

## بررسی تمایل اتصال داروهای ضد سرطان اکتینومایسین D و میتوزانترون به کروماتین کبد موش صحرایی

زهرا حاجی حسن<sup>۱</sup>، عذرا ربانی چادگانی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۷

تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۷

### چکیده

اکتینومایسین D و میتوزانترون داروهای ضد سرطانی هستند که در درمان طیف وسیعی از سرطانها کاربرد دارند. DNA به عنوان یکی از اهداف اصلی این داروها معرفی شده که نتیجه این اتصال، مهار همانندسازی DNA و رونویسی RNA می باشد. در هسته سلول‌های یوکاریوتی، DNA بصورت برهنه نبوده و همراه با پروتئین‌های هیستونی ساختار فشرده کروماتین را تشکیل می‌دهد، در این تحقیق تأثیر دو داروی میتوزانترون و اکتینومایسین D بر روی کروماتین استخراج شده از کبد موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز و مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis نشان‌دهنده اتصال دو داروی فوق با کروماتین اما اتصال قویتر برای

<sup>۱</sup> استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، گروه بیوشیمی؛ hajihasan@ut.ac.ir

<sup>۲</sup> استادیار، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، گروه مهندسی علوم زیستی؛ rabbani@ibb.ut.ac.ir

میتوزانترون می‌باشد. حذف باندهای مربوط به پروتئین‌های هیستونی در مقایسه با نمونه‌های کنترل در ژل الکتروفورز و کاهش جذب در طول موج‌های ۶۰۸ و ۴۴۰ نانومتر که به ترتیب مربوط به طول موج‌های شاخص داروی میتوزانترون و اکتینومایسین D هستند حاکی از فشردگی و ترسیب کروماتین پس از اتصال با داروهای فوق‌الذکر است. منحنی‌های اسکاچارد و  $r$  نسبت به  $C_f$  نشان‌دهنده اتصال هر دو دارو بصورت تعاونی مثبت به کروماتین بوده و مقادیر ثابت اتصال ( $K_a$ ) محاسبه شده برای میتوزانترون  $10^7 M^{-1} \times 7/1$  و برای اکتینومایسین  $10^6 \times 0/35$  حاکی از اتصال داروی میتوزانترون با تمایل بیشتر به کروماتین می‌باشد. به علاوه منفی بودن مقادیر انرژی آزاد محاسبه شده برای اتصال هر دو دارو به کروماتین نشان‌دهنده انجام هر دو واکنش اتصال بصورت خود به خودی می‌باشد.

#### واژه‌های کلیدی: اکتینومایسین D، کروماتین، میتوزانترون، داروهای ضد سرطان

DNA رابط موجب فشرده شدن نوکلئوزوم‌ها و ایجاد ساختارهای سطح بالاتر کروماتین می‌شود (Rapkin et al, 2012). اکتینومایسین D با نام تجاری داکتینومایسین (Dactinomycin) در بازار وجود دارد یکی از قدیمی‌ترین داروهای شیمی درمانی است که در درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارد (Lewis, 1972; Koba and Konopa, 2005). این دارو از اعضای ابرخانواده اکتینومایسین‌ها که آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌پپتیدی جدا شده از باکتری‌های خاک (گونه‌های استرپتومیسس) می‌باشند، است. نتایج حاصل از بررسی‌های متعدد حاکی از اتصال این دارو با مولکول

#### مقدمه

در هسته سلول‌های یوکاریوت DNA با یک سری پروتئین‌های بسیار قلیائی بنام هیستون (Histone) کمپلکس نوکلئوپروتئینی را می‌سازند که کروماتین نامیده می‌شود. پنج نوع هیستون اصلی وجود دارد که شامل H1, H2A, H2B, H3, H4 می‌باشند (Bradbury and Van Hold, 2004). دو دایمر H2A, H2B و تترامر H3, H4 ساختار اکتامری می‌سازند و ملکول DNA  $1/75$  دور حول اکتامر پیچیده و نوکلئوزوم‌ها را که واحد ساختاری کروماتین می‌باشند را تشکیل می‌دهند. هیستون H1 با اتصال به ناحیه

که باعث استحکام بیشتر میانکنش بین دو مولکول مولکولی شود (Li et al, 2005; Agarwal et al, 2013). اتصال دو داروی فوق با هدف اصلی یعنی مولکول DNA و به عبارت دیگر اینترکاله شدن همراه با تغییر ساختار فضایی مولکول DNA بوده که این اتصال فرایندهای حیاتی سلول نظیر سنتز DNA و RNA را مختل خواهد نمود (Aivasashvilli et al, 1983; Nishio et al, 1983). از آنجایی که در سلول DNA همراه با پروتئین‌های هیستونی و غیر هیستونی ساختار فشرده کروماتین را بوجود می‌آورد به نظر میرسد که کروماتین موجود در هسته می‌تواند جایگاه‌های متنوع و بسیاری را برای اتصال این داروها فراهم آورد. لذا در این تحقیق سعی بر این است که میانکنش دو داروی فوق با کروماتین استخراج شده از کبد موش صحرایی بطور جداگانه و در مقایسه با یکدیگر بررسی شود.

### مواد و روش‌ها

#### ۱- تهیه نمونه‌های دارویی

داروهای میتوزانترون هیدروکلراید (غلظت ۲ mg/ml در آب) و اکتینومایسین D (غلظت ۱ mg/ml در آب) از هلال احمر ایران خریداری شدند. داروها قبل از استفاده در بافر ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH= ۷/۴ رقیق شده و غلظت‌های نهایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ضریب جذب مولی

DNA می‌باشد به نحویکه دارو از طریق حلقه فنوکسازون (phenoxazone) خود بین جفت بازهای DNA در نواحی GpC اینترکاله شده و دو حلقه پنتاپپتیدی آن در شیار کوچک DNA جای می‌گیرد (شکل ۱) (Sha et al, 2000; Paramarathan et al, 2012; Cesconetto et al, 2013). آنالیزها و مطالعات ته نشینی و هیدرودینامیک نشان دهنده اتصال داروی اکتینومایسین D با نوکلئوزوم‌ها بوده به نحویکه دارو پس از اتصال با نوکلئوزوم های ۱۷۵ جفت بازی فاقد H1-H5 قادر به باز کردن (Unfolding) ساختار نوکلئوزوم‌ها می‌باشد (Cacchione et al, 1986).

داروی سنتتیک میتوزانترون که با نام تجاری نووانترون (Novantrone) در بازار عرضه می‌شود یک آمینوآنتراکوئینون است که از نظر شیمیایی به خانواده آنتراسنیدیون‌ها تعلق دارد. این دارو در درمان انواع سرطان‌ها مثل سرطان سینه پیشرفته، لوسمی حاد، لنفومای پیشرفته و بیماری MS کاربرد دارد (Ory et al, 2008; Scott and Figgitt, 2004; Chan and Lo-Coco, 2013). ساختار شیمیایی این دارو متشکل از یک بخش حلقوی مسطح سه حلقه ای است (شکل ۱) که از این طریق بین جفت بازهای DNA اینترکاله شده و دو زنجیره جانبی حاوی گروه های آمین با بار مثبت آن اتصالات الکتروستاتیک با گروه های فسفات مولکول DNA برقرار می‌نمایند

( $\epsilon$ )  $10^4$  Mol<sup>-1</sup> Cm<sup>-1</sup> در ۶۰۸ نانومتر برای داروی میتوزانترون و  $21900$  Mol<sup>-1</sup> Cm<sup>-1</sup> در ۴۴۰ نانومتر برای اکتینومایسین D تعیین شدند.

## ۲- تهیه کروماتین از کبد موش صحرایی و میانکنش آن با داروها

ابتدا هسته‌ها به روش Burgoyne و همکارانش از کبد موش های صحرایی نژاد ویستار (vistar) تهیه شدند (Burgoyne et al, 1970). هسته‌های خالص شده در بافر ۰/۲۵ مولار سوکروز، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با pH= ۷/۴ حاوی یک میلی مولار کلرید کلسیم سوسپانسیون شده و میزان جذب DNA با استفاده از مقدار جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. از سوسپانسیون هسته با اضافه کردن آنزیم ماکروکوکال نوکلئاز با غلظت نهایی سه واحد به ازای هر میلی گرم DNA و محلول ۰/۲۵ میلی مولار EDTA با pH= ۸ کروماتین محلول تهیه شد (Rabbani et al, 1999). به منظور بررسی میانکنش کروماتین حاصله با داروها، غلظت مناسبی از کروماتین بطور جداگانه با غلظت‌های متغیر داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D در تاریکی به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه و سپس مورد بررسی قرار گرفتند.

## ۳- اسپکتروسکوپی UV-Vis

نمونه‌های حاصل از میانکنش کروماتین با داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و میزان جذب محلول‌های رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis (carry 100) به ترتیب در طول موج‌های ۶۰۸ و ۴۴۰ نانومتر (جذب شاخص داروها با توجه به طیف های جذبی شکل ۱ قسمت الف و ب) ثبت گردید.

## ۴- الکتروفورز پروتئین‌ها بر روی ژل

محلول‌های رویی حاصل از میانکنش بر روی ژل SDS پلی آکریل آمید ۱۵ درصد مطابق روش لاملی (Laemmli, 1970) الکتروفورز شدند. ژل با رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شده و در محلول متانول/اسید استیک رنگ بری شد.

## ۵- روش دیالیز تعادلی

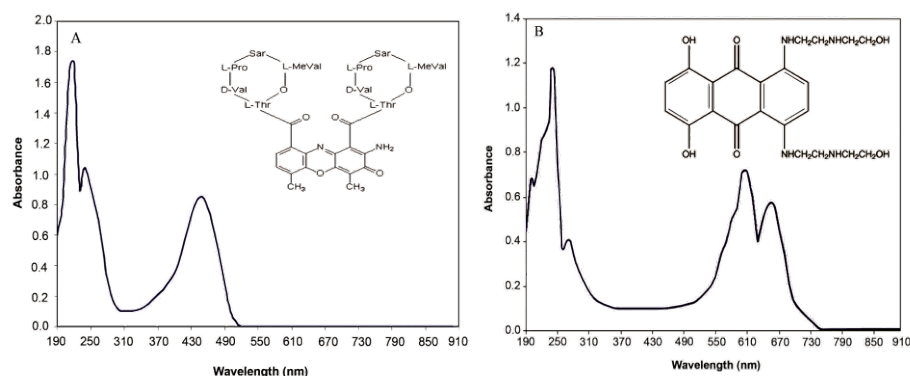
ابتدا غلظت‌های متفاوتی از داروها با غلظت‌های ثابتی از کروماتین در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با pH= ۷/۴ انکوبه گردید. در حدود یک میلی لیتر از نمونه‌های فوق در هر کیسه دیالیز ریخته شده و در مقابل غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی دیالیز شدند. سپس با توجه به ضریب جذب مولی ( $\epsilon$ ) داروها و حداکثر جذب داروی میتوزانترون و اکتینومایسین D

رابطه ترمودینامیکی  $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_a)$  مقدار  $\Delta G^\circ$  (انرژی آزاد) مربوط به میانکنش‌های مربوطه تعیین گردید (Freifelder, 1982).

### نتایج

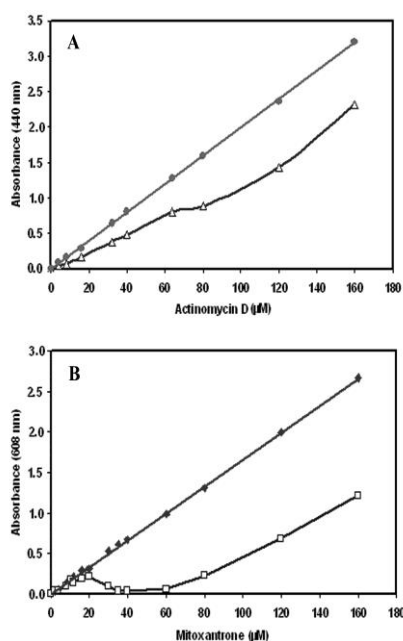
در ابتدا خصوصیت اسپکتروسکوپی داروی میتوزانترون و اکتینومایسین D بررسی گردید. لذا طیف جذبی داروهای فوق بین طول موج‌های ۱۹۰ تا ۹۰۰ نانومتر ترسیم گردید (شکل ۱). همانطور که ملاحظه می‌شود طیف جذبی داروی اکتینومایسین D دارای دو قله جذبی در ۲۲۰ و ۲۵۰ نانومتر و یک قله جذبی نسبتاً بلند دیگر در ۴۴۰ نانومتر می‌باشد (شکل ۱ قسمت A). طیف جذبی داروی میتوزانترون دارای یک قله جذبی بلند در ۲۴۰ نانومتر و یک قله جذبی کوتاه در ۲۷۳ نانومتر و دو قله جذبی دیگر در ۶۰۸ و ۶۶۰ نانومتر می‌باشد (شکل ۱ قسمت B).

به ترتیب در ۶۰۸ و ۴۴۰ نانومتر قبل و بعد از دیالیز مقادیر غلظت مولی کل دارو ( $C_t$ )، غلظت مولی داروی آزاد ( $C_f$ ) و غلظت مولی داروی متصل شده به مکانهای اتصال در کروماتین ( $C_b$ ) تعیین شدند. با تعیین مقدار جذب کروماتین تهیه شده در ۲۶۰ نانومتر مقادیر  $r$  (نسبت تعداد مولهای داروی متصل شده به تعداد کل مولهای کروماتین) و  $r/C_f$  بدست آورده شدند. منحنی اسکاچارد بر اساس فرمولهای زیر ترسیم گردید (Scatchard, 1949):  $r/C_f = n/K_d - r/K_d$  یا  $r/C_f = K_a(n-r)$  همچنین نمودار  $r$  در برابر  $C_f$  که یک نمودار اشباعی است ترسیم شد. با امتداد حد ماکزیمم  $r$  به  $C_f = 0$  تعداد جایگاه‌های ظاهری اتصال ( $n$ ) بدست آمد. با برون‌یابی منحنی هیل به  $\ln(C_f) = 0$ ، عرض از مبدا  $\ln(K_a)$  بدست آمد که با گرفتن آنتی‌لگاریتم، مقدار  $K_a$  (ثابت اتصال دارو) حاصل شد. با توجه به



شکل ۱: طیف جذبی و ساختار شیمیایی اکتینومایسین D در غلظت ۳۱  $\mu\text{M}$  معادل ۴۰  $\mu\text{g/ml}$  (قسمت A) و میتوزانترون در غلظت ۴۵  $\mu\text{M}$  معادل ۲۰  $\mu\text{g/ml}$  (قسمت B).

در مقدار جذب نشان می‌دهند که این افت جذب حاکی از حضور داروی متصل شده به کروماتین در تجمعات دارو و کروماتین و ترسیب آن به همراه کروماتین می‌باشد.

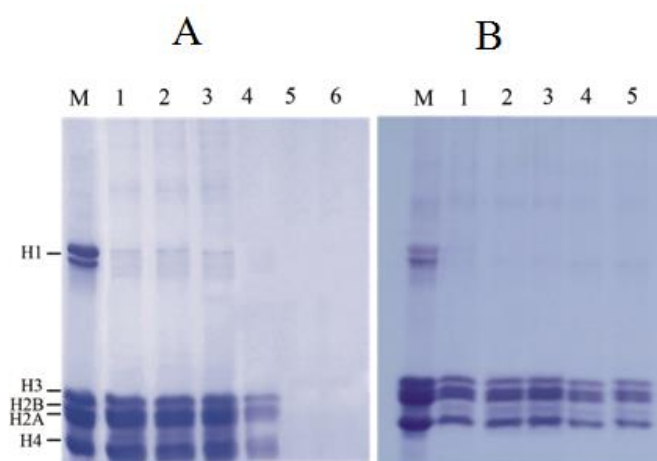


شکل ۲: تغییرات میزان جذب نمونه‌های حاصل از میانکنش داروی اکتینومایسین D (قسمت A) و داروی میتوزانترون (قسمت B) با کروماتین استخراج شده از کبد موش صحرائی. (●) تغییرات میزان جذب داروی اکتینومایسین D در طول موج ۴۴۰ نانومتر. (▲) تغییرات میزان جذب محلول رویی حاصل از میانکنش کروماتین با داروی اکتینومایسین D در طول موج ۴۴۰ نانومتر. (◆) تغییرات میزان جذب داروی میتوزانترون در طول موج ۶۰۸ نانومتر. (□) تغییرات میزان جذب محلول رویی حاصل از میانکنش کروماتین با داروی میتوزانترون در طول موج ۶۰۸ نانومتر.

لذا با توجه به طیف جذبی داروها، جذب در ۴۴۰ نانومتر برای داروی اکتینومایسین D و در ۶۰۸ نانومتر برای داروی میتوزانترون به عنوان جذب شاخص انتخاب گردید. سپس کروماتین محلول تهیه شده بطور جداگانه با غلظت‌های متفاوت دو دارو میانکنش داده شد. از آنجاییکه نتیجه میانکنش هر دو داروی فوق با کروماتین، ترسیب کروماتین می‌باشد لذا نمونه‌ها طبق قسمت ۲ مواد و روشهای همین مقاله سانتریفوژ شده و محلولهای رویی جمع آوری شدند. به منظور مطالعه میانکنش داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D با کروماتین از بررسی مقدار داروی موجود در محلول‌های رویی حاصل از میانکنش (ثابت جذب در طول موج‌های ۴۴۰ و ۶۰۸ نانومتر) و مقایسه با جذب غلظت‌های معادل دارو در غیاب کروماتین استفاده گردید. شکل ۲ قسمت A و B تغییرات میزان جذب را در طول موج‌های ۴۴۰ و ۶۰۸ نامومتر برای دو داروی میتوزانترون و اکتینومایسین D نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود جذب نمونه‌های هر دو دارو بصورت یک خط راست بوده در حالیکه نمونه‌های کروماتین تیمار شده با داروها نسبت به شاهد‌های دارو کاهش شدیدی را

غلظت‌های بالاتر دارو حذف نسبی و کم‌رنگ شدن بندهای پروتئینی در غلظت‌های بالاتر از  $50 \mu\text{M}$  داروی اکتینومايسين D و حذف کامل بندهای پروتئینی در غلظت‌های بالاتر از  $30 \mu\text{M}$  داروی میتوزانترون مشاهده می‌شود. حذف بندهای پروتئینی در غلظت‌های بالای دارو حاکی از رسوب نمونه‌های پروتئینی به همراه تجمعات کروماتین و دارو می‌باشد که این تأییدی بر میانگش هر دو دارو با کروماتین می‌باشد.

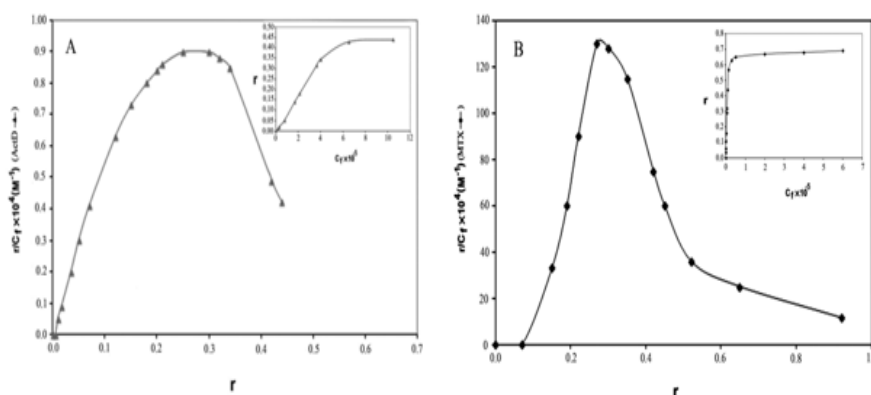
به منظور تعیین اجزای پروتئینی موجود در محلول‌های رویی حاصل از میانگش کروماتین با غلظت‌های مختلف داروها، این نمونه‌ها بر روی ژل SDS پلی آکريل آميد ۱۵ در صد الکتروفورز شدند (شکل ۳). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود در غلظت‌های پایین داروها الگوی پروتئین‌های موجود مشابه نمونه کنترل (فاقد دارو) است و شامل هیستون H1 و هیستون‌های Core (H2A, H2B, H3 و H4) می‌باشد اما در



شکل ۳: طرح الکتروفورزی پروتئین‌های محلول رویی کروماتین تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی میتوزانترون (قسمت A) و اکتینومايسين D (قسمت B) بر روی ژل SDS- پلی آکريل آميد ۱۵٪ رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. (A) شماره‌های ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار داروی میتوزانترون و M مارکر پروتئین‌های هیستونی می‌باشد. (B) شماره‌های ۱ الی ۵ به ترتیب غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میکرومولار داروی اکتینومايسين D و M مارکر پروتئین‌های هیستونی می‌باشد.

می‌شود منحنی‌های اسکاچارد در مورد هر دو دارو بصورت زنگوله‌ای شکل می‌باشند که نشان‌دهنده اتصال هر دو دارو بصورت تعاونی مثبت به کروماتین می‌باشد.

به منظور بررسی چگونگی اتصال دو داروی مورد مطالعه به کروماتین و تعیین پارامترهای اتصال از روش دیالیز تعادلی استفاده گردید (شکل ۴). همانطور که ملاحظه



شکل ۴: A) منحنی اسکاچارد و تغییرات  $r$  مربوط به اتصال داروی اکتینومایسین D (▲) به کروماتین برحسب غلظت مولی داروی آزاد در دمای اتاق. B) منحنی اسکاچارد و تغییرات  $r$  مربوط به اتصال داروی میتوزانترون (◆) به کروماتین برحسب غلظت مولی داروی آزاد در دمای اتاق

جایگزینی مقادیر  $n$  و  $K_a$  در رابطه  $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_a)$  مقدار انرژی آزاد اتصال برای داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D به ترتیب  $-9/34$  و  $-6/2$  Kcal/M محاسبه شدند که بدلیل منفی بودن اعداد محاسبه شده چنین نتیجه گیری می شود که واکنش های فوق بصورت خود به خودی انجام می گیرند.

#### بحث

داروهای ضد تومور میتوزانترون و اکتینومایسین D به تنهایی و یا در ترکیب با سایر داروهای شیمی درمانی در درمان طیف وسیعی از سرطان ها کاربرد دارند (Faulds et al, 1991; Koba and konopa, 2005). اعتقاد بر این است که هدف اصلی این داروها در سلول، مولکول DNA می باشد و داروها بدلیل دارا بودن بخش های حلقوی قادرند در

تغییرات  $r$  به  $C_f$  در مورد هر دو دارو نشان می دهد که در ابتدا با افزایش مقدار  $C_f$ ،  $r$  نیز افزایش قابل توجهی داشته و سپس مقدار آن ثابت می شود و به عبارت دیگر سیستم در نهایت به حالت تعادل می رسد. از منحنی های مربوطه تعداد جایگاه های ظاهری اتصال ( $n$ ) و مقدار ثابت اتصال  $K_a$  قابل محاسبه می باشد که برای داروی میتوزانترون  $n$  و  $K_a$  به ترتیب برابر  $0/62$  و  $10^6 M^{-1}$  و برای داروی اکتینومایسین D برابر  $0/43$  و  $10^3 M^{-1}$  محاسبه گردیدند. با جایگزینی اعداد محاسبه شده در رابطه هیل نمودار مربوطه برای هر دو دارو بصورت یک خط راست با شیبی بزرگتر از یک بدست آمد که این نتیجه نیز بر فرایند اتصال مولکول های دارو به کروماتین بصورت تعاونی مثبت دلالت می کند و تأییدی بر نتایج حاصل از منحنی اسکاچارد می باشد. با



کروماتین به یکدیگر و در نتیجه ته نشینی بیشتر می‌شود، این در حالی است که اتصال هر دو دارو به مولکول DNA و اینترکاله شدن بخش‌های حلقوی داروها بین جفت بازهای DNA قبلاً نیز توسط سایر محققان گزارش شده است (Lown et al., 1985; Liu et al., 2013; Agarwal et al., 1991). مقایسه الگوهای افت جذب در مورد دو داروی فوق حاکی از تمایل اتصال بیشتر داروی میتوزانترون به کروماتین می‌باشد زیرا داروی میتوزانترون در غلظت‌های بسیار کمتری (غلظت‌های بالاتر از  $30 \mu\text{M}$ ) قادر به ترسیب کروماتین بطور کامل می‌باشد به نحویکه جذب نمونه‌ها در این غلظت دارو تقریباً به صفر میرسد. از آنجاییکه داروی میتوزانترون از نظر ساختاری دارای دو زنجیره جانبی کاملاً متقارن با دو بار مثبت می‌باشد (شکل ۱ قسمت B) احتمالاً می‌تواند قویتر از اکتینومایسین D با بارهای منفی پراکنده هیستون‌ها وارد واکنش شود. پس می‌توان چنین استنباط کرد که داروی میتوزانترون به کروماتین تمایل اتصال زیادی داشته باشد زیرا از یک طرف می‌تواند با هیستون‌ها وارد بند و بست شود و از طرف دیگر با DNA. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نیز میانکنش و اتصال داروی میتوزانترون با پروتئین‌های هیستونی H1 و Core را تأیید می‌نمایند (Hajihassan et al., 2011).

بین جفت بازهای DNA اینترکاله شده و ساختار و عملکرد DNA را تحت تاثیر قرار دهند (Cescanetto et al. 2013; Agarwal et al, 2013). از آنجاییکه در هسته سلول DNA به همراه پروتئین‌های مختلف هیستونی و غیر هیستونی ساختار کروماتین را تشکیل می‌دهد، کروماتین و پروتئین‌های آن می‌توانند جایگاه‌های متنوع و بسیاری را برای اتصال این داروها فراهم کنند. لذا در این تحقیق به منظور مشخص نمودن هر چه دقیق‌تر مکانیزم عمل داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D از اتصال داروهای فوق با کروماتین استخراج شده از کبد موش صحرایی استفاده گردید.

بررسی نتایج اسپکتروسکوپی جذبی محلول‌های رویی حاصل از میانکنش کروماتین با داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D در طول موج‌های ۶۰۸ و ۴۴۰ نانومتر مشخص نمود که با افزایش غلظت دارو جذب محلول‌های رویی در طول موج‌های ذکر شده نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش می‌یابد. افت جذب نشان دهنده اتصال هر دو دارو به کروماتین، فشردگی بیشتر و در نهایت رسوب کمپلکس دارو-کروماتین می‌باشد. فشردگی ایجاد شده در کروماتین بدلیل اینترکاله شدن دارو در بین جفت بازهای DNA و ایجاد پیوندهای عرضی درون زنجیری و بین زنجیری بین مولکول DNA است که باعث افزایش تمایل فیبرهای

نتایج حاصل از منحنی‌های اسکاچارد و  $r$  به  $C_F$  نشان‌دهنده اتصال هر دو دارو بصورت تعاونی مثبت به کروماتین می باشد اما چنین استتباط می‌شود که تمایل داروی میتوزانترون به کروماتین بسیار بیشتر از داروی اکتینومایسین D می‌باشد زیرا در میانکشی داروی میتوزانترون با کروماتین سیستم در مقادیر  $r$  کمتری به تعادل می‌رسد. لازم به ذکر است که اطلاعات حاصله با نتایج بدست آمده توسط محققان دیگر مبنی بر تعاونی بودن اتصال داروهای میتوزانترون و اکتینومایسین D با مولکول DNA کاملاً مطابقت دارد. در مورد داروی اکتینومایسین D بررسی‌های کالریمتریک و اسپکتروسکوپی انجام شده نشان داد که دارو قادر است بصورت تعاونی و محکم به توالی  $d(5'CGXCGXCG3')$  که در آن X باز A یا T است با ثابت اتصال  $2 \times 10^7 M^{-1}$  متصل شود (Snyder et al, 1989; Sha et al, 2000). همچنین اندازه‌گیری تغییرات شدت فلورسانس اکتینومایسین D که در حضور و عدم حضور DNA تیموس گوساله در سال ۲۰۰۸ توسط ایناچی (Enache) و همکاران انجام شد نشان داد که منحنی‌های اسکاچارد ترسیم شده حاصله بصورت زنگوله‌ای شکل می‌باشند که دلالت بر اتصال دارو بصورت تعاونی مثبت به DNA دارد (Enache et al, 2008). یافته‌های قبلی در مورد داروی میتوزانترون نشان می‌دهند که

مقایسه الگوی پروتئین‌های هیستونی H1 و Core در کروماتین تیمار شده با داروهای ذکر شده بر روی ژل (شکل ۳) نشان می‌دهد که داروی میتوزانترون در غلظت‌های بالاتر از  $30 \mu M$  قادر به حذف کامل پروتئین‌های هیستونی از روی ژل می‌باشد که این نتیجه نیز تمایل بیشتر داروی میتوزانترون به کروماتین را نسبت به داروی اکتینومایسین D نشان می‌دهد. حذف بندهای مربوط به پروتئین‌های هیستونی از روی ژل احتمالاً بدلیل وارد شدن دارو بین جفت بازهای DNA و اتصال با DNA از یک طرف و پروتئین‌های هیستونی از طرف دیگر و برقراری اتصالات عرضی بین زنجیره‌های DNA و پروتئین‌های هیستونی با یکدیگر است که باعث ایجاد تجمعات فشرده کروماتین و دارو و در نهایت رسوب کروماتین می‌شود که این مطلب تأییدکننده نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی UV-Vis نیز می‌باشد. این در حالیست که بررسی‌های اسپکتروسکوپی انجام شده در سالهای اخیر حاکی از رفتارهای متفاوت دو دارو با کروماتین و DNA می‌باشد زیرا اکتینومایسین D با تمایل بیشتری به DNA برهنه نسبت به کروماتین متصل میشود ولی میتوزانترون به ساختار فشرده کروماتین تمایل اتصال بیشتری دارد (Hajihassan and Rabbani-Chadegani, 2009; Rabbani-Chadegani et al, 2011).

در مورد داروی میتوزانترون ثابت‌های اتصال به کروماتین  $10^{-6} M^{-1} \times 7/1$  و مولکول DNA  $10^{-6} M^{-1} \times 5$  که قبلاً مطالعه شده بود (Hajihassan and Rabbani-Chadegani, 2009) نشانگر تمایل بیشتر دارو

به ساختار فشرده کروماتین می‌باشد. بنابراین از نتایج بالا چنین استنباط می‌شود که داروی میتوزانترون در مقایسه با اکتینومایسین D با تمایل بیشتری به کروماتین متصل می‌شود و احتمالاً در این اتصال علاوه بر DNA، پروتئین‌های هیستونی نیز درگیر می‌شوند. اما لازم به ذکر است که درک چگونگی اتصال دو داروی ضد سرطان مورد مطالعه به کروماتین و مشخص نمودن مکانیزم دقیق اتصال نیازمند مطالعات وسیعتری می‌باشد.

#### تشکر

منبع مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران طرح شماره ۱۷۰۱۰۶۴/۶/۰۷ می‌باشد که بدینوسیله تشکر می‌شود.

اتصال دارو با DNA های طویل و poly(dA-dT). poly(dA-dT) بصورت تعاونی است و تنها اتصال آن با poly(dG-dC).poly(dG-dC) بصورت تعاونی نیست (Rosenberg et al., 1986).

به علاوه مقدار ثابت اتصال پیوند ( $k_a$ ) محاسبه شده به کروماتین که برای داروی میتوزانترون  $10^{-6} M^{-1} \times 7/1$  و برای داروی اکتینومایسین  $10^{-6} M^{-1} \times 0/35$  می‌باشد، نمایانگر تمایل اتصال بیشتر داروی میتوزانترون به کروماتین در مقایسه با داروی اکتینومایسین D می‌باشد. مقادیر منفی محاسبه شده برای تغییرات انرژی آزاد هردو نمونه بیانگر خود به خودی بودن واکنش‌ها می‌باشد. از مقایسه ثابت‌های اتصال پیوند داروی اکتینومایسین D به کروماتین (مقاله حاضر) و مولکول DNA (محاسبه شده در فرانس ۵) که به ترتیب اعدادی برابر با  $10^{-6} M^{-1} \times 0/35$  و  $10^{-6} M^{-1} \times 2$  می‌باشند نیز می‌توان نتایج اسپکتروسکوپی (Rabbani-Chadegani et al, 2011) را تأیید کرده و با قاطعیت از اتصال محکم‌تر اکتینومایسین D به DNA برهنه صحبت نمود.

#### منابع

- Agarwal S., Jangir D.K., Mehrotra R. (2013) Spectroscopic studies of the effect of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf thymus DNA. J. Photochem. Photobiol. B. 120: 177-182.
- Aivasashvilli V.A. and Beabealashvilli, R.S. (1983) Sequence-specific inhibition of RNA elongation by actinomycin D. FEBS Lett., 160: 124-128.

- Bradbury E.M., Van Hold K. (2004) Chromatin structure and dynamics: a historical perspective. *New Compr Biochem.* 39:1-11
- Burgoyne L.A., Wagar M.A., Atkinson M.R. (1970) Calcium-dependent priming of DNA synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39: 254-259.
- Cacchione S., Caneva R., Savino M. (1986) Selective binding of actinomycin D induces a reversible conformational transition of nucleosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 867(4): 229-33.
- Cesconetto E.C., Junior F.C., Crisafuli F.A., Mesquita O.N., Ramos E.B., Rocha, M.S. (2013) Dna interaction with actinomycin D: mechanical measurements reveal the details of the binding data. *Phy. Chem. Che. Pys.* 15: 11070-11077.
- Chan A., Lo-Coco F. (2013) Mitoxantrone-related acute leukemia in MS: an open or closed book. *Neurology* 80: 1529-1533.
- Enache M., Volanschi E. (2008) Fluorescence study of the interaction of antitumor drug actinomycin D with double stranded DNA. *Revue. Roumaine de Chimie.*, 53(9): 841–846.
- Faulds D., Balfour J.A., Chrisp P., Langtry H.D. (1991) Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs.*, 41(3): 400-49.
- Freifelder D.M. (1982) *Physical Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition., chapter 15., W.H. Freeman, Inc. pp 537-572., New York.
- Hajihassan Z., Rabbani-Chadegani A. (2009) Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to chromatin, DNA and histone proteins. *J. Biomed. Sci.* 16(1): 31.
- Hajihassan Z., Rabbani-Chadegani A. (2011) Interaction of mitoxantrone as an anticancer drug with chromatin proteins, Core histone and H1 in solution. *Int. J. Biol. Macromol.* 48: 87-92.
- Koba M., Konopa J. (2005) Actinomycin D and its mechanisms of action. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 59: 290-298.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-685.
- Lewis J.L. (1972) Chemotherapy of gestational choriocarcinoma, *Cancer.* 30: 1517–1521.
- Li N., Ma Y., Yang C., Guo L., Yang X. (2005) Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biophys. Chem.* 116: 199-205.
- Liu X., Chen H., Patel D.J. (1991) Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug intercalation at isolated G-C sites. *J. Biomol. NMR.* 1(4): 323-47.

- Lown J.W., Morgen A.R., Yen S.F., Wang Y.H. and Wilson D.W. (1985) Characteristics of the binding of the anticancer agent's mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids. *Biochemistry.*, 24: 4028-4035.
- Nishio A., Uveki E.M. (1983) Cellular uptake and inhibition of DNA synthesis by dihydroxy anthraquinone and two analogues. *Cancer.Res.*, 43(5): 1951-1956.
- Ory S., Debouverie M., Le Page E., Pelletier J., Malikova I., Gout O., Edan G. (2008) Use of mitoxantrone in early Multiple Sclerosis with malignant disease course. Observational study in 30 patients with clinical and MRI outcomes after one year. *Rev.Neurol (Paris).*, 164(12): 1028-1034.
- Rabbani A., Iskander M., Ausio J. (1999) Daunomycin-induced unfolding and aggregation of chromatin. *J. Biol. Chem.*, 274: 18401-18406.
- Rabbani-Chadegani A., Keyvani-Ghamsari S. and Zarkar N. (2011) Spectroscopic studies of dactinomycin and vinorelbine binding to deoxyribonucleic acid and chromatin. *Spectrochimica. Acta .Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, 84(1): 62-67.
- Rapkin L.M., Anchel D.R., Li R., Bazell-Jones D.P. (2012) A view of the chromatin landscape. *Micron* 43: 150-158.
- Rosenberg L.S., Carvlin M.J., Krugh T.R. (1986) The antitumor agent mitoxantrone binds cooperatively to DNA: Evidence for heterogeneity in DNA conformation. *Biochemistry.*, 25: 1002-1008.
- Scatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 51: 660-672.
- Scott L.J., Figgitt D.P. (2004) Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 18: 379-396.
- Sha F., Chen F.M. (2000) Actinomycin D Binds Strongly to d (CGACGACG) and d(CGTCGTCG). *Biophys. J.* 79(4): 2095-2104.
- Snyder J.G., Hartman N.G., D'Estaintoit B.L., Kennard O., Remeta D.P., Breslauer K.J. (1989) Binding of actinomycin D to DNA: evidence for a nonclassical high-affinity binding mode that does not require GpC sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 86(11): 3968-72.