



NAUČNI I STRUČNI RADOVI

Mira Winterhalter, Stjepko Jadrić, Branko Perić
Institut za fiziologiju i biokemiju Medicinskog
fakulteta i Biološki institut Univerziteta
u Sarajevu

Upoređenje elektroforetske slike enzima laktat dehidrogenaze iz seruma i mišića *Barbus barbus* i *Barbus meridionalis* petenyi na gelu oksilamida

Danas je općenito prihvaćena i potvrđena pretpostavka da izoenzimi laktat dehidrogenaze (LDH) nastaju kombinacijom subjedinica, sintetiziranih pod kontrolom posebnih genetskih lokusa. Subjedinice posjeduju sposobnost polimeriziranja kako s identičnim, tako i s heterolognim subjedinicama (WEBB, 1964).

Većina tkiva sisavaca i ptica pokazuje prisutnost pet izoenzima LDH, koji su nastali polimeriziranjem subjedinica »H« i »M« u tetramere, pri čemu nastaju dva homotetramera (H_4 i M_4) i tri heterotetramera: H_3M , H_2H_2M i HM_3 (WIELAND et al. 1967).

MARKERT i FAULHABER (1965) su dokazali da i LDH riba dolazi u formi izoenzima, te da su u njihovoj strukturi angažirane također dvije subjedinice. Slična pojava je zapažena i u nekih amfibija (WINTERHALTER et al. 1972).

Kasnija istraživanja su pokazala da postoje znatne razlike u elektroforetskoj slici izoenzima LDH između pojedinih vrsta, kao i između populacija iste vrste riba (MORRISON i WRIGHT, 1966, ODENSE et al. 1966, 1969, OHNO et al. 1967, GOLDBERG 1965, 1966), koje su rezultat mutacija na lokusima odgovornim za sintezu jedne od subjedinica.

Kod nekih vrsta morskih riba (*Ditrema temminckii*) LDH izoenzimi predstavljaju dimere, sastavljene od dvije vrste ili od jedne vrste subjedinica (NUMACHI 1970). Dimerski karakter LDH izoenzima su dokazali Selander i Yank (1970) kod rakova *Limulus polyphemus*, pri čemu se javljaju dvije trijade izoenzima, nastalih pod odvojenom genskom kontrolom.

Kod nekih riba, kao kod većine Tetraodontida, Cottida, Pleuronectida i Lophiida, LDH se manifestirala kao jedinstven enzim (NUMACHI, 1970).

Saznanje o molekularnoj heterogenosti i genetskoj kontroli enzima ima poseban značaj s različitih stajališta. Za izučavanje evolucije i taksonomskih problema u riba, upoređenje izoenzimske slike će

dati podatke. Za analizu ribljih populacija, ispitivanje migracija ribljih jata i studije hibrida ispitivanje genetičkih varijacija enzima mogu koristiti kao jedan od genetskih marketa pored ispitivanja krvnih grupa i proteinograma.

Pored mutacija na lokusima, odgovornim za sintezu subjedinica, povećan broj izoenzima LDH se javlja i kod poliploidije, posebno tetraploidije. Ova pojava je uočena kod *Salvelinus fontinalis* (GOLDBERG 1966, MORRISON i WRIGHT 1966, BOUCK i BALL 1968, WINTERHALTER 1972), *S. namaychus* (BOUCK i BALL 1968), *Salmo salar* (WILKINS 1968), *S. gairdneri* (BOUCK i BALL 1968, WINTERHALTER et al. 1971-a, 1972-a) te *Salmo trutta* (WINTERHALTER et al. 1971-b), dok se među salmonidima jednostavan broj od pet izoenzima LDH može naći kod *S. marmoratus* i *Salmothymus obtusirostris* (WINTERHALTER et al. 1971-a, 1971-b).

Među ciprinidnim vrstama, povećan broj izoenzima LDH je dokaz u šarana — *Cyprinus carpio* — (WINTERHALTER 1972) i oštrulje — *Aulopyge hügelii* — (WINTERHALTE et al. 1972-a). U oba slučaja ispitivanja kromozomske slike su pokazala tetraploidni karakter ispitivanih riba (BERBEROVIĆ 1967, BERBEROVIĆ et al. 1971). Obzirom da dosadašnji podaci koji se odnose na kromozomsku sliku riba roda *Barbus* pokazuju da broj kromozoma u *Barbus barbus* i u *Barbus meridionalis petenyi* iznosi 100 (BERBEROVIĆ — et al. 1971), bilo je logično očekivati povećan broj izoenzima LDH i kod ovih vrsta.

U tom cilju smo ispitivali izoenzime LDH iz seruma i repnog mišića *B. barbus* i *B. meridionalis petenyi* elektroforezom na gelu akrilamida.

MATERIJAL I METODE

Krv je uzimana iz repne vene nakon presijecanja repa. Distalni dio repnog mišića je očišćen i homogeniziran uz dodatak 0,25 M rastvora saharoze u

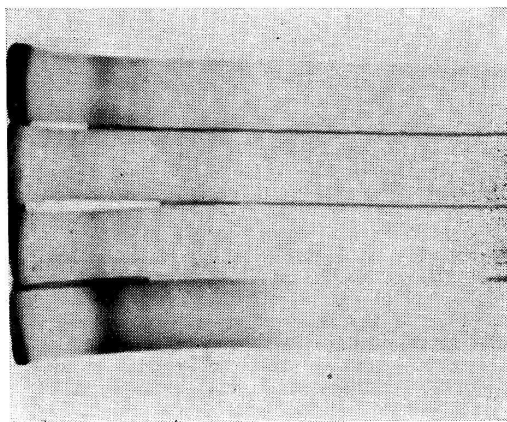
omjeru 1:1 g/ml. Nakon homogenizacije materijal je centrifugiran tokom 5 minuta na 16.000 obrtaja/min. u Beckmann Spinco mikrocetrifugi.

Elektroforetska analiza je izvođena po modificiranoj (JADRIĆ et al 1971) metodi BLOEMENDAALA (1963).

Detekcija izoenzima je vršena po modificiranoj (PERIĆ et al 1971, WINTERHALTER et al 1971-a) metodi CLAUSENA i OVLISENA (1965), koristeći test rastvor »Lac dehydrat« (Warner Chilcott Lab., Morris Plains, N. J.)

REZULTATI I DISKUSIJA

Na slici 1 su prikazani elferogrami seruma i mišića *B. barbus* (gore) i *B. meridionalis* petenyi (do-lje). Može se vidjeti da oba uzorka pokazuju povećan broj frakcija LDH.



Slika 1

U uzorcima *B. barbus* smo našli deset izoenzima, dok je taj broj kod *B. meridionalis* petenyi iznosio osam. U nekim uzorcima mišića *B. barbus* detektovano je po devet izoenzima LDH.

Ova razlika u broju izoenzima, kako kod pojedinih jedinki *B. barbus*, tako i među dvjema ispitivanim vrstama, je najvjerojatnije posljedica različite aktivnosti pojedinih izoenzima te se frakcije s najnižom aktivnošću pod uvjetima eksperimenta ne mogu uvijek dokazati. Ovu pojavu su uočili BOUCK i

BALL (1968) kod salmonida, a zapazili smo je i kod *Proteus anguinus* (WINTERHALTER et al 1972-b). Apsolutni broj izoenzima nije od presudnog značaja i ovisi o elektroforetskoj tehnici i uvjetima eksperimenta, količini uzetog materijala i aktivnosti fermenta u tkivima. Nalaz sa više od pet frakcija ukazuje da se radi o poliploidiji.

Izoenzimi LDH u *B. barbus* i *B. meridionalis* petenyi su locirani na katodnom dijelu gela, nedaleko od mjesta aplikacije. Njihov raspored je gotovo identičan, s tim da se dvije najbrže frakcije u *B. meridionalis* ne mogu vidjeti. Raspored frakcija duž gela je uglavnom jednoličan i razmak između pojedinih linija je približno jednak. Relativne aktivnosti izoenzima su različite i prema intenzitetu se mogu svrstati u tri grupe. Najmanju relativnu aktivnost imaju najbrže frakcije. Izoenzimi koji zauzimaju središnji dio slike su nešto jače izraženi i međusobno pokazuju približno jednaku aktivnost. Najveću relativnu aktivnost ispoljavaju tri frakcije na katodnom kraju, naročito frakcije 8 i 10.

Položajem, izgledom i raspodjelom relativnih aktivnosti izoenzimi LDH u riba roda *Barbus* podsjećaju uvelike na sliku zamijećenu u *Aulopyge hügelii* (WINTERHALTER et al 1972-a).

ZAKLJUČAK

U serumu i mišiću ispitivanih riba roda *Barbus* elektroforezom na gelu akrilamida dobiva se povećan broj izoenzima LDH.

U uzorcima *B. meridionalis* petenyi može se dokazati osam, a kod *B. barbus* do deset izoenzima.

Dobiveni rezultati potvrđuju nalaze koji ukazuju na tetraploidni karakter ispitivanih riba.

SUMMARY

Electrophoretic analysis of serum and muscle lactate dehydrogenases in *Barbus barbus* and *B. meridionalis* petenyi was performed using disc polyacrylamide method of Bloemendaal.

Acrylamide electrophoresis yielded eight fractions of LDH in *B. meridionalis*, while in *B. barbus* up to ten isoenzymes were detected.

The results obtained in our experiments support the findings indicating the tetraploidic nature of these two fishes.

LITERATURA

- BERBEROVIĆ LJ.: »Podaci o kariotipovima slatkovodnih riba iz voda Bosne i Hercegovine« Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu, **20**, 5—15 (1967)
- BERBEROVIĆ LJ., HADŽISELIMOVIĆ R., PAVLOVIĆ B., SOFRADŽIJA A.: »Sistematski položaj vrste *Aulopyge hügelii* Heckel 1841. u svjetlu osnovnih podataka o njenoj kromozomskoj garnituri« I. Jugoslavenski simpozijum iz sistema tike, Sarajevo, 1971, str. 31.
- BLOEMENDAAL H.: »Zone Electrophoresis in Blocks and Columns« Elsevier, Amsterdam (1963)

- BOUCK G. R. and BALL R. C.: »Comparative electrophoretic patterns of Lactate dehydrogenase in three species of Trout« J. Fisch. Res. Bd. Canada, **25**, 1323—1331 (1968)
- GOLDBERG E.: »Lactate dehydrogenase in Trout. Evidence for a third subunit« Science, **148**, 391—392 (1965)
- GOLDBERG E.: »Lactate dehydrogenase of Trout Hybridization in vivo and in vitro« Science, **151**, 1091—1093 (1966)
- CLAUSEN J. and OVLISEN B.: »Lactate dehydrogenase isoenzymes of human serum« Biochem. J **97**, 513—517 (1965)

- JADRIĆ S., PERIĆ B., WINTERHALTER H., ABINUN A.: »Upotreba modificirane denzitometrijske metode u kvantitativnoj analizi elferograma na agarnom i akrilamidnom gelu« Bilten K. O. fizičara za med. fiziku, 8, 7 (1971)
- MARKERT C. L. and FAULHABER I.: »Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish« J. Exp. Zool 159, 319—322 (1965)
- MORRISON W. J. and WRIGHT J. E.: »Genetic analysis of three dehydrogenase isozyme systems in Trout: Evidence for linkage of genes coding subunits A and B« J. Exp. Zool. 163, 259—270 (1966)
- NUMACHI K. I.: »Lactate and Malate dehydrogenase isozyme patterns in fish and marine mammals« Bull. Jap. Soc. Scient. Fisch. 36, 1067—1077 (1970)
- ODENSE P. H., ALLEN T. M., LEUNG T. C.: »Multiple forms of Lactate dehydrogenase and Aspartate aminotransferase in herring (Clupea harengus)« Can. J. Biochem. 44, 1319—1326 (1966)
- ODENSE P. H., LEUNG T. C., ALLEN T. M., PARKER E.: »Multiple forms of Lactate dehydrogenase in the Cod (Gadus morhua)« Biochem. Genetics, 3, 317—334 (1969)
- OHNO S., KLEIN J., POOLE J., HARRIS C., DESTREE A., MORRISON M.: »Genetic control of Lactate dehydrogenase in the hagfish (Eptatretus stoutii)« Science 156, 96—98 (1967)
- PERIĆ B., ABINUN A., WINTERHALTER M., JADRIĆ S., KRISTIĆ A., TANACKOVIĆ F.: »Komparacija elektroforetske i imunoelktroforetske slike serumskih proteina i izoenzima LDH kod 'Sarajevskih četvorki'« »Zbornik VII Kongresa fiziologa Jugoslavije, Beograd 1971, str. 166.
- SELÄNDER S. K., YANG S. Y.: »Horschoe Crab Lactate dehydrogenase: Evidence for dimeric structure« Science 169, 179—181 (1970)
- WEBB E. C.: »The identity of enzymes« e: FLORKIN M. and STOTZ E. H.: »Comprehensive Biochemistry« Vol. 12, pp 10—13, Elsevier, Amsterdam (1964)
- WIELAND TH. und PFLEIDERER G.: »Molekularbiologie« Umschau Verlag, Frankfurt (1967)
- WILKINS N. P.: »Lactate dehydrogenase isoenzymes in Atlantic salmon (Salmo salar)« Proc. 11-th Congress E. S. A. B. R. Warsaw (1968)
- WINTERHALTER M.: »Analiza izoenzima laktat dehidrogenaza u serumu i mišiću slatkovodnih riba elektroforezom na akrilamidnom gelu« (magistarski rad) Sarajevo, 1972.
- WINTERHALTER M., JADRIĆ S., PERIĆ B., ABINUN A.: »Elektroforetska analiza serumskih proteina, LDH i MDH kod endemskih slatkovodnih riba s kraškog područja Bosne i Hercegovine« Zbornik VII Kongresa fiziologa Jugoslavije, Beograd, 170 (1971-a)
- WINTERHALTER M., JADRIĆ S., PERIĆ B., ABINUN A.: »Komparacija elektroforetske slike izoenzima LDH i MDH u serumu i mišiću nekoliko vrsta slatkovodnih riba« I. Jugoslavenski simpozijum iz sistematike. Sarajevo, str. 39 (1971-b)
- WINTERHALTER M., JADRIĆ S., PERIĆ B.: »Elektroforetska analiza izoenzima LDH u oštrulje (Aulopyge hügelii Heck.) na gelu akrilamida« Ichthyologia (u štampi) 1972-a
- WINTERHALTER M., ŠVOB M., JADRIĆ S., ŠVOB T.: »The electrophoretic patterns of serum proteins and serum and muscle dehydrogenases in Proteus anguinus Laur« Folia Medica Saraeviensis (in press) 1972-b