

بررسی تأثیر غلظت و نوع نمک بر میانکنش آدریامایسین با هیستون H1

سید جلال زرگر^{۱*}، عذرا ربانی چادگانی^۲

^۱ دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات - آدرس الکترونیکی: Zargar@Khayam.ut.ac.ir

(دریافت: ۸۶/۱۰/۲۳؛ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۹)

چکیده

در مطالعه حاضر، میانکنش آدریامایسین با پروتئین هیستونی H1 تیموس گوساله در غلظت‌های مختلف نمک‌ها با استفاده از روش‌های طیف سنجی بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که آدریامایسین در غلظت‌های کم، میزان جذب هیستون H1 را در طول موج ۲۱۰ نانومتر افزایش می‌دهد (هیپروکرومیسیستی) در حالیکه این دارو در غلظت‌های بالاتر سبب کاهش جذب هیستون H1 می‌شود (هیپوکرومیسیستی). تکرار آزمایشات در حضور غلظت‌های مختلفی از نمک‌های کلوروسدیم و کلورومنیزیم، از شدت یافتن اثرات مذکور و تشدید میانکنش آدریامایسین با هیستون H1 حکایت دارد. بعلاوه، در حضور کلورومنیزیم نسبت به کلوروسدیم، تغییرات بیشتری مشاهده می‌شود. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد نه تنها میزان نمک بلکه نوع نمک موجود در محیط نیز می‌تواند فرآیند میانکنش آدریامایسین با هیستون H1 را تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: کروماتین، هیستون H1، طیف سنجی، آنتراسیکلین‌ها، آدریامایسین.

مقدمه

سطوح ساختاری بالاتر (Higher Order Structure) کروماتین نقش دارد (An et al. 1998; Noll et al. 1977). هیستون H1 پروتئین منحصراً بفردی است که در فواصل بین هسته‌های نوکلئوزومی، در ناحیه Linker به DNA متصل گشته و در نتیجه میزان پیچ و تاب (Folding) فیبرهای ۳۰ نانومتری کروماتین را افزایش می‌دهد (Luger et al. 1997; Howe et al. 1998; Zhou et al. 1998). اندازه‌گیری ضریب ته‌نشین شدن هیستون H1 نشان داده است که قدرت یونی محیط یکی از مهمترین عوامل مؤثر بر بنای فضای این پروتئین می‌باشد (Lewis et al., 1983). هیستون H1 قویترین میانکنش‌ها را با مولکول DNA برقرار می‌نماید و در این اتصال، سه نوع میانکنش یونی، هیدروژنی و آبگریز شرکت دارند (Ohlenbusch et al. 1967; Germond et al. 1975; Camerini-Otero et al. 1976).

آدریامایسین (Adriamycin) یا دکسوروبیسیسین (Doxorubicin) یکی از اعضای ترکیبات آنتراسیکلین (Anthracycline) است که توسط قارچ‌های *Streptomyces peucetius* ساخته می‌شود و اولین بار در سال ۱۹۶۷ میلادی بوسیله آراکامون (Arcamone) استخراج و تخلیص گردید (Arcamone et al. 1969). آدریامایسین خاصیت آنتی‌بیوتیکی دارد و امروزه به صورت گسترده در معالجه انواع سرطان‌ها به ویژه تومورهای سخت (Solid tumor) و لوسمی‌ها (Leukemia) مورد

هیستون‌ها دسته‌ای از ترکیبات پروتئینی تشکیل‌دهنده ساختمان کروماتین هستند که دارای میزان بالایی از اسیدآمینه‌های قلیایی نظیر لیزین و آرژنین بوده (Bradbur 1977; Derobertis 1980) و از پنج نوع پروتئین گوناگون به نام‌های H1، H2A، H2B، H3 و H4 تشکیل یافته‌اند (Fabry et al. 1995).

هیستون H1 با وزن مولکولی ۲۱ کیلو دالتون بزرگترین هیستون‌ها بوده و غنی از اسیدآمینه لیزین (Lysine-Rich) است. از نظر ساختار اول، پروتئین هیستونی H1 یک زنجیر پلی‌پپتیدی با تعداد ۲۰۶ تا ۲۱۶ اسیدآمینه است که در انتهای آمین با اسیدآمینه سرین شروع می‌شود و در انتهای کربوکسیل به اسیدآمینه لیزین ختم می‌گردد. از نظر ساختار دوم، بیش از نیمی از مولکول را ساختار فضایی مارپیچ آلفا (helix-) تشکیل می‌دهد و این در حالی است که فقط یک ناحیه کوچک دارای ساختار فضایی صفحات بتا (β -sheet) در بخش میانی مولکول وجود دارد. هیستون H1 فاقد اسیدآمینه‌های تریپتوفان، هیستیدین و سیستئین است و تعداد اسیدآمینه‌های اسیدی شرکت‌کننده در ساختمان آن نظیر اسیدگلوتامیک و اسیدآسپارتیک بسیار کم می‌باشد (Kinkada et al. 1966; Wilhelm et al. 1972; Cole 1984; Compton et al. 1976; Elgin et al. 1975; Lennox et al. 1982). عموم محققین معتقدند هیستون H1 در حفظ و تعدیل

فشرده‌گی (DNA Compaction) و حفظ و تعدیل سطوح بالاتر ساختاری کروماتین نقش ممتازی را ایفا می‌نماید. بنابراین با توجه به وجه تمایز هیستون H1 در مقایسه با سایر ترکیبات پروتئینی شرکت‌کننده در ساختار کروماتین و نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی خود در زمینه میانکنش دانومایسین با پروتئین هیستونی (H1 Zargar et al. 2000)، بررسی اثر متقابل این هیستون با آدریامایسین و تأثیر میزان و نوع نمک موجود در محیط بر این فرآیند جالب توجه به نظر رسید و موضوع طی مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش‌های مورد استفاده برای بررسی میانکنش آدریامایسین با هیستون H1 در مطالعه حاضر عبارتند از:

(الف) بررسی طیف جذبی آدریامایسین

ابتدا طیف جذبی داروی آنتی‌بیوتیکی آدریامایسین خریداری شده از شرکت Sigma، در غلظت ۵۰ میکرومولار در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌مولار EDTA در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۵۹۰ نانومتر رسم شد و مورد بررسی قرار گرفت. سپس با تهیه محلول‌های دارو در غلظت‌های گوناگون، میزان جذب هر یک در طول موج ۴۸۰ نانومتر در مقابل بافر انتخابی قرائت و نمودار جذب بر حسب غلظت آدریامایسین رسم گردید.

(ب) مطالعه طیف جذبی هیستون H1

طیف جذبی هیستون H1 استخراج شده از تیموس گوساله با استفاده از روش Sanders (1977)، در غلظت ۲۵ میکرومولار در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌مولار EDTA در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۳۴۰ نانومتر رسم شد و مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین با تهیه محلول‌های پروتئین در غلظت‌های مختلف و قرائت جذب هر یک از آنها در طول موج ۲۱۰ نانومتر در مقابل بافر مورد استفاده، نمودار جذب بر حسب غلظت هیستون H1 بدست آمد.

(ج) بررسی اثر آدریامایسین بر هیستون H1

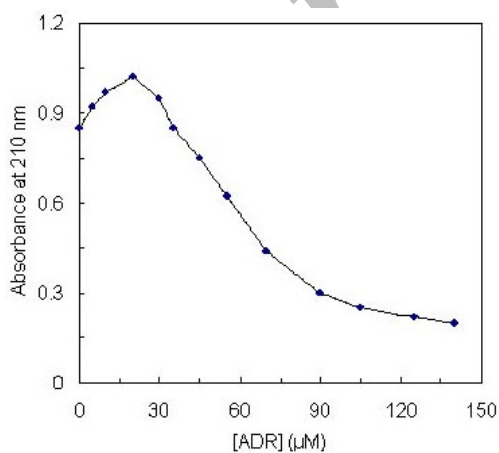
در حضور بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌مولار EDTA، هیستون H1 با غلظت ۲۵ میکرومولار را در لوله‌های آزمایش آماده شده ریخته و آدریامایسین در غلظت‌های ۵ تا ۱۴۰ میکرومولار بر هر یک از لوله‌ها افزوده شد. پس از مخلوط نمودن محتویات هر یک از لوله‌ها، محلول‌های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اطاق و به دور از نور انکوبه شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-160، تغییرات میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۱۰ نانومتر بررسی و طیف جذبی تفاضلی نمونه‌ها و سایر نمودارهای مورد نظر رسم گردیدند.

(د) مطالعه تأثیر میزان نمک موجود در محیط، بر میانکنش

استفاده قرار می‌گیرد (Smalley et al. 1980; Bonadonna et al. 1970; Bruckner et al. 1981). این ماده از نظر ساختمان شیمیایی، دارای حلقه تتراسیکلین (tetracycline) بوده که با یک مولکول قند آمین‌دار به نام دانوز آمین، اتصال گلیکوزیدی دارد و در حلقه‌های خود دارای گروه‌های فعال کینون (Quinone) و هیدروکینون (Hydroquinone) می‌باشد (Gilman et al. 1985; Frederick et al. 1990). مکانیسم اثر ضد سرطانی داروهای آنتراسیکلین از جمله آدریامایسین بسیار پیچیده و متشکل از مجموعه‌ای از فرآیندهاست. آدریامایسین بدلیل ویژگی‌های ساختمانی خود، قادر است در میان جفت بازهای DNA وارد شود (Intercalation)، سبب ایجاد تغییراتی در بنای فضایی (Conformation) این ماکرومولکول حیاتی و در نهایت مهار فرآیندهای مهمی همچون بیوسنتز RNA و DNA گردد (Sazuka et al. 1976; Gabbay et al. 1989). این دارو روند تولید اشکال بسیار فعال اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد که برای سلول بسیار مضر و مخرب هستند را تشدید نموده (Berlin et al. 1982; Bachur et al. 1981) و ترکیبات اخیر می‌توانند از طریق پایدار نمودن کمپلکس "DNA-توپوایزومراز II" سبب بروز مرگ سلولی شوند (Tewey et al. 1984; Shelton et al. 1996). آدریامایسین همچنین قادر است از طریق میانکنش با غشاء پلاسمایی و برخی از اندامک‌های سلولی نظیر میتوکندری، در ساختمان و عمل این بخش‌ها اختلال ایجاد نماید (Muphree et al. 1981; Solaini 1989). به طور کلی می‌توان گفت هدف اصلی ترکیبات آنتراسیکلین از جمله آدریامایسین در سلول، DNA می‌باشد و این ترکیب قادر است به طرق مختلف به DNA متصل شود (Gabbay et al. 1976). از آنجایی که در موجودات عالی، مولکول DNA به صورت برهنه و آزاد نبوده و در بند و بست با یک سری ترکیبات پروتئینی و به شکل یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی در داخل هسته سلول استقرار یافته است، لذا به نظر می‌رسد بدلیل حضور ترکیبات مختلف پروتئینی از جمله هیستون‌ها، مولکول‌های آدریامایسین نتوانند به آسانی به DNA دسترسی پیدا نموده و با آن وارد میانکنش شوند. از سوی دیگر، چگونگی اتصال مولکول‌های این دارو به DNA در حضور و عدم حضور ترکیبات اخیر متفاوت خواهد بود (Gyapay et al. 1985). بعلاوه برخی از محققین، میانکنش آدریامایسین با ترکیبات پروتئینی شرکت‌کننده در ساختار کروماتین را یکی از عوامل مؤثر در ایجاد مرگ سلولی تلقی می‌نمایند (Jeney et al. 1980). در میان ترکیبات پروتئینی شرکت‌کننده در ساختار کروماتین، هیستون H1 از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است چرا که به دلیل خصوصیات ساختمانی ویژه خود، از طریق برقراری اتصالات گوناگون، با سایر اجزای کروماتین ارتباط دارد و در شکل‌گیری نهایی و ثبات ساختار کروماتین، ثابت نگاه داشتن فواصل هسته‌های نوکلئوزومی،

1985). اگر چه هدف اصلی آدریامایسین، مولکول DNA می‌باشد لکن به نظر می‌رسد پروتئین‌های متصل به آن از جمله هیستون‌ها در این فرآیند نقش داشته باشند (Gyapay et al. 1985). از طرفی، هیستون H1 که بزرگترین هسیتونهاست، در بالا بردن میزان فشردگی ساختار کروماتین نقش ویژه‌ای دارد (Luger et al. 1997; Howe et al. 1998; Zhou et al. 1998). مطالعات انجام‌شده بر روی برخی از داروهای آنتراسیکلین نشان داده است که این داروها علاوه بر DNA، قادرند به هیستون‌ها نیز متصل شوند (Rabbani et al. 1999; Zargar et al. 2002). برای بررسی اثر آدریامایسین بر روی پروتئین هیستونی H1، غلظت‌های متفاوتی از این دارو بر هیستون مذکور در شرایط مورد نظر تأثیر داده شد و میانکنش بین آنها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف نمک مورد مطالعه قرار گرفت.

شکل ۱، طیف جذبی هیستون H1 (نمودار بزرگ) و طیف جذبی آدریامایسین (نمودار کوچک) را نمایش می‌دهد. همانگونه که ملاحظه می‌شود هیستون H1 صرفاً دارای یک قله (peak) جذبی در ناحیه طول موج ۲۱۰ نانومتر می‌باشد. این پروتئین به دلیل کمبود اسیدآمینه‌های حلقه‌دار (Chapman et al. 1978)، در ناحیه طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب شاخصی ندارد. آدریامایسین دارای دو قله جذبی مشخص به ترتیب در نواحی ۲۳۰ و ۴۸۰ نانومتر می‌باشد. محققین احتمال می‌دهند قله جذبی واقع‌شده در ۲۳۰ نانومتر مربوط به قند دانوزآمین و قله جذبی استقرار یافته در ۴۸۰ نانومتر مربوط به حلقه تتراسیکلین این مولکول باشد. بدین ترتیب طول موج ۲۱۰ نانومتر برای بررسی هیستون H1 در مطالعات بعدی انتخاب گردید. در ادامه، هیستون H1 با غلظت‌های متفاوتی از آدریامایسین در دمای اطاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و نمودار جذب پروتئین بر علیه غلظت دارو رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمایش تغییرات میزان جذب هیستون H1 پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف آدریامایسین در دمای اطاق به مدت ۳۰ دقیقه.

آدریامایسین با هیستون H1

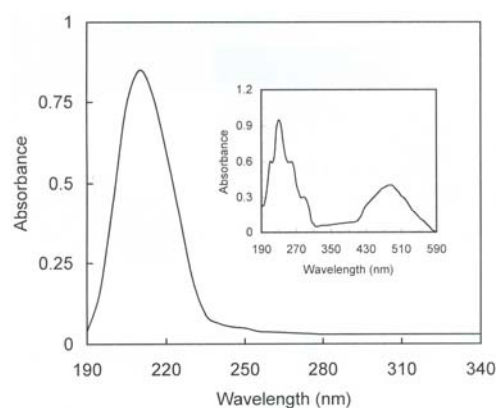
برای بررسی نقش نمک، از بافر فسفات نمکی استفاده شد، بدین ترتیب که هیستون H1 با غلظت ۲۵ میکرومولار در محیط حاوی ۰/۱ مولار نمک کلوروسدیم، با غلظت‌های ۵ تا ۱۴۰ میکرومولار آدریامایسین مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه و به دور از نور انکوبه گردید. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، تغییرات میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۱۰ نانومتر مطالعه گشته، طیف جذبی تفاضلی نمونه‌ها در مقابل بافر حاوی غلظت‌های مشابه دارو و نمک و سایر نمودارهای مورد نظر ترسیم شدند. در ادامه، این آزمایش‌ها در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ مولار نمک کلوروسدیم و در شرایط مشابه تکرار شد و نمودارهای مربوط رسم گردید.

۵) بررسی تأثیر نوع نمک موجود در محیط، بر میانکنش آدریامایسین با هیستون H1

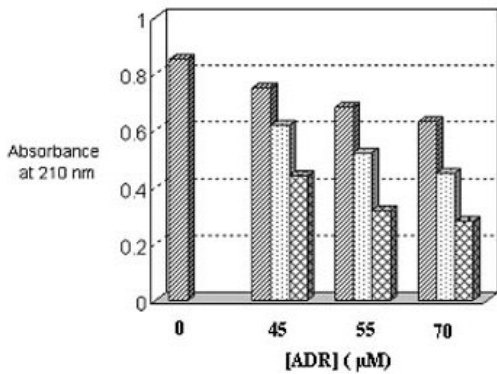
به منظور بررسی نقش نوع نمک موجود در محیط بر میانکنش دارو و پروتئین، آزمایشات قسمت "د" مجدداً تکرار گردید با این تفاوت که به جای کلوروسدیم از نمک کلورونیزیم استفاده شد. لازم به ذکر است که طی انجام این مطالعه، هر یک از آزمایشات حداقل سه مرتبه در شرایط مشابه تکرار گردید و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Excel، انحراف معیار (Standard Deviation) داده‌ها محاسبه شد که مقادیر بدست آمده برای انحراف معیار (۰/۰۲۱ - ۰/۰۱۴)، از صحت آزمایش‌ها حکایت داشت.

نتایج و بحث

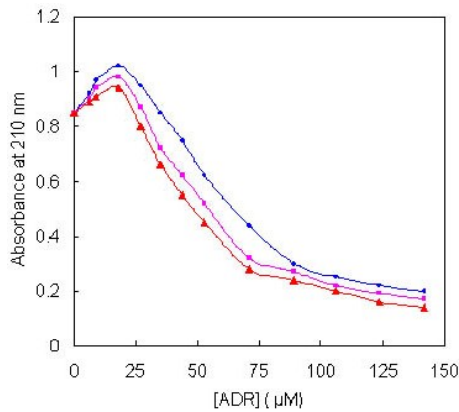
در سلول‌های عالی، DNA به صورت برهنه و آزاد نبوده بلکه در اتصال با یک سری ترکیبات پروتئینی و به صورت یک مجموعه نوکلئوپروتئینی در هسته سلول استقرار یافته است (Gyapay et al.



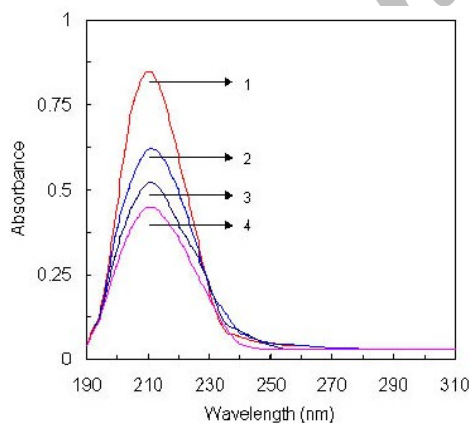
شکل ۱- نمایش طیف جذبی محلول هیستون H1 با غلظت ۲۵ میکرومولار (نمودار بزرگ) و محلول آدریامایسین با غلظت ۵۰ میکرومولار (نمودار کوچک) در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار، pH=۷ و ۱ میلی‌مولار EDTA.



شکل ۴- نمایش تغییرات میزان جذب هیستون H1 در غلظت ۲۵ میکرومولار پس از انکوباسیون با غلظت‌های ۴۵، ۵۵ و ۷۵ میکرومولار آدریامایسین در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در محیط عاری از نمک (□) و در حضور ۰/۲ مولار از نمک‌های کلوروسدیم (▨) و کلورونیزیم (▩).



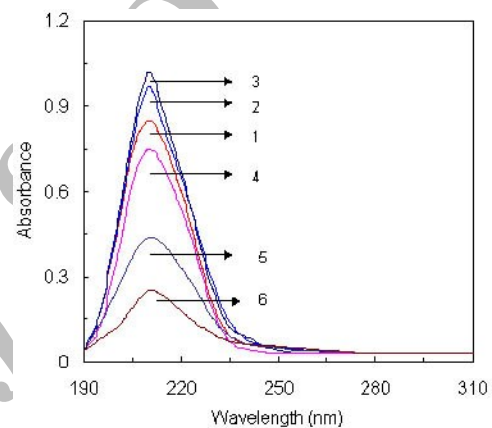
شکل ۵- نمایش تغییرات میزان جذب هیستون H1 پس از انکوباسیون با غلظت‌های مختلف آدریامایسین در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در محیط عاری از نمک (●) و در حضور ۰/۲ مولار از نمک‌های کلوروسدیم (■) و کلورونیزیم (▲).



شکل ۶- نمایش طیف جذبی محلول ۲۵ میکرومولار هیستون H1 (۱) و تغییرات آن پس از انکوباسیون با ۵۵ میکرومولار آدریامایسین در محیط عاری از نمک (۲) و در حضور ۰/۲ مولار از نمک‌های کلوروسدیم (۳) و کلورونیزیم (۴).

باتوجه به اینکه نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی ما حکایت از آن داشت که حداکثر میزان جذب هیستون H1، در محدوده طول موج

همانگونه که مشاهده می‌شود، جذب هیستون H1 در حضور آدریامایسین تا غلظت ۲۰ میکرومولار، افزایش نشان می‌دهد و در غلظت‌های بالاتر دارو، جذب پروتئین کاهش می‌یابد تا جایی که دیگر با افزایش غلظت آدریامایسین، در میزان جذب هیستون کاهش معنی‌داری ملاحظه نمی‌گردد. با رسم طیف جذبی تفاضلی محلول‌های پروتئین انکوبه شده با غلظت‌های مختلف آدریامایسین، مشخص شد که طیف جذبی هیستون H1، در حضور آدریامایسین تا غلظت ۲۰ میکرومولار دستخوش هیپروکرومیستی شده و این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر دارو، هیپوکرومیستی ملاحظه می‌گردد (شکل ۳).



شکل ۳- نمایش تغییرات طیف جذبی تفاضلی کمپلکس هیستون H1-آدریامایسین در مقابل غلظت‌های مشابه دارو: نمودارهای شماره ۱ تا ۶ به ترتیب غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۵، ۷۰ و ۱۰۵ میکرومولار دارو را نشان می‌دهند.

تکرار آزمایش‌ها به ترتیب در حضور غلظت‌های مختلفی از نمک‌های کلوروسدیم و کلورونیزیم نتایج مشابهی را در بردارد با این تفاوت که اولاً با افزایش غلظت نمک در محیط، کاهش جذب پروتئین در حضور غلظت معینی از آدریامایسین شدت می‌یابد و ثانیاً این کاهش جذب هیستون، در محیط حاوی غلظت مشخصی از نمک کلورونیزیم نسبت به محیط حاوی همان غلظت از نمک کلوروسدیم، بیشتر مشاهده می‌شود (شکل ۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که در محیط حاوی نمک، نمودار جذب هیستون H1 بر علیه غلظت آدریامایسین، به طرف پائین شیفت پیدا می‌کند و میزان شیفت نمودار در محیط حاوی نمک کلورونیزیم، از محیط حاوی نمک کلوروسدیم بیشتر است (شکل ۵). مطالعه تغییرات طیف جذبی هیستون H1 پس از میانکنش با آدریامایسین در محیط حاوی نمک، از شیفت پیدا نمودن طیف جذبی این پروتئین به طرف پایین (هیپوکرومیستی) حکایت دارد بطوریکه وارد کردن نمک در محیط، این اثر را تشدید نموده و در حضور نمک کلورونیزیم نسبت به نمک کلوروسدیم، این تغییرات شدیدتر است (شکل ۶).

غیرطبیعی شدن (Denaturation)، از خود مقاومت نشان می‌دهد لکن با افزایش غلظت دارو، غیرطبیعی شدن هیستون H1 آغاز می‌گردد. تکرار آزمایش‌ها در حضور غلظت‌های مختلفی از نمک کلروسدیم، نتایج مشابهی را در بردارد با این تفاوت که با افزایش غلظت کلروسدیم در محیط، میانکنش دارو با پروتئین شدت یافته و تغییرات بیشتری در میزان جذب هیستون H1 ملاحظه می‌شود. از آنجایی که جذب نوری پروتئین‌ها در محدوده طول موج‌های ۲۱۰ تا ۲۳۰ نانومتر، منحصرأً به عامل آمین پیوندهای پپتیدی موجود در ساختار آنها اختصاص دارد و نمک کلرو سدیم در محیط مائی به یون‌های Na^+ و Cl^- یونیزه می‌گردد لذا بنظر می‌رسد به دلیل وجود جاذبه الکترواستاتیک میان ذرات حاوی بارهای الکتریکی غیرهمنام، یونهای Na^+ با ایجاد پوششی بر روی زوج الکترون‌های غیر پیوندی اتم نیتروژن عامل آمین پیوندهای پپتیدی، از شرکت این الکترون‌ها در فرآیند جذب نور ممانعت به عمل می‌آورند و در نتیجه میزان جذب پروتئین کاهش می‌یابد. بعلاوه با توجه به اینکه افزودن نمک به محیط باعث افزایش قدرت یونی و ثابت دی‌الکتریک محیط می‌شود و این امر، تضعیف میانکنش‌های الکترواستاتیک و در نقطه مقابل، تقویت میانکنش‌های آبگریز بین مولکول‌های دارو و هیستون را در پی دارد، در نتیجه درحضور نمک، کاهش جذب هیستون شدت می‌یابد. بررسی‌ها نشان می‌دهد چنانچه به جای کلروسدیم، غلظت‌های مشابه‌ای از نمک کلرو منیزیم در محیط حضور داشته باشند، اثرات مذکور تشدید می‌گردد به عبارتی حضور یون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی در محیط، اثرات کاملاً مشابهی را در پی ندارند و چنین به نظر می‌رسد که در تأثیر نمک بر میانکنش آدریامایسین با هیستون H1، علاوه بر کمیت یون‌ها، کیفیت و چگونگی توزیع یون‌ها در محیط نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. بعلاوه با توجه به اینکه حضور هر مول $MgCl_2$ معادل ایجاد سه مول یون $(Mg^{2+}, 2Cl^-)$ و حضور هر مول $NaCl$ معادل ایجاد دو مول یون (Na^+, Cl^-) در محیط است، چنین استنتاج می‌شود در حضور کلرومنیزیم که می‌تواند قدرت یونی محیط را هم از نظر کمی و هم از نظر کیفی بیشتر از کلروسدیم تحت تأثیر قرار دهد، میانکنش‌های آبگریز بین دارو و پروتئین تقویت می‌گردد و در نتیجه جذب نوری پروتئین کاهش بیشتری را نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

از زحمات همکاران گرامی به خاطر مساعدت در امر ماشین‌نویسی و ویرایش متن این مقاله، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

۲۱۰ نانومتر قرار می‌گیرد، میزان جذب این پروتئین در طول موج مذکور در حضور غلظت‌های مختلف آدریامایسین و نمک‌های کلروسدیم و کلرومنیزیم اندازه‌گیری شد (جدول ۱). همانگونه که مشاهده می‌شود، آدریامایسین جذب ۲۱۰ نانومتر هیستون H1 را کاهش می‌دهد و هر اندازه که غلظت بیشتری از این دارو با پروتئین مذکور انکوبه شود، در میزان جذب ۲۱۰ نانومتر هیستون H1 کاهش بیشتری ملاحظه می‌گردد، از طرفی حضور نمک‌های کلروسدیم و کلرومنیزیم در محیط، این اثر دارو را تشدید می‌نمایند بطوریکه تشدید این اثر، در محیط حاوی کلرو منیزیم نسبت به محیط حاوی کلرو سدیم بیشتر مشاهده می‌شود.

جدول ۱- تغییرات میزان جذب ۲۱۰ نانومتر محلول ۲۵ میکرومولار هیستون H1 پس از انکوباسیون با غلظت‌های ۴۵، ۵۵ و ۷۰ میکرومولار آدریامایسین در محیط حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ مولار از نمک‌های کلروسدیم و کلرومنیزیم.

غلظت نمک (مولار)	غلظت دارو (میکرو مولار)		
	۷۰	۵۵	۴۵
کلرو سدیم	۰/۴۴	۰/۶۲	۰/۷۵
	۰/۳۶	۰/۵۵	۰/۷۰
	۰/۳۲	۰/۵۲	۰/۶۸
	۰/۲۹	۰/۵۰	۰/۶۶
کلرو منیزیم	۰/۴۴	۰/۶۲	۰/۷۵
	۰/۳۴	۰/۵۰	۰/۶۷
	۰/۲۸	۰/۴۵	۰/۶۲
	۰/۲۶	۰/۴۲	۰/۶۰

بطور کلی، نتایج بدست آمده از مطالعات نشان می‌دهد که هرچه میزان داروی آدریامایسین در محیط زیادتر شود، مقدار داروی موجود در کمپلکس آدریامایسین- هیستون H1 افزایش می‌یابد. انکوباسیون آدریامایسین تا غلظت ۲۰ میکرومولار با هیستون H1 در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌مولار EDTA، سبب افزایش میزان جذب این پروتئین و هیپروکرومیسیته طیف جذبی آن می‌شود، لکن در غلظت‌های بالاتر دارو، جذب هیستون H1 کاهش یافته و طیف جذبی آن دستخوش هیپوکرومیسیته می‌گردد. بنابراین آدریامایسین در دو محدوده غلظت مختلف، دو اثر متفاوت را بر پروتئین هیستونی H1 القاء می‌نماید. در این حالت به نظر می‌رسد این داروی آنتی‌بیوتیکی همانند یک عامل غیرطبیعی‌کننده (Denaturant) وارد عمل می‌شود بطوریکه در غلظت‌های کم آن، پروتئین در برابر

منابع:

- An W., Leuba S.H., Van Holde K., Zlatanova J. 1998: Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence -dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3396-3401.
- Arcamon F., Francesch G., Tenco S., Selva A. 1969: Adriamycin (14-Hydroxy auronubicin), A Novel Antitumor Antibiotic. *Tetrahedron Letters.* **13**: 1007-1010.
- Bachur N.R., Gee M.V., Friedman R.D. 1982: Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res.* **42**: 1073-1081.
- Berlin V., Haseltine W. 1981: Reduction of adriamycin to a semiquinone free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in reaction mediated by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* **256**: 4747-4756.
- Bonadonna G., Monfardini S., Lena M.D., Bellani F.F., Berette G. 1970: Phase I and Preliminary Phase II Evaluation of Adriamycin. *Cancer Res.* **30**: 2572-2582.
- Bradbury E.M., Javaherian K. 1977: The organization and Expression of the Eukaryotic Genome, Academic Press Inc., London. pp. 1-276.
- Bruckner H.W., Cohen C. J., Goldenberg J.D., Kabakon B., Wallech R.C., Deppe G., Greenspan E.M., Grusberg S.B., Holland J.F. 1981: Improved Chemotherapy for Ovarian Carcinoma with Cis – diaminedichloroplatinium and Adriamycin. *Cancer* **47**: 2288-2294.
- Camerini-Otero R.D., Sollner-Webb B., Felsenfeld G. 1976: The Organization of histones and DNA in chromatin: evidence for an arginine –rich histone kernel. *Cell.* **8**: 333-347.
- Chapman G.E., Hartman P.G., Gary P.D., Bradbury E.M., Lee D.R. 1978: A Nuclear-Magnetic-Resonance study of the globular structure of the H₁ histone. *Eur. J. Biochem.* **86**: 35-44.
- Cole R.D. 1984: A minireview of microheterogeneity in H₁ histone and its possible significance. *Anal. Biochem.* **136**: 24-30.
- Compton J.L., Bellard M., Chambon P. 1976: Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 4382-4386.
- Derobertis E.D.P., Derobertis E.M.P. 1980: Cell and Molecular Biology, 2nd Edition, Sanders Colledge, Philadelphia, Holt – Sanders, Tokyo p. 13.
- Elgin S.C.R., Weintraub H. 1975: Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann. Rev. Biochem.* **44**: 725-774.
- Fabry S., Muller K., Lindauer A., Park P.B., Cornelius T., Schmit R. 1995: The organization structure and regulatory elements of Chlamydomonas histone genes reveal features linking plant and animal genes. *Curr. Genet.* **28**: 333-345.
- Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H.J. 1990: Structural comparison of anticancer Drug-DNA complexes: Adriamycin and daunomycin. *Biochemistry.* **29**: 2538-2549.
- Gabbay E.J., Grier D., Fingerle R.E., Reimer R., Lery R., Pearce S.W., Wilson W.B. 1976: Interaction specificity of the anthracyclines with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* **15**: 2062-2070.
- Germond J.E., Hirt B., Qudet P., Gross-Bellark M., Chambon P. 1975: Folding of the DNA double helix in chromatin –like structures from Simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 1843-1847.
- Gilman A.G., Goodman L.S., Rall T.W., Murad F. 1985: The pharmacological Basis of Therapeutics, 7th edition, Mc Millan Publishing Company, New York, p. 1283.
- Gyapay G., Jeney A., Lapis K. 1985: Drug action and chromatin structure. I. Adriamycin binding to core particle of nucleosomes and subsequent enhanced DNA fragmentation induced by micrococcal nucleas. *Neoplasma.* **32**: 521-528.
- Howe L., Iskandar M., Ausio J. 1998: Folding of chromatin in the presence of heterogeneous histone H₁ binding to nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **273**: 11625-11629.
- Jeney A., Harrap K.R. 1980: “Chromatin in normal and tumor cells” in “Biology of the Cancer Cell” E. D. K. Letnansky (ed.), Kugler Publications, Amsterdam. p. 389.
- Kinkada J.M.Jr., Cole R.D. 1966: The resolution of four lysine – rich histones derived from calf thymus. *J. Biol. Chem.* **241**: 5790-5797.
- Lennox R.W., Oshima R.G., Cohen L.H. 1982: The H₁ histones and their interphase phosphorylated states in differentiated and undifferentiated cell lines derived from murine tetradocarcinomas. *J. Biol. Chem.* **257**: 5183-5190.
- Lewis E.A., Reams R. 1983: Histone H₁: Ultracentrifugation studies of the effects of ionic strength and denaturants on the solution conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **223**: 185-192.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. 1997: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**: 251-260.
- Murphree S.A., Tritton T.R., Smith P.L., Sartorelli A.C. 1981: Adriamycin – induced changes in the surface membrane of sarcoma 180 ascites cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **649**: 317-324.
- Noll M., Kornberg R.D. 1977: Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H₁. *J. Mol. Biol.* **109**: 393 – 404.
- Ohlenbusch H.H., Olivera B.M., Tuan D., Davidson N. 1967: Selective dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein. *J. Mol. Biol.* **25**: 299-315.
- Rabbani A., Zargar S.J. 1999: Interaction of anthracycline antibiotics with the chromatin protein histone H₁. *Iranian Journal of Biology.* **8**: 13-22.
- Sanders C. 1977: A method for the fractionation of the High-Mobility-Group non-histone chromosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 1034-1042.
- Sazuka Y., Tanizawa H., Takino Y. 1989: Effect of adriamycin of DNA, RNA, Protein biosynthesis in mouse tissues in

- connection with its cardiotoxicity. *JPN J. Cancer Res.* **80**: 1000-1005.
- Shelton C.J., Harding M.M., Prakash A.S. 1996: Enzymatic and chemical footprinting of anthracycline antitumor antibiotic and related saccharide side chains. *Biochemistry* **35**: 7974 – 7982.
- Smalley R.V., Bartolucci A.A. 1980: Variations in Responsiveness and Survival of Clinical Subjects of Patients with Metastatic Breast Cancer to Two Chemotherapy Combinations. *Eur. J. Cancer* **1**: 141-146.
- Solaini G. 1989: Spermine antagonizes the binding of adriamycin to the inner membrane of heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 791-798.
- Tewey K.M., Rowe T.C., Yang L., Balligan B.D., Liu L.F. 1984: Adriamycin –induced DNA – damage mediated by mammalian DNA - Topoisomerase II. *Science.* **226**: 466-468.
- Wilhelm J.A., Groves C.M., Hnilica L.S. 1972: Lack of major cytoplasmic protein contamination of rat liver nuclear chromatin. *Experientia.* **28**: 514-516.
- Zargar S.J., Rabbani A. 2002: Interaction of daunomycin antibiotic with histone H₁: ultraviolet spectroscopy and equilibrium dialysis studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **30**: 113-117.
- Zargar S.J., Rabbani A. 2000: The effect of daunomycin antibiotic on histone H₁: thermal denaturation and fluorescence spectroscopy studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**: 75-79.
- Zhou Y.B., Gerchman S.E., Ramakrishnan V., Travers A., Muyldermans S. 1998: Position and orientation of the globular domain of linker histone H₅ on the nucleosome. *Nature.* **395**: 402–405.

Archive of SID