

## تأثیر داروی ضد تومور وینورلین بر روی پروتئین های کروماتین سلولهای ماکروفاژ ریوی در مقایسه با دانومایسین

عذرا ربانی چادگانی<sup>۱</sup>، معصومه بابایی<sup>۲</sup>، پرستو شهپیر<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۰۳

تاریخ تصویب: ۹۵/۰۷/۰۵

### چکیده

در مطالعه حاضر اثر این دو دارو در مقایسه با هم بر روی پروتئین های کروماتین سلولهای ماکروفاژ ریوی موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. سلول های ماکروفاژ بطریق لاواژ تهیه و در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف داروها برای زمان معین کشت داده شدند. سپس پروتئین های کروماتین استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می دهد که با افزایش غلظت هر یک از این داروها، درصد بقای سلولهای ماکروفاژ پس از گذشت زمان انکوباسیون کاهش می یابد بطوری که در ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر برای وینورلین ۵۰ درصد و برای دانومایسین ۷۳ درصد میرسد. در غلظت های پایین، این داروها تأثیر چندانی روی محتوای پروتئین های هیستونی کروماتین ندارند ولی در غلظت های بالاتر مقدار پروتئین  $H^1$  بشدت کاهش می یابد در حالیکه تغییرات در مورد هیستون های Core کم است. همچنین مقدار زیر جزء هیستون  $H^1$ ،  $H^1$  و پروتئین های HMG نیز با افزایش غلظت داروهای ذکر شده کاهش می یابند. آنالیز وسترن بلات توسط آنتی بادی های ضد این پروتئین ها نیز نتایج را تأیید میکند. رنگ آمیزی سلول ها با اتیدیم برومید-

۱- استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران، گروه بیوشیمی، تهران

(نویسنده مسئول: arabbani@ut.ac.ir)

۲- دکتر، مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران، گروه بیوشیمی، تهران

۳- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران، گروه بیوشیمی، تهران

آکریدین اورنج نشان میدهد که اثر وینورلبین بر روی سلول های ماکروفاژ قویتر از دانومایسین است. از نتایج فوق چنین استنباط میشود که وینورلبین تمایل بیشتری به کروماتین سلول های ماکروفاژ دارد تا دانومایسین. احتمالاً دارو با ایجاد اتصالات عرضی بین هیستون-هیستون یا هیستون-DNA در سطح کروماتین باعث ایجاد فشردگی کروماتین شده بنابراین پروتئین ها کروماتین از طریق روشهای معمول قابل استخراج نمی باشند.

واژه های کلیدی: دانومایسین ، سلولهای ماکروفاژریوی ، کروماتین ، هیستون ها، وینورلبین

#### مقدمه

و دم است که قسمت نوک و دم غنی از بارهای مثبت بوده و اساساً به صورت پیچه های نامنظم هستند در حالیکه بخش سر غنی از اسید آمینه های هیدروفوب بوده و ساختار گلبولار دارد (Hapel and Doeneke, 2009). چهار هیستون H2A، H3، H2B و H4 هیستونهای نوکلئوزومی نامیده می شوند. هیستونهای H3 و H4 با یکدیگر تترامر تشکیل داده و همراه دو دایمر H2A-H2B ساختار اکتامری می سازند که ملکول DNA 1/75 دور حول آن پیچیده و Core particle رامی سازد (Rapkin et al., 2012).

واحدهای سازنده کروماتین را نوکلئوزوم ها می سازند که از تکرار Core particle ها که به وسیله DNA رابط (Linker DNA) بهم متصل شده اند، ساخته می شود. هیستون H1 به DNA رابط متصل و بیشتر در فشردده ساختن نوکلئوزوم ها نقش دارد .

هسته سلول های یوکاریوت حاوی اطلاعات ژنتیکی و مرکز سازماندهی و انجام فرایندهای مهم سلولی مانند همانند سازی و رونویسی است. ماده ژنتیکی ترکیب نوکلئوپروتئینی است که در هسته اینترفازی بصورت شبکه ای درون هسته را اشغال و از سه ترکیب اصلی دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA)، پروتئین های هیستونی (Histones) و غیرهیستونی (Nonhistones) و مقدار بسیار کمی ریبونوکلئیک اسید (RNA) تشکیل یافته است (Bradbury and Van Hold, 2004). هیستونها پروتئین های قلیایی اند بطوریکه نقطه‌ایزوالکتریک حدود ۹-۱۲ دارند. در سلولهای یوکاریوت پنج نوع هیستون اصلی به نامهای H1، H2A، H2B، H3 و H4 وجود (Campos and Reinberg, 2009). هیستون H1 بزرگترین هیستونها و بسیار غنی از لیزین است. ساختار آن شامل سه بخش نوک، سر

می نمایند (Ngan et al, 2001). اخیراً اتصال این دارو به DNA و کروماتین در شرایط *in vitro* انجام و گزارش شده است (Rabbani-Chadegani et al. 2009). بسیاری از داروهای ضد سرطان علاوه بر اثر بر روی سلولهای سرطانی و بردن آنها به طرف مرگ سلولی، اثرات جانبی فاحشی بر بافت های سالم انسان نیز دارند. وینورلبین جزء داروهایی است که بر روی بافت ریه و سلولهای مرتبط با آن اثر گذاشته و موجب مختل شدن فعالیت این بافت می شود. سلولهای ماکروفاژ ریوی نیز یکی از این سلولهای طبیعی می باشند که بطور مؤثر می توانند تحت تأثیر قرار گیرند.

در این مطالعه اثر داروی ضد تومور وینورلبین بر روی پروتئین های کروماتین بافت ریه در مقایسه با داروی دانوماستین که اثرات سمی آن روی ترکیبات کروماتین شناخته شده است مورد بررسی قرار گرفت (Zahraei and Rabbani-Chadegani, 2007). نتایج نشان می دهند که این دارو می تواند با تغییر پروتئین های هیستونی در سلولهای ماکروفاژ اختلال ایجاد نموده و موجب مرگ آنها شود.

#### مواد و روشها

داروی ضد سرطان وینبلاستین از داروخانه هلال احمر خریداری شد. پروتئینهای هیستونی و غیرهیستونی تیموس گوساله

(Caterino and Hayes, 2010). پروتئین های غیر هیستونی HMG (High Mobility group) از مهمترین و فراوان ترین پروتئین های غیر هیستونی کروماتین می باشند. این پروتئین ها علاوه بر اسیدهای آمینه قلیایی، غنی از اسیدهای آمینه اسیدی نیز می باشند لذا PI حدوداً خنثی دارند. سه دسته از این پروتئین ها شناسایی و مطالعه شده اند (HMG A, B, N). از بین آنها گروه HMGB از طریق موتیف HMG-Box خود به DNA متصل می شود. این پروتئین ها نقش مهمی در ساختار و عملکرد کروماتین دارند (Catez and Hock, 2010).

در هسته سلول، DNA یکی از جایگاههای اصلی اتصال داروهای ضد سرطان است و کروماتین نقش مهمی را در این فرآیند به عهده دارد. این داروها با اتصال به DNA مانع از فرآیندهای همانندسازی و رونویسی شده و بدینوسیله سلولهای سرطانی را به طرف مرگ برنامه ریزی شده (apoptosis) و یا نکروز (necrosis) سوق می دهند (Johnstone et al., 2002). وینورلبین Vinorelbine از داروهای ضد سرطان متعلق به خانواده وینکا آلکالوئیدهاست (Vinca alkaloids) که به طور وسیع در درمان سرطان های مختلف بکار می رود. هدف اصلی این دارو در سلول میکروتوبولهای دوک میتوزی معرفی شده است که بدینوسیله اثر ضد سرطان خود را در سلول اعمال

در یخچال نگهداری گردید، محیط کشت حاصل با غلظت دو برابر است (x2) و هنگام استفاده این محیط به صورت x1 استفاده می‌شود.

- تهیه سلولهای ماکروفاژ ریویو تیمار با داروها

از روش لاواژ استفاده شد. برای خارج نمودن سلولهای ماکروفاژ با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل داخل ریه حیوان شستشو داده شد. سوسپانسیون حاوی ماکروفاژهای ریویو سانتیفیوژ (g ۲۰۰۰، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتیگراد) و در بافر فسفات سالین جمع آوری و شستشو داده شدند. برای تعیین درصد بقاء سلولها و شمارش آنها به ترتیب از رنگهای تریپان بلو و متیل گرین استفاده گردید.

حدود ۲ میلیون سلول ماکروفاژ به ازای هر میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FCS، وارد هر پتری گردید و مرحله قبل از کشت به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. سپس پتریها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت کامل قرار داده شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر، محیط کشت به آرامی خارج و سطح سلولها با محیط کشت سرم دار شستشو داده شدند. مجدداً محیط کشت سرم دار در پتریها وارد و غلظتهای مختلف از داروها بطور جداگانه به نمونه ها اضافه و برای مدت زمان مشخص در شرایط فوق مجدداً انکوبه

تهیه شده در آزمایشگاه به عنوان مارکر استفاده شدند. آنتی بادی خرگوشی ضد پروتئینهای هیستونی و غیرهیستونی که در آزمایشگاه تهیه شده بودند، استفاده گردید. سرم جنین گوساله (FCS : Fetal calf serum خریداری شده از آزمایشگاه بهار افشان استفاده شد. پتری های پلاستیکی یکبار مصرف استریل به قطر ۶۰ و ۳۵ میلی متر خریداری شده از شرکت NUNK دانمارک استفاده شد. مارکر، DNA EcoRI/Hind III و آنتی بادی بزی ضد IgG خرگوشی و کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز از شرکت Sigma خریداری شده است.

حیوان: از موش صحرایی از نوع Wistar با وزن تقریبی ۱۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. از محیط کشت DMEM (Dulbecco's) Modified Eagle Medium تهیه شده از شرکت Gibco استفاده شد. مقدار ۱/۳۴ گرم پودر DMEM را در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و به آن ۳ میلی گرم آسپارژین، ۰/۳۷ گرم بیکربنات سدیم (NaHCO<sub>3</sub>)، یک میلی لیتر مخلوط استرپتومایسین و پنی سلین ( به ترتیب به مقدار ۱۰ میلی گرم در میل لیتر و ۲۰۰ واحد در میلی لیتر) اضافه گردید. سپس حجم محلول با آب دیونیزه به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و PH در ۷/۱ تنظیم گردید. محیط کشت آماده شده از فیلتر میلی پور استریل ۰/۲ میکرومتری عبور داده شده و

شدند.

### رنگ آمیزی فلوئورسان

پس از کشت سلولها و تیمار آنها با غلظت های ۰-۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر داروهای دانومایسین و وینورلین، یک میکرولیتر از مخلوط رنگی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید به ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت  $1.06 \times 10^6$  سلول به ازاء هر میلی لیتر محیط کشت اضافه گردید و توسط میکروسکوپ فلوئورسانت مورد بررسی قرار گرفتند. - استخراج پروتئین های هیستونی و غیر هیستونی به منظور استخراج پروتئین های هیستونی از روش John(Johns,1964) و برای استخراج پروتئین های غیر هیستونی از روش Goodwin(Goodwin et al., 1977) استفاده شد. پس از انکوباسیون سلولها با غلظتهای مختلف داروهای نام برده سلولها جمع آوری و در  $10000 \text{g}$  و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب سلولی،  $\text{HCl}$  ۰/۲۵ نرمال اضافه و سپس نمونه ها شب تا صبح روی شیکردر ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ نمونه ها، محلول رویی حاوی پروتئین های هیستونی جمع آوری شد. به منظور استخراج پروتئین های غیر هیستونی به رسوب سلولها محلول  $\text{NaCl}$  ۰/۳۵ مولار سرد اضافه و سپس نمونه ها به مدت ۲ ساعت روی شیکر و در ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. محلول رویی

حاوی پروتئین های غیر هیستونی جمع آوری، و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

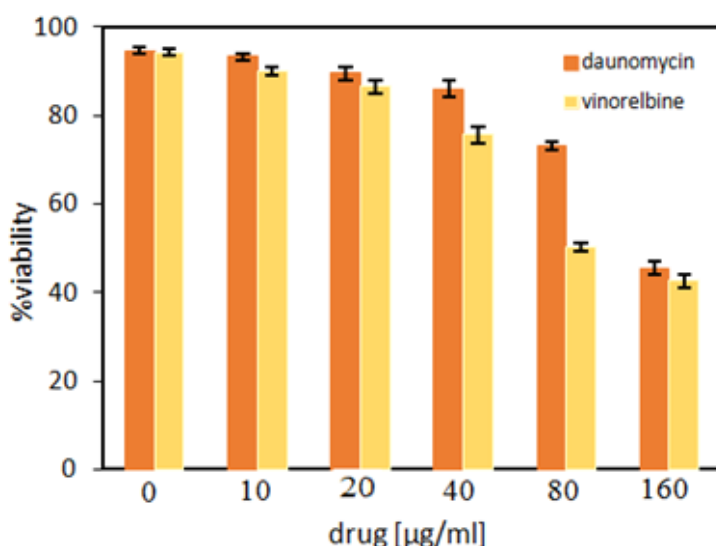
الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل SDS پلی آکریل آمید و وسترن بلات برای الکتروفورز پروتئین ها در حضور SDS از روش Laemmli استفاده گردید (Laemmli, 1970). بدین منظور ژل جدا کننده با غلظت ۱۵٪ و ژل متراکم کننده با غلظت ۶٪ تهیه شد. سپس، مقدار معینی از نمونه پروتئینی در مقدار مشخصی از بافر نمونه حل و به آرامی در چاهکهای مربوطه وارد شدند و الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت و شدت جریان متغیر بمدت ۲ ساعت انجام شد. به منظور انجام وسترن بلات، پروتئینهای مورد بررسی و تفکیک شده با ژل پلی آکریل آمید، بر روی کاغذ نیتروسولون منتقل گردیدند (De Maio, 1994). سپس، کاغذ های حاوی پروتئین انتقال یافته با محلول بلوکه کننده که شامل ۱٪ ژلاتین در بافر توئین دار بود انکوبه و سه بار با محلول  $\text{Tris-NaCl}$  شامل ۵۰ میلی مولار تریس و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و  $\text{pH}$  ۷/۴ شستشو داده شدند. سپس کاغذ ها با آنتی سرم ویژه پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی انکوبه و پس از شستشو با بافر حاوی ۳٪ توئین-۲۰، کاغذ بلات با آنتی سرم بزی ضد  $\text{IgG}$  خرگوش و کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. به

استفاده گردید. ابتدا تأثیر داروها بر بقای سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید. شکل ۱ درصد بقای سلولهای ماکروفاژ برای دو داروی وینورلین و دانومایسین را نشان می دهد. بطوریکه مشاهده می شود نمونه کنترل (عدم حضور دارو) بقای حدود ۹۴ درصد را نشان می دهد. با اضافه کردن داروها به تدریج بقاء کاهش یافته بطوریکه در ۲۰ میکروگرم بقاء در حضور دانومایسین ۸۹/۶ درصد در صورتیکه در حضور وینورلین به ۸۶/۶ درصد کاهش می یابد و در ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر بقاء برای دانومایسین و وینورلین به ترتیب به ۷۳ و ۵۰ درصد می رسد.

منظور ظاهر شدن بندها، کاغذ بلات در محیط تاریک با محلول سوبسترا شامل محلول ۳٪ آلفا کلروفتول در متانول به همراه ۲۰ میلی لیتر بافر تریس- کلرید سدیم و آب اکسیژنه ۳۷٪ به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد و در تاریکی انکوبه شد تا بندها ظاهر شوند.

### نتایج

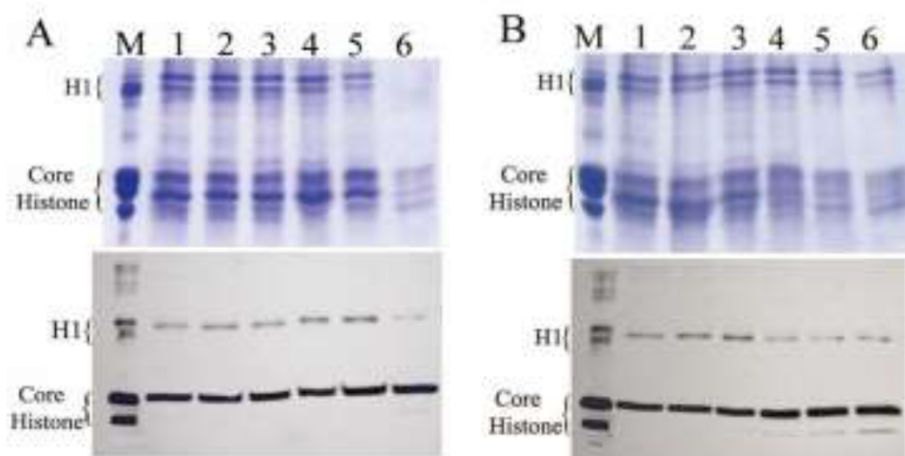
سلولهای ماکروفاژ از بافت ریه موش صحرائی به روش لاواژ جدا و پس از اطمینان از سالم بودن و بقاء ۹۶ درصد در شرایط استاندارد در حضور و عدم حضور داروها کشت داده شدند. با توجه به آزمایشات قبلی که برای دانومایسین، زمان انکوباسیون ۶ ساعت در نظر گرفته شده بود، در این آزمایش نیز این زمان



شکل ۱: درصد بقای سلول های ماکروفاژ ریوی پس از ۶ ساعت انکوباسیون در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف داروهای دانومایسین و وینورلین

کاهش می یابد و این کاهش در حضور وینورلین شدیدتر است. هیستونهای Core بر روی ژل برای هر دو دارو تغییر فاحشی را نشان نمی دهد بطوریکه بلات نمونه ها نیز مؤید این نتیجه است.

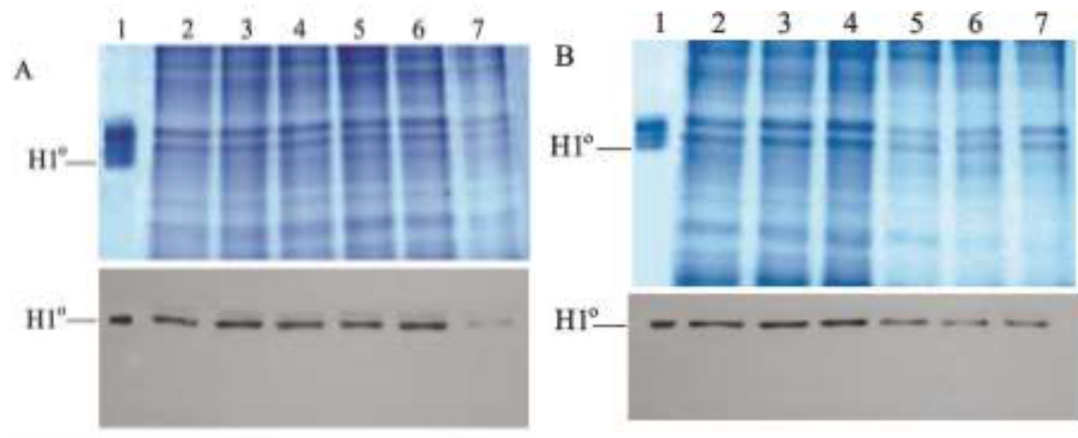
شکل ۲ طرح الکتروفورزی پروتئین های هیستونی بر روی ژل SDS به همراه بلات آنها در مقابل آنتی بادی بر ضد هیستون H1 و هیستون H3 را نشان می دهد. بطوریکه مشاهده می شود مقدار هیستون H1 بر روی ژل با افزایش غلظت دارو،



شکل ۲: طرح الکتروفورزی و وسترن بلات پروتئین های هیستونی استخراج شده از سلولهای ماکروفاژ ریوی تیمار شده با غلظت های مختلف داروی دانومایسین (A) و وینورلین (B). (ژل ۱۵% SDS) M. نمونه مارکر و شماره های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر داروهای دانومایسین و وینورلین.

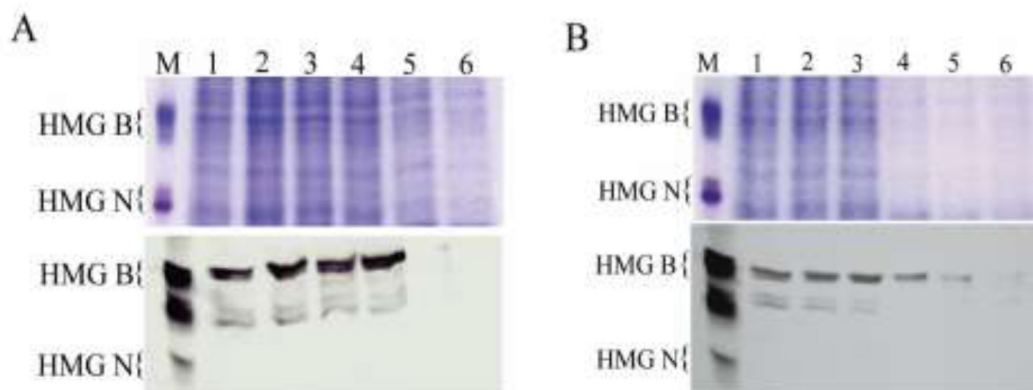
روی این پروتئین (شکل ۳) نشان می دهد که هیستون H10 نیز مانند H1 تحت تأثیر داروها قرار می گیرد بطوریکه با افزایش غلظت دارو مقدار این زیر جزء نیز در سلولهای ماکروفاژ کاهش می یابد. در مورد دانومایسین این اثر فقط در غلظت بالای دارو مشاهده می شود در حالیکه در مورد وینورلین از غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر به بالا مقدار H10 در این سلولها کاهش می یابد.

هیستون H1 پروتئینی است بسیار هتروژن و در سلولها و بافتهای مختلف زیر جزء های مختلفی را از خود نشان می دهد. در برخی از سلولها و بافت ها مانند بافت کبد و سلولهای ماکروفاژ زیر جزئی از پروتئین H1 به نام H10 معرفی شده است که معمولا در بافت هایی که تقسیم نمی شوند و یا تقسیم بسیار محدودی دارند یافت می شود و در تنظیم تکثیر و تمایز سلولی نقش دارد (Doenecke, 2009; Th'ng et al., 2005). بررسی تأثیر داروهای ضد سرطان بر



شکل ۳: طرح الکتروفورزی و وسترن بلات هیستون H10 استخراج شده از سلولهای ماکروفاژ ریوی تیمار شده با غلظت های مختلف داروی دانومايسين (A) و وینورلین (B). (ژل). SDS ۱۵% شماره ۱ نمونه مارکر و شماره های ۲ تا ۷ به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر داروهای دانومايسين و وینورلین.

پروتئین های HMG از پروتئین های غیر هیستونی هستند که در ساختار و عملکرد کروماتین نقش مهمی دارند. طرح الکتروفورزی این پروتئین ها در حضور و عدم حضور دو دارو در شکل ۴ نشان داده شده است. بطوریکه ملاحظه می شود مقدار پروتئین HMGB در حضور وینورلین کاهش شدیدتری را نسبت به دانومايسين از خود نشان می دهد. با توجه به مقدار بسیار پایین پروتئین های HMGN مشاهده آنها نیاز به بررسیهای بیشتر دارد. از طرفی آنتی بادی مربوطه منحصراً بر ضد HMGB است و با HMGN واکنش نمی دهد. لذا بند خاصی روی بلات در این ناحیه نیز مشاهده نمی شود.

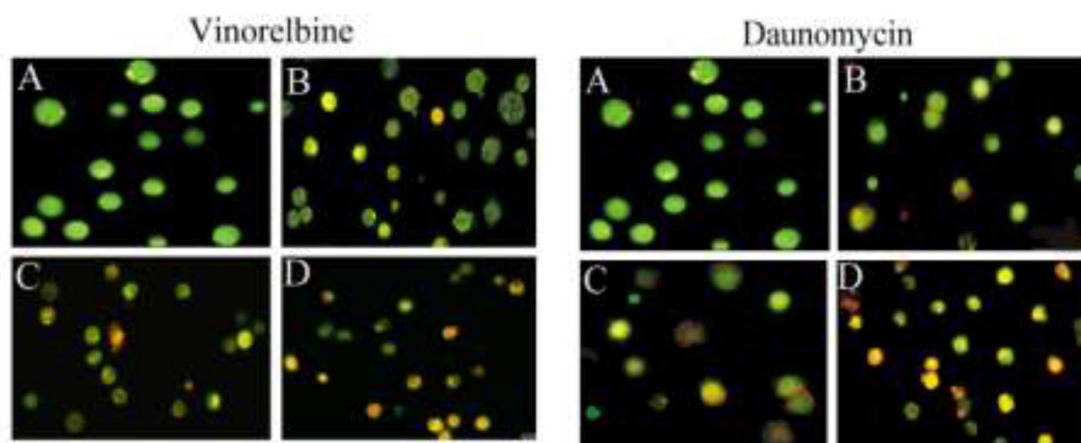


شکل ۴: طرح الکتروفورزی و وسترن بلات پروتئین های HMG استخراج شده از سلولهای ماکروفاژ ریوی تیمار شده با غلظت های مختلف داروی دانومايسين (A) و وینورلین (B) بر روی ژل SDS.M نمونه مارکر و شماره های ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر داروهای دانومايسين و وینورلین.



بررسی های سیتولوژی سلولهای تیمار شده با داروها با استفاده از رنگهای فلورسانس آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید در شکل ۵ نشان داده شده است. در عدم حضور داروها سلولها کاملاً کروی و سبز رنگ هستند ولی به تدریج که وینورلبین به محیط کشت سلولها اضافه می شود سلولها شکل کلی خود را از دست داده،

فشرده شدن هسته ها و چند قسمتی شدن کروماتین و سلولهای آپوپتوزی کاملاً مشخص است. باید یادآور شد که در حضور دانومایسین به علت اینکه خود دارو رنگ فلورسانس نارنجی دارد بررسی سلولها با مشکلاتی مواجه بوده است ولی برای مقایسه این سلولها نیز در شکل ۵ آورده شده اند.



شکل ۵: مورفولوژی سلولهای ماکروفاژ ریوی پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف داروی دانومایسین و وینورلبین با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید. حرف A تا D به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر داروهای دانومایسین و وینورلبین.

## بحث

اصلی این دارو در سلول، میکروتوبولهای دوک میتوزی و جلوگیری از تشکیل دوک میتوز و در نهایت ممانعت از تقسیم سلولی است (Bilir et al., 2010; Hait et al., 2007). کارهای اخیر در این آزمایشگاه نشان داده است که این دارو نیز می تواند با DNA در هسته سلول میانکنش نماید (Rabbani-Chadegani et al., 2009). داروهای ضد تومور در بدن علاوه بر تاثیر بر سلول

داروی وینورلبین از جمله داروهای ضد سرطانی است که امروزه در درمان طیف وسیعی از سرطان ها مانند درمان کارسینومای پیشرفته ریه، سرطان سینه و لوسمی بد خیم کودکان به کار برده می شود (Bilir et al., 2010; Capasso, 2012). بررسی های اولیه انجام شده بر روی وینورلبین نشان می دهند که هدف

کارگیری آنتی بادی ویژه هیستونهای H1 و Core Histone نیز نتایج فوق را تأیید می نماید. به نظر می رسد که به تدریج با افزایش غلظت هر یک از این داروها در محیط، آزادسازی پروتئین های هیستونی مشکل تر می گردد. این احتمالاً به دلیل اتصالات این داروها به هیستونها و DNA و یا ایجاد اتصالات عرضی بین آنها می باشد که در نتیجه به علت فشردگی ترشدن و تجمع کروماتین مانع از استخراج آنها با استفاده از روشهای معمول می گردد. از طرفی وینورلبین تأثیر چشمگیرتری نسبت به دانومایسین از خود نشان میدهد. این کاهش بدلیل ایجاد نکروز در سلول ها نیست زیرا بررسی پروتئین ها در محلول روتی رها سازی هیستون ها را نشان نمیدهد.

از آنجاییکه پروتئین های غیر هیستونی انواع مختلفی دارند، در آزمایشات انجام شده فقط نوع HMGB مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که با افزایش غلظت داروهای ذکر شده در محیط کشت سلول های ماکروفاژ طی انکوباسیون ۶ ساعته میزان پروتئین HMGB کاهش می یابد. نتایج وسترن بلات نیز این روند را به خوبی تأیید می کند. از طرفی اثر داروی ضد تومور وینورلبین بر پروتئین های HMG در سلولهای ماکروفاژ ریوی بیشتر از داروی دانومایسین است. از نتایج مشاهده شده می توان نتیجه گرفت که داروهای

های سرطانی، سلول های سالم را نیز تحت تاثیر قرار میدهند که اثرات جانبی دارو محسوب میشود. سلول های بافت ریه خصوصاً سلولهای ماکروفاژ که از مهمترین سلولهای سیستم ایمنی بدن و تقریباً اولین سد دفاعی بدن در مقابله با عوامل بیگانه و خارجی هستند یکی از این بافت ها است. لذا اثر دارو ها بر این سلول ها میتواند اطلاعات مفیدی در مورد مکانیسم اثر دارو بدست دهد.

نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف داروی وینورلبین در مقایسه با دانومایسین روی درصد بقاء سلولهای ماکروفاژ ریوی نشان می دهد که اثر وابسته به غلظت و زمان است. به طوریکه با گذشت ۶ ساعت از زمان انکوباسیون، درصد بقاء سلولها در نمونه شاهد همچنان بالای ۹۰٪، ولی در نمونه های تیمار شده کاهش می یابد بطوریکه میزان IC50 برای وینورلبین ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر و برای دانومایسین بالای ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر است. این نشان دهنده اثر قویتر وینورلبین روی این سلول ها نسبت به دانومایسین است.

در بررسی کیفیت و کمیت پروتئین های هیستونی در حضور و عدم حضور داروهای نامبرده میزان پروتئین های هیستونی بر روی ژل کاهش می یابد و این کاهش در هیستون H1 شدیدتر است. مشاهدات حاصل از وسترن بلاتینگ و به

توجه به نتایج فوق، میتوان استنتاج نمود که استفاده از این دارو ها اثرات جانبی داروهای وینورلین و دانومایسین بر روی پروتئین های هیستونی و غیر هیستونی و نیز DNA سلولهای ماکروفاژ ریوی و نیز سلولهای هیپاتوسیت موش صحرایی دارند، داروهای نامبرده می توانند به طور گسترده در درمان انواع سرطان مورد استفاده قرار گیرند و آزمایشات انجام شده در این تحقیق می تواند زمینه ساز مطالعات و بررسی های بیشتر در مورد جنبه های مختلف مکانیسم اثر این داروها در جلوگیری از انواع سرطانها باشد.

#### سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران بخاطر تامین مالی (طرح شماره ۶/۰۷/۱۷۰۱۰۶۴) تشکر و قدردانی میشود.

دانومایسین و وینورلین علاوه بر میانکنش با پروتئین های هیستونی، با پروتئین های غیر هیستونی نیز میانکنش دارند و سبب القاء فشردگی در ساختار کروماتین می شوند و میزان این فشردگی با افزایش غلظت دارو زیاد می شود. گزارش شده که HMGB1 یک فعال کننده آپوپتوز در پاسخ به برخی از داروهای ضد سرطان است (Krynetskaia et al., 2008) بطوریکه تحت تاثیر این داروها هنگام آپوپتوز سلولی، پروتئین HMGB1 به محیط خارج سلولی رها میشود. بررسی محلول روئی سلول ها از طریق ایمینوبلات رها سازی کمی را نشان میدهد که نسبت به مقدار این پروتئین در سلول ها ناچیز میباشد. همچنین بررسی سیتولوژی نشان می دهد که داروهای ذکر شده در غلظت های بالا سلول را به سمت آپوپتوز می برند. با

#### منابع

- Bilir, A., Erguven, M., Yazihan, N., Aktas, E., Oktem, G., Sabanci, A. (2010) Enhancement of vinorelbine-induced cytotoxicity and apoptosis by clomipramine and lithium chloride in human neuroblastoma cancer cell line SH-SY5Y. *Jornal of Neurooncology* 100: 385-395.
- Bradbury, E.M., Van Holde, K. (2004) Chromatin structure and dynamics: a historical perspective. *New Comprehensive Biochemistry* 39:1-11.
- Campos, E.I., Reinberg, D. (2009) Histones: annotating chromatin. *Annual Review of Genetics* 43:559-99.
- Capasso, A. (2012) Vinorelbine in cancer therapy. *Current Drug Targets* 13: 1065-1071.
- Caterino, T.L., Hayes, J.J. (2010) Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. *Biochemistry Cell Biology* 89:35-44.

- Catez, F., Hock, R. (2010) Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochimica Biophysica Acta* 1799:15-27.
- De Maio, A. (1994) Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes. *Protein blotting: a practical approach* Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, 11-32.
- Goodwin, G.H., Rabbani, A., Nicolas, R.H., Johns, E.W. (1977) The isolation of the high mobility group non-histone chromosomal protein HMG 14. *FEBS Letter* 80:413-6.
- Hait, W.N., Rubin, E., Alli, E., Goodwin, S. (2007) Tubulin targeting agents. *Cancer Research* 2: 1-18.
- Happel, N., Doenecke, D. (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1-12.
- Johns, E.W. (1964) Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. *Biochemical Journal* 92:55.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108:153-64.
- Krynetskaia, N., Xie, H., Vucetic, S., Obradovic, Z., Krynetskiy, E. (2008) High mobility group protein B1 is an activator of apoptotic response to antimetabolite drugs. *Molecular Pharmacology* 73:260-269.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Ngan, V.K., Bellman, K., Hill, B.T., Wilson, L., Jordan, M.A. (2001) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Molecular Pharmacology* 60:225-32.
- Rabbani-Chadegani, A., Chamani, E., Hajihassan, Z. (2009) The effect of vinca alkaloid anti-cancer drug, vinorelbine, on chromatin and histone proteins in solution. *European Journal of Pharmacology* 613:34-8.
- Rapkin, L.M., Anchel, D.R., Li, R., Bazett-Jones, D.P. (2012) A view of the chromatin landscape. *Micron*. 43:150-8.
- Th'ng, J.P., Sung, R., Ye, M., Hendzel, M.J. (2005) H1 Family Histones in the Nucleus control of binding and localization by the C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry* 280:27809-14
- Zahraei, Z., Rabbani-Chadegani, A. (2007) A comparison of the effect of anticancer drugs, idarubicin and adriamycin, on soluble chromatin. *European Journal of Pharmacology* 575:28-33.