اثرات بیولوژیکی و مکانیزم ایجاد مسمومیت توسط دو اسید آمینه غیر پروتئینی ایندوسپیکین و کاناوانین

دکتر حسینعلی عرب[۱] دکتر مایکل اِپاس[۲]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲ ، ۳۶ ـ ۳۱، (۱۳۷۸)

در این مطالعه اثرات دو اسید آمینه سمی غیر پروتئینی ایندوسپیکین و کاناوانین برروی رادیکال سوپراکساید در ماکروفاژ استخراج شده از حفره صفاقی موش صحرائی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که هردو ماده قادر به افزایش میزان سوپراکساید در ماکروفاژهای کشت شده می‌باشند. تولید سوپراکساید در ماکروفاژها توسط فوربول مایریستیک استات القاء گردید. میزان تولید سوپراکساید از طریق سیتوکروم C و به وسیلهٔ اسپکتروفوتومتر در حضور و یا عدم حضور آنزیم زائل کنندهٔ سوپراکساید (Superoxide dismutase) اندازه‌گیری گردید. این مطالعه نشان داد که افزایش میان سوپراکساید به علت کاهش ساخت نیتریک اکساید در ماکروفاژها بوده است که توسط دو اسید آمینه ایندوسپیکین و کاناوانین انجام پذیرفته است. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که این دو اسید آمینه سمّی غیر پروتئینی به علت مشابه (آنالوگ) بودن با آرژینین مانع از سنتز نیتریک اکساید از آرژینین شده‌اند و مسمومیت ناشی از این دو اسید آمینه ممکن است بر اثر افزایش رادیکال سوپراکساید باشد که در پی توقف ساخت نیتریک اکساید حاصل می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ایندوسپیکین، کاناوانین، اسید آمینه غیرپروتئینی، نیتریک اکساید، سوپراکساید

در حالی که فقط تعداد ۲۰ اسید آمینه در تشکیل پروتئین‌ها نقش دارند، مطالعات نشان می‌دهد که تعداد زیادی از اسید آمینه‌های غیرپروتئینی در گیاهان و دیگر موجودات یافت می‌شوند. تعداد این مواد شناسایی شده را بیشتر از ۶۰۰ نوع اعلام کرده‌اند (۱۶). از آنجایی که ساختمان شیمیایی بعضی از این مواد شبیه اسید آمینه‌های پروتئینی می‌باشند، ورود این مواد به بدن موجودات مختلف از جمله دامهای اهلی می‌تواند منشاء اختلالات و اثرات بیولوژیکی مختلف از جمله مسمومیت گردد. از آنجایی که این مواد در بعضی از گیاهان مورد تغذیه دامهای اهلی یافت می‌شوند، آشنایی به اثرات بیولوژیکی آنها امری ضروری است.

ایندوسپیکین (Indospicine)و کاناوانین (Canavanina) دو نوع از این اسید آمینه‌های غیرپروتئینی می‌باشند که به میزان فراوان در بعضی از گیاهان تیره نخود از جمله خانوادهٔ لگومینه (Leguminosae) یافت می‌شوند. ایندوسپیکین در برگ، ساقه و دانه‌های چندین گیاه جنس نیل (Indigofera) از جمله I. Spicata و I. Linnae یافت می‌شود. در حالی که کاناوانین بیشتر در ساقهٔ گیاهان تیره پروانه داران (Papilonaceae) دیده شده است (۹ و ۸). مصرف گیاهان حاوی این دو اسید آمینه باعث ایجاد اختلالات و مسمومیت‌های مختلف از جمله مسمومیت کبدی در حیوانات می‌گردد، که مسمومیت ایجاد شده توسط ایندوسپیکین برجسته و مخاطره‌آمیز می‌باشد، اما کاناوانین اثرات ضعیف‌تری را از خود به جای می‌گذارد (۹ و ۸).

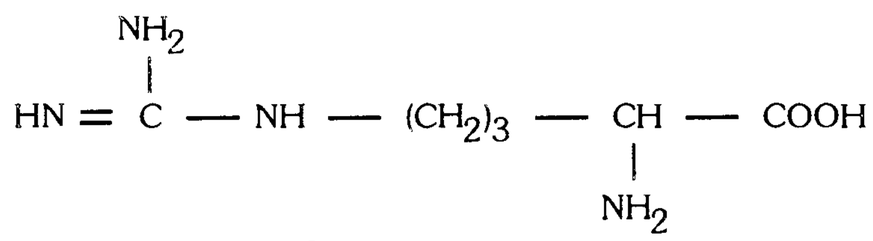
این دو اسید آمینه از نظر ساختمانی شبیه آرژینین می‌باشند (نمودار ۱) و از آنجایی که آرژینین یکی از اسید آمینه‌های مهم تشکیل دهندهٔ غالب پروتئین‌های بدن می‌باشد و در بسیاری از فعالیتهای بیولوژیکی دیگر از جمله سیکل اوره و سنتز نیتریک اکساید (NO) نقش دارد، اختلال در فعالیتهای آن توسط آنالوگ‌هایی از جمله ایندوسپیکین و کاناوانین می‌تواند اختلالات بیولوژیکی مختلفی را در بدن دام یا انسان ایجاد نماید. اختلالات کبدی که توسط این دو اسید آمینه غیرپروتئینی در دامهای مختلف ایجاد می‌گردد با مطالعات تجربی مختلف و از طریق خوراندن گیاهان حاوی آنها و یا مصرف خالص آنها در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۴ و ۷). ولیکن مکانیزم دقیق این مسمومیت بدرستی مشخص نمی‌باشد. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که این دو اسید آمینه به علت شباهت ساختمانی به آرژینین، در روند پروتئین سازی مداخله نموده و باعث به وجود آمدن پروتئین‌های ناقص در بدن می‌گردند (۱۱ و ۱۷). اما چون آرژینین دارای فعالیتهای مختلف در بدن می‌باشد جانشین شدن آنالوگهایی چون ایندوسپیکین و کاناوانین به جای آن و اثرات پاتوبیولوژیکی ایجاد شده می‌تواند با مکانیزم‌های متفاوت دیگری انجام گیرد که تاکنون شناخته نشده است.

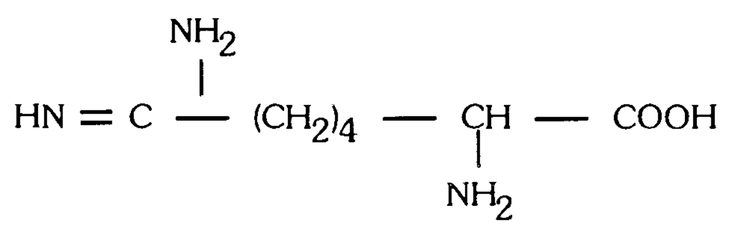
یکی از فعالیتهای مهم آرژینین در بدن نقش آن به عنوان پیش ساز در تولید NO از طریق آنزیم نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد. NO در فعالیتهای مختلف از جمله شل شدگی جدار عروق، جلوگیری از تجمع پلاکتی، تنظیم و کنترل واسطه‌های عصبی و سیستم ایمنی، از بین بردن سلولهای توموری و انگلهای مختلف و خنثی کردن رادیکال آزاد اکسیژن نقش دارد (۱۴). مطالعات نشان می‌دهد که نیتریک اکساید قادر به جلوگیری و حفاظت از ضایعات ناشی از سوپراکساید تولیدشده بر اثر مسمومیت با استامینوفن و لیپوپلی ساکارید میکروبی می‌باشد (۶ و ۱۰). چندین آنالوگ ساختگی آرژینین از جمله نیتروآرژینین متیل استر (NAME)، ان - منومتیل آرژینین (NMMA) نشان داده شده که قادر به جلوگیری از تولید نیتریک اکساید و توقف فعالیتهای آن در زمینه‌های مختلف می‌باشند (۱۵). مطالعه برروی آئورت ایزولهٔ رت نشان داد که کاناوانین و ایندوسپیکین نیز به عنوان آنالوگهای طبیعی آرژینین قادر به توقف تولید NO می‌باشند (۱ و ۱۳). از آنجایی که یکی از فعالیتهای NO خنثی کردن رادیکال سوپراکساید می‌باشد، توقف ساخت NO در بدن می‌تواند منجر به افزایش تولید رادیکال سوپراکساید و در نتیجه ایجاد ضایعه و مرگ سلول در بدن شود. هدف این مطالعه بررسی و آزمایش این نظریه می‌باشد که اثرات سمی ایجاد شده در کبد توسط ایندوسپیکین و کاناوانین می‌تواند ناشی از افزایش رادیکالهای آزاد اکسیژن باشد.

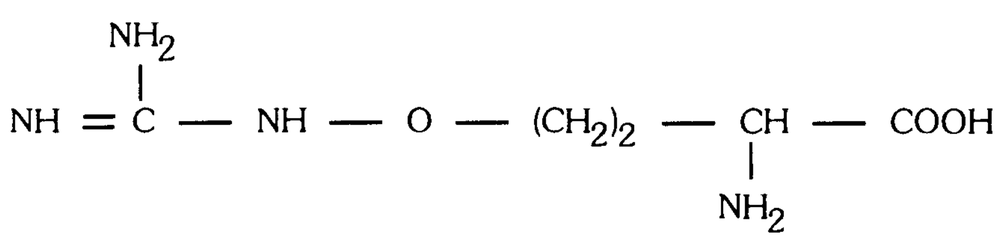
مواد و روش کار

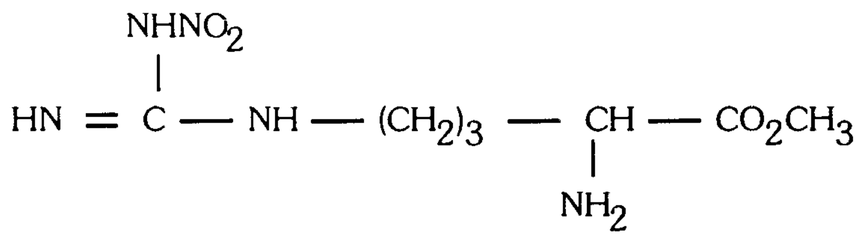
در این مطالعه ماکروفاژهای استخراج شده از حفرهٔ صفاقی موش صحرائی (Wistar rat) در تمامی آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا ۲۰ میلی‌گرم واکسن BCG به صورت داخل صفاقی به هر موش صحرایی تزریق شد. دوازده روز پس از تزریق، موشها به وسیلهٔ بیهوش کننده استنشاقی هالوتان بیهوش و

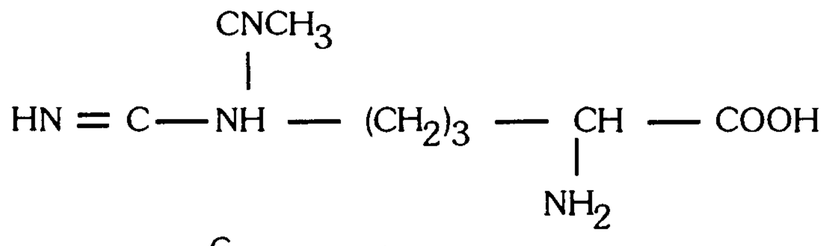
۱) گروه آموزشی فیزیولوژی، فارماکولوژی و سم‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه کوئینزلند - استرالیا.


L-arginine


Indospicine


Canavanine


L-nitroarginine methyl ester


N^G-monomethyl- L-arginine

نمودار ۱ـ ساختمان شیمیایی آرژینین و چند مواد مشابه (آنالوگ) آن ایندوسپیکین، کاناوانین، نیتروآرژینین متیل استر (NAME) و ان - مونومتیل آرژینین (NMMA)

سپس با روش جا به جا کردن مهرهای گردن کشته شدند. در این مطالعه تعداد ۲۵ حیوان مورد اشاره برای جمع‌آوری ماکروفاژ صفاقی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ضد عفونی کردن محوطه شکمی حیوان با فرمالین ۷۰ درصد، حدود ۵۰ میلی‌لیتر از بافر Hank's به محوطه صفاقی تزریق گردید. سپس محوطه صفاقی از طریق ماساژ دادن ملایم کاملاً شستشو گردید و بعد تمامی محلول تزریق شده که حاوی ماکروفاژها و سلولهای دیگر بود بیرون کشیده شد. پس از منتقل کردن به لوله‌های مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در پایان سانتریفوژ، ماکروفاژها به همراه تعدادی از گلبولهای قرمز و مواد زائد دیگر به صورت تودهٔ سلولی در ته لوله‌ها انباشته شدند. برای جداکردن گلبولهای قرمز و مواد زائد دیگر تودهٔ سلولی شستشو و مجدداً سانتریفوژ شدند. تودهٔ ماکروفاژهای خالص شده از انتهای لوله‌ها جمع‌آوری و در محیط مغذی حاوی RPMI 1640 که حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله نوزاد و جنتامایسین بود معلق گردیدند. پس از شمارش سلولی و تعیین درصد خلوص ماکروفاژها، رقت مشخصی از سلولها ($۱۰^۶ \times ۱-۰/۸$) آماده و سپس به ظرفهای کشت سلولی ۹۶ چاهکی منتقل شدند. این ظرفها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و در محیطی که حاوی ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد CO_2 بود قرار داده شدند. بعد از ۲ ساعت سلولها از انکوباتور بیرون آورده شدند و مایع بالای سلولها با سیستم خلاء مکیده و بیرون ریخته شد. با دو بار شستشوی متوالی سلولهای مرده از چاهکها خارج و ماکروفاژهای سالم در ته چاهکها مستقر شدند. پس از آن به هر چاهک به میزان ۲۵۰ ماکرولیتر مایع مغذی RPMI1640 سرم گوسالهٔ نوزاد، جنتامایسین، پلی ساکارید و گاماانترفرون افزوده شد و مجدداً در داخل انکوباتور قرار داده شدند، که در تمام طول شب باقی‌ماندند. این عمل برای القاء و تولید آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در داخل ماکروفاژها ضروری می‌باشد.

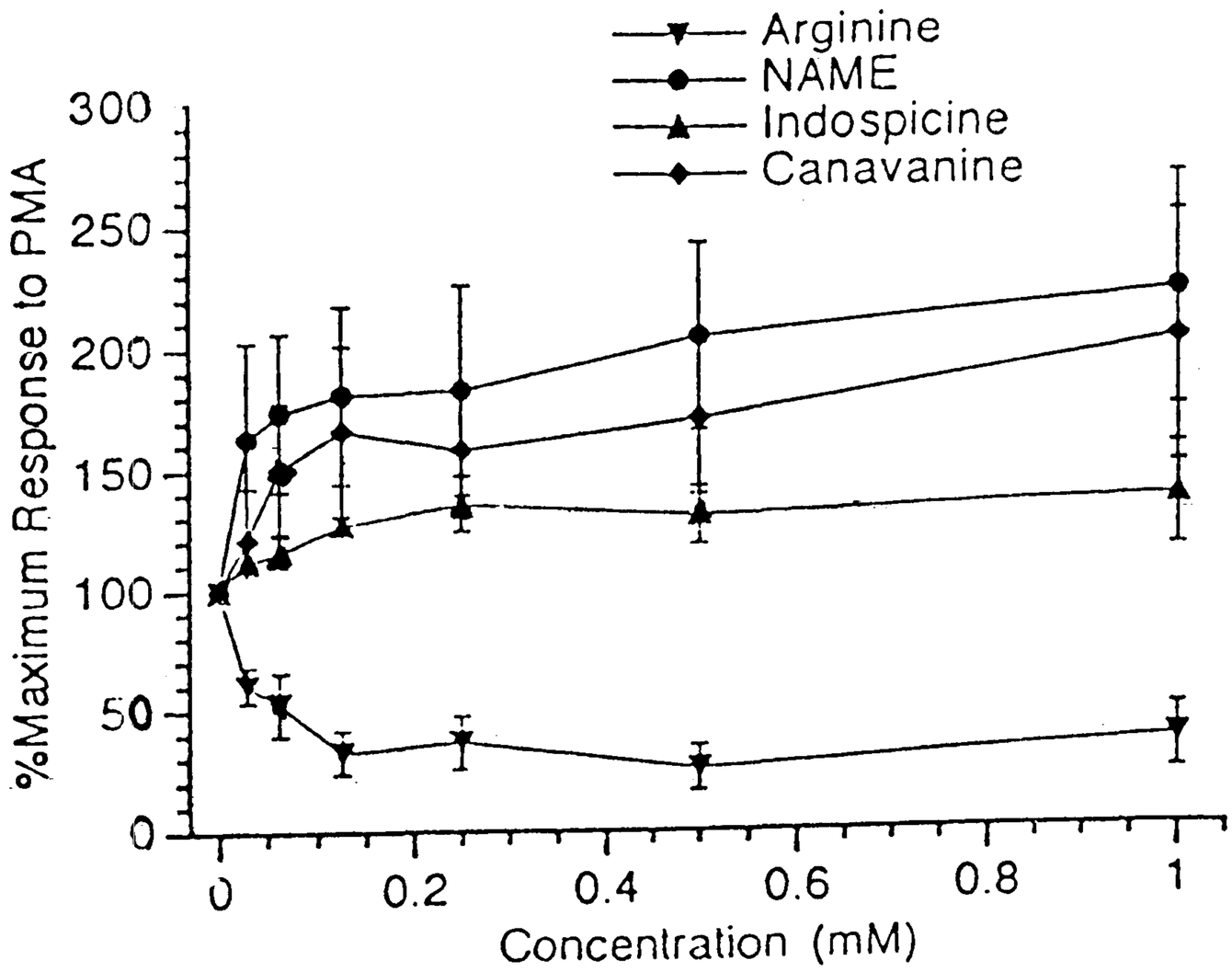
در این مطالعه تولید NO به طور غیر مستقیم و از طریق تولید رادیکال سوپراکساید اندازه‌گیری شد. زیرا میزان تولید سوپراکساید نسبت عکس با میزان NO داشت. تولید رادیکال سوپراکساید به روش احیاء سیتوکروم C مشخص و اندازه‌گیری شد. بدین معنی که سوپراکساید به علت داشتن الکترون اضافی قادر به احیاء سیتوکروم می‌باشد که این احیاء با تغییر رنگ محیط خود را نشان می‌دهد و میزان آن از طریق جذب نوری و توسط اسپکتروفوتومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. احیاء سیتوکروم C باکنترل منفی یعنی مهار سوپراکساید توسط آنزیم Superoxide dismutase (SOD) و در نتیجه توقف واکنش احیاء سیتوکروم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بدین طریق که صبح روز بعد ماکروفاژها از داخل انکوباتور بیرون آورده شدند و پس از بیرون ریختن مایع داخل چاهکها، آزمایشات مختلف جهت اندازه‌گیری سوپراکساید برروی آنها انجام گردید. در هر آزمایش ماکروفاژهای مستقر در چاهکها با ۸۰ ماکرومولار سیتوکروم C، حضور و یا عدم حضور آرژینین و آنالوگهای مختلف آن در محلول Hank's مجاور گردیدند و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه‌سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۹۰ دقیقه به چاهکها به میزان ۱۶۲ نانومولار مادهٔ القاء کننده تولید سوپراکساید یعنی Phorbol-12 myristate 13- acetate (PMA) افزوده شد و در داخل انکوباتور باقی می‌ماندند. پس از یک ساعت ظرفهای کشت سلولی از داخل انکوباتور بیرون آورده شدند و محلول داخل چاهکها که به میزان ۲۵۰ ماکرولیتر بود به طور جداگانه در لوله‌های مخصوص جمع‌آوری و در مجاورت یخ قرار داده شدند. محلولهای جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و پس از آن به طور جداگانه میزان تغییرات در جذب نوری در جهت تعیین مقدار سوپراکساید تولید شده توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

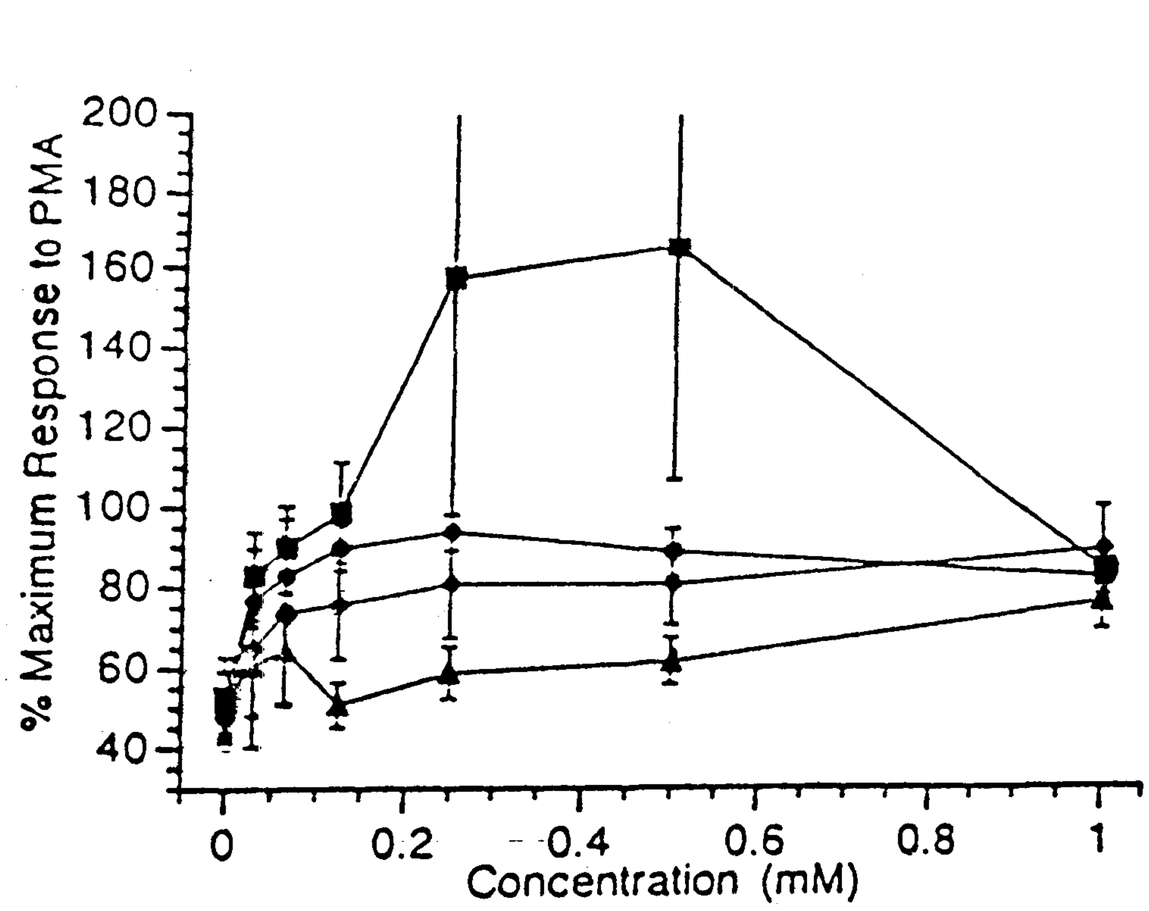
در این مطالعه علاوه بر ایندوسپیکین و کاناوانین دو آنالوگ ساختگی کاملاً شناخته شده آرژینین یعنی NAME و NMMA جهت مقایسه و به عنوان کنترل آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

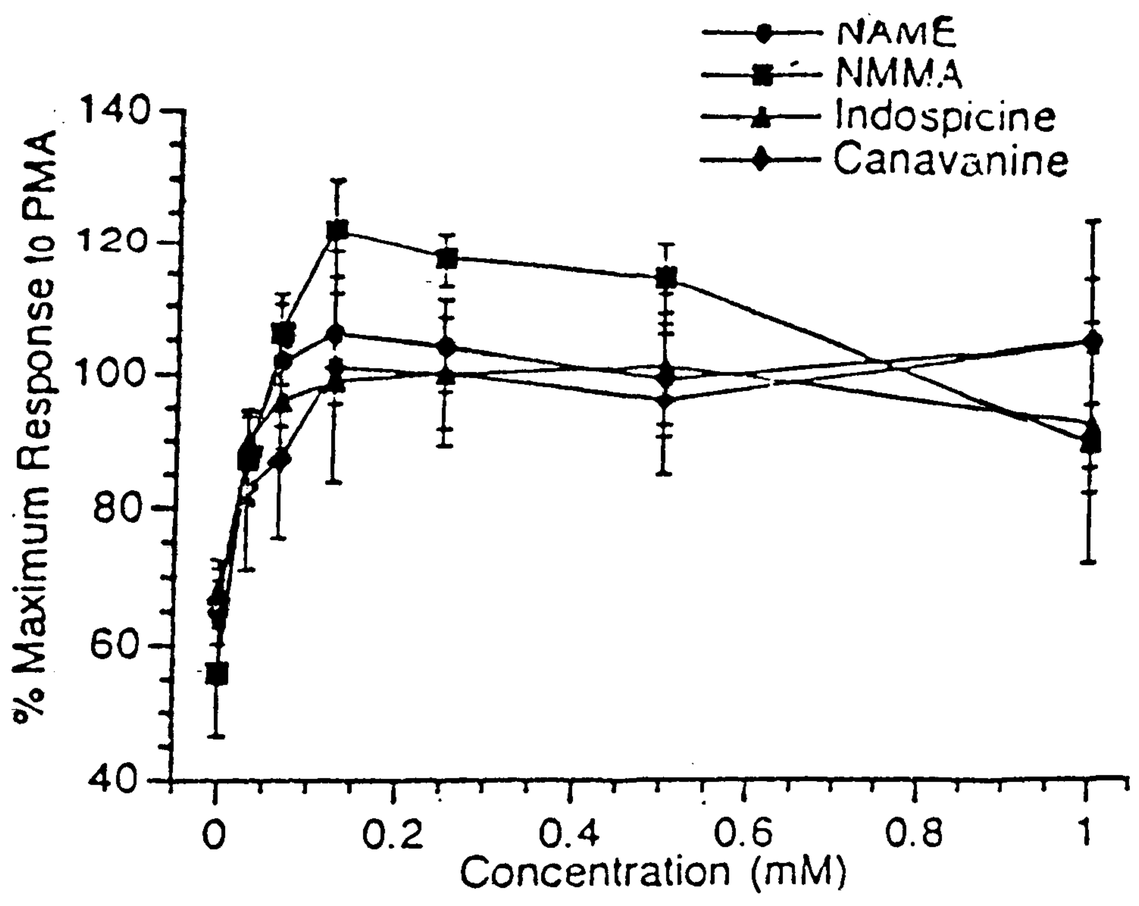
نتایج

اضافه نمودن PMA به محیط کشت باعث تحریک تولید سوپراکساید گردید که تولید این رادیکال از طریق احیاء سیتوکروم C قابل نشان دادن بود. افزایش آنزیم مهارکننده سوپراکساید یعنی SOD به محیط آزمایش مانع از احیاء سیتوکروم C گردید. همان طوری که نمودار ۲ نشان می‌دهد افزایش اسید آمینه آرژینین به محیط کشت باعث کاهش تولید سوپراکساید گردید که این اثر وابسته



نمودار ۲- این نمودار اثرات آرژینین NAME، ایندوسپیکین و کاناوانین را در احیاء سیتوکروم C یا تولید سوپراکساید، بعد از اضافه کردن PMA به محیط کشت ماکروفاژهای حفره صفاقی نشان می‌دهد. در این نمودار درصد پاسخ آرژینین و آنالوگهای آن به PMA نسبت به حداکثر پاسخی است که بدون حضور این مواد به PMA داده شده است. نتایج به صورت میانگین خطای انحراف معیار از ۶ - ۴ آزمایش برای هر ترکیب نشان داده شده است.





نمودار ۳ - این نمودار اثرات مواد مشابه آرژینین یعنی NMMA, NAME ،ایندوسپیکین و کاناوانین را در تولید سوپراکساید توسط ماکروفاژهای حفره صفاقی بعد از افزون PMA به محیط کشت نشان می‌دهد. همان طوری که نمودار نشان می‌دهد مواد فوق الذکر در حضور غلظت‌های ۰/۱۲۵ میلی مولار (الف) و ۰/۲۵ میلی مولار (ب) مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. نتایج نشان داده شده به صورت میانگین خطای انحراف معیار از ۱۲ - ۵ آزمایش برای هر یک از مواد بدست آمده است.

به میزان تجویز می‌باشد. تمامی آنالوگهای آرژینین یعنی NMMA, NAME، ایندوسپیکین و کاناوانین باعث افزایش تولید سوپراکساید گردیدند که میزان این افزایش بستگی به غلظت و نوع آنالوگ بوده است (نمودار ۲). غلظت آرژینین و آنالوگهای مورد استفاده در آزمایشات به میزان ۱ - ۰/۳۰ میلی‌مولار بوده است و نتایج به صورت درصد حداکثر پاسخ به PMA در عدم حضور آرژینین و آنالوگهای آن بیان شده است.

نتایج نشان داد که افزایش آنالوگهای آرژینین به محیط آزمایش باعث جلوگیری از اثرات آرژینین برروی تولید سوپراکساید گردید. این اثر شامل تمامی آنالوگهای مورد استفاده از جمله NAME، NMMA، ایندوسپیکین و کاناوانین بوده است، ولیکن همان طور که نمودار ۳ نشان می‌دهد دارای قدرت اثرات مختلف بوده است. اثر این مواد در تولید سوپراکساید با حضور غلظت‌های مختلف آرژینین مطالعه گردید. در این آزمایشات غلظتهای مورد استفاده برای‌آنالوگهای آرژینین بین ۰/۰۳ تا ۱ میلی مولار بود که در حضور آرژینین به غلظتهای مختلف ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار به محیط آزمایش افزوده گردیدند (نمودار ۳). نتایج به صورت درصد حداکثر پاسخ به PMA در عدم حضور آرژینین و آنالوگهای آن بیان گردیده است.

بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که دو اسید آمینه غیرپروتئینی ایندوسپیکین و کاناوانین به عنوان آنالوگهای آرژینین قادر به افزایش تولید سوپراکساید در ماکروفاژ می‌باشند. بدین ترتیب می‌توان به این نتیجه رسید که اثرات پاتولوژیکی ناشی از این دو اسید آمینه در حیوانات مختلف ممکن است ناشی از تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن باشد. نتایج این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که میزان تولید سوپراکساید بستگی به حضور یا عدم حضور آرژینین در محیط دارد. از آنجایی که اسید آمینه آرژینین به عنوان پیش ساز NO عمل می‌نماید و دو اسید آمینه مورد آزمایش و دیگر آنالوگهای مورد استفاده در این مطالعه قادر به جلوگیری از سنتز NO می‌باشند (۱، ۱۳ و ۱۵) در نتیجه افزایش تولید سوپراکساید به علت توقف تولید NO می‌باشد.

رادیکالهای آزاد اکسیژن عناصری هستند که دارای یک یا دو الکترون جفت نشده می‌باشند. این خاصیت باعث افزایش قدرت ترکیبی این مواد با دیگر ملکولهای سلول می‌گردد. سوپراکساید یکی از این رادیکالها می‌باشد که به دنبال افزایش اضافی به لایهٔ الکترون خارجی ملکول اکسیژن ایجاد می‌شود. این رادیکال ضمن این که خود بالقوه عامل ایجاد کننده ضایعه و اختلالات بیولوژیک در بافتهای مختلف می‌باشد، به عنوان پیش‌ساز مهم در تولید رادیکالهای خطرناک دیگر از جمله هیدروکسیل محسوب می‌شود. ضایعه سلولی که به وسیلهٔ رادیکالهای آزاد ایجاد می‌گردد ناشی از ترکیب این رادیکالها با محتویات سلولی از جمله چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA و اکسیداسیون آنها می‌باشد. یکی از ضایعات مهمی که به وسیله رادیکالهای آزاد ایجاد می‌گردد، پراکسیداسیون در لیپیدی (Lipid Peroxidation) جدار سلولها می‌باشد. بدین طریق که رادیکالهای آزاد براحتی اسیدهای چرب اشباع شده را اکسیده می‌نمایند که اسید اشباع شده خود باعث اکسیداسیون اسیدهای چرب مجاور خود می‌گردد که در نتیجه باعث به وجود آمدن سلسله واکنشهای اکسیداسیون پی در پی می‌گردد. تغییرات شیمیایی بوجود آمده در ساختمان ملکولها باعث ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، ساختمانی و فیزیولوژیک در جدا سلولها و در نتیجه اختلال در جدار سلولی و در نهایت مرگ سلول را به دنبال دارد (۵).

مطالعات مختلف نشان داده است که ایندوسپیکین و کاناوانین دارای فعالیتهای مختلف بیولوژیکی از جمله مسمومیت کبدی در حیوانات مختلف می‌باشند (۸ و۷) ولیکن مکانیزم اثر این مسمومیت کبدی به طور روشن شناخته نشده است. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که این دو اسید آمینه باعث ایجاد اختلال درروند پروتئین سازی می‌گردند(۱۷ و ۱۱). اما از آنجایی که این دو ماده به خاطر تشابهات ساختمانی قادر به مداخله در اعمال آرژینین در فعالیتهای مختلف می‌باشند، مکانیزم اثر فعالیتهای آنها می‌تواند فراتر از مداخله در پروتئین سازی باشد. مطالعات نشان می‌دهد که سلولهای کبد قادر به می‌باشند (۱۲ و ۳). برهم تولید سوپراکساید و یکی از این دو عنصر NO خوردن تعادل تولید به نفع می‌تواند منجر به اختلالات بیولوژیکی در بافت‌های کبد گردد. از جمله نشان داده شده است که جلوگیری و یا کاهش تولید نیتریک می‌تواند منجر به افزایش آندوتوکسین گردد NO اکساید توسط می‌تواند NMMA ضایعات کبدی ناشی از (۲). افزایش ضایعات کبدی در اثر توقف سنتز ناشی از تولید افزایش سوپراکساید و به دنبال آن تولید رادیکالهای دیگر اکسیژن باشد.

بنابر این از نتایج مطالعه حاضر این برمی آید که ضایعات ناشی از مسمومیت دو اسید آمینه ایندوسپیکین و کاناوانین در کبد حیوانات مختلف ممکن است بر اثر NO تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن در بدن باشد که این افزایش صورت گرفته تولید رادیکالها به طور غیر مستقیم و از طریق توقف سنتز ممکن است به عنوان است. در نتیجه می‌توان گفت که در مقابل ضایعات NO عامل حفاظتی بافتها ناشی از رادیکالهای آزاد اکسیژن در بدن عمل نماید.

References

1 . Arab, H. The effect of indospicine on nitric oxide induced vascular relaxation. A. Thesis for the post graduate Diploma in Veterinaty Studies, the University of Queensland, Australia,(1992).

2 . Billiar, T.R., Curran, R.D., Harbrecht, B.G., Stuehr, D.J., Demetrids, A.J., Simmons, R.L. Modulation of nitric oxide synthesis in vivo: N - monomethyl L - arginine inhibits endotoxin - induced nitrite / nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage, J. Leukocyte Biol. 48: 565 - 569, (1990).

3 . Billiar T.R, Cirram, R.D., Ferrari, F.K., Williams, D.L., Simmons R.L. Kupffer cell: hepatocyte cocultures produce nitric oxide in response to bacterial endotoxin. J. Surg. Res. 48: 349-353, (1990).

4 . Effects of feeding Canavalia ensiformis on the rumen flora of sheep, and the toxic amino acid canavanine on rumen bacteria. System Appl. Microbiolo. 13, 388 - 393, (1990).

5 . Farber, J.L., Kyqe, M.E., Coleman, J.B. Biology of Disease Mechanism of cell injury by activated oxygen species. Laboratory Investigation 62(6), PP: 670 -678, (1990).

6 . Harbrecht, B.G., Billiar, T.R., Stadler, J., Demetris, A.J. Ochoa, J. Synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic Thrombosis and an oxygen radical-madiatid hepatec injury. J.

Leukocyte Biol. 25: 390-394, (1992).

7 . Hegarty, M.P., Kelly, W.R., McEwan, D., William, O.J., Cameronr. Hepatotoxicity to dogs of horse meat contaminated with indospicine. Aust. Vet. J., 65: 337-340, (1988).

8 . Hegarty, M.P. and Pound, A.W. Indospicine, a new Hepatotoxic amino - acid from Indigofera. Nature, 217 (27), 354 -355, (1968).

9 . Hegarty, M.P. Toxic amino acino acids of plant origin, In Keeler R.F., Van Kampen K.R., James L.F., (eds): Effects of poisonous plants on livestock. Academic press, New York PP: 575-585, (1978).

10 . Kuop, C., Silvka, A. Nitric oxide decreases oxidant - mediated hepatocyte injury. J. Sura Res., 26, 594-600, (1994).

11 . Madsen, N.P., Christie, G.S., Hegarty, M.P. Effects of indospicine on incorporation of L- arginine 14C into protein and transfer ribonucteic by cell free system from rat liver. Biochem. pharmucol., 16, 853-857, (1970).

12 . Minor, T., Isselhard, W., Berghaus, K. Parenchymal and vascular endothelial cell injury in the hypoxic and reperfused rat liver. Evidence for superoxide anion generation by perfusion with ferricytochrome C. Biomed & pharmacother, 47, 213-218, (1993).

13 . Pass, M.A., Arab, H., Pollitl, S. and Hegarty, M.P., Effects of the naturally occurring arginine analogues indospicine and canavanine on nitric oxide mediated functions in aortic endothelium and peritoneal macrophages: Natural Toxins 4: 132-140, (1996).

14 . Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, The FASEB Journal 6: 3051-3064, (1992).

15 . Rees, D.P., Palmer, R.M.J., Schult, R., Hodson, H.F., Moncadas. Characteriztion of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J Pharmacol 110:746-752, (1990).

16 . Rosenthal, G.A. Nonprotein amino acids as protective allelochemicals, In Rosenthal, G.A., and Berenbaum M.R,. (eds) Herbivores: their interactions with Secondary Plant Metabolites, V.I., Academic Press, San Diego, PP:1-33, (1991).

17 . Rosenethal, G.A. The biological effects and mode of action of L- Canavanine, a structural analogue of L- arginine, The Quartery review of biology V. 25, 155-178, (1977).

18 . Rubanyi, G.M., Hoeh Cantor, E.H., Lumman, W.C., Parker, Botelho, L.H. Cytoprotective Function of nitvic oxide Inactivation of Superoxide radicals produced by human Leukocytes. Biochem. Biophy Res. Commun. 181, 1392-1397, (1991).

The biological effects and mechanism of toxicity induced by two non-protein amino acids Indospicine and canavanine

Arab H.A.[1], Pass M.A[2]

[1]*Department of physiology, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Vetevinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.*
[2]*Department of physiology and Pharmacology, University of Queensland , QLD - Australia.*

The effects of two non-protein toxic amino acide, indospicine and canavanine, and superoxide radicals was tested using cultured rat peritoneal macrophages. Both compounds were able to increase superoxide production induced by phorbol myristate acetate (PMA) in rat peritoneal macrophages. The amount of superoxide was measured spectrophotometrically by reduction of cytochrome C in the absence and presence of Superoxide dismutase (SOD). It was found that the increase in superoxide production was due to decreased nitric oxide (NO) synthesis. The synthesis of No in cultured macrophage was mediated by an inducable NO synthase. It is concluded that the toxicity of indospicine and canavanine may exerted through an increase in superoxide production, and the increase in superoxide is mediated by the inhibiton of NO by indospicine and canavanine as L- arginine analogues .

Key words: Indospicine, Canavanine, Non-protein amino acid, Nitricoxide, Superoxide