

## STANOVENIE AKTIVITY $\beta$ -GLUKURONIDÁZY V ŽALÚDOČNEJ ŠTAVE SLIMÁKA ZÁHRADNÉHO (*HELIX POMATIA*)

V. ŠTOLC, L. MIKULAJ

Endokrinologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Kyselina glukurónová je dôležitou detoxikačnou látkou ľudského a zvieracieho organizmu. S množstvom látok vytvára najmä v pečeni nejedovaté glukuronidy [1, 2]. Pre biochemické stanovenie týchto látok je potrebné rozrušiť väzbu s kyselinou glukurónovou a získať látku v pôvodnej forme. Najvýhodnejšia na tento účel je hydrolýza enzýmom  $\beta$ -glukuronidázou, pretože kyslá alebo alkalickej hydrolýza môže sledované látky čiastočne deštruovať. Enzymatická hydrolýza  $\beta$ -glukuronidázou nemá deštrukčné vlastnosti a umožňuje vykonávať hydrolýzu kvantitatívne, jednoducho a špecificky.

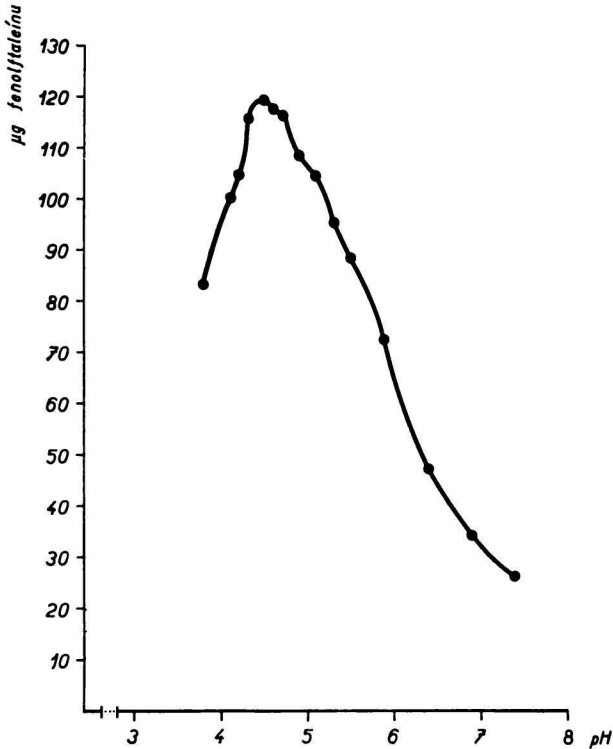
$\beta$ -glukuronidáza sa nachádza v rôznych orgánoch živočíchov, v rastlinách a baktériách [3, 4, 5]. Purifikovaná  $\beta$ -glukuronidáza dovážaná zo zahraničia má vysokú cenu, a preto je mnohým pracoviskám nedostupná. Dá sa však získať jednoduchou cestou z prírodných zdrojov. U nás najprístupnejším zdrojom je slimák záhradný (*Helix pomatia*), ktorý má vo svojej žalúdočnej štave okrem iných enzýmov [6] aj enzým  $\beta$ -glukuronidázu, a to vo vysokej koncentrácii. Bližšie údaje o pestovaní slimáka záhradného a získavaní žalúdočnej šťavy sme uviedli v predchádzajúcej práci [7].

Princíp metódy na stanovenie aktivity  $\beta$ -glukuronidázy podľa Talalaya a spol. [8] je v tom, že fenolftaleín-glukuronid (F—G) za prítomnosti enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy sa hydrolyzuje na kyselinu glukurónovú a fenolftaleín. Fenolftaleín v alkalickej prostredí dáva charakteristické zafarbenie s maximom intenzity pri 550 m $\mu$ . Jednotka aktivity  $\beta$ -glukuronidázy je definovaná množstvom enzýmu, ktoré je schopné uvoľniť 1 mikrogram fenolftaleínu z fenolftaleín-glukuronidu za 1 hodinu v špecifických podmienkach.

### Experimentálna časť

Stanovenie aktivity  $\beta$ -glukuronidázy v žalúdočnej štave slimáka záhradného sme vykonali podľa metódy Talalaya a spol. [8], ktorú sme upravili v tom, že sme miesto 4,5 ml reakčného prostredia inkubovali iba v 1,5 ml tlmivého roztoku. Ďalej pre stanovenie aktivity sme nenechali inkubovať celú jednu hodinu, ale iba 30 minút. Hydrolýza F—G pri 38 °C prebieha totiž lineárne, takže dobu inkubácie možno o polovicu skrátiť. Výsledok treba prepočítať na celú hodinu. Ďalšiu zmenu sme urobili v tom, že sme použili rozdielnu koncentráciu substrátu. Talalay a spol. používajú 0,001 M konc. F—G. Zistili, že vyššia koncentrácia substrátu inhibuje aktivitu enzýmu. Používali však  $\beta$ -glukuronidázu, ktorú získali z viacerých myších slezín, pečeni a obličiek. Pri sledovaní aktivity  $\beta$ -glukuronidázy získanej z tráviaceho traktu slimáka záhradného sme zistili, že ani 0,003 M koncentrácia F—G neznižuje aktivitu, práve naopak množstvo uvoľneného fenolftaleínu je ešte vyššie. Za optimálnu považujeme 0,0015 M konc. F—G, keď 10 % zvýšenie alebo zníženie koncentrácie substrátu pri 38 °C zapríčini ±1,5 % chybu v kon-

centrácii uvoľneného fenolftaleínu. Pretože niektorí autori uvádzajú rôzne optimálne pH pre aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy získanej z mäkkýšov [9, 10, 11], preskúmali sme tento parameter reakcie. Zistili sme, že pH 4,5 je optimálne pre priebeh hydrolyzy (graf 1).



Obr. 1. Vplyv pH na množstvo uvoľneného fenolftaleínu.

Reagencie:

1. glycinový tlmivý roztok 0,2 M, pH 10,4,
2. fenolftaleín-glukuronid 0,0045 M,
3. 0,05 % roztok žalúdočnej šťavy v octanovom tlmivom roztoku 0,15 M, pH 4,5,
4. štandardný roztok fenolftaleínu 2,0 mg %. Pripraví sa riedením 0,1 g % roztoku fenolftaleínu redestilovanou vodou.

#### Pracovný postup

K 1,0 ml roztoku žalúdočnej šťavy sa pridá 0,5 ml roztoku fenolftaleín-glukuronidu a nechá sa inkubovať 30 minút pri teplote 38 °C. Potom sa pridá 5,0 ml glycinového tlmivého roztoku. Zafarbenie fenolftaleínu sa odčíta pri 550 m $\mu$  na fotometri oproti glycinovému tlmivému roztoku.

Z kalibračnej krivky, ktorá sa zostrojí zmiešaním príslušnej koncentrácie fenolftaleínu s glycinovým tlmivým roztokom, odčítajú sa  $\mu$ g uvoľneného fenolftaleínu a prepočítajú na 1,0 ml žalúdočnej šťavy.

V našich sledovaniach sme nachádzali aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy v žalúdočnej šťave slimáka záhradného priemerne okolo 130 000 jednotiek v 1,0 ml šťavy. Aktivita šťavy, ktorá je uskladnená v chladničke, mení sa za jeden rok iba nepatrne.

### Diskusia

Výskyt  $\beta$ -glukuronidázy v mäkkýšoch je dnes dobre známy. Cieľom našej práce bolo však preskúmať aktivitu  $\beta$ -glukuronidázy, ktorú sme získali z našich prírodných zdrojov, a zistiť tak možnosť jej použitia v biochemickej praxi. Na našom pracovisku totiž používame  $\beta$ -glukuronidázu, ktorá sa nachádza v šťave slimačích žalúdkov, na štiepenie steroidných glukuronidov a na hydrolýzu glukurónových konjugátov hormónov štítnej žľazy. Pre tieto biochemické stanovenia je použitie nepurifikovanej slimačej  $\beta$ -glukuronidázy výhodné aj preto, lebo v žalúdočnej šťave sa nachádza aj enzým sulfatáza [6], ktorý zasa štiepi konjugáty týchto látok s kyselinou sírovou.

*Za technickú spoluprácu ďakujeme E. Štolcovej.*

### Súhrn

Metódou, ktorá používa ako substrát fenoltaleín-glukuronid, sme našli v 1,0 ml žalúdočnej šťavy slimáka záhradného (*Helix pomatia*) priemerne 130 000 jednotiek enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ $\beta$ -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ (*HELIX POMATIA*)

В. ШТОЛЦ, Л. МИКУЛАЙ

Эндокринологический институт Словацкой академии наук  
в Братиславе

### Выводы

По методу, в котором был применен в качестве субстрата фенолфталеин-глюкуронид определено, что в 1,0 мл желудочного сока виноградной улитки содержится в среднем 130 000 единиц энзима  $\beta$ -глюкуронидазы.

Поступило в редакцию 25. 2. 1958 г.

### BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER $\beta$ -GLUCURONIDASE IM MAGENSAFT DER WEINBERGSCHNECKE (*HELIX POMATIA*)

V. ŠTOLC, L. MIKULAJ

Endokrinologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

### Zusammenfassung

Mittels einer Methode, bei welcher als Substrat Phenolphthalein-Glucuronid verwendet wird, fanden die Autoren in 1,0 ml des Magensafts der Weibergschnecke (*Helix pomatia*) durchschnittlich 130 000 Einheiten des Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase.

In die Redaktion eingelangt den 25. 2. 1958

## LITERATÚRA

1. Cameron C. B., Brit. Med. Bull. 13, 119 (1957). — 2. Béraud T., Scazziga B. R., Vannotti A., Acta Endocr. 22, 55 (1956). — 3. Buehler H. J., Katzman P. A., Doisy P. P., Doisy E. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 297 (1949). — 4. Billett F., Biochem. J. 57, 159 (1954). — 5. Levvy G. A., McAllan A., March C. A., Biochem. J. 69, 22 (1958). — 6. Jarrige P., Henry R., Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 872 (1952). — 7. Mikulaj L., Štolc V., Brat. lek. listy 38, 456 (1958). — 8. Talalay P., Fishman W. H., Huggins C., J. Biol. Chem. 166, 757 (1946). — 9. Romanoff L. P., Wolf R. S., Constandse M., Pincus G., J. clin. Endocr. 13, 928 (1953). — 10. Stitch S. R., Halkerston I. D. K., Nature 172, 398 (1953). — 11. Marsh C. A., Levvy G. A., Biochem. J. 68, 610 (1958).

Do redakcie došlo 25. 2. 1958

*Adresa autorov:*

*Viktor Štolc, prom. farmaceut, dr. Ladislav Mikulaj, Bratislava, ul. Obrancov mieru 1/a, Endokrinologický ústav SAV.*