

## AKTIVITA HYALURONIDÁZY V ROZLIČNÝCH DRUHOCH VČELIEHO JEDU

B. DULOVIČOVÁ, O. MARKOVIČ\*

Katedra organickej chémie a biochémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského  
v Bratislave

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Niektoré živočíšne jedy (napríklad hadí, včelí a pod.) obsahujú hyaluronidázy — enzýmové komplexy — ktoré katalyzujú štiepenie kyseliny hyaluronovej za súčasného poklesu viskozity [2]. (Hyaluronidáza sa označovala aj ako Duran—Reynalsov prienikový faktor — „spreading factor“.)

Prítomnosť hyaluronidázy v extrakte včiel zistili E. Chain a E. S. Duthie [6]. Jej obsahom vo včelom jede sa zaoberal W. Lamparter [7] a neskôr podrobnejšie E. Habermann so spolupracovníkmi [4, 5], ktorí oddeľujú hyaluronidázu včelieho jedu od fosfolipázy. E. Habermann v ďalšej práci [3] opisuje vlastnosti hyalurodinázy včelieho jedu a určuje jej aktivitu.

O. Markovič a L. Rexová [11] pri elektroforetickom oddeľovaní rozličných druhov včelieho jedu zistili zreteľné rozdiely v obsahových zložkách. Na základe toho sa dalo predpokladať, že jednotlivé druhy včelieho jedu sa môžu líšiť aj intenzitou hyaluronidázovej aktivity, čo po experimentálnom overení môže mať význam pre prípravu a kontrolu farmaceutických preparátov obsahujúcich včelí jed.

### Experimentálna časť

Na sledovanie hyaluronidázovej aktivity sa použilo 7 druhov včelieho jedu, ktoré sa líšili dobou zberu (tab. 2). Každá skúšaná vzorka sa získala jednorazovým zberom z jedného úľa pomocou elektrického dráždenia včiel spôsobom, ktorý opísali O. Markovič a L. Molnár [10], a bola úplne jednotná. Jednotlivé vzorky včelieho jedu sa rozpustili v redestilovanej vode a po prefiltrovaní cez fritový filter (Jena G 3) sa odlyofilizovali a dosušili do konštantnej váhy vo vákuovom exsikatore nad  $P_2O_5$ .

Kyselina hyaluronová použitá ako substrát sa pripravila z pupočných šnúr spôsobom, ktorý uvádza E. Habermann [3]. Po jej trojnásobnom prezrážaní acetónom a vysušení sa pripravil asi 0,37 % základný roztok zmiešaním troch objemov 0,5 %-nej kyseliny hyaluronovej vo fyziologickom roztoku s jedným objemom fosfát—citrátového tlmivého roztoku o pH 5.

Ako základ určovania enzymatickej aktivity sa použila testikulárna hyaluronidáza (lyofilizovaný preparát firmy Biogena, Praha z r. 1958).

Na sledovanie hyaluronidázovej aktivity sa použila viskozimetrická metóda [8, 9], ktorou sa určuje pokles viskozity kyseliny hyaluronovej po pôsobení hyaluronidázy kapilárnym viskostalagmometrom a ktorú na sledovanie hyaluronidázovej aktivity vče-

\* Vypracované ako diplomová práca v školskom roku 1957—1958 a obhájené v máji 1958 na Katedre organickej chémie a biochémie Prírodovedeckej fakulty univerzity Komenského v Bratislave.

lieho jedu použil E. Habermann [3]. Meralo sa Traubovým viskostalagmometrom o objeme 4 ml v termostatickej miestnosti pri teplote 23 °C. Zmes 6 ml substrátu a 0,5 ml roztoku enzýmu (1 mg hyaluronidázy v 8 ml redestilovanej vody) sa po premiešaní nechala 10 minút (reakčný čas  $R_f$ ) inkubovať pri izbovej teplote. Potom sa vykonalo meranie — odčítal sa prietokový čas ( $f$ ); merania sa opakovali po desiatich minútach, kým viskozita  $\eta_s$  klesla na polovičnú hodnotu. Čas potrebný na zníženie viskozity na polovičnú hodnotu je tzv. reakčný čas  $R_i$  a jeho prevrátená hodnota je úmerná koncentrácii enzýmu ( $c$ ), resp. miere aktivity enzýmu ( $A$ ) podľa vzťahu

$$c = \frac{1}{R_i}, \text{ resp. } A = \frac{1}{R_i} \cdot 10^3$$

Pretože enzým pôsobí i počas vlastného merania, k jednotlivým reakčným časom ( $R_f$ ) sa pripočítava polovičná hodnota príslušného prietokového času ( $f$ ), čím sa získa výsledný — korigovaný reakčný čas ( $R_v$ ):

$$R_v = R_f + \frac{1}{2} f$$

Namerané hodnoty prietokových časov ( $f$ ), reakčného času ( $R_f$ ), relatívnej viskozity, ako aj výsledného reakčného času ( $R_v$ ) pre testikulárnu hyaluronidázu (Biogena, Praha) sú v tab. 1. Vyhodnocovanie sa robilo pomocou grafu 1, z ktorého sa odčíta reakčný čas  $R_i$ , za ktorý sa dosiahne polovičná viskozita substrátu  $\frac{\eta_s}{2}$ .

Tabuľka 1

Hodnoty reakčného času ( $R_f$ ), prietokových časov ( $f$ ), relatívnej viskozity ( $\eta$ ) a výsledného reakčného času ( $R_v$ ) pre testikulárnu hyaluronidázu (Biogena, Praha)

$R_f$ (v min.)	$f$ (v sek.)	$\eta$	$R_v$ (v min.)
10	63,0	210,0	10'31"
20	59,5	198,3	20'29"
30	57,2	190,6	30'27"
40	54,3	181,0	40'27"
50	53,4	178,0	50'26"
60	50,7	169,0	60'25"

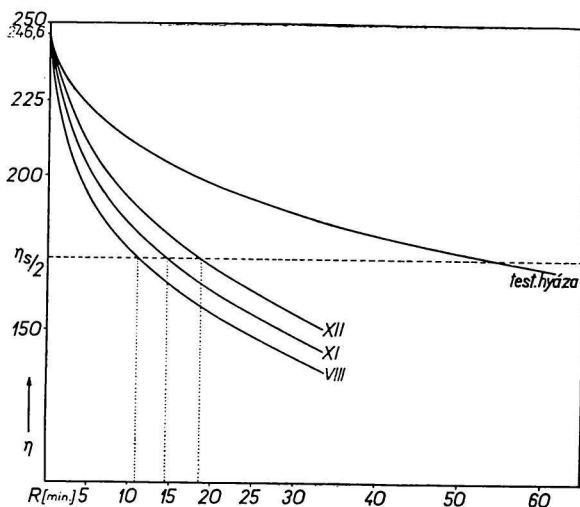
Pri zisťovaní enzýmovej aktivity včelích jedov sa tiež použilo riedenie 1 mg včelieho jedu v 8 ml tlmivého roztoku. Viskozita sa merala štyrikrát a do grafu pre krivku poklesu viskozity sa vynášali priemerné hodnoty týchto meraní. Na grafe 1 sú znázornené krivky poklesu viskozity testikulárnej hyaluronidázy a troch vzoriek včelieho jedu.

Výsledky stanovení enzýmovej aktivity skúšaných 7 druhov včelieho jedu sú uvedené v tab. 2, z ktorej vidieť, že hyaluronidázová aktivita týchto vzoriek včelieho jedu mala rôznu intenzitu; ak aktivitu najsilnejšie pôsobiaceho jedu (VIII) zvolíme za 100 %, aktivity ostatných skúšaných včelích jedov sú nižšie o 16 % (VII), ba až o 42,3 % (XII). Všetky skúšané vzorky včelieho jedu vykazovali väčšiu hyaluronidázovú aktivitu (v priemere 3,5 násobnú) než štandardná testikulárna hyaluronidáza.

Zo skúšaných 7 vzoriek včelieho jedu nie je možné robiť závery čo do regionálnych závislostí, resp. závislostí enzýmovej aktivity včelieho jedu od doby zberu. Pre farmaceu-

tickú výrobu a kontrolu je však dôležitá skutočnosť, že hyaluronidázová aktivita včelieho jedu môže kolísat až o 40 %.

V práci použitá viskozimetrická metóda dáva podľa J. Madinaveittu a T. H. H.



Graf 1. Krivky poklesu viskozity testikulárnej hyaluronidázy a troch vzoriek včelieho jedu.

Tabuľka 2

Porovnanie skúšaných vzoriek včelieho jedu s testikulárnou hyaluronidázou. Hodnoty reakčných časov ( $R_i$ ), hyaluronidázovej aktivity ( $A$ ) a aktivity vyjadrenej v percentách, keď za 100 % sa určila aktivita najsilnejšie pôsobiaceho včelieho jedu (VIII)

Včelí jed (označenie (v pokuse))	Miesto a doba zberu	Reakčný čas $R_i$ (v min.)	Aktivita $A$	Aktivita (v %)
VIII	Radošina, jún 1957	11'15"	89,68	100
VII	Radošina, sept. 1955	13'23"	75,58	84,27
II	Radošina, sept. 1953	13'35"	74,90	83,52
IX	Radošina, aug. 1957	14'20"	70,42	78,52
Ia	Bojnice, aug. 1952	14'23"	70,27	78,35
I	Radošina, aug. 1953	15'15"	66,00	73,59
XII	Radošina, sept. 1957	19'30"	51,81	57,77
Testikulárna hyaluronidáza (Biogena, Praha 1958)		54'15"	18,46	20,58

Quibella [8] najlepšie výsledky vtedy, keď reakčné časy  $R_i$  sú v časovom intervale 10—40 minút. Podľa A. Dorfmana [1] má byť reakčný čas  $R_i$  menší než 20 minút. Reakčné časy skúšaných včelích jedov spĺňali obidve uvedené podmienky.

## Súhrn

Stanovila sa hyaluronidázová aktivita 7 druhov včelieho jedu, ktoré sa líšili dobou zberu, za použitia viskozimetrickej metódy. Aktivita včelích jedov bola v priemere 3,5 krát vyššia než aktivita štandardnej testikulárnej hyaluronidázy (farmaceutický preparát firmy Biogena, Praha). Skúšané vzorky včelích jedov sa líšili v aktivite od 16 % do 42 %.

## АКТИВНОСТЬ ГИАЛУРОНИДАЗЫ У РАЗНЫХ ВИДОВ ЯДА ПЧЕЛ

Б. ДУЛОВИЧОВА, О. МАРКОВИЧ

Кафедра органической химии и биохимии Естественного факультета  
Университета имени Коменского в Братиславе

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук в Братиславе

Была определена активность семи видов пчелиного яда, которые отличались периодом уборки, применением вискозиметрического метода. Активность ядов пчел была в среднем 3,5 раза выше чем у стандартной тестикулярной гиалуронидазы (фармацевтический препарат фирмы Биогена, Прага). Испытуемые образцы ядов пчел отличались в активности от 16 до 42 %.

Поступило в редакцию 21. 9. 1961 г.

## AKTIVITÄT DER HYALURONIDASE BEI VERSCHIEDENEN ARTEN VON BIENENGIFT

В. ДУЛОВИЧОВÁ, О. МАРКОВИЧ

Lehrstuhl für organische Chemie und Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
an der Komenský-Universität in Bratislava

ČSAV, Chemisches Institut an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften  
in Bratislava

Unter Anwendung der viskosimetrischen Methode wurde die Hyaluronidase-Aktivität bei 7 Arten von Bienengiften bestimmt, welche sich durch den Zeitpunkt der Sammlung unterschieden. Die Aktivität der Bienengifte war im Durchschnitt 3,5 mal höher als bei der Standard-Testikularhyaluronidase (pharmazeutisches Präparat der Fa. Biogena, Praha). Die geprüften Proben von Bienengiften unterschieden sich von einander hinsichtlich ihrer Aktivität um 16 bis 42 %.

In die Redaktion eingelangt den 21. 9. 1961

## LITERATÚRA

1. Dorfman A., J. Biol. Chem. 172, 377 (1948). — 2. Duran—Reynals F., Science (Lancaster) 83, 286 (1936). — 3. Habermann E., Biochem. Z. 329, 1 (1957). — 4. Habermann E., Neumann W., Biochem. Z. 328, 465 (1957). — 5. Habermann E.,

Neumann W. P., Neumann W., Naturwiss. 43, 84 (1956). — 6. Chain E., Duthie E. S., Brit. J. Exp. Path. 21, 324 (1940). — 7. Lamparter W., Inaug. Diss., Würzburg 1954. — 8. Madinaveitta J., Quibell T. H. H., Biochem. J. 34, 625 (1940). — 9. McClean D., Hale C. W., Biochem. J. 35, 159 (1941). — 10. Markovič O., Molnár L., Chem. zvesti 8, 80 (1953). — 11. Markovič O., Rexová L., Celoštátny biochemický sjazd Československej spoločnosti biochemickej, Praha, september 1957.

Do redakcie došlo 21. 9. 1961

*Adresa autorov:*

*Prom. chem. Blanka Dulovičová-Böhmová, Piešťany, Biochemické laboratórium Štátnych kúpeľov.*

*Inž. Oskar Markovič, prom. farm., Piešťany, Výskumný ústav reumatických chorôb.*