انتخاب و بررسی شد. پرایمرها توسط سرور PRIMER1 طراحی (۸) و توسط نرم افزار GeneRunner این پرایمرها از نظر دمایی اتصال و تشکیل دایمر کنترل شدند (۹). هم چنین به منظور بررسی اختصاصیت و عدم اتصال آن با قسمت‌های دیگر ژنوم از برنامه BLAST استفاده گردید (۱۰). در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

سرطان پروستات یکی از بیماری‌های شایع در مردان است که تحت تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار دارد. این بیماری یک بیماری بسیار هتروژن بوده و اغلب در سنین بالاتر از ۵۰ سال رخ می‌دهد. سرطان پروستات معمولاً به آرامی پیشرفت کرده و در ابتدا محدود به غده پروستات می‌باشد و در سایر قسمت‌های بدن پخش نمی‌شود، درحالی که سایر انواع سرطان پروستات شدید بوده و سریعاً در بدن پخش می‌شود (۱). تشخیص این سرطان از طریق تست‌های خونی و به واسطه‌ی بررسی آنتی-ژن اختصاصی پروستات (PSA) صورت می‌پذیرد (۲). گیرنده آندروژن یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های موثر در بروز و پیشرفت سرطان پروستات می‌باشد که مهار آن می‌تواند نقش مهمی در کنترل سرطان پروستات ایفا نماید. ژن گیرنده آندروژن بر روی کروموزوم Xq11-12 قرار دارد و شامل هشت اگزون می‌باشد که چهار موتیف عملکردی را کد می‌کند و شامل دومین انتهای آمینی (NTD)، دومین باند شونده به DNA (DBD)، ناحیه‌ی لولا و یک دومین اتصال به لیگاند (LBD) می‌باشد (۳). ژن گیرنده‌ی آندروژن در ناحیه‌ی LBD خود حاوی یازده آلفا هلیکس و چهار زنجیره کوتاه بتا می‌باشد. به واسطه اهمیت گیرنده آندروژن در کنترل سرطان پروستات، تاکنون بسیاری از داروهای کنترل سرطان از جمله داروی انزالتامید جهت مهار گیرنده آندروژن طراحی و ساخته شده‌اند. این داروها ترکیباتی ضد آندروژن هستند که با اتصال به گیرنده آندروژن موجب مهار عملکرد آن می‌شوند (۴-۶). تاکنون مطالعات بسیاری جهت بررسی نقش پلی مورفیسم‌های مختلف در مقاومت دارویی گیرنده آندروژن انجام گرفته است. بررسی‌ها نشان می‌دهد وجود جهش در ژن گیرنده آندروژن می‌تواند در ایجاد مقاومت دارویی نقش مهمی داشته باشد. مطالعات گراسو و همکاران در بررسی نقش جهش‌های H874Y و L701H، W741C، T877A و گیرنده آندروژن نشان می‌دهد که این جهش‌ها با مهار اتصال داروهای ضد سرطان از جمله فلوتامید به گیرنده

جدول ۱. توالی‌های نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی شده‌ی پیش‌رو و معکوس خارجی و داخلی برای انجام آنالیز ARMS-PCR

	Sequence (5' _ 3')	Tm	Product size
Forward Outer	TCTTCCTTCCCAATAGCCCCGGAAGCTGA	68.91	379
Reverse Outer	ATGGTGGCTGGTCCATAGGAGCGTTCAC	69.93	---
(A Forward Inner)	GAGCCAGGTGTAGTGTGTGCTGGGCA	70.47	205
(C Forward Inner)	GAGCCAGGTGTAGTGTGTGCTGGGCC	70.95	205

آنالیز ARMS-PCR

همراه یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفت. مواد لازم جهت تکنیک ARMS-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. هم‌چنین شرایط بهینه جهت انجام ARMS-PCR در جدول ۳ آورده شده است.

در این آنالیز، دو واکنش PCR با استفاده از یک DNA الگو در دو ویال جداگانه انجام می‌شود که یکی از آن‌ها حاوی پرایمر جهش یافته و دیگری حاوی پرایمر طبیعی است (۱۱). در هر واکنش پرایمرهای مشترک به

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام آنالیز ARMS-PCR با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر.

ماده	مقدار	غلظت
Taq DNA polymerase	۰/۲۵	۱/۲۵ واحد بر میکرولیتر
Baffer PCR(10X)	۲/۵	1X
MgcL2 (50mM)	۰/۷۵	۱/۵ میلی مول
dNTP (10mM)	۰/۵	۰/۲ میلی مول
Primer (Mix F& R 100PMol/ μl)	۲/۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول
Primer F Inner	۲ میکرولیتر	۱۰ پیکومول
DNA Tempelat	۲ میکرولیتر	۲ میکروگرم
Deionised dH ₂ O	۱۴/۵ میکرولیتر	-

ژورده ریخته شد و حجم آن با آب مقطر دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده شد و از آن برای تهیه بافر 1X استفاده شد. سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط گردیده و سپس توسط سمپلر به چاهک‌ها اضافه شد. در یکی از چاهک‌ها نیز شاخص وزن مولکولی DNA جهت تعیین وزن مولکولی محصول PCR اضافه شد.

جدول ۳. شرایط دمایی و برنامه زمانی بهینه جهت آنالیز

ARMS-PCR			
Stage	TM	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

الکتروفورز

برای انجام دادن این تکنیک پس از بستن ژل آگارز ۲ درصد (که از ۰/۴ گرم آگارز و ۲۰ میلی لیتر بافر TBE 1X تهیه می‌شود)، شانه‌ها را از روی ژل برداشته و سینک حاوی ژل الکتروفورز در تانک الکتروفورز قرار داده شد و به آرامی بافر TBE 1X به تانک اضافه گردید تا بافر، تمام سطح ژل را بپوشاند. برای تهیه بافر TBE 10X ابتدا ۱۲۱/۱ گرم تریس (MERK)، ۶۱/۸ گرم اسید بوریک (MERK) و ۷/۴ میلی لیتر محلول EDTA درون بالن

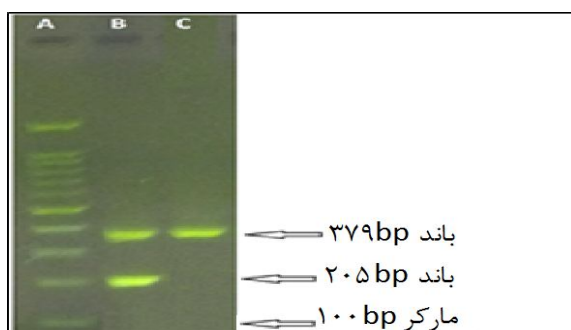
داکینگ

کلیه محاسبات داکینگ در این پروژه توسط نرم افزار AutoDock 4.2 و AutoDockTools انجام شد. الگوریتم ژنتیک لامارک برای جستجوی سطح گیرنده مورد استفاده قرار گرفت (۱۲). 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

نهایت، بررسی ارتباط وجود پلی مورفیسم rs137852599 و مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات با استفاده از آزمون خبی دو و تست فیشر و به واسطه سرور SISA مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

یافته‌ها

پس از انجام آنالیز ARMS-PCR بر روی نمونه‌های خون مردان و بررسی طیف باندهای به دست آمده، باندهایی به طول ۲۰۵ و ۳۷۹ bp بر روی ژل آگارز ۲ درصد (شکل ۱) مشاهده گردید که باند ۳۷۹ در هر دو گروه سالم و جهش یافته مشترک بوده در حالی که باند ۲۰۵ تعیین کننده سالم بودن و یا جهش یافته بودن فرد است و تنها در افراد دارای پلی مورفیسم rs137852599 مشاهده می‌شود.



شکل ۱. بررسی نتایج PCR پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852599. 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.

آنالیزهای جمعیتی

آنالیزهای جمعیتی برای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852599 نشان داد که فراوانی آللی برای پلی مورفیسم مذکور در بیماران مقاوم به درمان با داروی انزالوتامید و در بیماران فاقد مقاومت دارویی به ترتیب برابر با ۰/۰۶ و ۰/۲۲ می‌باشد. نتایج بررسی فراوانی آللی برای پلی مورفیسم rs137852599 در جدول ۴ نمایش داده شده است.

ساخته شد. برای محاسبه شبکه انرژی در اطراف رسپتور اندازه شبکه به صورتی تعیین شد که جایگاه فعال رسپتور در داخل آن قرار گیرد. در این راستا شبکه‌ای دارای ابعاد ۶۰×۶۰×۶۰ با فاصله‌ی ۰/۳۷۵ آنگستروم برای هر دو نقطه در اطراف رسپتور طراحی شده و انرژی تمامی نقاط درون این شبکه محاسبه گردید. در نهایت، نمای اتصال لیگاند به گیرنده و اتصالات هیدروژنی و هیدروفوبی توسط نرم افزار لیگ پلات و VMD نمایش داده شد (۱۳، ۱۴). برای آماده سازی ساختار گیرنده آندروژن، کمپلکس ساختار جهش یافته‌ی گیرنده آندروژن با لیگاند بیکالوتامید با کد دسترسی 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 گردید. در ادامه با استفاده از وب سرور Rosetta backrub (۱۵) جهش در اسید آمینه شماره‌ی ۷۴۱ حذف شد و ساختار طبیعی گیرنده آندروژن با تبدیل اسید آمینه‌ی جهش یافته‌ی لوسین به تریپتوفان به دست آمد. هم‌چنین با ایجاد جهش در اسید آمینه‌ی هیستیدین ۶۸۹ و تبدیل آن به پرولین ساختار SNP به شماره rs137852599 مدل سازی شد. ساختار داروی انزالوتامید با استفاده از وب سرور DrugBank (www.drugbank.ca) به دست آمد، سپس ساختار برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل آماری

در این مطالعه، بررسی آماری داده‌ها با استفاده از محاسبه فراوانی آللی، تعیین درجه هتروزیگوتی، آنالیز فاکتور PIC و بررسی تعادل هاردی واینبرگ انجام گرفت. تعیین میزان هتروزیگوتی، محاسبه فراوانی آللی و بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از سرور GeNePop و به واسطه آزمون دقیق فیشر صورت پذیرفت (۱۶). از سوی دیگر، بررسی میزان اطلاع دهنده‌ی پلی مورفیسم با استفاده از فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی (PIC) و به وسیله‌ی نرم افزار Powermarker نسخه‌ی ۳/۲۵ انجام شد (۱۷). فاکتور PIC از شاخص‌های مهم اطلاع دهنده‌ی در پلی مورفیسم‌های دارای تعادل هاردی واینبرگ است. در

جدول ۴. بررسی فراوانی آللی برای پلی مورفیسم rs137852599

آل	مقاوم (درصد)	غیر مقاوم (درصد)	OR (CI 95%)	p
A (سالم)	۳۹ (۷۸)	۴۷ (۹۴)	۰/۲۲۶ (-۰/۵۹-۰/۸۶۹)	۰/۰۲
C (جهش)	۱۱ (۲۲)	۳ (۶)		

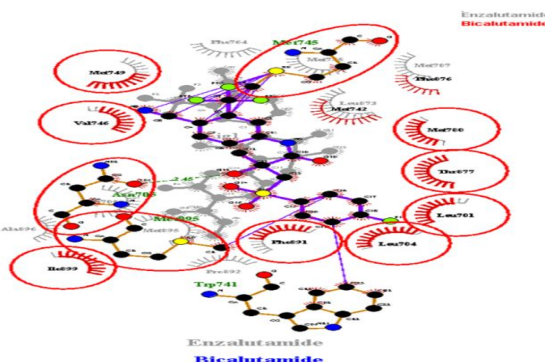
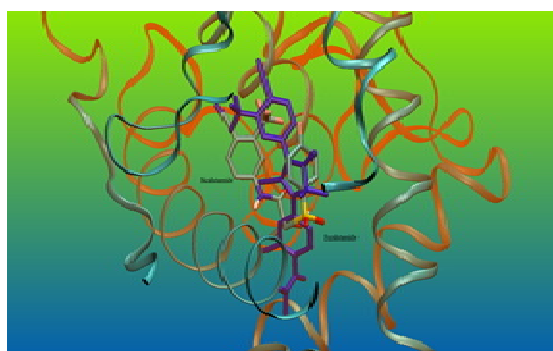
از سوی دیگر، به دلیل حضور پلی مورفیسم rs137852599 بر روی کروموزوم جنسی، بررسی فراوانی ژنوتیپی، درجه هتروزیگوسیتی، میزان اطلاع دهندگی، وجود تعادل هاردی واینبرگ و سایر پارامترهای جمعیتی برای پلی مورفیسم مذکور با استفاده از آنالیز نمونه-های اخذ شده از جمعیتی تصادفی از زنان انجام شد. بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی برای پلی مورفیسم rs137852599 در نمونه‌های اخذ شده از زنان نشان داد که فراوانی آللی برای آلل سالم (A) و جهش یافته (C) در گروه زنان به ترتیب برابر با ۰/۹۰ و ۰/۱۰ بوده و در مجموع ۸۴ درصد (۲۱ نفر) از جمعیت مورد مطالعه دارای ژنوتیپ سالم، ۱۲ درصد (۳ نفر) هتروزیگوت و ۴ درصد (۱ نفر) دارای ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته بودند.

بررسی وجود تعادل هاردی واینبرگ برای پلی-مورفیسم rs137852599 در جمعیت استان اصفهان نشان داد که این پلی مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد ($p = ۰/۱۹۸$). هم‌چنین بررسی درجه هتروزیگوسیتی پلی-مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852599 نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار جامعه برای این پلی مورفیسم به ترتیب برابر با ۱۲ و ۱۸/۳۷ درصد می‌باشد. بنابراین میزان هتروزیگوسیتی این مارکر از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار جامعه کمتر است. به علاوه، بررسی میزان اطلاع دهندگی (PIC) پلی-مورفیسم rs137852599 نشان داد که مقدار PIC برای پلی مورفیسم مذکور برابر با ۰/۱۶۳۸ است. به طور کلی، در صورتی که مقدار پارامتر PIC برای یک پلی مورفیسم بیشتر از ۰/۲۵ باشد، آن پلی مورفیسم به عنوان یک پلی-مورفیسم گویا و با اطلاع دهندگی بالا شناخته می‌شود. بنابراین با توجه به مقدار محاسبه شده برای پارامتر PIC،

پلی مورفیسم rs137852599 در جامعه انسانی استان اصفهان می‌تواند به عنوان یک پلی مورفیسم با اطلاع دهندگی پایین در نظر گرفته شود. در نهایت ارتباط مقاومت دارویی و وجود پلی مورفیسم rs137852599 با استفاده از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که در گروه مقاوم به دارو، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته به صورت معناداری افزایش پیدا می‌کند ($p = ۰/۰۲$) و در نتیجه ارتباط معناداری میان مقاومت دارویی و وجود پلی مورفیسم rs137852599 وجود دارد.

اتصال انزالوتامید به آندروژن رسپتور طبیعی

بررسی نتایج داکینگ انزالوتامید با آندروژن رسپتور طبیعی نشان داد که این دارو با برهمکنش با اسید آمینه‌های موجود در جایگاه فعال گیرنده آندروژن می‌تواند موجب مهار عملکرد این پروتئین در بیماران مبتلا به سرطان پروستات گردد. از جمله مهم‌ترین اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش انزالوتامید و گیرنده آندروژن می‌توان به اسید آمینه‌های لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱، متیونین ۷۴۵، متیونین ۸۹۵، آسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹ اشاره کرد. به علاوه، جهت مقایسه عملکرد داروهای ضد سرطان، این نتایج با نتایج داکینگ یکی دیگر از داروهای موثر در درمان سرطان پروستات به نام بیکالوتامید مقایسه شد. مقایسه نتایج نشان داد به علت شباهت ساختاری بالای این دو دارو، مکانیسم اتصال انزالوتامید و بیکالوتامید به گیرنده آندروژن مشابه بوده و برهمکنش‌های مشابهی با اسید آمینه‌های موجود در جایگاه فعال گیرنده آندروژن ایجاد می‌شود. بررسی نمای شماتیک و ساختار سه بعدی برهمکنش انزالوتامید و بیکالوتامید با آندروژن رسپتور طبیعی در شکل ۲ نشان می‌دهد که اسید آمینه‌های لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱، متیونین ۷۴۵، متیونین ۸۹۵، آسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹، متیونین ۷۴۹، والین ۷۴۶، فیل آلانین ۸۹۱، ترئونین ۸۷۷، متیونین ۷۸۰ مهم‌ترین اسید آمینه‌های مشترک در برهمکنش داروهای انزالوتامید و بیکالوتامید با گیرنده آندروژن می‌باشند.

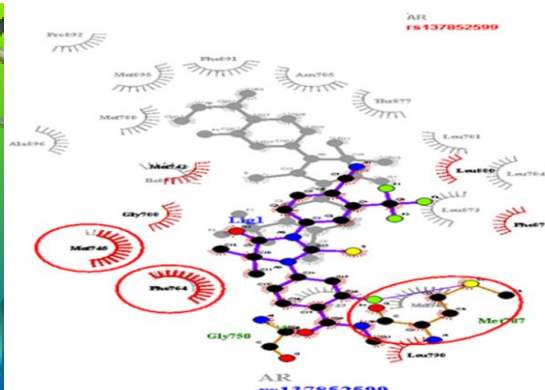
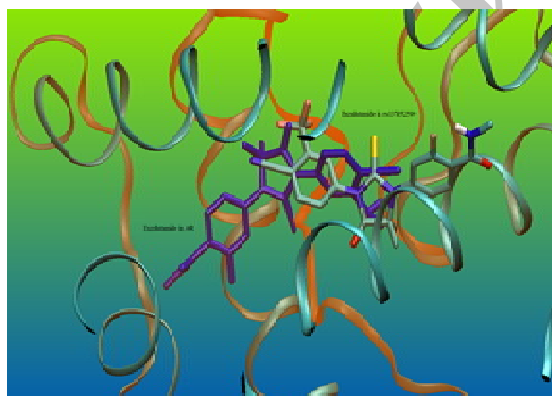


شکل ۲. مقایسه نتایج داکینگ داروهای انزوتامید و بیکالوتامید به گیرندهی آندروژن. در این شکل برهمکنش داروهای انزوتامید و بیکالوتامید با گیرنده آندروژن نشان می‌دهد که اسیدآمینه‌های لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱، متیونین ۷۴۵، متیونین ۸۹۵، اسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹، متیونین ۷۴۹، والین ۷۴۶، فنیل آلانین ۸۹۱، ترئونین ۸۷۷، متیونین ۷۸۰ در برهمکنش داروهای انزوتامید و بیکالوتامید با گیرنده آندروژن مشترک هستند. ساختار سه بعدی برهمکنش داروهای انزوتامید و بیکالوتامید با گیرنده آندروژن (شکل بالا) نشان می‌دهد که هر دو دارو به خاطر ساختار مشابه تقریباً در جایگاه مشابهی قرار می‌گیرند.

برهمکنش آن با جایگاه فعال گیرندهی آندروژن کاهش می‌یابد. به علاوه با تغییر محل اتصال دارو، الگوی برهمکنش‌ها نیز تغییر کرده و بسیاری از اسید آمینه‌های مهم، توانایی ایجاد برهمکنش با داروی انزوتامید را ندارند (شکل ۳).

اتصال انزوتامید به گیرندهی آندروژن جهش یافته

بررسی نتایج داکینگ داروی انزوتامید با گیرندهی آندروژن دارای پلی مورفیسم نشان داد که در صورت ایجاد جهش در گیرنده آندروژن، محل اتصال انزوتامید به گیرندهی آندروژن تغییر کرده و در نتیجه میزان



شکل ۳. مقایسه نتایج داکینگ داروی انزوتامید با گیرنده آندروژن سالم و جهش یافته (۱۳۷۸۵۲۵۹۹). در شکل سمت راست نمایی از برهمکنش داروی انزوتامید با گیرندهی آندروژن سالم و جهش یافته نشان داده شده است که در آن بسیاری از برهمکنش‌های مهم دارو و گیرندهی جهش یافته حذف شده اند. بررسی نمای سه بعدی برهمکنش داروی انزوتامید با گیرنده سالم و جهش یافته (شکل بالا) نشان می‌دهد که جایگاه و مکانیسم اتصال دارو به گیرندهی جهش یافته بسیار متفاوت از گیرنده سالم می‌باشد.

جدول ۵. انرژی اتصال داروی انزوتامید به گیرندهی آندروژن طبیعی و جهش یافته به تفکیک سهم‌های مختلف انرژی

$\Delta G_{\text{Binding}}$ Kcal/mol	Intermolecular Energy	Internal Energy	Torsional Energy	Unbond Energy	ساختار
-2.13	-2.33	-0.35	1.19	-0.35	AR
2.2	2.03	-0.55	1.19	-0.55	rs137852599

داشته باشد (۷). هم چنین تحقیقات هوانگ و همکاران بر روی پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده‌ی آندروژن نشان داد که وجود پلی مورفیسم‌های rs7201637، rs4243229 و rs16934641 در ژن گیرنده آندروژن موجب افزایش احتمال ابتلا فرد به سرطان پروستات و پیشرفت آن می‌گردد (۱۹). در سال ۲۰۰۳، هارا و همکاران به بررسی نقش جهش‌های ژن گیرنده‌ی آندروژن در مقاومت دارویی بیماران مبتلا به سرطان پروستات پرداختند و دریافتند که سرطان پروستات پیشرفته‌ی مقاوم به اخته که در اثر بیان بیش از اندازه‌ی ژن گیرنده‌ی آندروژن ایجاد می‌گردد و از طرفی جهش در اسید آمینه تریئوفان شماره ۷۴۱ و تبدیل این اسید آمینه به اسید آمینه‌ی لوسین می‌تواند منجر به مقاومت دارویی بیماران نسبت به داروی هیدروکسی فلوتامید گردد (۲۴).

امروزه تکنیک داکینگ یکی از مهم‌ترین ابزارهای تئوری بررسی اثرات جهش بر روی قدرت اتصال لیگاند به پروتئین می‌باشد. در این تکنیک، انرژی اتصال لیگاند در جایگاه‌های مختلف گیرنده و هم چنین حالت‌های مختلف چرخش پیوندهای لیگاند محاسبه می‌شود. در نهایت این تکنیک با مقایسه انرژی اتصال لیگاند به جایگاه‌های مختلف پروتئین، جایگاه دارای بهترین انرژی اتصال را به عنوان بهترین جایگاه برای اتصال لیگاند معرفی می‌کند (۱۴-۱۲). یکی از مزایای مهم تکنیک‌های نظری مانند داکینگ، توانایی ارائه مکانیسم‌های مولکولی مانند بررسی عملکرد داروها و تشریح مکانیسم مقاومت‌های دارویی می‌باشد. به عنوان مثال، باستو و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با استفاده از داکینگ و دینامیک مولکولی به بررسی مکانیسم عمل داروهای بیکالوتامید و انزالوتامید در مهار گیرنده آندروژن پرداختند. نتایج نشان داد که این دو دارو در جایگاه فعال گیرنده آندروژن در یک موقعیت قرار گرفته و با اسید آمینه‌های خاصی برهمکنش ایجاد می‌کنند. در نتیجه این برهمکنش‌ها دارو مانع از اتصال آندروژن به گیرنده شده و به عنوان آنتاگونیست برای این گیرنده عمل می‌کند (۲۵). سرطان پروستات، در میان تمامی انواع سرطانی که سبب

عدم اتصال صحیح انزالوتامید به گیرنده‌ی آندروژن می‌تواند موجب بروز مقاومت دارویی به داروی انزالوتامید در بیماران مبتلا به سرطان پروستات گردد. در نهایت مقایسه انرژی اتصال داروی انزالوتامید به آندروژن رستور طبیعی و جهش یافته نشان می‌دهد که جهش در ساختار آندروژن سبب مثبت تر شدن انرژی اتصال شده به میزان $4/33+$ کیلو کالری بر مول شده و در نتیجه موجب کاهش قدرت اتصال دارو به گیرنده می‌گردد (جدول ۵)، بنابراین ایجاد جهش فرآیند اتصال انزالوتامید به گیرنده‌ی آندروژن را نامطلوب می‌سازد. همین امر موجب کاهش اتصال و در نتیجه مقاومت دارویی گیرنده‌ی آندروژن جهش یافته‌ی مورد بحث به داروی انزالوتامید می‌گردد.

بحث

در دهه‌های اخیر، تحقیقات انجام شده بر روی تأثیر پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی بر عملکرد گیرنده‌ی آندروژن نشان می‌دهد که پلی مورفیسم‌ها می‌توانند در تشخیص (۱۹)، پیشرفت (۲۰) و ایجاد مقاومت دارویی (۲۱)، در سرطان پروستات نقش داشته باشند. یکی از مثال‌های بارز این تأثیر، جهش اسید آمینه‌ی فنیل آلانین ۸۷۶ گیرنده‌ی آندروژن به لوسین است که باعث می‌شود انزالوتامید به عنوان یک آگونیست تشخیص داده شود و بدین ترتیب مقاومت دارویی در محیط داخل بدن رخ دهد (۲۳). در گیرنده‌ی آندروژن بسیاری از جهش‌ها از نوع جهش‌های جایگزینی تک نوکلئوتیدی هستند که ۵۱ درصد از این جهش‌ها در مناطق مربوط به دومین باند شونده به DNA (DBD)، ۴۱ درصد در مناطق مربوط به دومین انتهای آمینی (NTD) و ۷ درصد در دومین اتصال به لیگاند (LBD) رخ می‌دهد (۲۳). مطالعات گراسو و همکاران در رابطه با نقش جهش‌های L701H، W741C، T877A و H874Y در گیرنده‌ی آندروژن نشان می‌دهد که این جهش‌ها در در دومین متصل شونده به لیگاند گیرنده‌ی آندروژن رخ می‌دهد و می‌تواند در ایجاد مقاومت دارویی در داروهای ضد سرطان به خصوص داروی فلوتامید نقش

واینبرگ مقدار PIC برای پلی مورفیسم rs137852599 مورد بررسی قرار گرفت. از سوی دیگر، برای بررسی میزان اطلاع دهندگی و گویا بودن این پلی مورفیسم از آنالیز PIC استفاده شد. نتایج این آنالیز نشان می‌دهد که مقدار PIC برای پلی مورفیسم rs137852599 برابر با ۰/۱۶۳۸ است که نشان دهنده میزان اطلاع دهندگی پایین این پلی مورفیسم می‌باشد. در نهایت، ارتباط مقاومت دارویی و وجود پلی مورفیسم با استفاده از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که در گروه مقاوم به دارو، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته به صورت معناداری افزایش پیدا می‌کند (۰/۰۲ = p) و در نتیجه ارتباط معناداری میان مقاومت دارویی و وجود پلی مورفیسم rs137852599 وجود دارد.

ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی مکانیسم وجود مقاومت دارویی به درمان با داروی انزالوتامید با استفاده از تکنیک داکینگ نشان می‌دهد که وجود پلی مورفیسم rs137852599 در گیرنده آندروژن می‌تواند موجب عدم اتصال دارو به جایگاه مناسب و در نتیجه کم شدن قدرت اتصال دارو به گیرنده گردد. در این حالت، برهمکنش بین اسید آمینه‌های مهم در جایگاه فعال گیرنده آندروژن مانند لوسین ۷۰۴، لوسین ۷۰۱ آسپارژین ۷۰۵ و ایزولوسین ۸۹۹ از بین رفته و دارو نمی‌تواند موجب مهار اتصال آندروژن به گیرنده گردد. در این راستا بررسی انرژی اتصال دارو به گیرنده نشان می‌دهد که در طی جهش انرژی اتصال از ۲/۱۳- کیلو کالری برمول برای آندروژن طبیعی به ۲/۲+ کیلو کالری برمول برای rs137852599 افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

فراوانی آللی در rs137852599 برای آلل‌های A و C در گروه مقاوم به دارو برابر با ۰/۷۸ و ۰/۲۲ و در گروه غیر مقاوم به دارو برابر ۰/۹۴ و ۰/۰۶ بود که نتایج نشان می‌دهد ارتباط معناداری بین وجود مقاومت دارویی و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852599 وجود دارد (۰/۰۲ = p). از سوی دیگر، ابزارهای بیوانفورماتیکی با

مرگ در مردان می‌گردند، در رتبه‌ی دوم قرار دارد. با این حال، در میان مردان ۴۵ ساله، سرطان پروستات پنجمین عامل مرگ و میر است (۲۶). با توجه به آمار بالای مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات در مردان، این مطالعه با هدف بررسی نقش پلی مورفیسم rs137852599 در مقاومت دارویی گیرنده آندروژن در سرطان پروستات طراحی گردید. در این پژوهش، جامعه آماری مورد مطالعه تعداد ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و مصرف‌کننده‌ی داروی انزالوتامید در دو گروه شامل ۵۰ نفر بیماران مقاوم به دارو و ۵۰ نفر بیمار فاقد مقاومت دارویی در نظر گرفته شد. نتایج بررسی فراوانی آللی برای پلی مورفیسم rs137852599 نشان داد که در گروه مقاوم به دارو، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته (آلل C) ۰/۲۲ و برای آلل سالم (آلل A) ۰/۷۸ و در گروه غیر مقاوم، فراوانی آللی برای آلل جهش یافته ۰/۰۶ و برای آلل سالم ۰/۹۴ می‌باشد. بررسی ژن گیرنده آندروژن نشان می‌دهد که این ژن یک ژن وابسته به جنس بوده و بنابراین جهت محاسبه درجه هتروزیگوسیتی برای پلی مورفیسم rs137852599 و هم‌چنین بررسی تعادل هاردی واینبرگ از جمعیت زنان استفاده می‌شود. در این رابطه تعداد ۲۵ نمونه‌ی زن به صورت تصادفی انتخاب شد و مورد بررسی قرار گرفت. بررسی فراوانی آللی در جمعیت زنان نشان می‌دهد که فراوانی آللی برای آلل سالم برابر ۰/۹۰ و برای آلل جهش یافته برابر ۰/۱۰ می‌باشد. به علاوه بررسی تعادل هاردی واینبرگ برای پلی مورفیسم rs137852599 با استفاده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که مقدار p در این جمعیت برابر ۰/۱۹۸ است که نشان می‌دهد این پلی مورفیسم در جمعیت مورد در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد. هم‌چنین بررسی درجه هتروزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم نشان داد که میزان هتروزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم برابر با ۱۲ درصد می‌باشد، در حالی که میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار جامعه برابر با ۱۸/۳۷ درصد می‌باشد و بنابراین میزان هتروزیگوسیتی این ژن از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار جامعه کمتر است. در ادامه با توجه به وجود تعادل هاردی

European journal of medicinal chemistry. 2016;118:230-43.

6. Raymond M. GENEPOP: Population genetics software for exact tests and ecumenism. Vers. 1.2. J Hered. 1995;86:248-9.

7. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castrate resistant prostate cancer. Nature. 2012;487(7406):239.

8. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. The Open Bioinformatics Journal. 2012;6(1).

9. Spruyt M, and F. Buquicchio. Gene Runner version 3.05. Website <http://www.generunner.net/> [accessed 10 2015] (1994).

10. Johnson M, Zaretskaya I, Raytseles Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic acids research. 2008;36(suppl_2):W5-W9.

11. Medrano RFV, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. Molecular biotechnology. 2014;56(7):599-608.

12. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of computational chemistry. 2009;30(16):2785-91.

13. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein Engineering, Design and Selection. 1995;8(2):127-34.

14. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics. 1996;14(1):33-8.

15. Lauck F, Smith CA, Friedland GF, Humphris EL, Kortemme T. RosettaBackrub—a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. Nucleic acids research. 2010;38(suppl_2):W569-W75.

16. Raymond M. GENEPOP: Population genetics software for exact tests and ecumenism. Vers. 1.2. J Hered. 1995;86:248-9.

17. Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 2005;21(9):2128-9.

18. Uitenbroek D. SISA Binomial. Southampton: DG Uitenbroek. 1997.

بررسی مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی توانست درک صحیحی از ماهیت اتصال دارو به گیرنده آندروژن، اسید آمینه‌های درگیر در واکنش و مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی ایجاد نماید. به علاوه بررسی درجه هتروزیگوسیتی، وجود تعادل هاردی واینبرگ و آنالیز PIC اطلاعات ارزشمندی در رابطه با خصوصیات ژنتیکی پلی مورفیسم rs137852599 ارائه نموده است که می‌تواند در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه 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 نمونه در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. 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: update 2010. CA: a cancer journal for clinicians. 2010;60(2):70-98.
2. Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Reissigl A, Oberaigner W, Schönitzer D, et al. Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. Urology. 2001;58(3):417-24.
3. Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F. The hinge region in androgen receptor control. Molecular and cellular endocrinology. 2012;358(1):1-8.
4. Soloway MS, Pareek K, Sharifi R, Wajsman Z, McLEOD D, Wood DP, et al. Neoadjuvant androgen ablation before radical prostatectomy in cT2bNxMo prostate cancer: 5-year results. The Journal of urology. 2002;167(1):112-6.
5. Bassetto M, Ferla S, Pertusati F, Kandil S, Westwell AD, Brancale A, et al. Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer.

19. Huang T-Y, Chien T-M, Liu C-C, Lee H-Y, Yu C-C, Huang C-Y, et al. Prognostic significance of genetic polymorphisms in disease progression and survival in prostate cancer after androgen deprivation therapy. *Urological Science*. 2015;26(2):81-4.
20. Obinata D, Takada S, Takayama K-i, Urano T, Ito A, Ashikari D, et al. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *European Journal of Cancer*. 2016;57:39-49.
21. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castrate resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487(7406):239.
22. 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;3(9):1020-9.
23. Korpai M, Korn JM, Gao X, Rakiec DP, Ruddy DA, Doshi S, et al. An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide). *Cancer discovery*. 2013;3(9):1030-43.
24. Hara T, Miyazaki J. I, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, Miyamoto M. Novel mutations of androgen receptor. *Cancer research*. 2003; 63(1): 149-153.
25. Bassetto M, Ferla S, Pertusati F, Kandil S, Westwell AD, Brancale A, et al. Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer. *European journal of medicinal chemistry*. 2016; 118(1):230-43.
26. Gohagan JK, Prorok PC, Kramer BS, Cornett JE. Prostate cancer screening in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial of the National Cancer Institute. *The Journal of urology*. 1994;152(5):1905-9.