Archive of SID



# مقایسه تورین با مهار کننده‌های آنزیم میلوپراکسیداز در فرایند تغییر لیپوپروتئین کم تراکم توسط اسید هیپوکلروس

دکتر هادی خرازی * ؛ دکتر جورج شاور **

## چکیده :

***سابقه و هدف :*** *تورین اسید آمینه گوگرد داری است که احتمالاً از روند خودتخریبی سلول‌ها طی فرایند تولید مواد اکسیدان نظیر اسید هیپوکلروس (HOCl)جلوگیری می‌نماید. مطالعه حاضر با هدف مقایسه تورین با مهارکننده‌های آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) در فرایند تغییر لیپوپروتئین کم تراکم (LDL) ایجاد شده توسط HOClانجام شده است.*

***مواد و روش‌ها :*** *مطالعه به روش آزمایشگاهی با استفاده از خون تعدادی اهداکننده با سطح لیپید طبیعی انجام گرفت. بر این اساس دو عملیات ذیل را مورد توجه قرار دادیم : مهار عملکرد نوتروفیل‌ها با جلوگیری از تولید اکسیدان‌ها توسط MPO، با به‌کارگیری مواد مختلف شیمیایی نظیر آمینو۱ ، ۲ ، ٤ تریازول ، سیانید پتاسیم و خنثی سازی یا متوقف‌ساختن ترکیبات حاصله از نوتروفیل‌های فعال شده نظیر HOCl مشتق از MPO با استفاده از اسیدهای آمینه متیونین، تورین و گلیسین. بدین منظور تخریب تریپتوفان در حضور سیستم MPO با استفاده از تکنیک فلوریمتر ارزیابی شد و از این روند به عنوان شاخصی برای تغییر LDLاستفاده گردید .*

***یافته‌ها :*** *تورین در غلظت ٤۰ میکرومولی که ۳ برابر کمترازغلظت فیزیولوژیک آن است، در مقایسه با حالت شاهد (عدم وجود تورین) ۵۰ برابر $t_{max/2}$طولانی‌تر گردید (۲۰دقیقه در برابر ۰/٤ دقیقه ) . همچنین پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید هیدرازید (PHBAH) در محدوده غلظتی ۰/۳ تا ۰/۷۵ میکرومول به‌عنوان یک عامل شیمیایی تأخیردهنده قوی در روند تخریب تریپتوفان مؤثر بود.*

***بحث :*** *باتوجه به یافته‌ها، تورین پس از متیونین مؤثرترین خنثی کننده HOCl بوده است و از میان معرف‌ها PHBAH قوی ترین مهارکننده آنزیم میلوپراکسیداز بود؛ بنابراین تورین می‌تواند با اثر خنثی کنندگی بر اکسیدان‌ها در شرایط پاتولوژیک در استراتژی‌های درمانی خاص به‌کار گرفته شود، چرا که بدین جهت از وقوع آسیب در برخی از سلول‌های هدف (نوتروفیل‌ها) توسط اکسیدان‌های قوی کلردار در پروسه بیماری‌های قلبی عروقی جلوگیری نمود.*

***کلیدواژه‌ها:*** *LDL ، MPO ، تورین ، PHBAH ،HOCl.*

---

* دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

** دانشیار بیوشیمی انستیتوبیوشیمی و بیولوژی مولکولی دانشگاه گراتس – اطریش.

**عهده دار مکاتبات:** کرمانشاه، باغ ابریشم، بلوار شهید شیرودی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی،گروه بیوشیمی،

تلفن: ۰۸۳۱-۸۳۶۷۳۳٤. Email:h_kharrazi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه :

اسید آمینه تورین(Taurine) در بسیاری از بافت‌های حیوانی به صورت یک اسید آمینه آزاد وجود دارد و در ساختمان پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها قرار نمی‌گیرد. غلظت‌های بالایی از تورین ( ۲ تا ٤٠ میلی مولار) در مغز ، عضله ، قلب ، غدد درون‌ریز، شبکیه و پلاکت‌ها یافت می‌شوند و همچنین مقادیر فوق العاده زیاد آن در سیتوزول سلول‌های التهابی خصوصاً نوتروفیل‌ها وجود دارد. در لوکوسیت‌ها غلظتی برابر ۳۵ میکرومول از این اسید آمینه گزارش شده است (۱). تورین از روند خودتخریبی که در طی فرایند تولید اکسیدان‌ها ایجاد می‌شود، جلوگیری می‌کند(۲). نقش تورین در لوکوسیت‌ها احتمالاً خنثی‌سازی اکسیدان‌های کلرینه نظیر HOCl می‌باشد(۳) . آنزیم MPO یک پروتئین هم دار موجود در گرانولوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئوفیلی و مونوسیت‌های فعال شده می‌باشد(٤). این آنزیم در معدود واکنش‌های شیمیایی باعث تغییر در LDL به‌عنوان یک عامل اصلی و عمده و در فرایند تشکیل پلاگ‌های آتروژنیک، نقش کاتالیزوری دارد(٥). یکی از این واکنش‌ها به شکل‌گیری مقادیر قابل‌ملاحظه‌ای از HOCl که قوی‌ترین اکسیدان تولیدشده توسط MPO است، منتهی می‌گردد (٦). این اکسیدان قوی باعث گسترش‌واکنش رادیکال‌های آزاد لیپیدهای موجود درلیپوپروتئین‌هامی‌گردد(۷و۸).

HOCl همچنین باعث کلرینه‌شدن آمین‌های موجود در پروتئین‌ها، غیر فعال شدن گروه‌های سولفیدریل (SH) بیرنگ شدن گروه‌های هم و در نهایت تغییراتی در ساختار پروتئین‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۹ و ۱۰). Stelmaszynska و Lampert دریافتند که HOCl تولیدشده توسط MPO می‌تواند آغازگر فرایند پراکسیداسیون در لیپوپروتئین‌ها و لیپوزوم‌ها باشد(۱۱ و ۱۲).

از آنجاکه آپوپروتئین ۱۰۰ – B یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های تشکیل‌دهنده ملکول LDL می‌باشد، لذا با قراردادن LDL در معرض معرف‌هایی همچون هیپوکلریت تولیدشده طی فرایند آنزیماتیک منجر به اکسیداسیون اسیدهای آمینه باقی‌مانده از آپوپروتئین ۱۰۰ – B خواهد گردید(۱۳).

در مورد آترواسکلروزیس و نقش با اهمیت ماکروفاژها و فاگوسیت‌ها به‌عنوان یک فرایند التهابی در جدار شریانی مطالعات متعددی صورت گرفته است(١٦-١٤)، اما در مورد نقش نوتروفیل‌ها در پاتولوژی آترواسکلروزیس مطالعات اندکی انجام شده است(۱۸و ۱۷) .

این مطالعه به منظور مقایسه تورین با دیگر مهارکننده‌های MPO در فرایند تغییر LDL توسط HOCl انجام گرفته است که در آن با بررسی ویژگی‌های یکی ازترکیبات مشتق از نوتروفیل‌ها یعنی MPO می‌توان مداخلات اختصاصی طراحی‌شده‌ای را در راستای پیشگیری از بروز آترواسکروتیک و سایر بیماری‌های التهابی در انسان پیشنهاد و اعمال نمود .

## مواد و روش‌ها :

در یک مطالعه آزمایشگاهی از تعدادی اهداکننده خون که شامل مردان و زنان در محدوده سنی ۲۵ تا

www.SID.ir

Archive of SID



۴۰ سال و با سطح طبیعی لیپیدی که مدت ۱۴ ساعت ناشتا بودند، در لوله‌های پروپیلن حاوی EDTA ۱۰ درصد (PH=7/4) خون‌گیری به‌عمل‌آمد. بر این اساس دو عملیات ذیل را انجام دادیم:

۱- مهار عملکرد نوتروفیل‌ها با جلوگیری از تولید اکسیدان‌ها توسط MPO، با به‌کارگیری مواد مختلف شیمیایی نظیر آمینو ۱ ، ۲ ، ٤ تریازول ، سیانید پتاسیم، سدیم آزاید، پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید هیدرازید و بنزوئیک اسید هیدرازیک .

۲- خنثی سازی و متوقف ساختن ترکیبات حاصل از نوتروفیل‌های فعال‌شده نظیر HOCl مشتق از MPO با استفاده از اسیدهای آمینه مختلف نظیر متیونین، تورین و گلایسین .

بدین منظور تخریب تریپتوفان در حضور سیستم MPO با استفاده از تکنیک فلوریمتر ارزیابی شد و از این روند به عنوان شاخصی برای تغییر LDL استفاده گردید . برای تعیین کمی خصوصیات محافظتی، میانگین و انحراف معیار پارامتر $t_{max/2}$ برای سه بار تکرار آزمایش محاسبه گردید. برای به‌دست آوردن $t_{max/2}$ ابتدا از نمودار روند برحسب زمان $t_{max/2}$ استاندارد محاسبه و نمودار روند آن رسم گردید. سپس در مورد تمامی معرف‌ها در غلظت‌های ثابت این محاسبه تکرار گردید. و نمودار محاسبه میانگین و انحراف معیار $t_{max/2}$ برای همه معرف‌ها برحسب غلظت رسم گردید.

**آماده سازی مواد :**

**الف - تهیه پلاسما:** پلاسمای تمامی نمونه‌های خونی در سانتریفوژ یخچال‌دار و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد جدا شد و با حجم مساوی از محلول سوکروز ٦٠ درصد که غلظت نهایی آن به ٦ گرم سوکروز در لیتر پلاسما می‌رسید، مخلوط گردید. سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در تاریکی تا هنگام آماده سازی LDL حداکثر به‌مدت دو ماه نگهداری شد (۱۹).

**ب- آماده‌سازی LDL :** به روش Bergmann صورت گرفت (۲۰). غلظتLDL با استفاده از کیت ساخت بهرینگر - مانهایم و باروش CHOD – PAD تعیین گردید و از ضریب عددی۳/۱٦ برای تبدیل میلی‌گرم کلسترول به کل حجم LDL در میلی لیتر استفاده شد .

**ج- تهیه معرف‌ها:** آنزیم انسانی میلوپراکسیداز ( EC 1.11.1.7 ) از کارخانه Calbiochem، ۳ آمینو ۱و۲و٤- تریازول (ATZ) پارا - هیدروکسی بنزوئیک اسید هیدرازید (PHBAH)، بنزوهیدروکسامیک اسید (BHA)، سالیسیل هیدروکسامیک اسید(SHA)، گلیسین ومتیونین از کارخانه شیمیایی زیگما - آلدریچ آلمان غربی تهیه شد . تورین و سدیم آزاید از کارخانه Fluka سویس و بالاخره سیانید پتاسیم ساخت کارخانه مرک آلمان غربی بوده است .

**د - تعیین فلورسانس تریپتوفان :** از کاهش فلورسانس تریپتوفان تحت تأثیر MPO ، به‌عنوان شاخصی جهت ارزیابی تأثیر ترکیبات خنثی‌کننده HOCl و مهارکنندگان MPO در جلوگیری از تغییر پروتئین apo B-100 در LDL استفاده گردید. LDL ، فلورسانسی در محدوده اشعه فرابنفش ایجاد می‌نماید که به‌دلیل ۳۷ مولکول تریپتوفان باقی‌مانده در apo B–100 می‌باشد .اندازه گیری‌فلورسانس بااستفاده از اسپکترومترلومینسانس Perkin Elmer LS 50 B

www.SID.ir

Archive of SID



انجام‌شد. کاهش فلورسانس تریپتوفان متصل به LDL در حضور MPO، بااستفاده از روش پی‌گیری زمانی[1] در طول موج انتشاری ۳۳۱ نانومتر و با درجه القایی مشخص شده ۲۸۲ نانومتر ، انجام گرفت . شکاف‌های انتشاری و القایی در طول موج ۱۵نانومتر تنظیم شدند . در یک کووت ، LDL تا غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و نسبت به جرم مولکولی تام LDL با بافر PBS و ٦= PH رقیق و تا حد غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر آنزیم MPO اضافه گردید.

واکنش با اضافه نمودن ۰/۱ میلی مول از $H_2O_2$ ، که روزانه و با رقیق سازی محلول مادر به دست می‌آمد، آغاز می‌شد. تحولات کنیتیکی تغییرات فلورسانس در هر نیم دقیقه اندازه‌گیری شد.

تغییرات LDLدر هنگام فعالیت سیستم $MPO/H_2O_2/Cl^-$ به‌تنهایی‌و یادرحضوراسیدهای‌آمینه خنثی‌کننده HOCl نظیر تورین، متیونین و گلایسین و یا در حضور ترکیبات مهارکننده MPO مثل ATZ، سیانید پتاسیم، سدیم آزاید SHA، PHBAH و BHA ارزیابی واندازه‌گیری گردید. همه این آزمایش‌ها در شرایط یکسان از جمله حرارت ۳۷درجه سانتی‌گراد در محیط بافر PBS با PH=6 و غلظت‌های ((12/5µg/ml LDL, 0.1µg/ml MPO; 0.1mmol/l$H_2O_2$) صورت پذیرفت .

سیر اختصاصی و مشخص بروز تغییرات در فلورسانس تریپتوفان کاملاً قابل تکرار بوده و عموماً به صورت یک کاهش سریع تا حد نزدیک به صفر بوده است. استحاله apo B-100 که با شاخص تخریب تریپتوفان مشخص می‌شد یک فرایند سریع بودکه در غیاب مهارکنندگان، غالباً در کمتر از ده دقیقه کامل می‌شد. برای توصیف کمی تغییرات فلورسانس ، پارامتر $t_{max/2}$ به عنوان عاملی برای مشخص نمودن تأثیرات محافظتی، معرفی گردید.

$t_{max/2}$ عبارت‌است از مدت زمان لازم برای مشاهده یک کاهش ۵۰ درصدی از میزان فلورسانس اولیه . همچنین می توان $t_{max/2}$ را به‌عنوان واحد سرعت تخریب تریپتوفان در حین بروز تغییرات ناشی از MPO در LDL دانست. توضیح این نکته لازم است که برای هرغلظت از تمامی معرف‌های به‌کارگرفته شده در این مطالعه سه بار آزمایش تکرار شده‌است و برای تکرار آزمایش‌های میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید. برای دستیابی به نتایج حاصل از این پژوهش از نمودار روند استفاده شد.

## یافته‌ها :

وجه مشترک همه آزمایش‌های انجام شده در حضور سیستم $MPO/H_2O_2/Cl^-$ یک الگوی کینتیک عمومی می‌باشد که در منحنی ۱ به تصویر کشیده‌شده‌است. کل میزان کاهش فلورسانس، بدون در نظرگرفتن غلظت به کار رفته تقریباً در مورد تمام مهارکنندگان (به‌جزسدیم آزاید) مساوی بود. تنها براساس مقادیر $t_{max/2}$ تفاوت هایی به وجود می‌آید.

### تورین، گلایسین و متیونین:

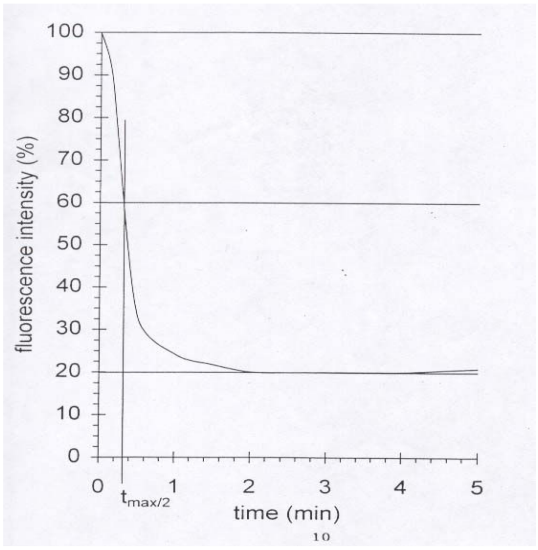
از میان این سه اسید آمینه که اثر تأخیری را بر روند تغییر LDL توسط MPO از طریق خنثی‌سازی

1. time drive method

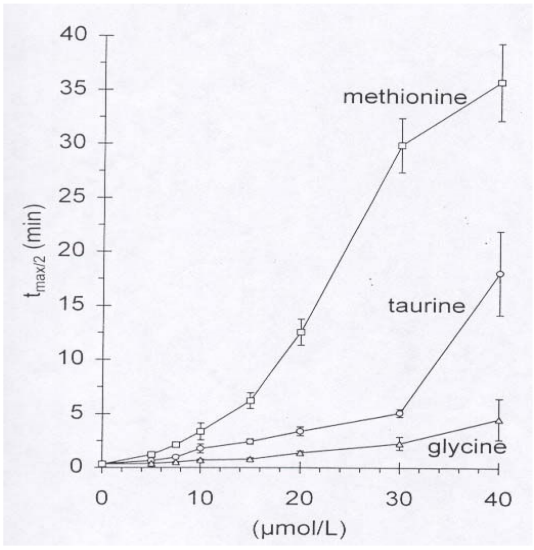
www.SID.ir

Archive of SID






**منحنی ۱-** منحنی کنتیک استاندارد تغییرات فلورسانس تریپتوفان در حضور $MPO/H_2O_2/Cl^-$ و محاسبه $t_{max/2}$ بعنوان واحد سرعت تخریب تریپتوفان.




**منحنی ۲-** چگونگی مهار توسط متیونین، تورین و گلیسین در حضور $MPO/H_2O_2/Cl^-$ و محاسبه میانگین و انحراف معیار $t_{max/2}$.

HOCl اعمال می‌کنند، متیونین قوی‌ترین اثر مهاری را داشت و تورین و گلایسین به‌ترتیب، در رده‌های بعدی قرار گرفتند.

تورین و متیونین در محدوده ۱۰ تا ٤٠ میکرومول ، تخریب تریپتوفان را مهار نموده، به‌نحوی‌که $t_{max/2}$ افزایش چشمگیری داشت. در غلظت ٤٠ میکرومول از تورین که ۳ مرتبه زیر مقادیر غلظت فیزیولوژیک این اسید آمینه در بدن می‌باشد، $t_{max/2}$ در مقایسه با حالت عدم وجود تورین ، با ضریبی در حد ۵۰ افزایش داشت(۲۰ دقیقه در برابر ۰/٤ دقیقه). متیونین حتی اثر مهاری قوی‌تری نسبت به تورین نشان داد(ضریب ۱۳۲)، در حالی‌که گلایسین کمترین اثر (ضریب ۱۳) را دارا بود(منحنی۲).

## پارا–هیدروکسی‌بنزوئیک‌اسیدهیدرازید (PHBAH):

این ترکیب به عنوان یک عامل مهار کننده عالی در برابر تغییرات apo B-100 ناشی از فعالیت MPO، شناسایی گردید. این ماده در محدوده غلظتی ۰/۳ تا ۰/۷۵ میکرومول، اثر تأخیردهندگی پرقدرتی را نشان داد. در مقادیر غلظتی پایین تر از ۰/۳ میکرومول تغییرات $t_{max/2}$ به سختی قابل اندازه‌گیری بودند(منحنی ۳).

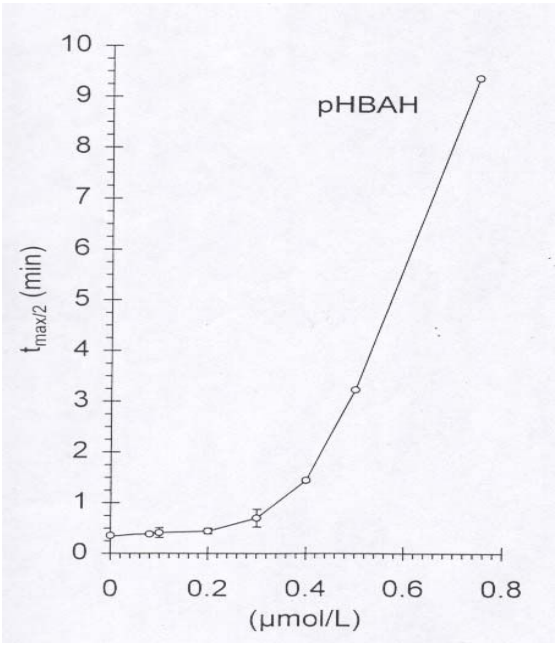
## اسید سالیسیل هیدروکسامیک (SHA) و اسید بنزوهیدروکسامیک (BHA) :

عملکرد مهارکننده SHA در جلوگیری از تغییر LDL توسط $MPO/H_2O_2/Cl^-$ ، در محدوده غلظت ۵ تا ۱۰۰ میکرومول اندازه گیری شد (منحنی ٤) . در

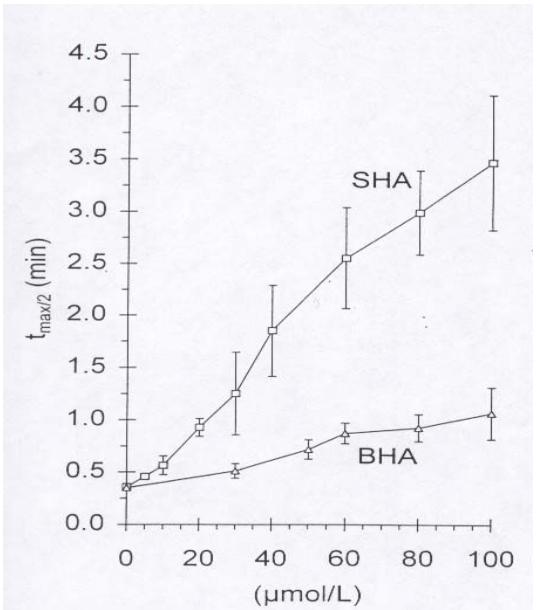
www.SID.ir

Archive of SID






**منحنی ۳**- چگونگی مهار MPO توسط پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید هیدرازید (PHBAH) درحضور سیستم $MPO/H_2O_2/Cl^-$ و محاسبه میانگین و انحراف معیار $t_{max/2}$




**منحنی ۴**- چگونگی مهار MPO توسط اسید سالیسیل هیدروکسامیک(SHA) و اسید بنزوهیدروکسامیک(BHA) در حضور سیستم $PO/H_2O_2/Cl^-$ و محاسبه‌میانگین و انحراف معیار $t_{max/2}$

مقادیر پایین SHA (۵ تا ۱۰۰ میکرومول) بروز تغییرات در apo B-100 با سرعت بالایی صورت پذیرفت . با افزایش غلظت مهارکننده در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ میکرومول $t_{max/2}$ به نحوی‌که در منحنی٤ نشان داده شده است، افزایش یافت. در مورد BHAنیز نتایج مشابه حالات فوق (SHA) بودند، با این تفاوت که با درجات پایین‌تر رخ می‌دادند .

### ۳-آمینو ۱، ۲، ٤- تریازول (ATZ) :

این ترکیب ضعیف‌ترین تأثیرات محافظتی را در بین مهارکنندگان اثر MPO در ایجاد تغییرات LDL داشته است. ATZ تنها تأخیر کمی در کنیتیک واکنش‌ها به‌وجود آورد، به نحوی که در محدوده غلظتی ۲/۵ تا ۵۰ میکرومول باعث افزایش مختصری در $t_{max/2}$ گردید.( منحنی ۵).

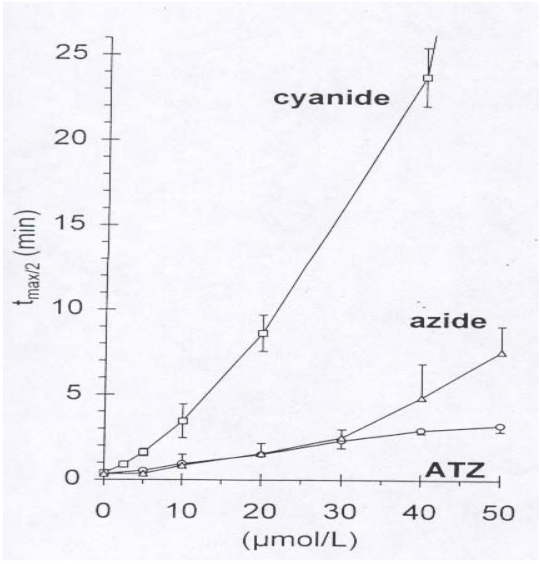
### سیانید پتاسیم و سدیم‌آزاید:

ارتباط پیوسته بین $t_{max/2}$ و غلظت‌های متفاوت سموم هم (Heme) یعنی سیانید پتاسیم و سدیم آزاید در منحنی ۵ نشان داده شده است. سیانید پتاسیم در غلظتی بالاتر از ۲۰ تا ۵۰ میکرومول باعث بروز تأخیری چشمگیر در تغییر LDL گردید . درجه مهارکنندگی این ماده شبیه به تورین بود. گرچه این دو ماده مکانیزم های عملی متفاوتی دارند، درجه عملکرد مهاری سدیم آزاید شبیه به یکی از عوامل متوقف‌سازنده HOCL یعنی گلایسین بود . در غلظت ۵۰ میکرومول سدیم آزاید اثر تأخیری مهمی در زمینه جلوگیری از تغییر LDL توسط MPO بروز نمود. در مقایسه با حالت شاهد که سدیم آزاید وجود

www.SID.ir

Archive of SID






**منحنی ۵**-چگونگی مهار MPO توسط ۳-آمینو۱،۲،٤ تریازول (ATZ) ، سیانید پتاسیم و آزید سدیم در حضور سیستم $PO/H_2O_2/Cl^-$ و محاسبه میانگین و انحراف معیار $t_{max/2}$

ندانشت، $t_{max/2}$ در حضور این‌ماده باضریبی درحدود ۲۱ افـزایش نـشان داد(۷/۵ دقیقـه در مقابـل ۰/۳۵ دقیقه ).

## بحث:

این پژوهش نشان داد که تورین دومین خنثی‌کننـده قوی HOCl حتی در غلظت‌های حدود ٤۰میکرومول است که سه مرتبه کمتر از مقادیر آن در لوکوسـیت انـسانی اسـت؛ بنـابراین فعالیـت بیولوژیـک MPO وابسته به یون کلر ممکن است تحت کنترل درونزای تورین باشـد. $t_{max/2}$ در حـضور تـورین ۵۰ برابـر طولانی‌تـر از حالـت شـاهد(عـدم وجـود تـورین) بـه‌دسـت آمـد ( ۲۰ دقیقـه در برابـر ۰/٤ دقیقـه ). برخلاف این نتایج Davies و Edwards نشان دادنـد که گرچه تورین با خنثی سازی HOCl لومینـسانس شیمیایی سیستم $H_2O_2/HOCl$ را مهار می سازد، امـا این ترکیب تنها اثر کوچکی بر لومینسانس شـیمیایی وابسته به سیستم $MPO/H_2O_2$ دارد که در توافـق بـا یافته های مطالعه ما نیست (۲۱).

اثر مهاری متیونین قوی‌تر از تـورین مـی باشـد، به‌نحـوی کـه $t_{max/2}$ در حـضور متیـونین دو برابـر طولانی تر از $t_{max/2}$ نـسبت بـه تـورین اسـت. ایـن مطلب را می‌توان با توجه به این واقعیت که متیـونین می‌تواند به سه مولکول HOCl متصل شـود، توجیـه نمود.

شناسایی واکنش مطلوب تـورین بـا HOCl بـه مطالعات Grisham و همکارانش بـاز مـی‌گـردد کـه مشخص گردید تورین واکنش سریع با HOCl داشـته و در نهایت تورین – کلرآمین ( TAU-NHCl)ایجـاد می‌گردد(۲۲) که یک‌متابولیت تقریباً غیرسمی و کمتر واکنش‌دهنده بوده و بنا به نظر برخی دانـشمندان بـه عنـوان یـک ملکـول پیـام رسـان اختـصاصی در نوتروفیل‌های فعال‌شده عمل کرده، باعـث همـاهنگی عمـل ماکروفاژهـا در تولیـد مـدیاتورهای التهـابی می‌گردد و ممکن است حداقل به میزان کمی ، باعث محافظت غشاها در برابـر آسـیب مـواد اکـسیدان از طریق مهار تولید نیتریت و آلفا- TNF گردد (۲). بـا این‌حال دلیل اهمیت مطالعه تورین نـسبت بـه سـایر اسیدهای آمینه این‌است که در فرایند التهاب حضور این اسید آمینه بسیار بالاتر از حد مورد انتظار است. از میان ترکیبات مهارکننده عملکرد نوتروفیل‌ها بـرای جلوگیری از تولید اکسیدان‌ها توسط MPO می‌تـوان ATZ را یک مهارکننده ضعیف MPO به شمار آورد،

www.SID.ir

Archive of SID



که در عین حال خاصیت مهارکنندگی برای آنزیم کاتالاز را نیز داراست. سدیم آزاید و سیانید پتاسیم در زمینه تعدیل و کندسازی اثرMPO بر apo B–100 کاملاً مؤثر می‌باشند که به‌دلیل مکانیزم غیراختصاصی‌شان در تأثیرگذاری برتمام پروتئین‌های هم‌دار(Heme)، ارزش درمانی بالایی ندارند (۲۳) . میزان کارایی سیانید پتاسیم در اعمال اثر مهاری و در نهایت جلوگیری از تغییر LDL مشابه تورین و کارایی مهاری سدیم آزاید معادل گلایسین بود . نمودار تغییرات LDL در حضورهردو ترکیب فوق ، مشابه الگوی کلی کینتیکی شرح داده شده در مورد سایر مهارکنندگان بود . نکته قابل ذکر اینکه در مورد سدیم آزاید نوعی کاهش وابسته به غلظت در روند تخریب تریپتوفان وجود داشت که احتمالاً در نتیجه غیرفعال‌سازی آنزیم بوده است .

Kettle و همکارانش یک سلسله مطالعات را روی بنزوئیک اسید هیدرازیدو مشتقات آن انجام داده‌اند(۲٤و۲۵)، که دریابند کدام خصوصیات این دسته از ترکیبات باعث مؤثربودن آنان در جلوگیری از تولید HOCl توسط آنزیم MPO شده است . این محصول منتج از اکسیداسیون (که احتمالاً یک رادیکال می‌باشد)، به صورت غیرقابل برگشت باعث غیرفعال‌شدن آنزیم می‌گردد . آزمایش‌های ما درمورد PHBAH ، نشان‌دهنده تأثیرات چشمگیر تأخیردهنده این ترکیب در روند تغییر LDL توسطMPO ، حتی در غلظتی به میزان ۰/۳ میکرومول بود.

Davies و Edwards در مطالعات خود این نکته را روشن ساختند که SHA هم می‌تواند باعث مهار لومینسانس شیمیایی تولیدشده توسط سیستم سلولی آزاد $MPO/H_2O_2$ گردد و هم بر فعالیت پراکسیداتیو MPO خالص‌شده تأثیرات مهاری داشته باشد. غلظت SHA لازم جهت مهار کامل فعالیت MPO ، بین ۳۰ تا ۵۰ میکرومول بود.در آزمایش‌های به عمل آمده در این مطالعه جلوگیری کامل از تغییرات LDL ناشی از MPO حتی در غلظت ۱۰۰ میکرومول SHA دیده نشد. احتمالاً دلیل عمده اثر مهاری قوی SHA برMPO، مهار پراکسیداز می‌باشد و خنثی‌سازی HOCl تأثیر جزئی را در این‌خصوص موجب می‌گردد(۲٦). SHA و BHA نسبت به یون کلر تمایل بیشتری به اکسید شدن دارندو از اتصال کلر به گروه‌های هم آنزیم جلوگیری می‌نمایند. اتصال SHA سه برابر قوی‌تر از اتصال BHA ارزیابی شده‌است .

نتایج این مطالعه این نظریه را تأیید و تقویت می‌کند که تورین در محیط آزمایشگاهی دارای اثر بالقوه درمانی می‌باشد، چرا که ازوقوع آسیب در برخی از سلول‌های هدف توسط اکسیدان‌های کلرینه قوی جلوگیری می‌نماید. فرایند خنثی سازی HOCl می‌تواند در شرایط پاتولوژیک با ارزش باشد؛ زیرا که با توجه به آن می‌توان استراتژی‌های درمانی خاص را طراحی نمود و خصوصاً فعالیت طوفانی نوتروفیل‌های فعال‌شده را در تولید مواد اکسیدکننده با توقف و تعویق مواجه ساخت.

www.SID.ir

Archive of SID



**REFERENCES:**


1. Pasantes - Moralses H, Fellman JH. Taurine and hypotaurine and membrane lipid peroxidation . In: Miquel J, editor. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989, P.105-119.
2. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators . J Leukoc Biol 1995; 58: 667-674.
3. Marquez LA, Dunford HB. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. J Biol Chem 1994; 269: 7950-7956.
4. Daugherty A, Rateri DL, Dunn JL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1994; 94:437-444.
5. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Rad Bilo Med 1996; 20:707-727.
6. Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. J Biol Chem 1976; 251:1371-1374.
7. Jerlich A, Fabjan JS, Tschabuschnig S, Smirnova AV, Horakoval L, Hayn M, et al. Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase. Free Radic Biol Med 1998; 24:1139-1148.
8. Panasenko OM, Evgina SA, Aidyraliev RK, Sergienko VI, Vladimirov YA. Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite generated in the system of myeloperoxidase+ $H_2O_2$ + Cl . Free Radic Biol Med 1994; 16:143-148.
9. Heinecke JW, Li W, Mueller DM, Boher A, Turk J. Cholesterol chtorohydrin synthesis by the Myeloperoxidas hydrogenperoxide-chloride system: potential markers for lipoproteins oxidatively damaged by phagocytes. Biochemistry 1994; 33:10127- 10136.
10. Aruoma O, Halliwell B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutas catalase and glutathione peroxidase. Biochem J1987; 248: 973-976.
11. Stelmaszynska T, Kukovelz E, Egger G, Schaur RJ. Possible involvement of myeloperoxidase in lipid peroxidation. Int J Biochem 1992; 24:121-128.
12. Lampert MB, Weiss J. The chlorinating potential of the human monocyte. Blood 1993; 62: 645-651.


www.SID.ir

Archive of SID



13. Hazell JL, Van den Brg JJM, Stocker R. Oxidation of low density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. Biochem J 1994; 304:297-304.

14. Zgliczynski JK, Stelmaszynska T. The respiratory burst of neutrophilic granulocytes and its infuence on infected tissues: In: Sbarra AJ, Strauss RR, editors. The respiratory burst and its physiological significance. New York: Plenum Press, 1988, P.315-347.

15. Roessner A, Vollmer E, Jaeger E, Rauterberg J, Bocker W. Differentiation and role of macrophages in the early human atherosclerotic plaque: In: Vollmer E, Roessner A; editors. Recent progress in atherosclerosis research. Berlin: Springer Verlag; 1993, P.59-71.

16. Ricevuti G, Mazzone A, Pasotti D, De Servi S. Specchia G. Role of granulocytes in endothelial injury in coronary heart disease in humans. Atherosclerosis 1991; 91:1-14.

17. Ainsworth TM, Lynam EB, Sklar LA. Neutrophil function in inflammation and infection: In: Sirica AE, editor. Cellural and molecular pathogenesis. Philadephia: Lippincott - Raven Publishers; 1998, P.37-55.

18. Key NS, Platt JL, Vercellotti GM. Vascular endothelial cell proteoglycans are susceptible to cleavage by neutrophils. Arterioscler Thromb 1992; 12:836-842.

19. Kleinfeld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. Improved measurement of low-density lipoprotein. Susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. Clin Chem 1992; 38: 2066-2072.

20. Bergmann AR, Ramos P, Esterbauer H, Winklhofer-Roob BM. RRR- tocopherol can be substituted for by Irolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidizability by copper. J Lipid Res 1997; 38: 2580-2588.

21. Davies B, Edwards SW. Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. Biochem J 1989; 258: 801-806.

22. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils: ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of chloramines. J Biol Chem 1984; 259:10404-10.

www.SID.ir

Archive of SID



23. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine: a specific marker of myeloperoxidase – catalyzed oxidation is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. J Clin Invest1997; 99:2075-2081.

24. Kettle AJ, Gedye CA, Hampton MB, Winterbourn CC. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydarzides. Bio J 1995; 308:559-563.

25. Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzic acid hydrazide. Biochem J 1997; 321:503-508.

26. Ikeda-Saito M, Shelley DA, Lu L, Booth KS, Caughey WS, Kimura S. Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxi activity. J Biochem Chem 1991; 266:3611-3616.

www.SID.ir