

## O SVOJSTVIMA NEKIH TOKSIČNIH PROTEINA\*

N. MUIĆ

*Toksini zmiје Vip. ammodytes a. i pauka Latrodectus tredecimguttatus Rossi*

*Škola narodnog zdravlja »Andrija Stampar«, Medicinski fakultet Zagreb  
(Priljeno 15. III. 1959.)*

1. Toksični proteini otrova Vip. ammodyt. a. mogu se u toku filtracije iz vodenih otopina adsorbirati na filtru u značajnim količinama. Antigena struktura toksina u filtratu može se smatrati izmijenjenom.
2. Otrov Vip. ammodyt. a. pokazuje u Oudinovu testu tri precipitaciona prstena, pa sadržava prema tome 3 antigena.
3. U vodi netopljivi proteinski talog toksina Vip. ammodyt. a. može se pročistiti precipitacijama iz vodene otopine, pa pokazuje svojstva netoksične čiste proteinske supstance.
4. Toksin Vip. ammodyt. a. sastoji se iz najmanje sedam proteinskih komponenta, koje pri elektroforezi pokazuju različitu elektroforetsku pokretljivost.
5. U pokusima titracije imunog seruma s toksinom Vip. ammodyt. a., upotrebljavajući hemolizu eritrocita ili 50% smrtnost miševa kao indikator za točku neutralizacije, dobiveni su isti rezultati. Iz te činjenice može se zaključiti, da su toksičnost za miševе i hemolitička aktivnost toksina Vip. ammodyt. a. svojstva iste proteinske supstance.
6. Flokulaciona krivulja toksina i antitoksina pokazuje maksimum turbiditeta u točki neutralizacije toksina. Ti se rezultati slažu s onima iz pokusa neutralizacije hemolizom i titracije seruma otrovom na životinjama.
7. Elektroforezom toksina Latrodectus tredecimguttatus Rossi utvrđeno je, da se toksin sastoji iz šest proteinskih komponenta.
8. Izvršena je elektroforetska analiza priređenog imunog seruma protiv otrova pauka Latrodectus t. R.

Govoreći o toksinima opisać ću bitna svojstva samo onih, koji se mogu smatrati proteinima, a karakterizirani su time, što pokazuju opće reakcije na proteine (1, 2).

Neki od njih, koji su izolirani precipitacijama ili drugom kojom preparativnom metodom, pa ispunjavaju fizikalno-kemijske uvjete homo-

\* Habilitaciona radnja, Zagreb 1958.

genosti, mogu se smatrati za čiste proteinske supstance. Proteinski toksini su topljivi u vodi ili, ukoliko su globulinskog karaktera, u razrijeđenim otopinama anorganskih soli; oni nisu topljivi u organskim otapalima, a da se pritom ne denaturiraju, a iz vodenih otopina mogu se taložiti s amonijevim sulfatom, natrijevim sulfatom ili natrijevim kloridom. Zagrijavanjem oni se denaturiraju, a proteolitički encimi ih rastvaraju. Pri dijalizi ne prolaze kroz membranu, a imunološki ih, budući da u tijelu životinje proizvode antitijela, treba smatrati antigenima. Mnogi proteini, primijenjeni u eksperimentu u većim količinama, mogu biti toksični, a granica toksičnosti za prave toksine nije do sada sporazumno utvrđena, ali se može prihvatiti prijedlog W. E. Heyningena, da se toksinom ima smatrati onaj protein, koji djeluje toksično na životinju, u količini, koja je manja od jedne milijuntine težine eksperimentalne životinje. Princip ne zadovoljava potpuno, jer je poznato, da su toksini različito otrovni prema vrsti životinje upotrebene za eksperiment. Tako je toksin difterije kudikamo otrovniji za zamorca nego za miša, a kobrin otrov je otrovniji za konja nego za psa (3).

Neki od toksina mogu biti i encimi (4), pa mogu pokazivati svojstva encima, kao na pr. Crototoxin, koji je izoliran iz otrova *Crotalus t. t.* ili Alfa toksin *Clostr. welchii*. No to nije redovno. Znamo, da u mnogo slučajeva neki toksin inhibira jedan ili više enzima u eksperimentu *in vitro*, ali mi ne možemo iz toga izvesti zaključak, da je ta inhibicija jedan od važnih uzroka za opći izgled toksičnog efekta na živom organizmu. Dakako, da se supstrat nekog toksičnog enzima mora nalaziti u životinji, na koju on djeluje toksično, tako na pr. ureaza je toksična samo za one životinje, koje imaju ureu u krvi. S druge strane, kad se govori o toksičnoj prirodi toksina uopće, treba imati na umu, da se toksini obično razaraju u životinjskom probavnom traktu, pa je to razlog, da su toksični proteini otrovni za životinje samo uz parenteralnu primjenu.

#### *Imunološka svojstva*

Gotovo svi proteini, pa tako i toksični, pokazuju svojstva dobrih antigena. Toksini induciraju proizvodnju antitijela, antitoksina u životinjskom organizmu, pa su tako zmijski otrov *Vip. ammodytes a.* i otrov pauka *Latrodectus tredecimguttatus* dobri antigeni, te se protiv njih životinje mogu zaštititi aktivnom ili pasivnom imunizacijom. Ti toksini pokazuju običajne imunološke reakcije kao što je neutralizacija imunim serumom *in vivo*, pa flokulacija ili precipitacija *in vitro*. Osim toga ti toksini imaju opća svojstva proteina, dakle i onih netoksičnih, da, uneseni u živi organizam, parenteralno taj specifični senzibiliraju. U tom slučaju druga doza toksina može biti toksična za životinju, bez obzira na prirodu antigena, koji sam može inače biti i netoksičan. To vrijedi osobito za toksin *Vip. ammodytes a.*, koji izaziva tipične alergične pojave (5).

### *Razdioba toksičkih proteina*

Toksične proteine možemo razdijeliti u tri velike grupe: to su životinjski toksini, fitotoksini, kao što je ricin, i bakterijski toksini. Jednu od velikih grupa čine zmijski toksini, kojoj pripada otrov *Vip. ammodytes* a., našega poskoka, čiji ćemo otrov posebno opisati.

Od 2300 specijesa zmijski u svijetu ima ih oko 600, koje imaju otrovne žlijezde, a samo 150, koje su pogibeljne za čovjeka. Otrovnice su zoološki raspoređene u 6 familija: Colubridae, Hydrophidae, Amblycephalidae, Elapidae, Crotalidae i Viperidae. Familija Viperidae ima 15 genera i 69 specijesa. U tu familiju ubraja se i poskok *Vip. ammodytes* a.

### *Farmakološko djelovanje zmijskih toksina*

Zmijski su otrovi u onom obliku, u kojem ih dobivamo od životinja, smjese toksičnih i netoksičnih bjelančevina te malih količina organskih spojeva i anorganskih soli u različitim omjerima. Samo neke blize zoološke grupe zmijski pokazuju izvjesne sličnosti u sastavu toksina. Ipak, pojedini individuumi istoga specijesa znaju često pokazivati manje razlike u sastavu otrova, i to prema godišnjoj dobi, u kojoj je otrov vađen, i prema kraju, iz kojega reptil potječe. Prema svome farmakološkom djelovanju mogu se otrovi podijeliti u tri glavne grupe (6, 7, 8). U prvu grupu pripadaju toksini, koji pretežno djeluju na periferni živčani sistem, a simptomi trovanja kod životinje nalik su na simptome kod trovanja otrovom kurare. Oni na mjestu ugriza ne pokazuju znatnih promjena u tkivu, pa slabo djeluju na krvnožilni sistem. Druga grupa su otrovi, koji djeluju uglavnom na krvnožilni sistem (takvih toksina ima u svakoj od tri glavne grupe zmijski Elapida, Viperida i Crotalida), a treće su toksini, kojih je djelovanje karakterizirano jakim hemolizom, koji proizvode hemoragije i djeluju histolički, proizvodeći nekroze. Zmijski obitelji Crotalidae pripada ovoj grupi. Otrovi Elapidae razlikuju se nešto u djelovanju prema kraju iz kojeg primjerci potječu, pa se kaže, da toksini indijskih otrovnica pokazuju tipično kurarinsko djelovanje, dok je djelovanje australskih otrovnica atipično i sličnije djelovanju nekih kvarternih amonijevih baza.

Otrov *Naja* haje paraliza poprečno prugasti mišić i motorne pločice živca. Taj otrov paralizira živčane završetke, ali ne i nervna vlakna. Otrovi djeluju na neuromuskularnu vezu i na mišić. Postavljena je hipoteza, da je holinesteraza, koja se nalazi u otrovima Elapida, odgovorna za djelovanje tih otrova. Međutim se čini, da to nije točno, jer ni holinesteraza ne djeluje u pokusu slično kurarinu, a koncentrirani otrovi, u kojem je uništena holinesteraza, djeluje i dalje neurotoksično. Moguće je, kako tvrde *Ghosh, Sarkar* (9), *De, Chatterjee*, da je faktor, koji inhibira glikolizu, u isto vrijeme i onaj, koji inhibira sintezu acetilholina. Sve tri grupe, Elapidae, Viperidae i Crotalidae, pokazuju djelovanje na periferni vaskularni sistem. Ti otrovi smanjuju snažno krvni tlak i uzro-

kuju tahikardiju. U pokusima perfuzijom unutarnjih organa trovanih životinja dokazano je, da se oslobađa histamin iz tkiva, a drži se, da je tome uzrok lizocitin (lizolecitin). Međutim su *Feldberg, Holden i Kellaway* (10) našli, da u organizmu polagano djeluje još jedna supstanca, S. R. S., nazvana »Slow reacting substance«, koja snažno kontrahira ileum zamorca. Uzevši u obzir, da iz serumskih proteina nastaju pod utjecajem otrova raspadni produkti bjelančevina, kao što na pr. djelovanjem otrova *Bothrops jararace*, a i drugih otrova nastaje polipeptid bradykinin (11), možemo kazati, da su za opći efekt trovanja zmijskim toksinima odgovorni i pod utjecajem ovih samih toksina nastali raspadni produkti tkivnih i serumskih bjelančevina.

Otrov *Naja haje*, koji slabo snižava krvni tlak, djeluje i na srce i zaustavlja ga u dijastoli, dok otrovi *Viperidae*, pa i *Vip. ammodytes* a. snižava krvni pritisak, a zaustavlja srce u sistoli.

Treća grupa zmijskih otrova je karakterizirana hemoragijama, što ih oni proizvode u tijelu trovane životinje. Ti toksini oštećuju endotel krvnih kapilara i po cijelom tijelu, pa i u moždanoj kori. Ti otrovi u velikoj koncentraciji sprečavaju koagulaciju, dok u slabim koncentracijama ubrzavaju koagulaciju krvi.

*Ganguly S. N.* tvrdi, da otrov *Vip. russelli* uzrokuje oslobađanje trombokinaze, pa prema tome ubrzava koagulaciju krvi. Međutim, često proteolitički encimi iz zmijskih otrova u velikoj koncentraciji otapaju fibrinske niti, probavljaju protrombin i fibrinogen i zato djeluju kao antikoagulansi. Noviji radovi *Quivyja, Devia, Bose, Sarkara* (12) iznose rezultate, prema kojima se vidi, da je pitanje koagulacije krvi zmijskim toksinima problem, koji se zapravo nalazi u stanju rješavanja.

#### *Encimi u zmijskim otrovima*

Razmjerno velik broj encima nađen je u zmijskim otrovima. *E. A. Zeller* (13) misli, da u općem sindromu, što ga izazivaju zmijski toksini na ugrizenoj životinji, ti encimi imaju određenu ulogu. Uzevši u obzir, da su toksini sekreti žlijezda, koje odgovaraju glanduli parotis, može se smatrati, da je toksin zapravo sekret, kojemu je osnovna namjena bila probava žrtve. Sigurno najveća grupa encima zmijskih toksina su esterase, i to fosfatidaze, a od njih fosfatidaza A pa C, ali ne i B, zatim fosfodiesteraze, 5-nukleotidaza, adenzin, trifosfataza i ofioholinesteraza. *Delezenne i Ledebt* (1911) utvrdili su, da zmijski otrovi cijepaju iz lecitina oleinsku kiselinu, a lizoleticin, koji tako nastaje, hemolizira oprane eritrocite. Fosfatidaza A je prisutna, koliko je dosad poznato, u svim zmijskim otrovima. Izuzetno otrov *Bothrops alternata* sadržava i fosfatidazu C, koja cijepa lecitin u diglicerid i fosfoholin. Fosfatidaza B, koja iz lizofosfatida oslobađa zasićenu masnu kiselinu sa B položaja, nađena je dosad samo u otrovu osa, ali ne i u zmijskim toksinima. Kao i lecitinazu A, tako svi dosad ispitani zmijski otrovi sadržavaju i fosfo-

diesteraze. Te se diesteraze razlikuju od drugih, kao što je na pr. ona iz *Aspergillus oryzae*, time, što im je optimum djelovanja kod pH 8,5, dok je pH posljednjih 5,5. R. O. Hurst i G. C. Buttler uspjeli su odvojiti fosfodiesterazu iz otrova *Vip. russelli* od 5-nukleotidaze (14). Taj encim cijepa adenilnu kiselinu u adenzin i fosforu kiselinu, a aktiviraju ga ioni magnezija i kobalta, dok ga inhibira imuni serum, pa ioni nikla i cinka. Važno je istaći, da svi dosad ispitani zmijski toksini sadržavaju adenzin trifosfatazu, koja cijepa adenzin trifosfat u adenzin monofosfat i pirofosfat. Takav tok reakcije stvarno može imati veliku ulogu u procesu trovanja. Ofiolinesterazu sadržavaju uglavnom otrovi Elapidae, dok se ona ne nalazi u toksinima Viperidae. Ta se holinesteraza razlikuje od oba poznata tipa iz krvi s i e holinesteraze, jer ona djeluje na metilbutirat, atilacetat, tributirin, pa na acetyl metilholin. Zmijski toksini sadržavaju i jednu karbohidrazu, hijaluronidazu, nazvanu ponekad i invazin ili spreading factor. Taj encin uzrokuje penetraciju otrova u tkivu cijepajući hijaluronsku kiselinu.

Proteinaze zmijskih toksina djeluju slično tripsinu, pa im je optimalni pH od 7-8,2, prema vrsti zmija. Ipak, oni nisu identični s tripsinom, jer sami zmijski toksini inhibiraju djelovanje tripsina. Mnogi otrovi, kao toksin *Vip. russelli*, sadržavaju i polipeptidazu, karboksipeptidazu i dipeptidazu. Ovi proteolitički encimi utječu na koagulaciju krvi, i to jedni poput tripsina, pretvarajući protrombin u trombin, a drugi kao papain, djelujući izravno na fibrinogen. Otrov poskoka cijepa i protrombin, a i fibrinogen. Promjenu boje krvi kod ujedjenih životinja proizvodi vrlo vjerojatno katalaza. Pretvaraje hemoglobina u methemoglobin ne sprečava ni antitoksin. Gotovo svi zmijski toksini, pa i toksin *Vip. ammodytes a.*, su žućkasti. Ta žuta boja potječe od flavina, kako je to utvrdio T. P. Singer i E. B. Kearney (15). Denaturacijom izolirane ofio L amino kiselinske oksidaze može se odcijepiti prostetička grupa, koja je kod toga encima flavin-adenin-dinukleotic. Primijećeno je, da zmijski otrovi sadržavaju još jednu supstancu, koja pri dijalizi ne prolazi kroz celofansku membranu, ali koju razara pepsin, i u pokusu s ekstraktom mišića inhibira glikolizu. Tako su inhibirane dehidrogenoze mliječne i jabučne kiseline. Poznato je, da otrov kobre inhibira sistem citobrom-citobrom-oksidaze.

## EKSPERIMENTALNI DIO

### *Toksin Vip. ammodytes a.*

Držim, da ima više razloga, zbog kojih zmijski toksin poskoka, *Vip. ammodyt. a.*, zaslužuje naročitu pažnju. Poskok je naša najopasnija otrovnica. Imuni serum proizveden ovim toksinom predstavlja lijek protiv zmijskog ujeda, ne samo poskoka, nego i ridovke, dviju najopasnijih

zmija velikog dijela evropskog kontinenta. Taj je toksin smjesa toksičnih proteina, pa je za imunokemijska istraživanja izvor biološki veoma aktivnih bjelančevina. To je važan faktor za kontrolu ispravnosti kemijskih radova pri izolaciji čistih proteina. Međutim su ovi radovi (16) imali i jednu praktičnu svrhu: da boljim upoznavanjem fizikalnih i kemijskih svojstava ovog toksina riješimo pitanje, nije li promjenljiv uspjeh u imunizaciji životinja ovim toksinom, pa i njegovo nesigurno biološko djelovanje, u vezi s time, što taj toksin sadržava neke biološki aktivne komponente, koje se možda u toku preparativnog rada djelomično ili potpuno gube.

#### *Opća svojstva toksina upotrebljenog za pokuse*

Otrov Vip. ammodyt. a., koji smo upotrebili za naše pokuse, sabran je od oko 100 živih zmija. Žućkasta, gusta tekućina sušena je 3 sata kod 37° na suhom zraku. U kasnijim pokusima frakcioniranja otrov je otopljen u destiliranoj vodi, centrifugiran i liofiliziran. Tako dobiveni otrov otapa se dobro u 0,9% - otopini natrijeva klorida, ali već u destiliranoj vodi ostavlja proteinski talog, koji se dijalizom vodene otopine otrova još povećava. Dijalizirani otrov, koji je centrifugiranjem oslobođen u vodi netopljivog proteinskog taloga, a potom liofiliziran, poslije nekoliko mjeseci stajanja pokazuje, da se u krutom otrovu ponovo stvorila netopljiva proteinska supstanca.

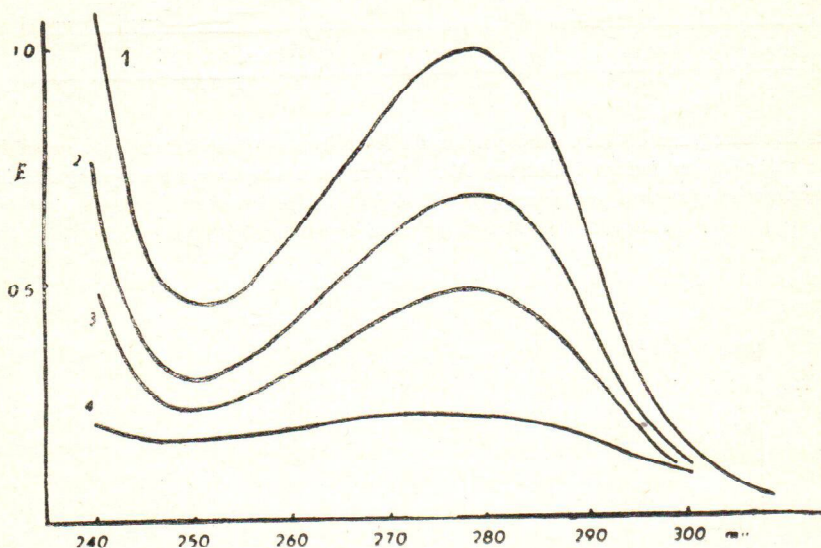
Za sve naše pokuse upotrebljen je jedan prosječni uzorak toksina, koji je liofiliziran i sušen u visokom vakuumu kod 20°. Uz pretpostavku, da je potpuno suh, on je sadržavao 13,5% dušika i 4,2% sumpora.

Dosis letalis minima (D. L. M.) ovoga uzorka bila je 18 mikrograma za miša od 18-20 grama. Za dosis letalis minima smatramo onu količinu otrova, koja otopljena u sterilnoj 0,85% - otopini natrijeva klorida i dana intravenozno bijelom mišu (18-20 grama) ubija miša za 8-24 sata. Za ovaj test upotrebljavano je redovno 10 bijelih miševa, a test držim aproksimativnim i orijentacionim. LD 50 našega uzorka toksina bila je 16 mikrograma za miša od 18 grama. Pod LD 50% smatramo onu količinu otrova, koja ubija 50% miševa u toku od 48 sati. Za svako serijsko razređenje otrova uzeto je 12 miševa. Za jedan pokus ukupno 54 životinje. Otrovi su injicirani u repnu venu miša u 0,25 ml 0,85% - natrijeva klorida.

Za titraciju imunog seruma toksinom poskoka upotrebljeno je za svako serijsko razređenje seruma 5 grupa po 6 životinja, i to samo muških (16-18 grama), ukupno 174 životinje za jedan eksperiment. Smjese imunog seruma i otrova bile su injicirane u 0,5 ml fiziološke otopine natrijeva klorida u repnu venu životinje. Životinje su promatrane 48 sati.

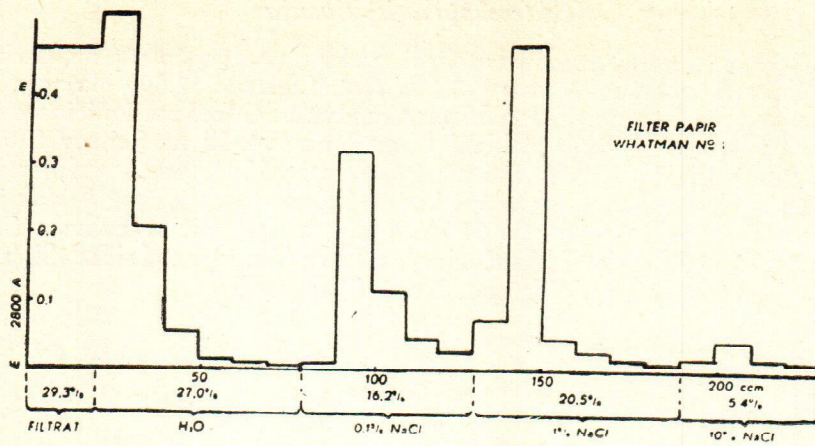
*Spektroskopska ispitivanja*

Ponajprije je određen apsorpcijski spektar u ultravioletu na Beckmanovu spektralnom fotometru, 0,1% centrifugirane 17.000 okretaja u minuti vodene otopine toksina Vip. ammodyt. a. Određena količina ove otopine filtrirana je kroz stakleni filter Jena G 4, ili na Seitzov filter (1 gram). Stakleni filter je prema koncentraciji proteina u filtratu, određenoj ekstincijom ove otopine kod 280 m $\mu$ , propustio 69,2%, dok je Seitzov filter jedva propustio 21,7% bjelančevina. Bjelančevine u filtratu poslije adsorpcije bjelančevina na filtru bile su netoksične. Sličan pokus je načinjen i sa Whatman Nr. 1 filter papirom.

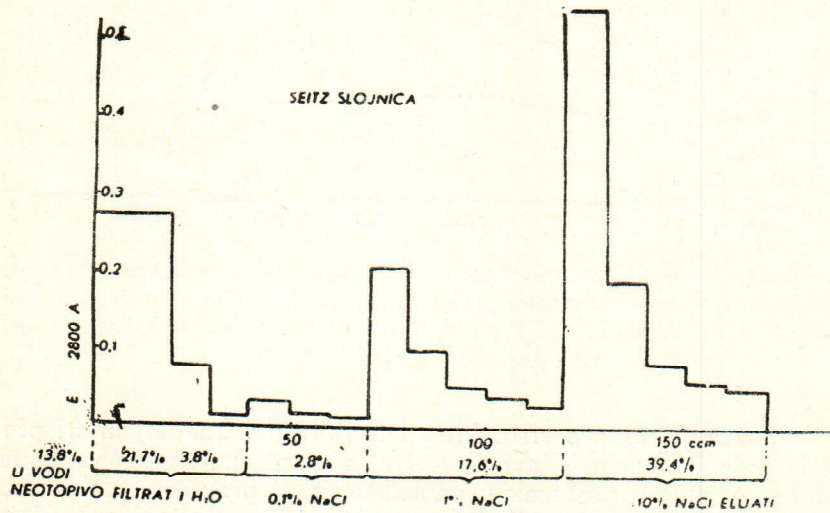


Sl. 1. Adsorpcijski spektri u ultravioletu: 1. Centrifugiranje 0,1%-otopine otrova Vip. ammodyt. a.; 2. filtrata ove otopine poslije adsorpcije na staklenom filtru G 4 Jena; 3. filtrata poslije adsorpcije na Whatman Nr. 1 filter papiru; 4. filtrata poslije adsorpcije na Seitzovoj slojnici.

Sl. 1 pokazuje, da sve vrste filtra adsorbiraju u znatnoj mjeri proteine iz vodenih otopina. Kako je filtracija razredjenih vodenih otopina bjelančevina običan postupak u imunokemijskoj praksi, a selektivnom adsorpcijom biološki aktivnih komponenata toksina promijenio bi se antigeni sastav proteinske smjese, mene je interesirala mogućnost postepene elucije adsorbiranih proteina s otopinama neutralnih soli, i to naročito iz papira Whatman Nr. 1 i Seitzovih slojnica (E K Nr. 1011). Načinjena su dva pokusa i kromatografirana je određena količina otrova



Sl. 2. Kromatogram dobiven adsorpcijom 0,1%-vodene otopine otrova *Vip. ammodyt. a.* na stupcu filter papira Whatman Nr. 1 elucijom s otopinama natrijskog klorida. Aproximativni procenti proteina u pojedinim frakcijama izračunani su prema totalnoj ekstinkciji ( $E \times Vol.$ ) u vodi topljivog proteina

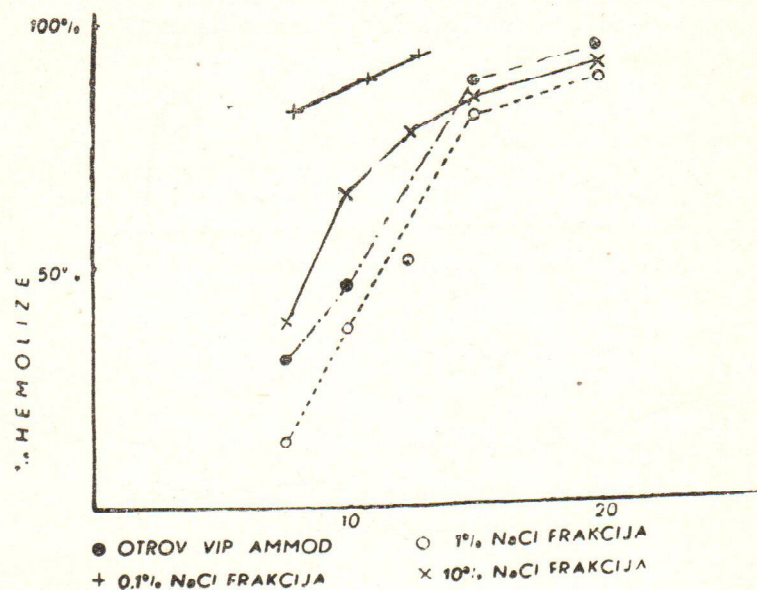


Sl. 3. Kromatogram dobiven adsorpcijom 0,1%-vodene otopine otrova *Vip. ammodyt. a.* na stupcu filter papira Whatman Nr. 1 elucijom s otopinama natrijskog klorida. Aproximativni procenti proteina u pojedinim frakcijama izračunani su prema totalnoj ekstinkciji ukupno sadržanih proteina u otrovu



na stupcu papirne kaše, načinjene iz 2 grama Whatman Nr. 1 papira, te na slojnici Seitz, teškoj 1 gram. Kromatogrami su razvijeni otopinama natrijeva klorida različite koncentracije.

Iz slika 2 i 3 vidi se, da sastav frakcija, dobivenih elucijom nekom određenom koncentracijom natrijeva klorida, nije istovetan u oba kromatografska pokusa, pa je vjerojatno i proteinski sastav ovih dvaju filtrata različit. No za nas je bila mnogo interesantnija razlika među samim frakcijama iz jednoga od ovih pokusa. Da bi se to utvrdilo, ispitana je hemolitička aktivnost ovih frakcija. Hemolitička aktivnost nekog zmijskog toksina može se iskazati količinom otrova, koja je potrebna da hemolizira neku određenu količinu eritrocita, suspendiranih u fiziološkoj otopini natrijeva klorida u određenim eksperimentalnim uvjetima, u određenom roku i kod određene temperature. Ako se primijeni metoda



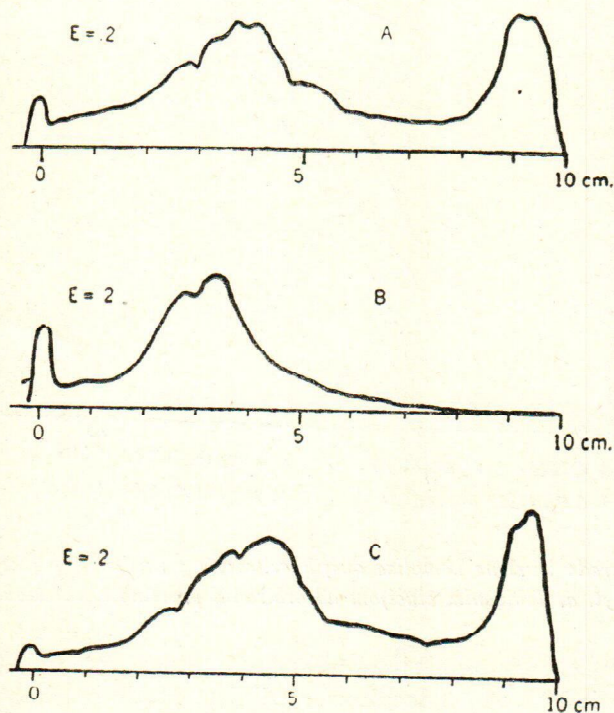
Sl. 4. Tok uporedo izvršene hemolize ovčjih eritrocita s različitim frakcijama otrova Vip. ammodyt. a. dobivenim elucijom adsorbiranih proteina na Seitzovoj slojnici

K. H. Slotte i G. Szyska (17), onda otrov V. ammodyt. a. pokazuje hemolitičku aktivnost od 30 lecitinaze jedinica. Međutim, kako su takva mjerenja u području 100%-hemolize veoma netočna, a povrh toga se eksperimentalno može lako utvrditi, da isti uzorci toksina u istim eksperimentalnim uvjetima, ali u različitim eksperimentima, vjerojatno zbog varijabilnih svojstava eritrocita, produciraju različite stepene hemolize,

primijenio sam metodu sličnu onoj, koju su preporučili *H. W. Euler* i *Swen Gard* (1931) (18), *E. Maltaner* i *F. Maltaner* (1935) (19) i *M. M. Paić* i *M. Chorokoff* (1938) (20). Na taj način isporučena je hemolitička aktivnost dobivenih frakcija s originalnim otrovom u jednom i istom pokusu, a hemolitička aktivnost neke frakcije izražena je omjerom koncentracija proteina originalnog otrova i neke frakcije, potrebnih da proizvedu 50% hemolizu određene količine eritrocita.

Na sl. 4 vidi se tok uporedno izvedene hemolize ovčjih eritrocita s različnim frakcijama otrova *Vip. ammodyt. a.*, dobivenim elucijom sa 0,1% i 10% otopinom natrijeva klorida. Hemolitička aktivnost ovih frakcija odnosi se prema aktivnosti originalnog otrova kao 1,9:0,8:1,2:1.

Iz ovih pokusa može se zaključiti: 1. Iz razrijeđenih vodenih otopina zmijskog toksina *Vip. ammodyt. a.* adsorbiraju se u različnim filtrima proteinske komponente samog toksina. 2. Antigena struktura toksičnih proteina u vodenoj otopini filtracijom je promijenjena.

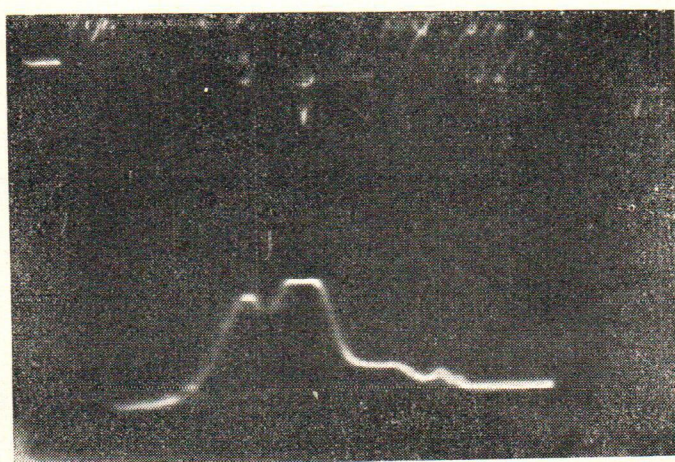


Sl. 5. Ekstincioni dijagram kromatograma na papiru razvijen otopinama  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  različnih koncentracija  $1 \times 10^{-3}$  do 1 M. A) Otrov *Vip. ammodyt. a.* B) Frakcija netopljiva kod niskih ionskih jakosti. C) Dio topljiv u vodi

*Kromatografija toksina Vip. ammodyt. a. na papirnoj traci*

U toku rada s toksinom poskoka izrađena je posebna metodika kromatografije proteina na papiru. Detalji ove metode objavljeni su u zasebnim publikacijama (21, 22, 23). Metoda se zasniva na selektivnoj adsorpciji proteina na papiru i na njihovoj različitoj desorpciji otopinama elektrolita različite ionske jakosti. Smjese proteina se nanese na papirnu traku u obliku uske poprečne pruge. Kromatogram se razvija nizom progresivno sve koncentriranijih otopina soli ili pufera. Kontinuiranim gradijentom ionske jakosti, koji tako nastaje na traci, postiže se bolje razdvajanje proteina nego elucijom s otopinom neke određene koncentracije soli na papirnoj koloni. Proteini se na papirnoj traci zatim fiksiraju otopinom Hg Cl<sub>2</sub> i oboje bromfenolskim plavilom.

Sl. 5 prikazuje dijagram ekstinkcija kromatograma razvijenih na otopinama natrijeva fosfata različnih koncentracija od  $1 \times 10^{-3}$  M – 1M. Iz ovog dijagrama već se lijepo vidi sastav proteinske smjese toksina Vip. ammodyt. a. Ovaj raspored komponenata mnogo je pregledniji na elferogramima.



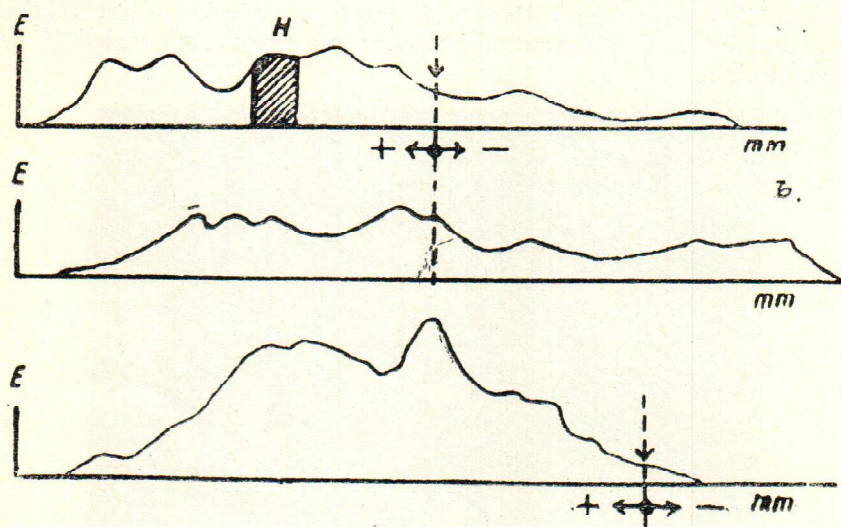
Sl. 6. Elektroforeza otrova Vip. ammodyt. a. Početno stanje i smjer kretanja proteinskih komponenata označeni su strelicom. Fosfatni pufer pH 6,2;  $I = 12,3$  mA,  $U = 198$  V;  $E = 5$  V/cm;  $c = 5\%$  t/v. Trajanje elektroforeze 180 minuta

*Elektroforetska ispitivanja toksina Vip. ammodyt. a.*

Otrov poskoka analiziran je slobodnom elektroforezom prema A. Tiseliusu u fosfatnom puferu pH 6,2, na aparaturi prema Wiedemannu (24). Na sl. 6 može se razlikovati najmanje sedam komponenata, koje pri elektroforezi pokazuju različite brzine putovanja.

Iste rezultate postignuli smo i elektroforezom na papiru u veronal-skrom puferu pH 8,6 (sl. 7). Rezultati naših ispitivanja slažu se razmjerno dobro s rezultatima *Grassmanna* i *Hanniga* (25).

Ali rastavljanje proteinskih komponenata toksina elektroforezom na papiru u otopini fosfatnog pufera pH 7,2 ne uspijeva tako dobro kao rastavljanje u natrijevu barbituratu pH 8,6, no ovim smo postupkom uspjeli dobro izolirati jednu novu komponentu otrova P (sl. 8). Ova supstanca dobro adsorbira bromfenol plavilo, ali se slabo da fiksirati na papirnoj traci otopinom merkuri klorida ili sušenjem kod 100° C. Ta komponenta ne hemolizira ovčje eritrocite ni nakon 24 sata stajanja reakcione smjese. Sudeći prema ovim svojstvima ona je vjerojatno identična sa supstancom, koja zaostaje u filtratu vodene otopine otrova poslije adsorpcije toksičnih proteina na papirnom filtru.

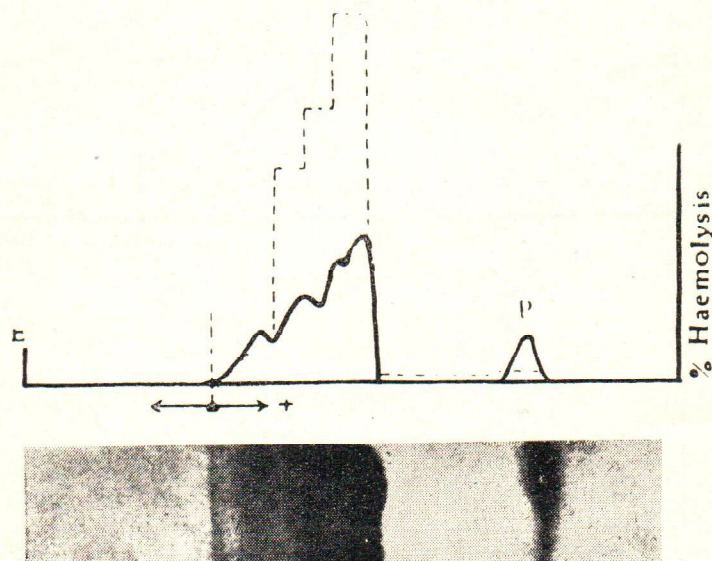


Sl. 7. Elektroferogram na papiru toksina. Veronal-veronal natrium pH=8,6;  $\mu=0,05$ ; Whatman Nr. 1;  $E=3$  V/cm;  $I=0,75$ ; 2 mg toksina; 20 sati. a) *Vip. ammodyt. a.*, b) *Vip. aspis Cesari*, c) *Bugarus caeruleus*

Sličnost različnih otrova na temelju zajedničkih antigena primijetili su *Grasset*, *Schöttler* (26, 27) i drugi autori. Ispoređujući dijagrame elektroforeze toksina *Vip. ammodyt. a.* i toksina *Vip. aspis Cesari* vidimo na slici 7 a i b predmnijevanu sličnost ovih otrova. Međutim, toksini zmija iz različitih familija, kao što su na pr. poskok, *Bugarus caeruleus* i *Naja naja*, ne pokazuju, kako se vidi iz sl. 7 a i c, pa slike 9, nikakve elektroferetske sličnosti s toksinom *Vip. ammodyt. a.* Uistinu imuni

serum priređen imunizacijom konja s toksinom Vip. ammodyt. a. neutralizira u pokusu na životinjama i otrov Vip. aspis (*E. Grasset, M. Stanić*) (28).

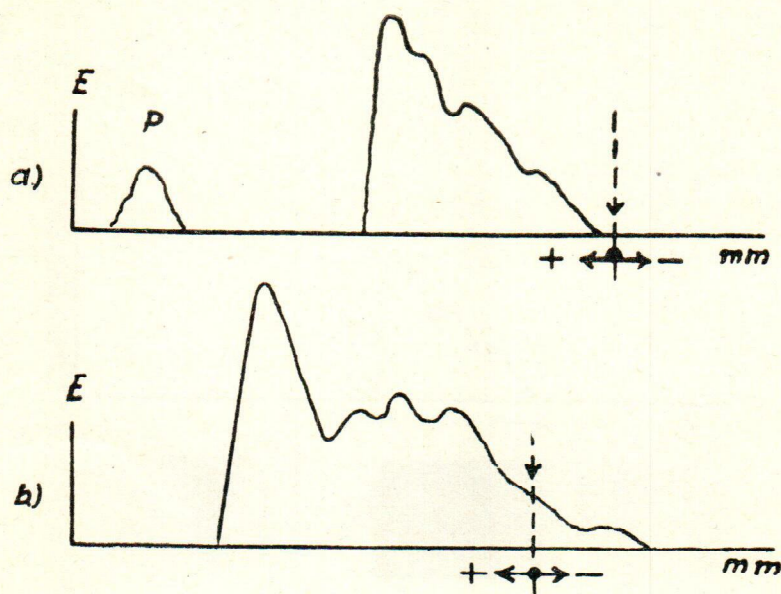
*Polson, Joubert i Haig* uspjeli su slobodnom elektroforezom rastaviti cijelu jednu seriju različitih zmijskih otrova u proteinske komponente. Te komponente oni su ispitali kvalitativno na fosfatidazu A i utvrdili, da je hemolitička aktivnost vezana uvijek samo s jednom od proteinskih komponenata, koja je definirana svojom elektroforetskom pokretljivošću. Očitavanje hemolize vršeno je u svima njihovim eksperimentima nakon 20 minuta. Međutim, ako je hemolitički sistem, koji se sastojao iz proteinske komponente, lecitinske emulzije i eritrocita, bio ostavljen preko noći, sve su komponente izolirane iz nekog toksina pokazivale



Sl. 8. Elektroferogram na papiru otrova Vip. ammodyt. a. s dijagramom hemolize pojedinih komponenata. Fosfatni pufer pH 7,2, 0,05 M; Whatman Nr. 1;  $I = 2$  mA;  $E = 6,5$  V/cm; 2 mg toksina; trajanje elektroforeze 4 sata. Hemoliza 2%-ovčjih eritrocita nakon 24 sata kod 20 stupnjeva

manju ili slabiju hemolitičku aktivnost. *Grassmann i Hannig* (25) su primijetili, da hemolitička aktivnost može biti svojstvo i dviju inače dobro elektroforezom rastavljenih komponenata. Da ovu pojavu objasnimo, rastavili smo poskokov toksin elektroforetski na širokoj papirnoj traci i traku zatim razrezali po dužini; na jednoj polovici bojadisali smo rastavljene proteinske komponente bromfenol plavom bojom, a drugu

polovicu razrezali smo poprečno u papirne tračice od 0,5 cm širine i s njih ekstrahirali proteine. Za ekstrakt svake pojedine tračice određena je posebno hemolitička aktivnost izluženih proteina. Ako sam mjerio hemolizu nakon 2 sata, hemolizirali su eritrociti samo u epruveti, koja sadržava veoma vjerojatno fosfatidazu A. U našem je slučaju ovo mjesto označeno u sl. 7a sa H. Međutim, ako se hemoliza ekstrahiranih proteina čita nakon 24 sata, svi ekstrakti bjelančevina pokazuju određenu hemolitičku aktivnost. Ta aktivnost je, kako se vidi iz sl. 10, određena vjerojatno koncentracijom bjelančevina na trake. To se može rastumačiti tako, da male količine fosfatidaze A (2-4 mikrograma), koje

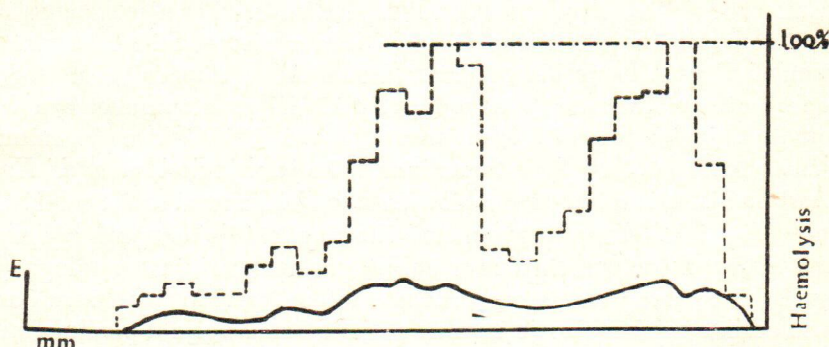


Sl. 9. Elektroferogram na papirnoj traci toksina. Fosfatni pufer pH 7,6; 0,05 M; Whatman Nr. 1;  $I = 2 \text{ mA}$ ;  $E = 6,5 \text{ U/cm}$ ; 2 mg toksina; 4 sata. a) *Vip. ammodyt. a.*  
b) *Naja naja*

su manje od granične količine nekog proteina, koja se može elektroforezom rastaviti iz proteinske smjese, zaostaju vezane s inače rastavljenim proteinskim komponentama. Te male količine nakon duljega djelovanja (10-24 sata) na suspenziju eritrocita proizvode hemolizu, koja bi mogla sugerirati krive zaključke.

*Pokusi s frakcioniranim taloženjem toksičnih proteina*  
*Vip. ammodyt. a. toksina*

Moji pokusi, kojima sam nastojao na stupcu od papirne kaše kromatografijom rastaviti smjesu toksičnih proteina zmijskog otrova, bili su samo djelomično uspješni. Proteinske frakcije dobivene na taj način nisu bile čiste proteinske komponente. Elektroforeza je međutim pokazala, da se otrov poskoka sastoji od najmanje sedam proteina, koji se više ne daju dalje rastaviti, i da je jedan od njih fosfatidaza A kao nosilac hemolitičke aktivnosti otrova. Međutim, mi smo željeli izolirati u većoj količini čiste proteinske komponente iz otrova i upotrebiti ih za dalji studij. Radi toga sam pokušao rastaviti toksične proteine frakcioniranim precipitacijom. U toku ovih pokusa stekli smo uvjerenje, koje se slaže s iskustvom *Michaela* i *Bössera* (29), da otrov poskoka kao i otrovi

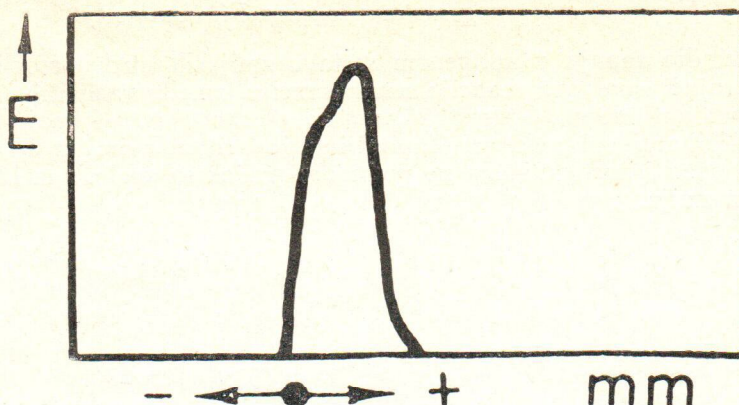


Sl. 10. Elektroferogram na papirnoj traci toksina *Vip. ammodyt. a.* s ucrtanim dijagramom hemolize. Veronal-veronal natrium pufer pH - 8,6;  $\mu$  - 0,05; Whatman Nr. 1;  $I = 0,75$  mA;  $E = 5$  V/cm; 2 mg toksina; 20 sati. Hemoliza 2% - suspenzije ovčjih eritrocita, 24 sata kod 20°

ostalnih Viperida, za razliku od Colubrida, sadržavaju uz toksične proteine još i biološki potpuno inaktivne proteine. Osim toga su otrovi Viperida osjetljiviji prema djelovanju kiselina, lužina, prema povišenju temperature, a samim stajanjem u vodenim otopinama brzo se denaturiraju. Ponajprije sam pokušao upotrebiti metodu kristalizacije toksičnih proteina, koju su izradili *Slotta* i *Fraenkel-Conrat* (30), i kojom su oni uspjeli izolirati i kristalizirati Crotoxin, t. j. fosfatidazu A. Međutim, tom metodom uspio sam izolirati uvijek samo neotrovne i amorfne bjelancevine. Isto su tako bili negativni rezultati preliminarnih pokusa, da taloženjem s natrijevim sulfatom ili pikratom poput indijskih autora

*Ghosh* i *Dea* (31) razdvojim proteine poskokova otrova. U toku ovih radova došao sam do uvjerenja, da je metoda, koju su primijenili *H. Wieland* i *W. Konz* (32), *F. Micheel* i *E. Bösser*, pa *D. von Klobusitzky* i *P. König* (33) možda najprikladnija. Ona se zasniva na frakcioniranom taloženju proteina etanolom kod niske temperature. U tu svrhu sam najprije 1% otopinu otrova dijalizirao kod  $+5^{\circ}\text{C}$  u celofanskoj membrani prema vodi kroz 24 sata i tako uspio odstraniti topljive anorganske nečistoće i nisko molekularne organske primjese. U toku ovog postupka istaložio se iz sirovog otrova proteinski talog (I), koji sam odstranio centrifugiranjem (17.000 okretaja na minutu). Pokusi s ovim u vodi netopljivim proteinskim talogom bit će zasebno opisani. Bistra otopina toksičnih bjelančevina bila je zamrznuta, pa u smrznutom stanju osušena u visokom vakuumu, i upotrebljena za naša dalja ispitivanja. 1,5%-vodena otopina zakiseljena je sa 0,1 n HCl na pH 4,2 i 10 min. grijana kod  $70^{\circ}\text{C}$ . Protivno navodima *Calmetta* (34) nije koagulirala, pa je zadržala svoja toksična i hemolitička svojstva. Slično su *Slotta* i *Fraenkel-Conrat* uspjeli koagulirati jedan dio bjelančevina iz vodene otopine otrova *Crotalus t. t.* kod pH 4,1. Ali se otopina otrova *Vip. ammodyt.* jedva zamutila zagrijavanjem kod  $100^{\circ}\text{C}$  kroz 30 minuta. Slično se ponaša otrov *Naja tripudians*, kako je objavio *Wieland* i *Konz*. Preostala bistra otopina otrova bila je slabo alkalizirana sa 0,1 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  - pH 5,2 - 5,5. Tim postupkom staložilo se oko 40% ukupnih bjelančevina otrova iz vodene otopine u obliku gustog, pahuljastog taloga (talog II). Ovaj talog bio je otprilike isto toliko toksičan kao i sam otrov, ali se odlikovao time, što je uzrokovao jake hemoragije u plućima miša, a djelovao je mnogo slabije neurotoksično. Taj se talog (II) mogao veoma lijepo reprecipitirati iz vodene otopine uz prisustvo malih količina amonijevih soli kod pH 5,2, gdje je pokazivao najmanju topljivost. Tako prečišćen ovaj protein (II R) s izoelektričnom točkom oko pH 5,2 i topljiv u slabo kiseljoj otopini, nije pokazivao gotovo nikakvih toksičkih simptoma na bijelim miševima, a ni hemolitičke aktivnosti na suspenziji eritrocita. Međutim, činjenica, da je pokazivao veoma oštro minimum topljivosti kod pH 5,2, pa se elektroforetski ispitan u različnim puferima pokazao homogenim (sl. 11), utvrdila me u mišljenju, da je taj talog prilično čista proteinska supstanca. Frakcija II R pokazivala je svojstvo globulina. Ona je bila topljiva u razrijeđenim otopinama soli, a gotovo netopljiva u vodi. Osušena u visokom vakuumu iz smrznute otopine nakon nekoliko tjedana stajanja gubi ona topljivost u vodi, pa je to znatno otežalo egzaktnost ispitivanja njezinih svojstava. Frakcija II R je vjerojatno netoksični protein globulinskih osobina iz poskokova otrova u razmjerno čistom stanju.





Sl. 11. Elektroferogram frakcije II R iz toksina *Vip. ammodyt. a.* Fosfatni pufer pH 7,4;  $\mu = 0,17$ ; 6,6 V/cm; 2 mA; Whatman Nr. 1; 4 sata; 1,2 mg toksina obojeno bromfenol plavom bojom

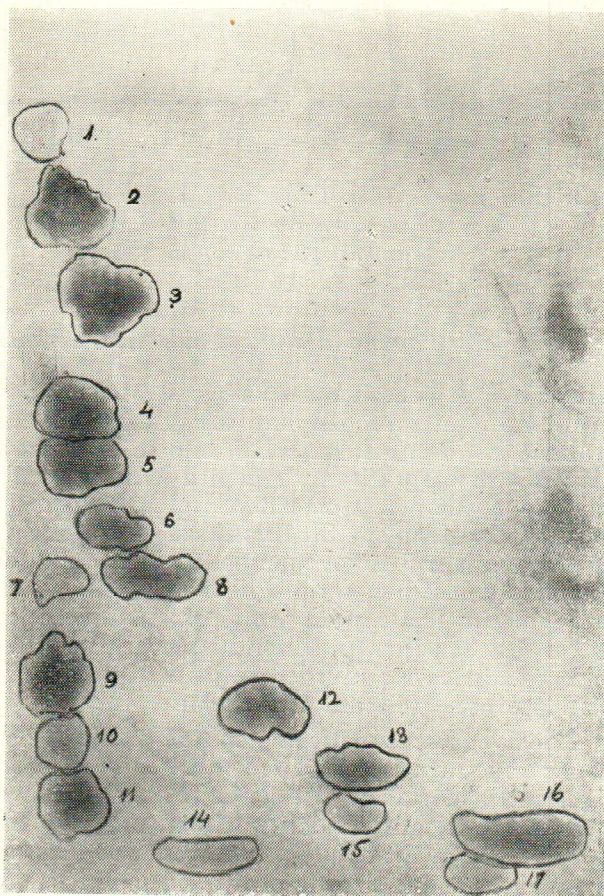
#### Kromatografija na papiru amino kiselina iz hidrolizata frakcije II R (35)

Kako je frakcija II R pokazivala neka svojstva čistog proteina, smatrao sam, da bi bilo interesantno ispitati sastav amino kiselina u hidrolizatu ove frakcije. 5–10 mg frakcije II R bilo je hidrolizirano sa 20% HC<sub>1</sub>, i hidrolizat kromatografiran na papiru Whatman Nr. 1. I to u jednom smjeru sa n-butanolom-octenom kiselinom-vodom (4:1:5), a u drugom smjeru sa 80%-fenolom. Sl. 12 prikazuje rezultate ove kromatografije. Hidrolizat je sadržavao ove amino kiseline: cistin, asparaginsku kiselinu, glutaminsku kiselinu, serin, glikokol, treonin, alanin, tirozin, valin, metionin, leucin, fenilalanin, prolin, lizin. U hidrolizatu sirovog otrova nađen je još reakcijom po Elsonu i Morganu i glukozamin, a u alkaličnom hidrolizatu otrova utvrđen je još i triptofan reakcijama po Adamkiewicz-Hopkinsu, Voisentu i Ehrlichu.

Frakcija III dobivena je iz matične otopine frakcije II dodatkom etanola do konačne koncentracije od 57% kod 1° C. Ovim postupkom istaložila se frakcija III kao talog, a frakcija IV ostala je u otopini. Ove su frakcije prečišćene i izolirane liofilizacijom. Frakcija III pokazivala je približno dvostruku, a frakcija IV četverostruku toksičnost za bijelogu miša prema toksičnosti sirovog otrova. Hemolitička aktivnost bila je vidno povećana prema aktivnosti otrova, ali nakon 72 sata stajanja frakcija u vodenim otopinama, hemolitička aktivnost njihova je značajno pala. Prema tome možemo zaključiti, da je stabilnost prečišćenih proteinskih komponenata u vodenim otopinama kod sobne temperature znatno smanjena. Pregled pokusa fracioniranja toksičnih proteina *Vip. ammodyt. a.* iznijet je u tablici I.

*Ispitivanje antigenog sastava toksina Vip. ammodyt. a.*

Veliki dio znanja o antigenom sastavu zmijskih otrova stekli smo promatrajući unakrsne reakcije neutralizacije između različitih otrova i njihovih antitoksina. Grasset (26) smatra, da mnogi otrovi imaju jedan zajednički antigeni nukleus. Zanimljivo je pritom primijetiti, da se grupna specifičnost antigena ne podudara uvijek sa zoološkom klasifikacijom zmijski.



Sl. 12. Dvodimenzionalni kromatogram od 320 mikrograma proteinskog hidrolizata frakcije II R. - 1. Cistin, 2. asparaginska kiselina, 3. glutaminska kiselina, 4. serin, 5. glikokol, 6. treonin, 7. glukozamin (nije sigurno identificiran), 8. alanin, 9. nije identificirano, 10. lizin, 11. arginin, 12. tirozin, 13. valin, 14. prolin, 15. metionin, 16. leucin, 17. fenilalanin. Smjer A-B butanol octena kiselina; A-C fenol voda. Razvijeno s 0,1% minhidrina

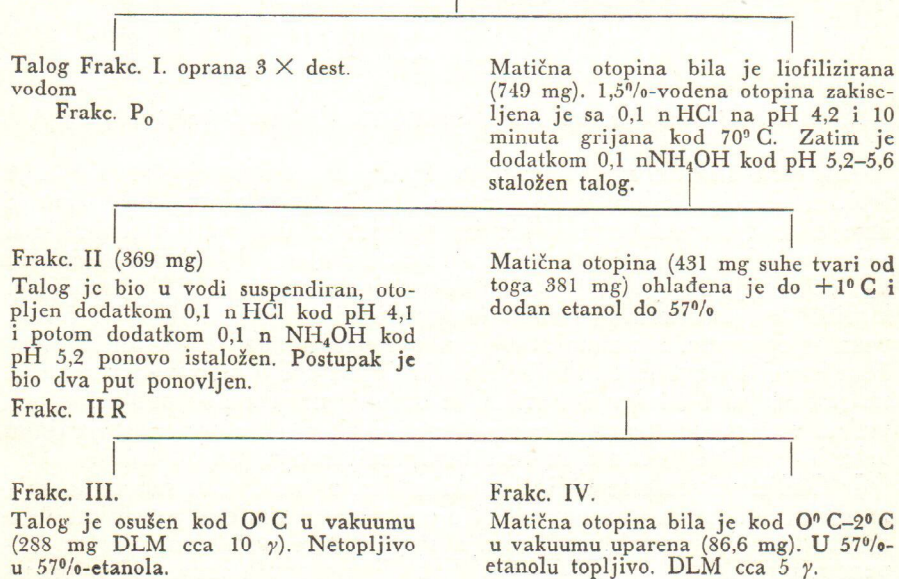
Smatrao sam, da bi bilo interesantno utvrditi broj antigena u toksinu Vip. ammodyt. a. i u onom dijelu bjelančevina iz toksina, koji se ne tope u destiliranoj vodi. Radi toga je svježe priređena frakcija I, iz već opisanog pokusa precipitacije, dobro oprana destiliranom vodom, a oprani talog dobiven centrifugiranjem ( $P_0$ ) eluiran sa 0,1% natrijeva klorida kroz 30 minuta. Netopljivi dio  $P_1$  bio je ponovo izoliran centrifugiranjem ili liofiliziran. Bistri matični lug razrijeđen je poslije izoliranja taloga  $P_1$  dvostrukim volumenom vode do koncentracije 0,33% natrijskog klorida. Nastali talog  $P_2$  obrađen je kao i  $P_1$ . Supernatant poslije taloga  $P_2$  je dijaliziran prema destiliranoj vodi, a nastali talog  $P_3$  je opran vodom ili liofiliziran. Pregled ovih pokusa prikazan je u tablici II.

Svi ti precipitati ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) su još uvijek bili toksični za bijele miševе, no simptomi neurotoksina bili su jedva vidljivi. Kod autopsije trovanih životinja primijećene su jake hemoragije u plućima. Hemolitička aktivnost ovih frakcija je znatno smanjena u odnosu prema aktivnosti otrova, kao što se vidi iz sl. 13.

Tablica I.

## Frakcionirano taloženje proteina otrova Vip. ammodyt. a.

1 g sirovog otrova (sadržaj dušika 13,5%; sumpora 4,2%; DLM za bijelog miša oko 18–20  $\gamma$  u 1%-otopini, dijaliziran u ledenici +5° C kroz 24 sata prema destiliranoj vodi.



Tablica II.

Sirovi talog  $P_0$  opran i ekstrahiran sa 1% natrijeva klorida (100%)

Netopljivi dio u 1%-otopini NaCl ( $P_1$ ). Centrifugirano i liofilizirano (26%).

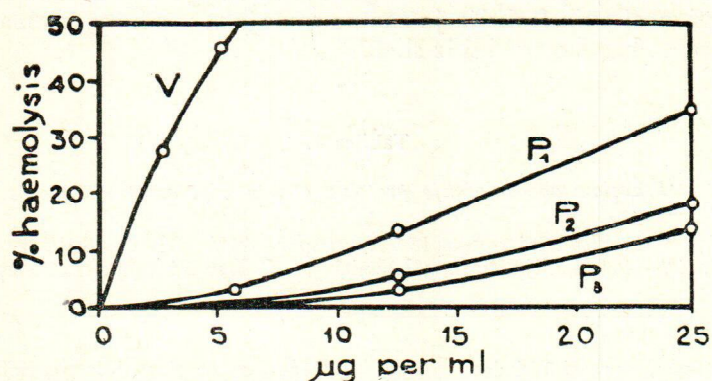
Topljivi dio u 1% NaCl razrijeđeno do 0,33% NaCl.

Netopljivi dio u 0,33 NaCl ( $P_2$ ) centrifugirano i liofilizirano (24%).

Topljivo u 0,33% NaCl dijalizirano.

Talog ( $P_3$ ) Centrifugirano i liofilizirano (48%).

Topljivi ostatak. Liofilizirano (2%).

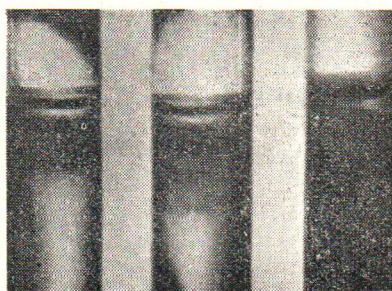
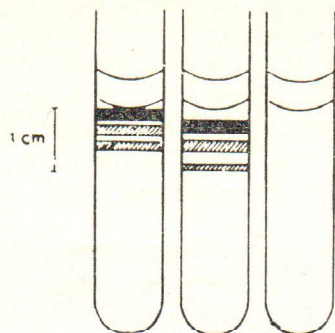


Sl. 13. Krivulje hemolize otrova *Vip. ammodyt. a.* i njegovih frakcija  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$

Antigena struktura ovih frakcija ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) i sirovog otrova bila je ispitana precipitacijom u polukrutom mediju po *Oudin* (36). Test je izveden u epruvetama presvučenim agarom (1% u vodi) i osušenim u vakuumu. Serum protiv zmijskog otrova, dobiven od hiperimuniziranih konja, razrijeđen je (1:1) sa 0,6%-otopinom agara u 0,9%-natrijevu kloridu. Smjesa imunog seruma i agara izmiješana je kod 40° C i izlivena u epruvete, a potom stavljena u ledenicu, da se stvrdne. Priređene su bile otopine opisanih frakcija ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) i sirovog otrova, a sadržavale su 1–10 mg u 1 ml. Ove otopine nalivene su potom na površinu stupca od agara u epruvetama. Nakon deset dana stajanja u ledenici (+ 5° C) očitani su rezultati precipitacija (Sl. 14 i 15).

Iz *Oudin*ova testa se vidi, da toksin *Vip. ammodyt. a.* sadržava najmanje tri antigene komponente, koje pokazuju prstene precipitacije u agaru. Antigena struktura frakcija stoji u obratnom razmjeru sa stepenom purifikacije ovih frakcija. Tako  $P_3$  pokazuje samo jedan preci-

pitacioni prsten, a  $P_1$  tri. Međutim su važne činjenice, da sedam komponenata, poskokova toksina pokazuju samo tri antigene komponente, koje daju precipitacionu reakciju s imunim serumom, a da se u vodi netopljivi proteinski talog može elucijom s otopinom natrijeva klorida očistiti samo djelomice.

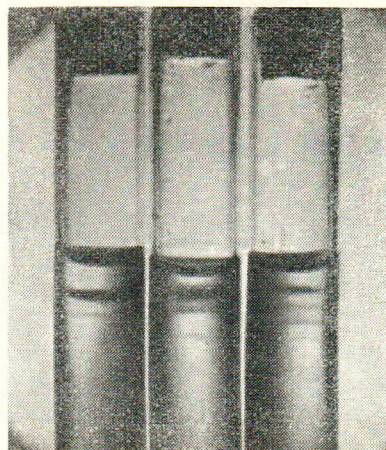
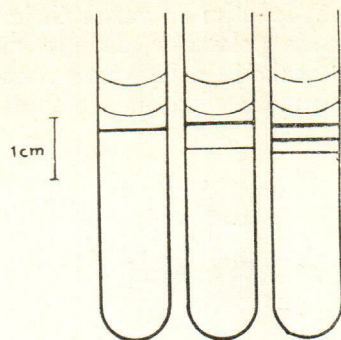


Sl. 14. Oudinov test otrova *Vip. ammodyt. a.* a) koncentracija antigena 5 mg/ml; b) 1 mg/ml; c) kontrola

*Aktivnost antifosfatidaze A u odnosu prema antitoksičnim svojstvima imunog seruma protiv Vip. ammodyt. a. (37)*

Ovim radom htio sam utvrditi moguću vezu između antihemolizina i antineurotoksina u otrovu, pa da budem u mogućnosti odgovoriti na problem, koji zasad još nije riješen. Postavlja se, naime, pitanje, nisu li moguća hemolitička i toksična svojstva toksina *Vip. ammodyt. a.* svojstva jedne i iste proteinske supstance.

*Slota* i *Fraenkel-Conrat* (1938) (30) izolirali su iz otrova *Crotalus t. t.* kristalinički *Crotoxin* i ustvrdili, da je on kristalična lecitinaza A, budući da pokazuje svojstva i neurotoksina i lecitinaze A. *Crotoxin* je ispunjavao sve fizičko-kemijske kriterije homogene čiste supstance. Međutim su u isto vrijeme *Gosh* i *De* (31, 37) objavili svoje radove, koji



Sl. 15. Oudinov test frakcija  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  toksina *Vip. ammodyt. a.*

su očito protivrječili rezultatima K. Slotte i Fraenkel Conrata. U novije vrijeme objavio je *Gonçalves* (39, 40), da je izdvojio iz Crotoxina jednu bazičnu supstancu Crotamin, dok su *Neumann* i *Habermann* (41) objavili, da su izdvojili na stupcu Amberlita, ionskog izmjenjivača, iz otrova *Crotalus t. t.* neurotoksin Crotaktin, koji više ne pokazuje hemolitičkih svojstava. Metode, koje su primijenjene u navedenim radovima, moguće nisu bile najzgodnije za ispitivanje tako osjetljivih proteina, kao što su zmijski toksini.

Princip, koji sam ja primijenio, da bih osvijetlio kemijsku prirodu toksina *Vip. ammodyt. a.*, s obzirom na njegovu toksičnost i hemolitičku aktivnost, bio je ovaj: ako su dvije različite aktivnosti nekog toksina uzrokovane svojstvima jednog i istog antigena, a antiserum se titrira tim antigenom, iste vrijednosti moraju se dobiti za odnos antigen-anti-

tijelo u točki neutralizacije, bez obzira na to, koja od aktivnosti nam je poslužila kao indikator za završetak titracije.

U tu svrhu sam odredio inhibični efekt imunog konjskog seruma na hemolitičku aktivnost toksina Vip. ammodyt. a. Ove rezultate isporodio sam s antitoksičnom vrijednošću istog imunog seruma, dobivenom iz titracije na bijelim miševima istim toksinom. Ponajprije je trebalo odrediti količinu otrova, koju neutralizira jedan ml imunog seruma, upotrebivši parcijalnu hemolizu ovčjih eritrocita kao indikator za količinu rezidualnog otrova u reakcionoj smjesi poslije stvaranja kompleksa toksin-anatoksin. Hemoliza, koja nastaje djelovanjem lizolecitina, je proces, koji se ne zbiva po zakonima stehiometrije nego po zakonima vjerojatnosti (42, 43).

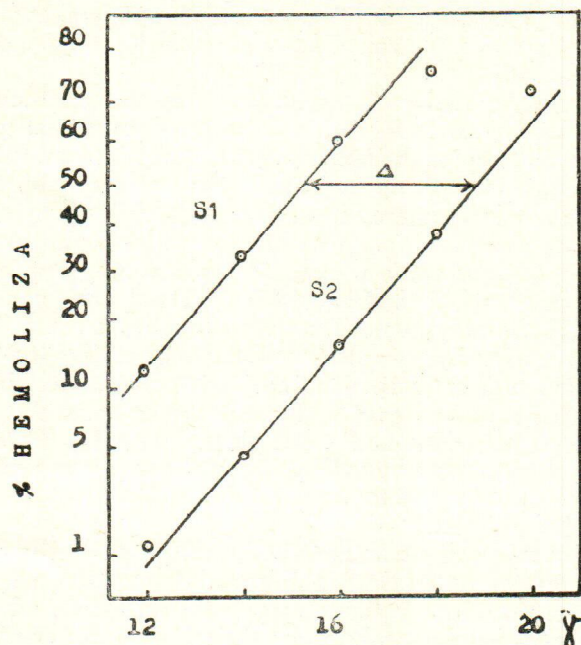
Vjerojatno se zbog razlika u osobinama uzoraka eritrocita, koji se upotrebljavaju za pokuse, dobivaju s istim otrovom u različnim eksperimentima različiti stepeni hemolize unatoč tome, što su eksperimenti izvedeni pod jednakim radnim uvjetima. (16) Da bi se izbjegle moguće griješke, za svaki eksperiment hemolize upotrebljene su dvije serije epruveta, koje su sadržavale otopine otrova u identičnim progresivnim dozama. Otrov je bio otopljen u izotoničnom fosfatnom puferu pH 7,1. Svaka od epruveta serije  $S_1$  sadržavala je 0,001 ml imunog seruma, dok su epruvete serije  $S_2$  sadržavale dvostruku količinu seruma. Pošto se je formirao toksin-antitoksin kompleks u reakcionoj smjesi (nakon 24 sata kod 20°C), dodao sam emulziju lecitina i eritrocite suspendirane u izotoničnom fosfatnom puferu (pH 7,1). Obje serije epruveta bile su zajedno stavljene u termostat kod 37°C (kroz 2-3 sata) dotle, dok nije nastala dovoljna parcijalna hemoliza. Stupanj hemolize mjeren je fotometrijski na Fischerovu fotometru uz filter 425 B, uvijek pod istim eksperimentalnim uvjetima.

Slika 16 prikazuje tok hemolize ovčjih eritrocita u slučaju, kad je fosfatidaza A otrova parcijalno inhibirana s protutijelima iz seruma. Ako se funkcionalni odnos količine otopljenih eritrocita, od neke određene količine eritrocita u reakcionoj smjesi, prikaže prema količini otrova grafički, dobiva se sigmoidna krivulja, koja opisuje proces hemolize. Te se sigmoidne krivulje daju transformirati u sistem paralelnih pravaca, ako se prikažu na grafu, gdje je doza na apscisi nanesena u aritmetičkoj, a na ordinati procenat hemolize u logaritamskoj skali ili skali vjerojatnosti.

Pomak druge krivulje ( $S_2$ ) paralelno s osi apscisa uzrokovan je inhibicijom toksina suviškom antitoksina u seriji  $S_2$  prema seriji  $S_1$ . Taj suvišak je konstantan i iznosi u našem slučaju 0,001 ml imunog seruma. Ovaj paralelni pomak na apscisi numerički odgovara i razlici u količinama otrova, koje su bile potrebne da proizvedu 50%-hemolizu istovremeno u serijama  $S_1$  i  $S_2$ . Ova razlika može se izračunati ili grafički odrediti, a njezina srednja vrijednost iznosi za deset pokusa  $\bar{A}$  3,42 mikrograma toksina. Budući da je u svakoj epruveti serije  $S_1$  bilo 0,5 ml imunog seruma razrijeđenog 1:500, a u epruvetama serije  $S_2$  0,5 ml

imunog seruma razrijeđenog 1:250, to znači, da jedan ml toksina može neutralizirati 3,42 mg otrova, kad se 50%-hemoliza eritrocita upotrebi kao indikator neutralizacione točke za formiranje toksin-antitoksin kompleksa u reakcionoj smjesi.

Za titraciju imunog seruma s toksinom na bijelim miševima bilo je upotrebjeno za svako razređenje seruma i otrova najmanje pet grupa životinja po 6 miševa. Ukupno su za titraciju bila upotrebjena 174 miša (sl. 17).



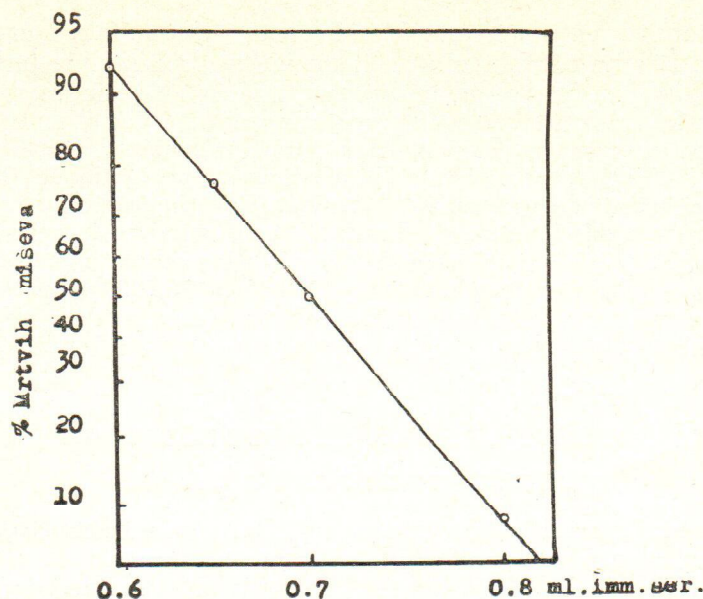
Sl. 16. Krivulje hemolize pokusnih serija  $S_1$  i  $S_2$  transformirane u sistem paralelnih pravaca. Apscisa: otrov u mikrogramima, skala aritmetička. Ordinata: procenat hemolize na skali vjerojatnosti

Iz pokusa titracije imunog seruma toksinom Vip. ammodyt. a. vidjelo se, da 0,7 ml imunog seruma neutralizira 2,5 mg zmijskog toksina, ili da je 3,57 mg otrova potrebno za 1 ml imunog seruma, ako se točkom neutralizacije toksina antitoksinom smatra točka, koja odgovara 50%-smrtnosti miševa na dijagramu.

Test na životinjama je ispravan samo u određenim granicama, jer je uvijek potrebna jedna konstantna doza slobodnog toksina u reakcionoj smjesi, da bi se omogućilo mjerenje.

Ova konstantna doza je vjerojatno približna kao doza otrova, koja ubija u pokusu toksičnosti 50% bijelih miševa. Ta je doza za naš uzo-





Sl. 17. Grafički prikaz pokusa neutralizacije toksina *Vip. ammodyt. a.* s antitoksinom na bijelim miševima. Apscisa: doza antitoksina u ml, skala aritmetička. Ordinata: procenat uginulih miševa, skala vjerojatnosti

rak otrova bila  $LD_{50} = 16$  mikrograma. Uzevši to u obzir, realna količina zmijskog toksina, koju neutralizira jedan ml imunog seruma u pokusu in vivo, je 3,34 mg.

Rezultati ovih ispitivanja pokazuju, da je približno ista količina imunog seruma potrebna za neutralizaciju toksina *Vip. ammodyt. a.*, bez obzira na to, koje od njegovih svojstava, hemolizu ili toksičnost za bijele miševе, upotrebimo za određivanje točke neutralizacije. Dva važna zaključka mogu se izvesti iz ovih ispitivanja: prvo, da su hemolitička aktivnost i toksičnost zmijskog toksina za bijele miševе svojstva jednog antigena, a drugo, da se na opisanom principu hemolize može izraditi originalna analitička metoda za titraciju imunih seruma protiv zmijskih otrova. Ipak sve te rezultate treba smatrati tek za preliminarne, jer su svi opisani pokusi, zbog prirode samog problema, bili izvedeni jednim uzorkom otrova i jednom serijom imunog seruma.

#### *Flokulaciona reakcija toksina Vip. ammodyt. a. s antitoksinom (44)*

Načinjen je niz pokusa, koji treba da rasvijetle stvaranje toksin-antitoksin kompleksa u razrijeđenim otopinama anorganske soli. Ispitan je utjecaj omjera količina otrov-protuotrov na tok neutralizacije, pa

utjecaj koncentracije natrijeva klorida, amonijeva sulfata i natrijeva sulfata na stvaranje toksin-antitoksin kompleksa. Ispituje li se turbiditet reakcionih smjesa otrova imunog seruma, maksimum замуćenja dobiva se kod točke neutralizacije, već poznate iz pokusa s hemolizom i titracijom imunog seruma toksinom na bijelim miševima. Precipitaciona krivulja je flokulacionog tipa s jednim maksimum. Optimum flokulacije nalazi se između  $pH_5$  i  $pH_8$ . Za ta ispitivanja upotrebljen je imuni serum protiv zmijskog otrova, obrađen s pepsinom prosječne molekularne težine 54.000. Prosječna molekularna težina otrova bila je 28.000, a kompleksa toksin-antitoksin između 120.000-3,100.000, prema sastavu reakcione smjese. Molekularne težine određene su metodom rasipavanja svijetla.

#### TOKSIN PAUKA LATRODECTUS TREDECIMGUTTATUS ROSSI

U posljednjih deset godina u Jugoslaviji, Istri, pa u Dalmaciji, Crnoj Gori i Makedoniji (45) primijećena je česta pojava pauka *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. Otrovom ovog pauka izazivaju se kod ugrizenog pojave teškog trovanja, pa sam držao, da je važno ispitati malo poznata biokemijska i imunokemijska svojstva ovog toksina. Prema *Pavlovskom* (46), *Phisalixu* (47), *Bettiniju* i *Lebezu* (48, 49) otrov je proteinski toksin, pa on pokazuje pozitivnu reakciju po Millonu, pa biuret i ksantoproteinsku reakciju.

Zagrijavanjem preko  $70^{\circ}C$  iz vodene otopine toksina koagulira se jedan dio proteina. Etanol acetona i kiseline talože iz vodene otopine toksina bjelančevine ireverzibilno.

Lebez je ekstrahirao iz otrova *Latrodectusa* jednu lipoidnu supstancu, koja pod ultravioletnim svjetlom pokazuje modru fluorescenciju. On drži, da se jedan bio bjelančevina ovoga toksina sastoji iz lipoproteina.

Ovaj toksin navodno pokazuje jako proteolitičko djelovanje. On sadržava oksidazu, i jedan inhibitor za holinesterazu iz eritrocita. Toksin ovog pauka ne pokazuje nikakve hemolitičke aktivnosti.

#### *Dobivanje otrova (50)*

Otrov *Latrodectusa* dobiven je od 30 (ženki) pauka, koji su sabrani u julu i augustu u blizini Pule. Pauci su za vrijeme eksperimenta bili čuvani u staklenim posudama s vlažnim pijeskom, i povremeno sunčani. Hranjeni su bili isključivo kućnim muhamama. Za uzimanje otrova od pauka upotrebljena je traka Whatman Nr. 1 filter papira (25 na 300 milimetara), koja se obično upotrebljava za kromatografiju ili elektroforezu. Pauk je lagano uhvaćen rukom, a između helicera stavljena mu je bila traka papira presavijena na mjestu, gdje se nanosi otrov. La-

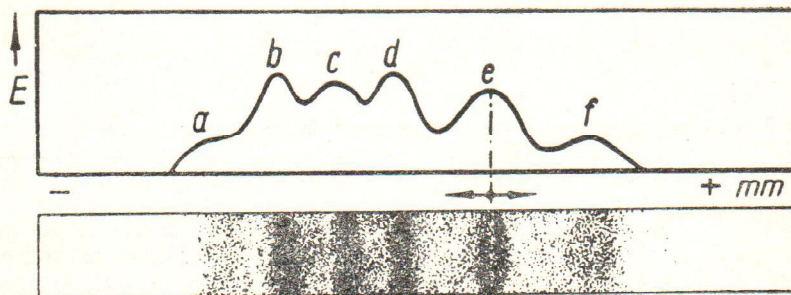
ganim nadraživanjem pauk je zagrizao u papir, koji upija otrov. Ta je metoda originalna, a ima prednost, da je ovako dobiveni otrov čist i ne sadržava stranih proteina, koji se inače redovno nalaze u ekstraktu kefalotoraksa. Takva traka papira je izravno upotrebljena za kromatografiju ili elektroforezu.

Prosječna količina otrova kod jednog ugriza iznosila je cca 0,5 mg. Suhi otrov se razmjerno brzo denaturira. Osušen na papiru, nakon kratkog vremena otrov se ne može više ekstrahirati ni sa 10% otopinom natrijeva klorida.

Svježi otrov uzet za vrijeme ljeta pokazuje alkaličnu reakciju  $\text{pH} = 8,2 \pm 0,3$ .

#### *Elektroforetska ispitivanja toksina *Latrodectus t. R.**

Svježi toksin rastavljen elektroforezom na papiru u veronal-veronalnom natrij puferu  $\text{pH}$  8,6 sadržavao je šest proteinskih komponenata, koje su dobro adsorbirale bromfenolnu plavu boju (sl. 18). Dvostrukim bojenjem elektroforograma bromfenolom i ninhidrinom bile su identificirane još dvije komponente. Jedna od njih nalazila se između komponenata b i c, a druga između e i f na elektroforogramu u sl. 18.



Sl. 18. Elektroferogram otrova *Latrodectus t. R.* u veronal-veronalnom natrij puferu  $\text{pH}$  8,6; ionska jakost 0,05; 5 Volta na cm; 0,75 mA; Whatman Nr. 1; cca 1 mg toksina; 20 sati; bojadisano bromfenolnom plavom bojom

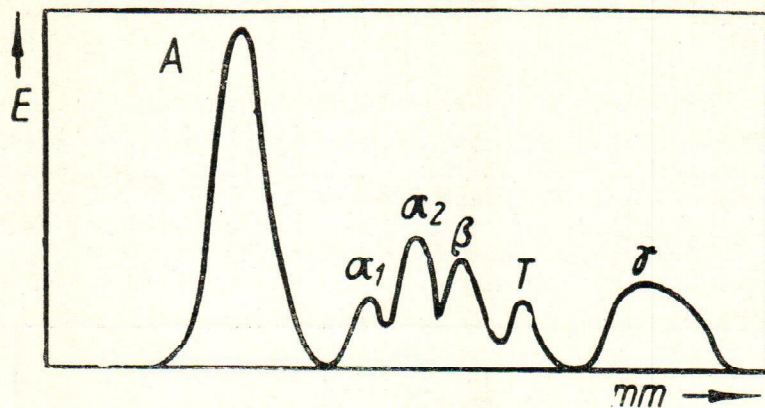
#### *Kromatografija toksina na papiru*

Kromatografija na papirnim trakama bila je izvedena serijom otopina natrijeva klorida metodom, koja je već prije opisana. Uzlazna kromatografija na papiru toksina sa n-butanolom i octenom kiselinom ili sa fenolom nije dala nikakvih rezultata.

Potpuno razdvajanje proteinskih komponenata toksina *Latrodectus t. R.* kromatografijom nije uspjelo, jer su tri komponente tako razdvojene sadržavale svih šest dokazanih već elektroforezom. Bojadisanjem kromatograma ninhidrinom pojavile su se još dvije komponente, već prije dokazane elektroforezom.

*Pokusi s imunim serumom protiv otrova Latrodectus t. R.*

Imuni serum priređen je imunizacijom magarca, jer se konj pokazao i suviše osjetljiv prema ovom toksinu. Životinja je dobivala svaki drugi do peti dan intravenozno ekstrakt paukovih žlijezda u fiziološkoj otopini natrijeva klorida. Početna doza sadržavala je jednu pedesetinu jednog para žlijezda, dok je konačna doza sadržavala deset paukovih žlijezda u ekstraktu. Pošto je imunizacija nakon 53 dana završena, odvojen je iz krvi, dobivene punkcijom vratne vene, imuni serum.



Sl. 19. Elektroferogram imunog seruma magarca protiv toksina pauka *Latrodectus t. R.*; fosfatni pufer pH 9,2; ionska jakost - 0,066; 4 volta na cm; 1 mA; Whatman Nr. 1; 0,01 ml seruma; 20 sati; bromfenolno plavilo

Elektroforetska analiza imunog seruma na papirnoj traci (sl. 19) pokazala je, da se između beta i gama globulina pojavila nova komponenta T, koje nismo nikada našli u normalnom serumu životinje u pokusu prije imunizacije. Ona vjerojatno odgovara antitoksinima u imunom serumu imuniziranog magarca.

*Literatura*

1. Sachs, H., Klopstock, iz *Imunitätsforschung* 2. Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden. E. Abderhalden XIII. 2. II. 841, Urban u. Schwarzenberg, 1933.
2. Calmette, M., iz R. Kraus, C. Levaditi, *Handbuch der Technik u. Methodik der Imunitätsforschung*, Verl. G. Fischer, Jena 1908. Bd. I. 1 St. 294.
3. Sevag, M. G.: *Immuno-Catalysis*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, II. Ed. 1951.
4. Heyningen van W. E., iz H. Neurat, K. Bailey, *The Proteins*, Acad. Press, New York 1954. Vol. II. A str. 345.
5. Papenheimer A. M. Jr.: *Advances in Protein Chem.* 4 (1948) 123.
6. Cinader, B.: *Biochem. Soc. Symposia*, 10 (1953) 16.
7. Stanić M.: *Venoms*, International Conference on Venoms 1954. Berkeley, California, Am. Assoc. for Advancement of Science, Washington 1956. Str. 181.

6. *Slotta, K. H.*: *Experientia* 9 (1953) 81.
7. *Slotta, K.*: *Progress in the Chemistry of org. Natural Products*, Wien, Springer Verl. 1955, XII. str. 406.
8. *Klobusitzky v. D.*: *Ergebnisse d. Hygiene, Bakteriologie u. Immunitätsforschung exp. Therapie* 24 (1941) 226.
9. *Ghosh, B. N., Sarkar, N. K.*: *Venoms, International Conference on Venoms 1954, Berkeley, California, Am. Assoc. for Advancement of Science, Washington, 1956, str. 189.*
10. *Feldberg, W., Holden, H. F., Kellaway, C. H.*: *J. Physiol.* 94 (1938) 232.
11. *Deutsch, H. F., Diniz, C. R.*: *J. of Biological Chemistry* 216 (1955) 17.
12. *Devi, A., Bose, A. K., Sarkar, N. K.*: *Venoms, International Conference on Venoms 1954, Berkeley, California, Am. Assoc. for Advancement of Science, Washington, 1956, str. 227.*
13. *Zeller, E. A.*: *Advances in Enzymol.* 8 (1948) 459.
14. *Hurst, R. O., Buttler, G. C.*: *J. biol. Chem.* 193 (1951) 91.
15. *Singer, T. P., Kearney, E. B.*: *Arch. biochem. biophys.* 29 (1950) 190.; *ibid.* 27 (1950) 348.
16. *Muić, N., Piantanida, M.*: *Rad Jug. akademije znan. i umjet. Razreda mat. prirod.* 298 (1953) 207.
17. *Slotta, K. H., Szyska, G.*: *Ber.* 71 (1938) 258.
18. *Euler, H. U., Swen Gard.*: *Z. Immunitätsforsch.*, 72 (1931) 113.
19. *Maltaner, E., Maltaner, F.*: *J. Immunolog.* 29 (1935) 151.
20. *Paić, M. M., Chorokhoff, M.*: *Bull. Soc. Chim. biol.* XX. (1938) 947.
21. *Piantanida, M., Muić, N.*: *Arch. Biochem. and Biophys.* 46 (1953) 110.
22. *Piantanida, M., Meniga, A., Muić, N.*: *Arch. Biochem. and Biophys.* 57 (1955) 334.
23. *Muić, N., Meniga, A., Fleš, M.*: *Arch. Biochem. and Biophys.* (u tisku).
24. *Wiedemann, E.*: *Experientia*, 3 (1947) 341.
25. *Grassmann, W., Hannig, K.*: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 30.
26. *Grasset, E.*: *Quart. Bull. Health Org. L. of N.* V (1936) 347.
27. *Schöttler, W. H. A.*: *Bull. World Health Org.* 5 (1952) 294.
28. *Grasset, E.*: *Exp. Commitee, World Health Org.* 316 (1955) 12.
29. *Micheel, F., Jung, F., Bösser, E.*: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 239 (1936) 217.
30. *Slotta, K. H., Fraenkel-Conrat, H. L.*: *Ber.* 71 (1938) 1076. *Mem. Inst. Butantan XII* (1938) 505.
31. *Ghosh, B. N., De S. S.*: *Indian J. med. Reas.* 24 (1937) 1175; *ibid.* 25 (1938) 779.
32. *Wieland, H., Konz, W.*, S. B. math.-naturwiss. Abt. bayer. Akad. Wiss., München. str. 177 (1936).
33. *Klobusitzky v. D. u. König, P.*: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 255 Sup. I. (1938).
34. *Calmette, M. po R. Kraus u. C. Levaditi*, *Handbuch der Technik u. Methodik der Immunitätsforschung* Verl. Fischer, Jena 1908. Bd. I. 1 str. 294.
35. *Muić, N., Piantanida, M.*: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 299 (1955) 6.
36. *Oudin, J.*: *An. Inst. Pasteur* 75 (1948) 30, 109.
37. *Muić, N., Ajduković, Đ.*: *Arh. hig. rada* 8 (1957) 89.
38. *Gosh, B. N., De S. S.*: *Nature* 143 (1939) 380.
39. *Gonçalves, I. M., Uiera, L. G.*: *Dos Anais da Acad. Brasil de Cxiencias* 22 (1950) 141.
40. *Gonçalves, I. M., Deutsch, H. F.*: *Arch. Biochem. and Biophys.* 60 (1956) 402.

41. *Neumann, W. P., Habermann, E.*: *Biochem. Z.* 327 (1955) 170.
42. *Heidelberger, M., Mayer, M. M.*: *Advances in Enzym.* 8 (1948) 71.
43. *Ponder, E.*: *Protoplasmalogija*, X. 2 Red cell structure and its breakdown, Wien 1955, p. 79.
44. *Kratohvil, J., Ajduković, Đ., Muić, N.*: Physical Chemical Study of an Antigen-Antibody Interaction. *Int. Symp. on Macromol. Chemistry, Praha, 1957.* Abst. No 143.
45. *Stanić, M.*: *Schweiz. Z. f. allgem. Pathologie u. Bakter.* 20 (1957) 619.
46. *Pavlovsky, E. N.*: *Gifftiere und ihre Giftigkeit*, Verlag G. Fischer, Jena 1927, str. 155.
47. *Phisalix, M.*: *Animaux venimeux et venins*, Masson et Cie., Paris, 1922, str. 223.
48. *Bettini, S.*: *Rend. Ist. super. Sanità*, 17 (1954) 333.
49. *Lebez, D.*: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 298 (1954) 73.
50. *Muić, N., Stanić, M., Meniga, M.*: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 305 (1956) 70.

#### Summary

#### BIOCHEMICAL PROPERTIES OF SOME TOXIC PROTEINS

The toxic proteins from *Vip. ammodytes* a. venom can be selectively adsorbed on filter paper fibers, so that antigenic composition of filtrated aqueous solution can be considered as changed.

The water insoluble precipitate obtained from *Vip. ammodytes* toxin can be purified by reprecipitation from aqueous solution at its isoelectric point. This substance shows the properties of a non-toxic pure protein. The Oudin test gives evidence for the presence of three precipitating antigenic components in the venom of *Ammodytes viper*.

Six or seven protein components in crude venom can be distinguished by their different electrophoretic mobilities. The same value for immune serum has been obtained in the neutralization test of *Vip. ammodytes* toxin, irrespective of which of the activities of venom, haemolysis or toxicity in mice were used for indicating the endpoint. Thus the haemolytic and toxic effects of the venom can be considered as the properties of a single substance. The toxin-antitoxin precipitation curve was of the flocculation type showing a maximum, corresponding to the neutralization point as revealed through the measurement of haemolytic activity of venom and antitoxic potency of antivenin.

Six protein components with different electrophoretic mobilities can be distinguished when the venom of the spider *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi is examined by electrophoresis.

The immune serum against *Latrodectus t. R.* toxin was analysed electrophoretically.

*School of Public Health, Medical Faculty,  
University of Zagreb,  
Zagreb*

*Received for publication  
March 15, 1959*