

УДК 577.391.152.173

І.К. Кисельова, інж, А.В. Майданюк, канд. біол. наук,
С.П. Імедадзе, пров. інжен.**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КСАНТИНООКСИДАЗНОЇ РЕАКЦІЇ ТИМУСА ЩУРІВ***Експериментально визначено ксантинооксидазну активність тимуса щурів. Визначено кінетичні константи (K_m та V_{max}) даної ферментативної реакції.**Xanthine oxidase activity of rat thymus is studied. The kinetic parameters (K_m and V_{max}) of enzyme reaction are determined.*

Вступ. В останні роки ретельно вивчалась дія ксантинооксидазно-дегідрогеназної системи в клітині. Відомо, що ксантинооксидаза (КФ: 1.1.3.2) каталізує перетворення гіпоксантину в ксантин і далі до сечової кислоти [1]. З 80-х років минулого століття вивчення ксантинооксидази стає все актуальнішим у зв'язку з відкриттям супероксидутворювальної, канцерогенної та апоптогенної активностей ферменту [1]. Апоптичний вплив ксантинооксидази реалізується через генерацію супероксиду, а також NO. [2]. Супероксид або NO (але не пероксинитрит) взаємодіє з тиореоксидом, вивільнює зв'язану з ним тирозин/тирозинову протеїнкіназу ASK-1 (Apoptotik signal regulating kinase 1), яка відповідає за активацію експресії гена, який кодує білок p53 – апоптогенний білок [3]. Цей білок перешкоджає можливості мітотичного поділу клітини, пригнічує активність мітогенного фактора MPF. MPF складається з цикліну A, який зв'язується з тирозиновою протеїнкіназою p33cdk2. Комплекс циклін-A-p33cdk2 зв'язується у свою чергу з фактором транскрипції U2F і фосфорилує білок p107Rb – частину мітогенного фактора MPF, а потім викликає синтез білка p21 – інгібітора циклінзалежних протеїнкіназ [3].

Ксантинооксидаза присутня практично в усіх тканинах тваринного організму. Найбільша питома активність спостерігається в печінці й цитозолі гепатоцитів. Усе наведене свідчить про актуальність визначення активності ксантинооксидази, тому мета даної роботи полягала у визначенні кінетичних констант (K_m і V_m) ксантинооксидазної реакції тимуса щурів.

Матеріали та методи. У роботі використовували білих безпородних щурів масою 130–150 г, яких утри-

мували на стандартному раціоні віварію. Тимус гомогенізували в гомогенізаторі Поттера в 0,1 моль/л калійфосфатному буфері, pH 7,8. Гомогенат центрифугували 30 хв при 5000 об./хв на центрифугі К – 23, супернатант (тобто цитозольну фракцію тимуса) використовували в досліді. Усі операції проводили при температурі 4 °С. Білок визначали за методом Лоурі.

Швидкість ксантинооксидазної реакції визначали спектрофотометрично за утворенням сечової кислоти з використанням як субстрату гіпоксантину [4]. Результати статистично обробляли за стандартними методами.

Результати та їх обговорення. Під час дослідження ксантинооксидазної реакції за різних концентрацій ферменту лінійність спостерігалась при 150 мкг ферменту на пробу та до 30 хв інкубації. Тому подальші дослідження проводились за цієї концентрації білка. Експериментальне дослідження залежності утворення продукту в часі за різних концентрацій субстрату (табл. 1) дала можливість установити лінійність цієї залежності при трьох досліджуваних концентраціях субстрату до 30 хв інкубації. Саме ця прямопропорційна залежність утворення продукту в часі дала можливість визначити початкову швидкість (V_0). Значення цієї величини наведені в табл. 1, графічне зображення їх указує на те, що залежність V_0 від S є гіперболічною, тобто кінетика ксантинооксидазної реакції тимусу підлягає кінетиці Міхаелеса – Ментен. За допомогою методів подвійних зворотних величин (Лайнуївера – Берка) і за методом Едді – Хофсті визначили кінетичні константи (K_m і V_{max}) даної ферментативної реакції.

Таблиця 1. Швидкість ксантинооксидазної реакції тимуса щурів

1. Залежність утворення Р*нмоль (сечової кислоти) в часі при різних концентраціях субстрату (150 мкг білка)				
Час інкубації, хв	10	15	20	30
0,04 ммоль/л	1,7 ± 0,3	2,5 ± 0,6	3,5 ± 0,7	5,7 ± 0,5
0,15 ммоль/л	4,7 ± 0,4	7,0 ± 0,5	9,4 ± 0,8	14 ± 0,7
2 ммоль/л	10 ± 0,4	15 ± 0,7	20 ± 0,9	28 ± 1,0
2. Залежність початкової швидкості (V_0) від концентрації субстрату (гіпоксантину)				
Концентрація гіпоксантину, ммоль/л	0,04	0,15	2	
V_0 нмоль/хв · мг	1,33 ± 0,5	3,33 ± 1,2	6,67 ± 1,5	
3. Значення кінетичних констант ксантинооксидазної реакції				
K_m		V_{max}		
0,133 ммоль/л		7,4 нмоль/хв · мг		

Примітки: Р* – продукт ксантинооксидазної реакції = (сечова кислота).

Висновки. З аналізу одержаних результатів можна зробити висновок про те, що насичуючою концентрацією субстрату є мілімольні концентрації (1–2 ммоль/л) і саме за таких концентрацій гіпоксантину необхідно визначати активність ферменту. З літературних даних відомо, що питома активність ксантинооксидази в печінці становить 1,8 мкмоль/хв·мг білка [5]. Визначена нами активність ферменту тимуса становить 7,4 нмоль/хв·мг, що збігається з даними про те, що активність ксантино-

оксидази в печінці є найбільшою порівняно з іншими органами.

1. Мазда Х., Акаїке Т. // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – С. 1007–1020.
2. Rollet-Labelle E., Grange M.J., Marquetti C. // Free radik. biol. med. – 1998. – Vol. 24, № 4. – Р. 563–572.
3. Матильшевская О.П. // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 15–30.
4. Stirpe F., Lella Corte E // J. Biol. Chem. 1969. – Vol. 244, № 14. – Р. 3855–3863.
5. Krenitsky T.A., Spector T., Hall W.W. // Archives biochem. biophys. – 1986. – Vol. 247 (1). – Р. 108–109.

Надійшла до редколегії 29.09.04