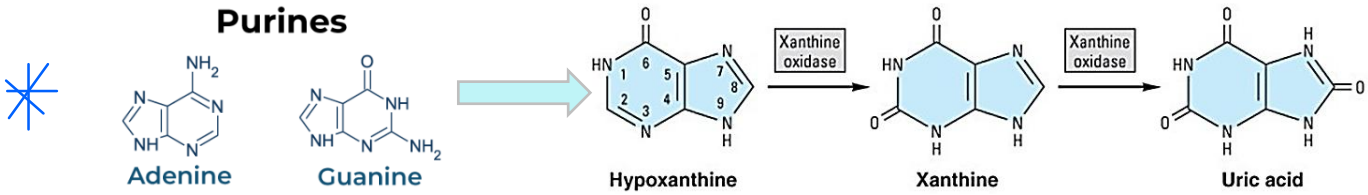
Experiment 7
Xanthine oxidase enzyme inhibition with allopurinol

Introduction:

أوكسيداز الزانثين (XO) هو شكل من أشكال أوكسيدوريدوكتاز الزانثين، وهو نوع من الإنزيمات التي تولد أنواع الأكسجين التفاعلية. تحفز هذه الإنزيمات أكسدة الهيبوكسانثين إلى زانثين، ويمكنها أيضًا تحفيز أكسدة الزانثين إلى حمض اليوريك. تلعب هذه الإنزيمات دورًا مهمًا في هدم البيورينات في بعض الأنواع، بما في ذلك البشر.

Xanthine oxidase (XO) is a form of **xanthine oxidoreductase**, a type of enzyme that generates reactive oxygen species. These enzymes catalyse the oxidation of hypoxanthine to xanthine and can further catalyse the oxidation of xanthine to uric acid. These enzymes play an important role in the catabolism of purines in some species, including humans.



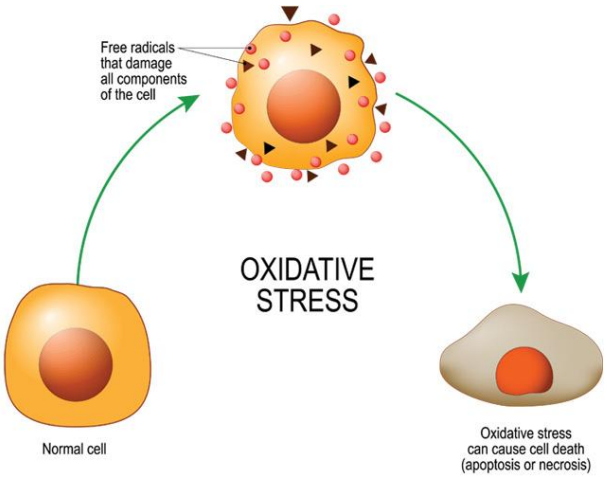
The following chemical reactions are catalyzed by xanthine oxidase:

يتم تحفيز التفاعلات الكيميائية التالية بواسطة إنزيم زانثين أوكسيداز:

$$\text{hypoxanthine} + H_2O + O_2 \longleftrightarrow \text{xanthine} + H_2O_2$$
$$\text{xanthine} + H_2O + O_2 \longleftrightarrow \text{uric acid} + H_2O_2$$

يعمل إنزيم أوكسيداز الزانثين (X0) كمصدر بيولوجي مهم للجذور الحرة المشتقة من الأكسجين والتي تساهم في تلف الأنسجة الحية الناتج عن الأكسدة. الجذور الحرة: هي ذرات أو مجموعات من الذرات تحتوي على إلكترون منفرد. وهي جزيئات غير مستقرة تتكون أثناء عملية التمثيل الغذائي الطبيعية للخلايا. يمكن أن تتراكم الجذور الحرة في الخلايا وتسبب تلفًا لجزيئات أخرى، مثل الحمض النووي (DNA) والدهون والبروتينات. قد يزيد هذا التلف من خطر الإصابة بالسرطان وأمراض أخرى.

Xanthine oxidase (XO) serves as an important biological source of oxygen-derived free radicals that contribute to the oxidative damage of living tissues. Free radical: are atoms or groups of atoms that have a single unpaired electron. They are unstable molecule that is made during normal cell metabolism. Free radicals can build up in cells and cause damage to other molecules, such as DNA, lipids, and proteins. This damage may increase the risk of cancer and other diseases.



unpaired electron shown in red

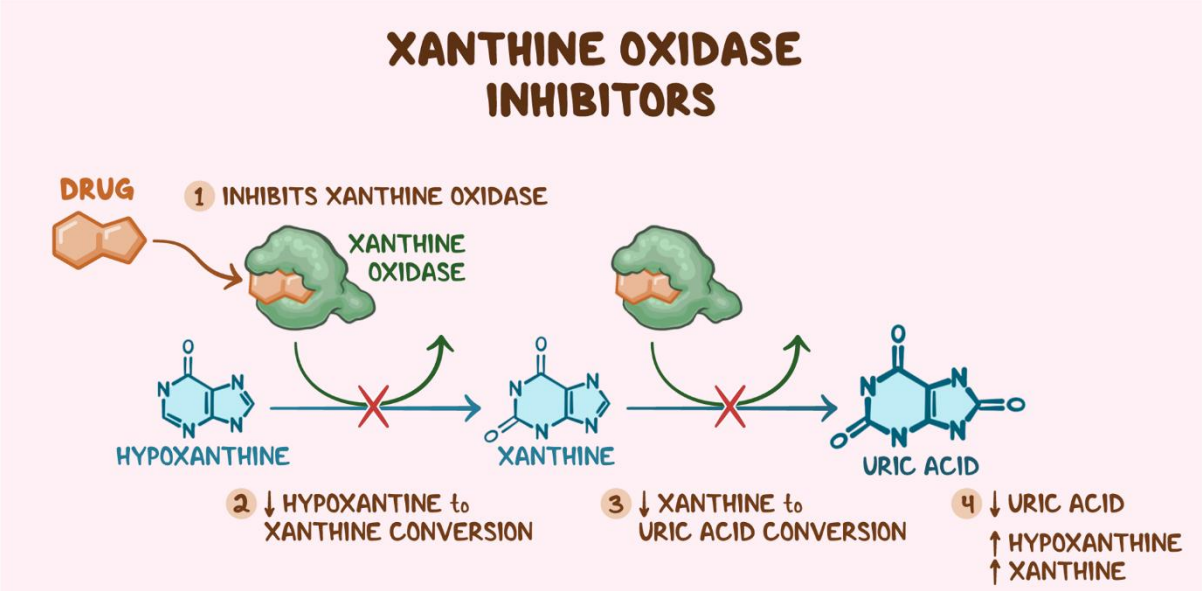
Gout-النقرص

XO is involved in the medical condition known as gout, which is characterized by hyperuricemia that leads to uric acid deposition in the joints resulting in painful inflammation. Hyperuricemia, which is present in 5–30% of the general population, seems to be increasing worldwide and is considered an important risk factor in serious disorders, e.g. renal failure.

يشارك إنزيم XO في الحالة الطبية المعروفة باسم النقرس، والتي تتميز بفرط حمض يوريك الدم الذي يؤدي إلى ترسب حمض اليوريك في المفاصل مما ينتج عنه التهاب مؤلم. يبدو أن فرط حمض يوريك الدم، الموجود لدى 5-30% من عامة السكان، آخذ في الازدياد في جميع أنحاء العالم ويعتبر عامل خطر مهمًا في الاضطرابات الخطيرة، مثل الفشل الكلوي.

يمكن للأدوية المدرة لحمض اليوريك، التي تزيد من إفراز حمض اليوريك في البول، أو مثبطات أوكسيداز الزانثين التي تمنع الخطوة النهائية في التخليق الحيوي لحمض اليوريك، أن تخفض تركيز حمض اليوريك في البلازما، وتُستخدم عمومًا لعلاج النقرس.

Uricosuric drugs which increase the urinary excretion of uric acid, or XO inhibitors which block the terminal step in uric acid biosynthesis, can lower the plasma uric acid concentration, and are generally employed for the treatment of gout.



Allopurinol is an inhibitor of XO and used clinically in the treatment of gout as well as febuxostat drug.

ألوبيورينول هو مثبط لـ XO ويستخدم سريريًا في علاج النقرس وكذلك دواء فيبوكسوستات.

Assay procedure:

1. The xanthine oxidase activity will be assayed using xanthine as substrate and utilizing a plate reader.
2. In a 96 well plate, add 50 µl of allopurinol (concentration as written in the table), 95 µl of 1X Phosphate buffer and 50 µl of xanthine substrate (0.6mM). (Final volume per well is 200 µl) (prepare the blank and enzyme only wells as per the numbers in the table below)

Well no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Phosphate Buffer	150µl	145µl	95 µl	95 µl	95 µl	95 µl	95µl	95µl	95µl
Xanthine substrate (0.6mM)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50µl	50µl	50µl
Allopurinol	-----	-----	50 µl 40ng/ml	50 µl 400ng/ml	50 µl 2µg/ml	50 µl 6µg/ml	50 µl 40µg/ml	50 µl 50µg/ml	50µl 100µg/ml
Xanthine oxidase enzyme	-----	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5µl	5µl

3. Preincubate for 10 min at 25°C
4. Start the reaction by the addition of 5 µl ml of XO enzyme (0.1U/ml in phosphate buffer).
5. Incubate the reaction at 25°C for 30 min and measure the absorbance against phosphate buffer as blank at **295 nm** using **Biotek plate reader**.
6. Select the xanthine oxidase protocol from the software and make sure the settings are correct and validated (set the plate layout according to the wells used)

Calculation:
Calculate % inhibition for each concentration of allopurinol using endpoint absorbances. Make sure to blank out your Absorbance reading-by subtracting the absorbance of blank. (show your calculation):

$$\%inhibition = 100 - \left[\frac{A1 - A\,(blank)}{A_{\circ} - A\,(blank)} \right] * 100$$

Where A1 is the activity of the enzyme in presence of plant extract, $A_{\circ}$ is the absorbance in absence of the plant extract (activity of the enzyme alone).

حيث A1 هي نشاط الإنزيم في وجود مستخلص النبات، وA° هي قيمة الامتصاص في غياب مستخلص النبات (نشاط الإنزيم وحده).

For example; allopurinol (40 ng/ml → the final conc. in the well is 10 ng/ml as the inhibitor is diluted by 1 in 4 in each well) and the % inhibition is calculated as follow Blank Abs=0.18075, $A_{\circ}$=4.473 and A1=2.4159.

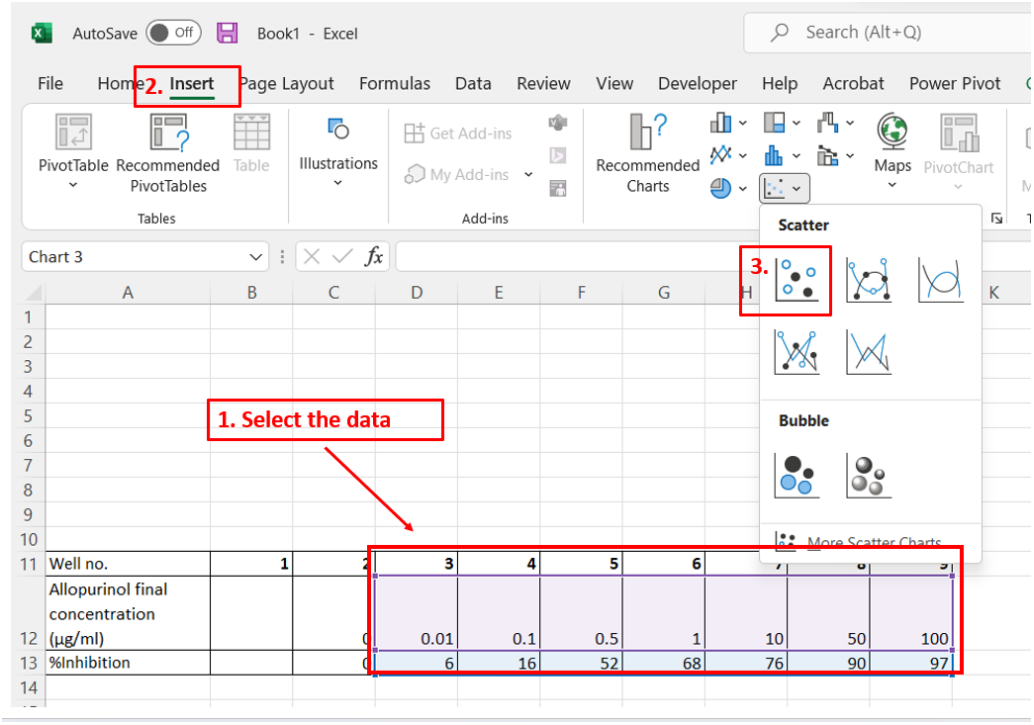
Well no.	1	2	3	4
Phosphate Buffer	150µl	145µl	95 µl	95 µl
Xanthine substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Allopurinol	-----	-----	50 µl 40ng/mL	50 µl 400ng/ml
Xanthine oxidase enzyme	-----	5 µl	5 µl	5 µl
Final allopurinol concentration per well.	-----	Zero		
Absorbance (30 minutes)	0.1807	4.473	2.4159	
%Inhibition			47.92	

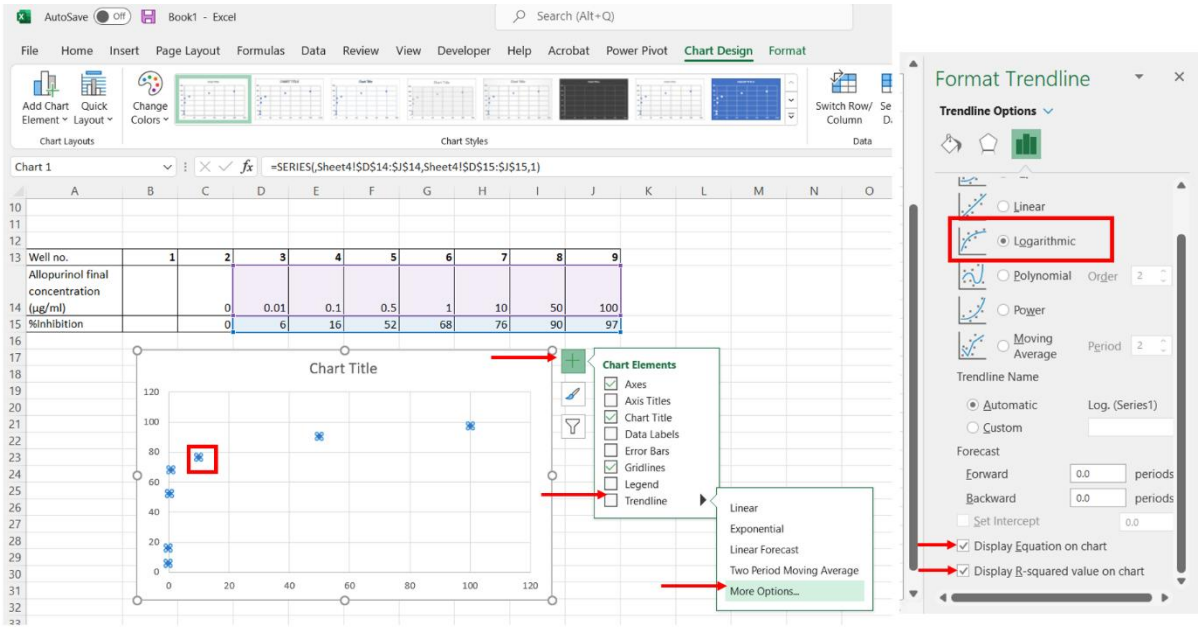
$$\%inhibition = 100 - \left[\frac{2.4159-0.18075}{4.473-0.18075}\right] * 100$$

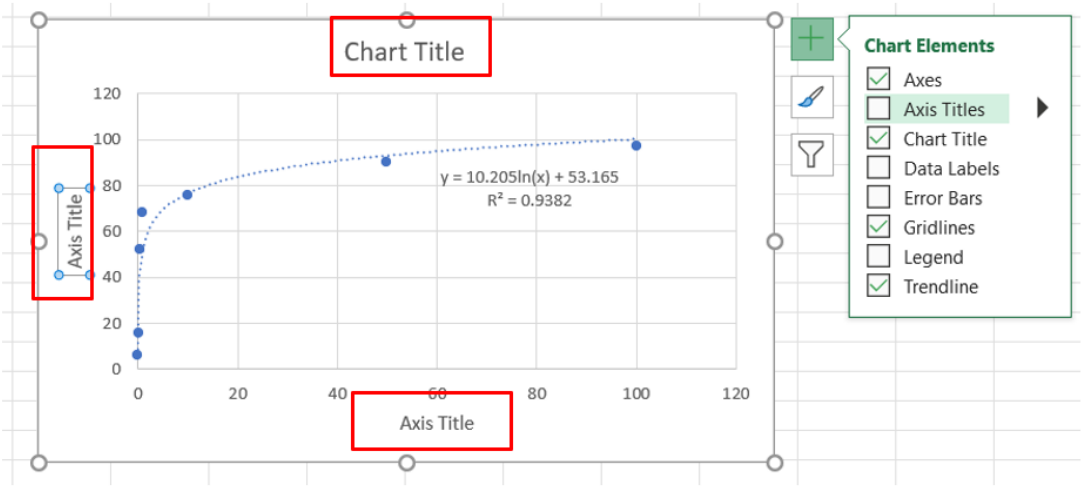
= 100 -52.07

= 47.92%

Data analysis: Draw graph using excel, by following the steps below:







How to determine the IC50?

IC50 is the half maximal inhibitory concentration

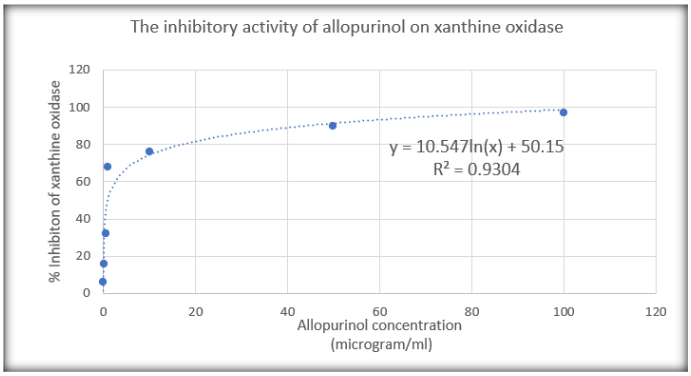
- For example: maximum inhibitory concentration was found to be 97% as in the table below:

Well no.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Allopurinol final concentration (µg/ml)		0	0.01	0.1	0.5	1	10	50	100
%Inhibition		0	6	16	32	68	76	90	97

- Then IC50 for this example will be the concentration which gives an inhibition value of 48.5%

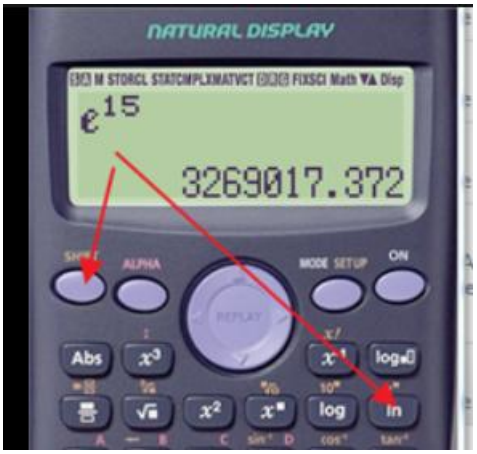
Apply the value on the equation obtained

- y = 10.547ln(x) + 50.15
- 48.5= 10.547ln(x) + 50.15
- Ln(x)= $\frac{48.5-50.15}{10.547}$
- Ln(x)= -0.15644
- X= $e^{-0.15644}$
- X=0.855181 µg/ml is the IC50 in this example.



How to find anti-ln

- On calculator: press shift then → press ln



- On excel: find the exponential function and open a bracket then select the cell which has the number and close the bracket again, press enter to obtain the value.