

بررسی *in vitro* اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین توسط مولیبدنیوم

هیدروکسیلازها

دکتر محمدرضا رشیدی^۱

Title: *In vitro* study of 6-mercaptapurine oxidation by molybdenum hydroxylases

Author: Mahammad Rrza Rashid¹

Abstract In spite of over 40 years of 6-mercaptapurine application, many aspects of complex pharmacology and metabolism of this drug remain unclear. It is thought that 6-mercaptapurine is oxidized to the inactive metabolite, 6-thiouric acid through 6-thioxanthine or 8-oxo-6-mercaptapurine in its catabolic metabolic pathways. Although this oxidative deactivation of 6-mercaptapurine has been attributed to the action of one of two molybdenum hydroxylases, xanthine oxidase, the role of other molybdenum hydroxylase, aldehyde oxidase, in the oxidation of 6-mercaptapurine has not been investigated in more details. In the present study, the role of aldehyde oxidase and xanthine oxidase in the oxidation of 6-mercaptapurine has been investigated. 6-Mercaptapurine was incubated with bovine milk xanthine oxidase or partially purified guinea pig liver molybdenum hydroxylase fractions and the reactions were monitored by spectrophotometric and HPLC methods in the absence and presence of xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, and some aldehyde oxidase inhibitors. Xanthine oxidase-catalyzed oxidation of 6-mercaptapurine was completely inhibited by allopurinol with aldehyde oxidase inhibitors having no significant inhibitory effects. With guinea pig liver fractions, however, the initial oxidation rate of 6-mercaptapurine was inhibited by 39-66% in the presence of allopurinol and aldehyde oxidase inhibitor. The HPLC analysis of the reaction was indicative of oxidative conversion of 6-mercaptapurine to 6-thiouric acid through 6-thioxanthine. The oxidation of 6-mercaptapurine was inhibited by >90% and 45-49% in the presence of allopurinol and aldehyde oxidase inhibitors, respectively. Based on the results obtained, it may be suggested that 6-mercaptapurine is oxidized by both molybdenum hydroxylases to 6-thiouric acid through 6-thioxanthine. The first reaction which is the rate limiting step is catalyzed by xanthine oxidase, whereas the second reaction is catalyzed by both molybdenum hydroxylases.

Key words: *mercaptapurine, molybdenum hydroxylase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase*

خلاصه

۶-مرکاپتوپورین متجاوز از چهل سال است که مورد استفاده است باوجود این بیشتر جنبه های متابولیسم و فارماکولوژی پیچیده آن هنوز ناشناخته باقی مانده است. نظر براین است که ۶-مرکاپتوپورین در مسیر کاتابولیک خود، با عبور از حدواسط ۶-تیوگزانتین و یا ۸-اکسو-۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیواوریک اسید اکسید میشود. اگرچه این واکنش اکسیداتیو به یکی از دو آنزیم مولیبدنیوم هیدروکسیلاز، گزانتین اکسیداز، نسبت داده شده است، نقش دیگر آنزیم مولیبدنیوم هیدروکسیلاز، آلدئید اکسیداز، در این واکنشها بخوبی شناخته نشده است. در بررسی حاضر، نقش آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز در اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین مورد مطالعه قرار میگیرد. ۶-مرکاپتوپورین با گزانتین اکسیداز شیر گاوی و فراکسیون کبدی خوکچه هندی، حاوی آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز، انکوبه و روند واکنشها توسط روشهای اسپکتروفوتومتری و HPLC در عدم حضور و حضور آلپورینول (مهارکننده گزانتین اکسیداز) و برخی از مهارکننده های آلدئید اکسیداز، بررسی گردید. اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز کاملاً بوسیله آلپورینول مهار گردید، درحالیکه مهارکننده های آلدئید اکسیداز هیچ اثر مهارری بر روی واکنش نداشتند. در مورد فراکسیون کبدی خوکچه هندی، سرعت اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین به میزان ۶۶-۳۹٪ توسط آلپورینول و مهارکننده های آلدئید اکسیداز مهار گردید. آنالیز HPLC واکنش بیانگر تبدیل ۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیواوریک اسید از طریق ۶-تیوگزانتین بود. در این میان، مرحله اول توسط گزانتین اکسیداز واسطه گری شده و مرحله تعیین کننده سرعت میباشد، در حالیکه مرحله دوم توسط هر دو آنزیم مولیبدنیوم هیدروکسیلازها واسطه گری میشود.

گل واژگان : ۶-مرکاپتوپورین، مولیبدنیوم هیدروکسیلازها، آلدئید اکسیداز، گزانتین اکسیداز

مقدمه

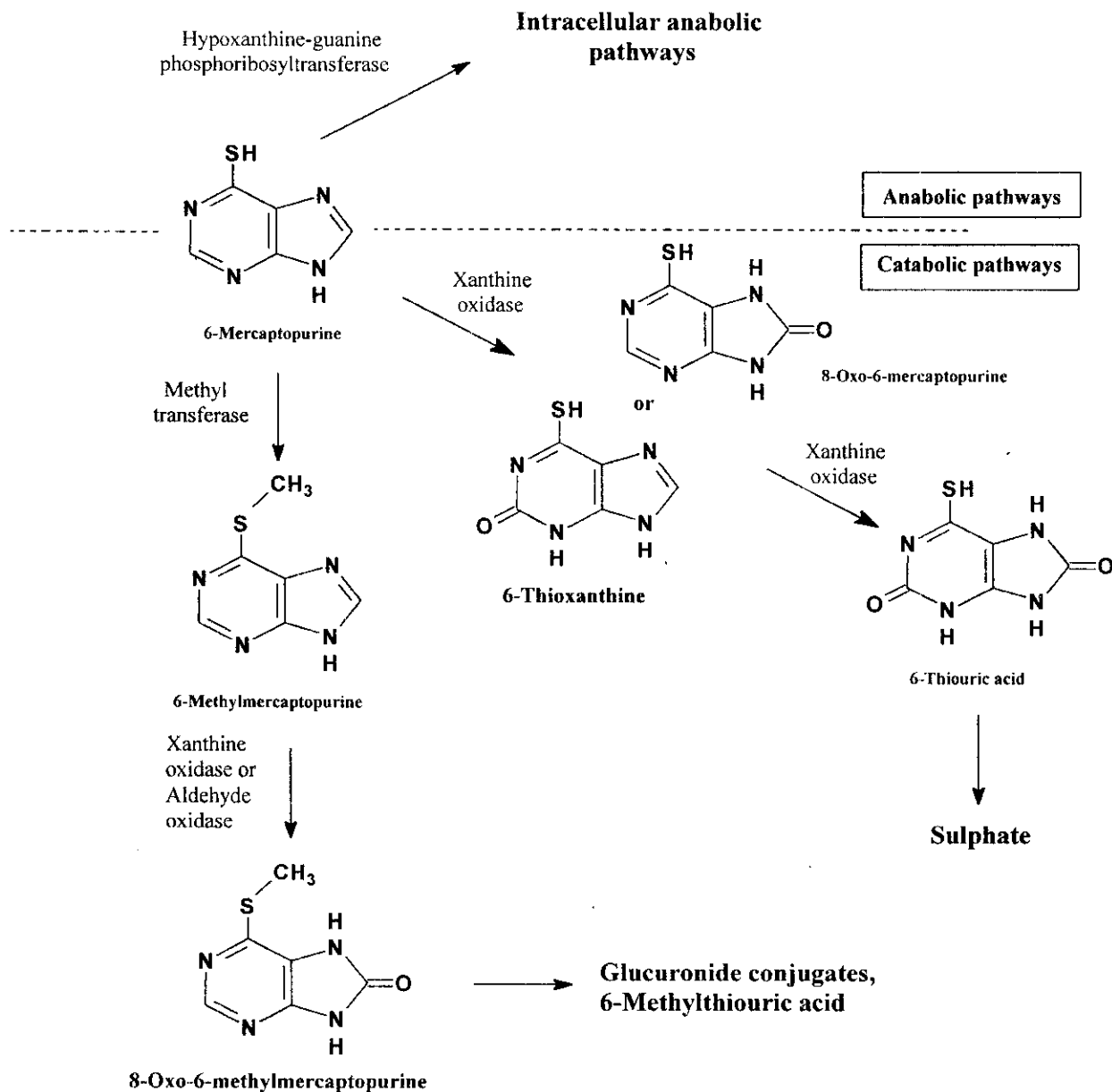
(۱، ۶). در مسیر آنابولیک، این دارو به شکل فعال خود تبدیل میشود، در حالیکه در مسیر کاتابولیک، ۶-مرکاپتوپورین از دو طریق به اشکال غیرفعال متابولیزه میشود (۱، ۴). اولین مسیر کاتابولیک مستلزم اکسیداسیون دارو به ۸-اکسو-۶-مرکاپتوپورین و سپس به ۶-تیواوریک اسید است (۱، ۴). اما، Zimm و همکاران (۵) توانسته اند ۶-تیوگزانتین را در ادرار برخی از بیمارانی که ۶-مرکاپتوپورین را از راه انفوزیون وریدی دریافت می نمودند، شناسائی کنند. این یافته میتواند نشاندهنده این باشد که ۶-مرکاپتوپورین با عبور از ۶-تیوگزانتین به ۶-تیواوریک اسید تبدیل میشود. اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین به فعالیت یکی از آنزیمهای مولیبدنیوم هیدروکسیلاز، گزانتین

۶-مرکاپتوپورین از آنالوگهای هیپوگزانتین بوده و به همراه متوترکسات، داروی انتخابی در درمان لوسمی لنفوسیتیک حاد کودکان، بویژه در مواردیکه نیاز به دوره درمان طولانی وجود دارد، است (۳-۱). اگرچه این دارو بیش از چهل سال است که مورد مصرف میباشد، برخی از جنبه های فارماکولوژی و متابولیسم آن بطور دقیق شناخته نشده است (۱، ۲). نظر بر این است که در داخل سلول، ۶-مرکاپتوپورین ابتدا تحت تاثیر آنزیم هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل-ترانسفراز به تیواینوزینیک اسید و سپس به تیوگوانین ربیونوکلئوتید و داکسی ربیونوکلئوتید متابولیزه میشود (۶-۴). ۶-مرکاپتوپورین بعد از تجویز ممکن

SID.ir سمت وارد مسیر آنابولیک و یا کاتابولیک گردد

عمل کند (۸). در دومین مسیر کاتابولیک، اتم گوگرد ۶-مرکاپتوپورین توسط آنزیم تیوپورین متیل ترانسفراز متیله میشود، سپس موقعیت ۸ مولکول ۶-متیل مرکاپتوپورین ایجاد شده توسط گزانتین اکسیداز و یا آلدئید اکسیداز اکسیده میگردد (۱).

اکسیداز (xanthine: O₂ oxidoreductase EC 1.2.3.2)) نسبت داده شده است (۷، ۵، ۱). همچنین نشان داده شده است که این دارو میتواند بعنوان سوبسترای یکی دیگر از آنزیمهای مولیبدنیوم هیدروکسیلاز، آلدئید اکسیداز (aldehyde: O₂ oxidoreductase EC 1.2.3.1)) کبدخردگوش



شکل ۱- مسیرهای متابولیک پیشنهادی برای ۶-مرکاپتوپورین (۵، ۱)

در قفسهای پلاستیکی، تحت دوره ۷-۱۹h (روشنایی) و ۷-۱۹h (تاریکی)، در دمای ۱۸-۱۹°C و رطوبت ۵۰°C با دسترسی کامل به غذا و آب نگهداری شدند.

طرز تهیه فراکسیون کبدی حاوی آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز

هر کدام از خوکچه های هندی در ساعت ۱۰-۹ صبح از طریق قطع ناگهانی نخاع کشته شدند. بعد از کشته شدن حیوان، کبد آن سریعاً جدا گردیده و در محلول ایزوتونیک کلرید کلسیم (۴°C، ۱/۱۵، KCl w/v) که حاوی ۰/۱ mM EDTA بود، قرار داده شد. کیسه صفرا و چربیهای اضافی جدا، و کبد بعد از توزین به صورت ریز بریده شده و در حجمی معادل ۳-۴ برابر وزن بدست آمده از محلول کلرید کلسیم (۱/۱۵) قرار داده شد. سپس مخلوط بدست آمده توسط هموژنایزر با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و بمدت دو دقیقه در دمای ۴°C هموژنیزه گردید. نمونه هموژنیزه بدست آمده بر روی حمام بخار در دمای ۵۵-۵۷°C بمدت ده دقیقه حرارت داده شد و سپس تا دمای ۴°C سرد گردیده و تحت ۱۵۰۰۰ g بمدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. مایع بالایی توسط پشم شیشه صاف و به آن باندازه ۳۵/۳ g / ۱۰۰ ml سولفات آمونیوم افزوده و مخلوط حاصل در دمای ۴°C تا زمان حل شدن کامل ماده جامد بهم زده شد. سوسپانسیون بدست آمده دوباره تحت ۶۰۰۰ g بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ گردید. مایع بالایی دور ریخته شد و رسوب حاصل در حداقل حجم از (۰/۱ mM) EDTA حل گردید. فراکسیون کبدی بدست آمده که عمدتاً حاوی آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز میباشد، جهت استفاده های بعدی در داخل نیتروژن مایع نگهداری شد.

در شکل ۱، مسیرهای متابولیک ۶-مرکاپتوپورین نشان داده شده است. اگرچه ۶-تیواوریک اسید بعنوان متابولیت اصلی ۶-مرکاپتوپورین بعد از تجویز خوراکی دارو شناسائی شده است (۷، ۵، ۴، ۱)، هیچ شاهد مستقیمی مبنی بر دخالت گزانتین اکسیداز و یا آلدئید اکسیداز در این واکنشهای اکسیداتیو ارائه نشده است. بعلاوه، هر دو ترکیب ۸-اکسو-۶-مرکاپتوپورین (۴، ۱، ۶) و ۶-تیوگزانتین (۷، ۵) بعنوان حد واسط تبدیل ۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیوگزانتین در نظر گرفته شده اند. از آنجائیکه نقش مولیبدنیوم هیدروکسیلازها، بویژه آلدئید اکسیداز، در اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین و نوع متابولیتهای ایجاد شده مورد مطالعه قرار نگرفته است، در بررسی حاضر، این موضوع مورد تحقیق قرار میگیرد. با توجه باینکه، آنزیم بدست آمده از کبد خوکچه هندی بیشترین شباهت را با آلدئید اکسیداز کبد انسان دارد (۱۰، ۹)، در این بررسی از کبد خوکچه هندی بعنوان منبع تهیه آلدئید اکسیداز استفاده گردید.

مواد و روش کار

مواد

۶-مرکاپتوپورین، ۶-تیوگزانتین، آلپورینول، ایزووایلین، کلرپرومازین و گزانتین اکسیداز گاوی (Grade 1) از شرکت سیگما (UK) تهیه شدند. کیت اندازه گیری پروتئین (BSA[®]) از Pierce (Rockford, USA) شرکت خریداری شد.

طرز نگهداری حیوان

خوکچه های هندی از نوع Dunkin-Hartley (۴۰۰-۶۰۰ g) بصورت گروههای یک الی چهار تایی

اندازه گیری اسپکتروفتومتریک اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین

تمام اندازه گیریهای اسپکتروفتومتریک در دمای °C ۳۷ و توسط اسپکتروفتومتر UV-VIS مدل Shimadzu 2101 متصل به یک واحد کنترل کننده دمای سل انجام یافت. سرعتهای اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین ($100 \mu\text{M}$) توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی و یا فراکسیون کبدی نسبتاً تخلیص یافته خوچه هندی از طریق اندازه گیری تغییرات جذب UV در طول موج 350 nm ، و در بافر فسفات (Sorenson's $\text{pH} = 7$)، 67 mM (دارای 0.1 mM EDTA از اندازه گیری شد. همچنین واکنشهای در مجاورت مهارکننده های قوی و اختصاصی آلدئیداکسیداز (منادیون و ایزووانیلین) (۹، ۱۰، ۱۱) و گزانتین اکسیداز (آلپورینول) (۱۲، ۱۳) تحت مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز HPLC اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین

تمام آنالیزهای HPLC توسط دستگاه HPLC از نوع Waters که متشکل از یک پمپ ۵۱۰، تزریق کننده خودکار B WISPV10، دتکتور UV مدل Lambda Max LC بود، صورت پذیرفت. شرایط کروماتوگرافی عبارت بودند از: ستون 25 cm Spherisorb ODS2 $5 \mu\text{m}$ (4.6 mm , i.d.) همراه با ستون محافظ از نوع Bondapack C18 μm ، فاز متحرک استات آمونیوم (0.05 M)، $\text{pH} = 4.65$ ، و استونیتریل ($1/5 : 98/5$)، با سرعت شویش 1 ml/min ، و طول موج 335 nm .
۶-مرکاپتوپورین ($50 \mu\text{M}$) با فراکسیون آنزیمی

بدست آمده از کبد خوچه هندی در 3 ml بافر فسفات (67 mM ، $\text{pH} = 7$) حاوی 0.1 mM EDTA، و دمای 37°C بمدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. در طول انکوباسیون و در فواصل زمانی معین، $200 \mu\text{l}$ از نمونه در حال واکنش، جدا و به $100 \mu\text{l}$ از تری کلرواستیک اسید 20% اضافه و بمدت ۳ دقیقه در 5000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. از مایع بالائی نمونه سانتریفیوژ شده، $20 \mu\text{l}$ به HPLC تزریق و ترکیبات موجود مورد بررسی قرار گرفتند. واکنشها همچنین در حضور $100 \mu\text{M}$ از ایزووانیلین، کلرپرومازین (مهار کننده آلدئید اکسیداز) (۱۴) و آلپورینول صورت پذیرفت.

اندازه گیری پروتئین فراکسیون کبدی

غلظت پروتئین فراکسیون کبدی تهیه شده با استفاده از کیت Pierce BCA Protein Assay و آلومین سرم گاوی بعنوان پروتئین استاندارد تعیین شد (۱۵).

نتایج

اثر مهارکننده های گزانتین اکسیداز و آلدئید اکسیداز بر روی سرعت اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین

در جدول ۱، اثرات مهاري $100 \mu\text{M}$ از آلپورینول (مهارکننده گزانتین اکسیداز)، منادیون و ایزووانیلین (مهارکننده های آلدئید اکسیداز) بر روی سرعت اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین ($100 \mu\text{M}$) کاتالیز شده توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی و فراکسیون کبدی خوچه هندی آمده است.

جدول ۱- اثر $100 \mu\text{M}$ از مهار کننده های گزانتین اکسیداز و آلدئید اکسیداز بر روی سرعت اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین ($100 \mu\text{M}$) کاتالیز شده

توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی و فراکسیون کبدی خوچه هندی

| مهار اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین | | | | آنزیم |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|--------------------------------------|
| ایزووانیلین | آلپورینول + منادیون | منادیون | آلپورینول | |
| — | — | ۲۲ (↑) | ۱۰۰ | گزانتین اکسیداز شیر گاوی ($n = 2$) |
| 52 ± 11 | ۱۰۰ | $39 \pm 9 \times$ | 66 ± 10 | فراکسیون کبدی خوچه هندی ($n = 3$) |

(↑) افزایش سرعت اکسیداسیون

* میزان مهار بعد از دو دقیقه به صفر رسید

نشان میداد که ۶-تیوگزانتین با سرعت بیشتری در مقایسه با ۶-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی اکسیده میشود. بنابراین، اگرچه بدلیل عدم دسترسی به ۶-تیواوریک اسید، امکان تزریق این ترکیب و مشاهده پیک آن وجود نداشت، شواهد موجود نشاندهنده این است که متابولیت مشاهده شده با $Rt = 4/4$ min گزارش Zimm و همکاران (۵)، با استفاده از سیستم HPLC (مشکل از یک ستون C18 (25 cm x 4.6 mm) فاز متحرک آب، استونیتریل و استیک اسید (۲/۰ : ۱ : ۹۸/۸)، و سرعت شویش ۱ ml/min، که بسیار مشابه با سیستم HPLC بکار رفته در مطالعه حاضر است، میتوان ۶-تیواوریک اسید، ۶-مرکاپتوپورین و ۶-تیوگزانتین را بترتیب در ۹/۹، ۱۲/۵ و ۱۶/۸ دقیقه جدا نمود. بنابراین، هر دو ترکیب ۶-مرکاپتوپورین و ۶-تیوگزانتین به ۶-تیواوریک اکسیده میشوند. اما، تبدیل ۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیواوریک بایستی با عبور از ۶-تیوگزانتین (۵، ۷) و یا ۸-اکسو-۶-مرکاپتوپورین (۱، ۴) صورت پذیرد، در حالیکه در انکوباسیون ۶-مرکاپتوپورین با گزانتین اکسیداز شیر گاوی، تنها پیک مربوط به ۶-تیواوریک مشاهده گردید. سرعت نسبی اکسیداسیون ۶-تیوگزانتین به ۶-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی برابر با ۸ میباشد، در حالیکه سرعت اکسیداسیون ۸-اکسو-۶-مرکاپتوپورین تنها ۱/۲ برابر بیشتر از ۶-مرکاپتوپورین (۱۷) است. با در نظر گرفتن مجموع این نتایج، بنظر میرسد ۶-مرکاپتوپورین توسط گزانتین اکسیداز ابتدا به ۶-تیوگزانتین و سپس به ۶-تیواوریک اسید اکسید میشود و در این میان، واکنش اول مرحله تعیین کننده سرعت است.

همچنان که انتظار میرفت آلوپورینول توانست موجب مهار کامل واکنش شود در حالیکه ایزووانیلین هیچ اثری بر روی واکنش نداشت. منادیون باعث افزایش سرعت اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین شد. این امر بدلیل اثر محرکی منادیون بر روی گزانتین اکسیداز (۱۱، ۱۶) میباشد. از طرف دیگر، در مورد فراهسیون کبدی خوچه هندی، آلوپورینول نتوانست باعث مهار کامل اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین شود. اگرچه منادیون تنها توانست به میزان ۳۹٪ واکنش را مهار نماید، اما این میزان بعد از ۲ دقیقه به صفر کاهش یافت. ایزووانیلین موجب بیش از ۵۰٪ مهار اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین شد. بنابراین، هر دو آنزیم آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز در اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین مشارکت دارند، همچنانکه این واکنش در مجاورت منادیون و آلوپورینول بطور کامل مهار میشود.

بررسی متابولسیم اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین توسط HPLC

با استفاده از سیستم کروماتوگرافیک بکار گرفته شده در این مطالعه، جداسازی ۶-مرکاپتوپورین ($Rt = 9/8$ min) و ۶-تیوگزانتین ($Rt = 11/5$ min) در ۱۲ دقیقه امکان پذیر گردید. انکوباسیون ۶-مرکاپتوپورین ($50 \mu M$) با گزانتین اکسیداز شیر گاوی منتهی به مصرف کامل ۶-مرکاپتوپورین و مشاهده تنها یک پیک ($Rt = 4/4$ min) بعد از نود دقیقه شد. بدنبال انکوباسیون ۶-تیوگزانتین ($50 \mu M$) با گزانتین اکسیداز شیر گاوی نیز تنها یک پیک با $Rt = 4/4$ min ایجاد نمود با این تفاوت که تمام ۶-تیوگزانتین در طی پانزده دقیقه مصرف گردید که

واکنش را کاهش دهند هر چند ایزووانیلین تا حدودی اثر تحریکی بر روی اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین داشت (جدول ۲).

همچنانکه انتظار میرفت، آلوپورینول، بعنوان مهارکننده قوی گزانتین اکسیداز موجب مهار کامل اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین شد، در حالیکه ایزووانیلین و کلرپرومازین (مهارکننده های آلدئیداکسیداز) نتوانستند سرعت

جدول ۲- اثر مهارکننده های گزانتین اکسیداز و آلدئید اکسیداز بر روی میزان تشکیل متابولیت با $Rt = 4/4 \text{ min}$ (۶-تیواوریک اسید) حاصل از اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین $(50 \mu\text{M})$ توسط گزانتین اکسیداز شیر گاوی و فراکسیون کبدی خوکچه هندی که بوسیله HPLC در 335 nm اندازه گیری شد.

| % مهار تشکیل متابولیت با $Rt = 4/4 \text{ min}$ (۶-تیواوریک اسید) | | | | | دارو |
|---|------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| فراکسیون کبدی خوکچه هندی ($n = 3$) | | | گزانتین اکسیداز شیر گاوی ($n = 2$) | | |
| ۶۰ دقیقه | ۳۰ دقیقه | ۱۵ دقیقه | ۳۰ دقیقه | ۱۵ دقیقه | |
| 94 ± 3 | 91 ± 6 | 90 ± 2 | ۱۰۰ | ۱۰۰ | آلوپورینول |
| 45 ± 10 | 64 ± 3 | 43 ± 6 | $5 (\uparrow) \times \times \times$ | $10 (\uparrow) \times \times \times$ | ایزووانیلین |
| 49 ± 12 | 54 ± 3 | 45 ± 3 | . | . | کلرپرومازین |

* ۶-مرکاپتوپورین $(50 \mu\text{M})$ با گزانتین اکسیداز شیر گاوی و فراکسیون کبدی خوکچه هندی انکوبه و میزان متابولیک تشکیل شده بوسیله HPLC در 335 nm اندازه گیری شد.

** میانگین \pm انحراف معیار

*** افزایش میزان تشکیل متابولیت

اکسیداز است که در جریان فرایند ایجاد اثر مهاری به اکسی پورینول تبدیل میشود (۱۸)، از اینرو، با گذشت زمان اثر مهاری آن افزایش میابد. ضمناً، آلوپورینول سوبسترای آلدئید اکسیداز نیز است (۱۹)، لذا، با گذشت زمان میزان آن در محیط انکوباسیون افزایش میابد. مهارکننده های آلدئید اکسیداز موجب مهار تشکیل متابولیت $Rt = 4/4 \text{ min}$ به میزان حدود ۵۰٪ شدند (جدول ۲). جالب توجه است که مجموع میزان مهار ایجاد شده توسط مهارکننده های گزانتین اکسیداز و آلدئید اکسیداز بیش از ۱۰۰٪ گردید که نشاندهنده وجود بیش از یک مرحله در تبدیل ۶-مرکاپتوپورین به متابولیت $Rt = 4/4 \text{ min}$ است. با توجه به اثر مهاری زیادتر آلوپورینول

انکوباسیون ۶-مرکاپتوپورین $(50 \mu\text{M})$ با فراکسیون کبدی خوکچه هندی نیز منتهی به تشکیل متابولیت مشاهده شده در انکوباسیون با گزانتین اکسیداز شد با این تفاوت که دو بیک کوچک نیز بعد از گذشت ۶۰ دقیقه در $Rt = 8/1 \text{ min}$ و $Rt = 11/5 \text{ min}$ مشاهده گردید. بعلاوه، تنها ۵۸٪ از ۶-مرکاپتوپورین در طی ۹۰ دقیقه متابولیزه شد. آلوپورینول باعث مهار تشکیل متابولیت $Rt = 4/4 \text{ min}$ به میزان بیش از ۹۰٪ شد و این مقدار بیش از اثر مهاری آلوپورینول بر روی سرعت اولیه اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین است (جدول ۱ و ۲ مقایسه شوند). این تفاوت میتواند ناشی از این مطلب باشد که آلوپورینول یک مهارکننده وابسته به مکانیسم گزانتین

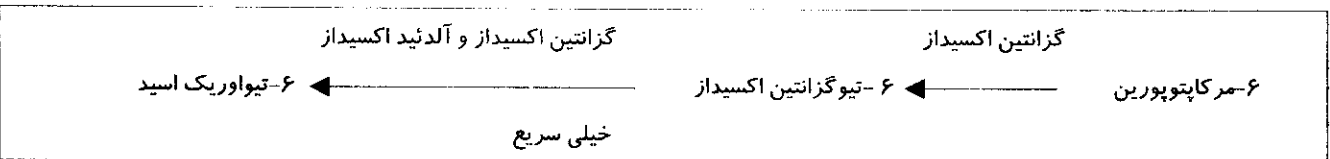
همکاران (۲۱) گزارش نموده اند که در شرایط *in vivo* سرعت اکسیداسیون آلپورینول و آنالوگ ۶-مرکاپتو آن، در یک فرد مبتلا به گزانتین اوری به همان اندازه افراد کنترل است. اکسیداسیون آلپورینول در افراد مبتلا به گزانتین اوری به فعالیت آلدئید اکسیداز نسبت داده شده است (۲۲).

براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیواوریک با عبور از ۶-تیوگزانتین صورت میپذیرد و در این مسیر کاتابولیک دو آنزیم گزانتین اکسیداز و آلدئید اکسیداز مشارکت دارند، که در این میان، نقش آنزیم اول بیشتر میباشد. همچنین بر اساس یافته های بررسی حاضر، واکنش اول، یعنی تبدیل ۶-مرکاپتوپورین به ۶-تیوگزانتین مرحله تعیین کننده سرعت است. بطور خلاصه، میتوان مسیری را که در شکل ۲ آمده است بعنوان مسیر اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین توسط فراکسیون کبدی کوچک، که حاوی هر دو آنزیم آلدئید اکسیداز و گزانتین اکسیداز است، معرفی نمود.

در مقایسه با مهارکننده های آلدئید اکسیداز، میتوان نتیجه گرفت که گزانتین اکسیداز آنزیم اصلی در کاتابولیسم ۶-مرکاپتوپورین است.

بحث

اگرچه گزانتین اکسیداز بعنوان آنزیم عمده در کاتابولیسم ۶-مرکاپتوپورین در نظر گرفته میشود (۱، ۵، ۷)، براساس برخی شواهد این واکنش اکسیداسیون همچنین میتوندند توسط آنزیم دیگری نیز صورت پذیرد. مطالعات *in vivo* (۲۰) نشان داده اند که متعاقب تجویز خوراکی ۱۵۰ میلی گرم از ۶-مرکاپتوپورین و ۳۰۰-۷۵ میلی گرم از آلپورینول به انسان، میزان ۶-مرکاپتوپورین آزاد دفع شده به ادرار ۴ برابر افزایش و مقدار ۶-تیواوریک دفع شده با ادرار ۸ برابر کاهش مییابد. باوجود این کاهش در دفع ۶-تیواوریک اسید، هنوز میتوان این متابولیت را به میزان ۳۹ و ۱۴ درصد مقدار کنترل بترتیب علیرغم تجویز ۷۵ و ۳۰۰ میلی گرم از آلپورینول در ادرار مشاهده کرد (۲۰). Auscher و



شکل ۲- مسیر متابولیک پیشنهادی برای اکسیداسیون ۶-مرکاپتوپورین توسط فراکسیون کبدی کوچک هندی



Reference:

- 1- Van Scoik K.G., Johnson C.A., Porter W.R. The pharmacology and metabolism of the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and azathioprine. *Drug Metabolism Review*, 1985, 16:157-74.
2. Knoester P.D., Underberg W.J.M., Beijnen J.H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of anticancer agents in pediatric patients, *Anticancer Research*, 1993, 13:1795-808.
3. Meerten E., Verweij J., Schellens J.H.M. Antineoplastic agents. Drug interactions of clinical significance, *Drug Safety*, 1995, 12:168-82.
4. Elion G.B. Biochemistry and pharmacology of purine analogues, *Federation Proceedings*, 1967, 26: 898-904.
5. Zimm S., Grygiel J.J., Strong J.M., Monks T.J., Poplack D.G. Identification of 6-mercaptopurine riboside in patients receiving 6-mercaptopurine as a prolonged intravenous infusion, *Biochemical Pharmacology*, 1984, 33:4089-92.
6. Rowland K., Lennard L., Lilleyman J.S. In vitro metabolism of 6-mercaptopurine by human liver cytosol, *Xenobiotica*, 1999, 29:615-28.
7. Keuzenkamp-Jansen C.W., DeAbreu R.A., Bokkerink J.P., Lambooy M.A., Trijbels J.M. Metabolism of intravenously administered high-dose 6-mercaptopurine with and without allopurinol treatment in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Pediatrics Hematology and Oncology*, 1996, 18:145-50.
8. Hall W.W., Krenitsky T.A. Aldehyde oxidase from rabbit liver: specificity toward purines and their analogs, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 251: 36-46.
9. Beedham C. Molybdenum hydroxylases: biological distribution and substrate-inhibitor specificity. In "Progress in Medicinal Chemistry", Ellis, G.P., West, G.B. Eds.; Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1987, pp. 85-127.
10. M. R. Rashidi M.R., Smith J.A., Clarke S.E., Beedham C. In vitro oxidation of famciclovir and 6-deoxypenciclovir by aldehyde oxidase from human, guinea pig, rabbit, and rat liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 1997, 25: 805-813.
11. Rajagopalan K. V., Fridovich I., Handler P. Hepatic aldehyde oxidase: I. purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237: 922-928.
12. Clarke S.E., Harrell A.W., Chenery R.J. Role of aldehyde oxidase in the in vitro conversion of famciclovir to penciclovir in human liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 1995, 23: 251-254.
13. Lamarque D., Whittle B.J.R. Involvement of superoxide and xanthine oxidase in eutrophil-independent rat gastric damage induced by NO donors, *British Journal of Pharmacology*, 1995, 116:1843-8.
14. Rashidi M.R. PhD. Thesis, University of Bradford, UK 1996.
15. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk C. Measurement of Preotein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150: 76-85.
16. Yoshihara S., Tatsumi K. Kinetic and inhibition studies on reduction of diphenyl sulfoxide by guinea pig liver aldehyde oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 249: 8-14.
17. Krenitsky T.A., Nell S.M., Elion G.B., Hitchings G.H. A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1972, 150: 585-599.

18. Spector T., Hall W.W., Krenitsky T.A.
Human and bovine xanthine oxidases.
Inhibition studies with oxipurinol.
Biochemical Pharmacology, 1986,
35:3109-14.
19. Moriwaki Y., Yamamoto T., Nasako
Y., Takahashi S., Suda M., Hiroishi
K., Hada T., Higashino K. In vitro
oxidation of pyrazinamide and allopurinol by
rat liver aldehyde oxidase, *Biochemical
Pharmacology*, 1993, 46: 975-981.
- 20- Elion G.B., Callahan S., Nathan H., Biebek S.,
Rundles R.W., Hitchings G.H. Potentiation by
inhibition of drug degradation: 6-substituted purines
and xanthine oxidase, *Biochemical Pharmacology*,
1963, 12:85-93.
21. Auscher C., Pasquier C., Mercier N., Delbarre F.
Urinary excretion of 6 hydroxylated metabolite
and oxypurines in a xanthinuric man given
allopurinol or thiopurinol, *Adv Exp Med Biol*.
1974, 41:663-7.
22. Reiter S., Simmonds H.A., Zollner N., Braun
S.L., Knedel M. Demonstration of a combined
deficiency of xanthine oxidase and aldehyde
oxidase in xanthinuric patients not forming
oxipurinol, *Clinical Chemical Acta*, 1990,
187:221-34.