

M. Winterhalter, S. Jandrić, S. M. Ayoub, B. Perić

Institut za fiziologiju i biokemiju
Medicinskog fakulteta u Sarajevu

Izoenzimi laktat dehidrogenaze u riba roda *Leuciscus*

Ranija istraživanja, vršena na nekim vrstama riba iz roda *Leuciscus*, ukazuju da ove vrste spadaju u grupu diploidnih Ciprinida (Ohno et al. 1967.). Prema podacima spomenutih autora, diploidni broj kromozoma klena (*Leuciscus cephalus*) iznosi 50. Veličina genoma, međutim, kod iste vrste iznosi 38 posto od genoma placentarnih sisavaca, dok je za niz drugih diploidnih Ciprinida veličina genoma znatno manja. Veličinom genoma *L. cephalus* je bliži nekim tetraploidnim ciprinidnim vrstama, npr. *Barbus barbus* (Ohno, 1970.).

Obzirom na interesantno mjesto roda *Leuciscus* na ljestvici genoma, od posebnog je značaja istraživanje broja lokusa koji kodiraju sintezu subjedinića složenih enzimskih molekula. Nameće se, naime, pitanje u kojoj mjeri je povećana količina DNK po jezgri (veličina genoma) posljedica regionalne duplikacije gena, bez porasta broja kromozoma. Dok tetraploidizacija podrazumijeva udvajanje svakog genskog lokusa u genomu, kod regionalnog udvajanja dolazi do selektivnog povećanja broja lokusa odgovornih za kodiranje pojedinih polipeptidnih lanaca, a ostali lokusi ostaju neumnoženi (Ohno, 1970., Nikolić 1972.). Posljedica je toga da samo neki od fermentata ili drugih proteina pokazuju povećani broj molekularskih varijacija. Tako u *L. cephalus* nije zapažen porast broja lokusa za sintezu laktat dehidrogenaze (Ohno, 1970.), ali je primijećeno udvajanje lokusa za sintezu 6-fosfoglukonat dehidrogenaze, slično kao i kod linjaka (Bender i Ohno, 1968, Klose et al. 1969.).

Ispitujući broj i pokretljivost dehidrogenaza iz ekstrakta mišića čovječije ribice (*Proteus anguinus* Laur.) elektroforezom na gelu akrilamida, mogli smo konstatirati da se malat dehidrogenaza (MDH) i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (GPDH) manifestiraju kao jedinstveni enzimi, dok laktat dehidrogenaza (LDH) pokazuje pojavu izoenzima, a time i postojanje najmanje dvaju tipova subjedinića (Winterhalter et al. 1972.).

Osim podataka o izoenzimima LDH u *L. cephalus*, koji su navedeni u istraživanjima Ohno-a (1970.) i potvrđeni u našim ranijim ispitivanjima (Jandrić et al. 1972.), postoji još samo mali broj podataka o LDH kod drugih vrsta ovoga roda. U preliminarnim ispitivanjima izoenzima LDH iz mišića strugača (*L. svallize*) dobili smo po pet frakcija, sa pokretljivošću pojedinih izoenzima koje odgovaraju onima kod klena (Winterhalter et al. 1971.). Slične rezultate smo dobili i kod *L. idus* (Jandrić et al. 1972.).

U ovom radu smo elektroforezom na gelu akrilamida ispitivali broj i pokretljivost izoenzima LDH iz ekstrakta repnog mišića kod četiri vrste riba roda *Leuciscus*.

MATERIJAL I METODE:

Analizirani su uzroci mišićnog ekstrakta sljedećih vrsta riba: *L. cephalus cephalus* i *L. cephalus albus*, *L. svallize*, *L. idus* i *L. turskyi*. Ukupno je ispitivano 40 jedinki, kako se vidi iz tabele 1.

Ekstrakti repnog mišića su priređeni homogeniziranjem očišćenog repnog mišića uz dodatak 0,25 M rastvora saharoze (1 ml na 1 gram tkiva) i centrifugirani 30 minuta na 7.000 obrtaja u minuti. Bistri supernant je korišten za analizu.

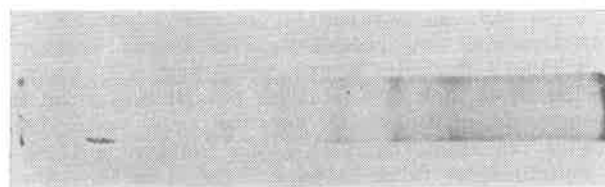
Elektroforetska separacija izoenzima je vršena na gelu akrilamida po vertikalnoj »disk« metodi Bloemendala (1963.) u aparatu firme »Pleuger«, Vijnegem.

Vizualizacija izoenzima je vršena po vlastitoj metodi (Winterhalter 1972., Winterhalter et al. 1972.-a) uz upotrebu test-kompleta »Lac Dehydrate« (Warner-Lambert Co, Morris Plains, N. J.) Mjesta aktivnosti izoenzima se manifestiraju na gelu u obliku jarkocrvenih linija koje potječu od formazana stvorenog u toku inkubacije.

REZULTATI I DISKUSIJA:

Na slici 1 je prikazan originalni enzimogram LDH mišića klena (*L. cephalus*).

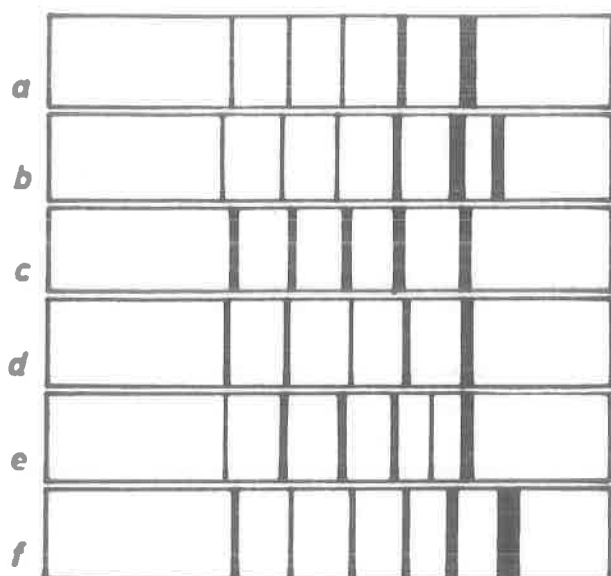
Slika 1.



Tipični enzimogrami, dobiveni u toku istraživanja, su šematski prikazani na slici 2. Položaj frakcija na šemi odgovara položaju na akrilamidnom gelu dužine 8 cm. U uzorcima mišića *L. cephalus* (sl. 1, sl. 2-a), *L. idus* (sl. 2-c) i *L. svallize* (sl. 2-t) dobili smo u većini slučajeva po pet frakcija LDH. Istu sliku smo u *L. cephalus* i *L. svallize* dobili ranije i u serumu (Winterhalter 1972., Jandrić et al. 1972.).

1) — Šef laboratorija Vojne bolnice, Addis Abeba, Etiopija, stipendist Zavoda za tehničku suradnju SR BiH.

Slika 2.



Pokretljivost frakcija LDH prema anodi u svim ispitivanim uzorcima je bila veća nego u ekstraktima mišića većine tetraploidnih i nekih diploidnih: Ciprida, kao i Salmonida (Winterhalter et al. 1971., 1972-c), a izoenzimi su odvojeni razmjerno širokim međuprostorima.

Navedene karakteristike enzimograma pokazuju da se radi o izoenzimima koji su rezultat spajanja dviju vrsta subjedinica u formi tetramera, odnosno da su u sintezu izoenzima LDH kod ovih riba uključena dva genska lokusa (Markert, 1963).

Subjedinice »A« i »B«, kodirane od posebnih lokusa, prema tumačenju Markerta, stvaraju sljedeće tetramere: A_4 , A_3B , A_2B_2 , AB_3 i B_4 , pri čemu je homotetramer A_4 najsporija (LDH-5), a homotetramer B_4 najbrža (LDH-1) frakcija prema anodi, kada se elektroforeza izvodi u pH području između 8,0 i 9,0.

Postojanje pet klasičnih izoenzima LDH je karakteristika diploidnih vrsta. Rezultati koje smo dobili u ovom radu su u skladu s postojećim podacima o kariotipovima riba roda *Leuciscus*. Prema Berberoviću (1967.) diploidni kromozomski broj u *L. cephalus* iznosi 46, dok Ohno (1970.) navodi brojku od 50 kromozoma u diploidnoj garnituri ove vrste. Istu brojku (50 kromozoma) je našao Berberović (1967.) u epitelijskom tkivu škrge *L. turskyi* iz livanjsko-poljskih voda.

Nismo našli podataka o kromozomskoj garnituri *L. idus* i *L. svallize*, ali se na temelju dobivene elektroforetske slike LDH može pretpostaviti da se i kod ove dvije vrste radi o diploidnim kromozomskim garniturama.

Slika sa pet jasno separiranih izoenzima LDH bi, prema tome, bila normalan nalaz kod ribe roda *Leuciscus*, što znači da u ovih riba nije došlo do udvajanja gena koji kodiraju sintezu subjedinica »A« i »B«.

U toku rada smo kod nekih jedinki dobili po šest, umjesto pet izoenzima LDH.

Učestalost ovih nalaza kod pojedinih vrsta riba je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1.

Vrsta	Broj ispitanih jedinki	Broj jedinki sa 6 frakcija LDH
L. cephalus:		
L. ceph. cephalus	15	3
L. ceph. albus	7	5
L. idus:	5	—
L. svallize:	12	2
L. turskyi:	1	1

Iz tabele se vidi da je pojava »prekobrojne« frakcije LDH bila na ispitivanom materijalu relativno česta (blizu 30%). Učestalost je bila najveća kod riba lovljenih u slivu Neretve (*L. cephalus* albus, *L. svallize*). Zanimljivo je da je u pet od sedam ispitanih jedinki *L. cephalus* albus nađena pojava šestot izoenzima LDH, dok takva pojava nije nađena niti u jednom od pet mišića *L. idus*. Ove razlike sugeriraju da je potrebno izvršiti opsežnija populacijska ispitivanja, da se ispita da li se ne radi o slučajnim razlikama, uvjetovanim razmjerno malim brojem ispitanih jedinki.

Pokretljivost »prekobrojne« frakcije je bila različita, a također i njena aktivnost. U većini slučajeva, kod *L. cephalus* (sl. 2-b) i u jedinom primjerku *L. turskyi* (slika 2-f) ova frakcija ima manju pokretljivost prema anodi nego frakcija LDH-5. U nekim slučajevima, kako kod *L. cephalus*, tako i kod *L. svallize* (sl. 2-e), prekobrojna frakcija se javlja između izoenzima LDH-a4 i LDH-5. Pozicija »prekobrojne« frakcije se može razmjerno lako utvrditi na osnovu pokretljivosti izoenzima pod standardnim uvjetima elektroforeze.

Aktivnost »prekobrojne« frakcije je u nekim slučajevima bila mala, a u nekih jedinki (sl. 2-b, sl. 2-f) je bila približno jednaka, ili čak veća od aktivnosti frakcije LDH, koja je u mišiću redovno najjača LDH frakcija.

Objašnjenje pojave šeste frakcije LDH u riba roda *Leuciscus* nije jednostavno.

Ne može se isključiti mogućnost da se radi o artifičnoj frakciji (»Nothing dehydrogenase«-Wilkinson, 1970.), čija je pojava zapažena od više istraživača (Markert i Faulhaber, 1965, Hochachka 1966.), ali je vjerojatnost da se radi o lažnoj frakciji smanjena činjenicom da se prekobrojne frakcije javljaju samo kod nekih jedinki, i to također u opetovanim analizama, iako su svi uzorci analizirani pod istim uvjetima obzirom na pH, jonsku jačinu, napon struje i vrijeme elektroforeze. Moguće je da u toku elektroforeze na pH iznad 8,0 dolazi u nekim slučajevima do disocijacije LDH-5, s pojavom više aktivnih subfrakcija. Sličnu pojavu su zapazili Štepan i Večerek (1969) kod jetre štakora u LDH-5 nakon elektroforeze na agarom gelu. U pokusima ovih autora, međutim, dodatne frakcije su pokazivale veću elektroforetsku pokretljivost.

Ne može se, nadalje, zanemariti ni mogućnost da je pojava prekobrojnih frakcija posljedica patoloških promjena, prvenstveno uslijed trovanja, jer je zapaženo da kod štakora dolazi ne samo do porasta aktivnosti serumske LDH-5, nego i do pojave sub-

frakcija nakon eksperimentalnog trovanja tetraklorometanom (Schneiderka et al. 1970., Večerek et al. 1971.), iako ne raspoložemo nikakvim podacima da se u ovim pokusima radi o oštećenoj ribi. Čini se najvjerojatnijim da bi pojava »prekobrojne« frakcije mogla biti rezultat interspecijske hibridizacije. Ranija istraživanja slatkovodnih i morskih riba, kao i nekih drugih nižih kičmenjaka, su pokazala da se kod hibridnih jedinki javlja povećani broj izoenzima LDH (Goldber et al. 1969., Whitt et al. 1971.), koji su rezultat pojave različitih alala za kodiranje jedne vrste subjedinice LDH, bez promjene broja kromozoma. Pojava prekobrojnih frakcija je zapažena i kod infra-specijskih hibrida, ako dolazi do ukrštanja jedinki od kojih barem jedna ima mutantni gen za LDH. (Odense et al. 1966., Hodgins et al. 1969., Wright et al. 1970., Morrison 1970., etc.).

Ovu pojavu smo zapazili i od izoenzima LDH iz mišića dviju podvrsta *A. alburnus* (*A. alburnus alburnus* i *A. alburnus albarella*) pri čemu su karakteristike mutantnih subjedinica kod jedne i druge podvrste bile različite, iako standardna slika izoenzima LDH dviju podvrsta ne pokazuje vidljivih razlika (Winterhalter et al. 1973.).

Iako se na osnovu dosadašnjih ispitivanja ne može sa sigurnošću izvesti zaključak da se kod riba roda *Leuciscus* zaista radi o posljedici inter- i intraspecijske hibridizacije, ovi podaci sugeriraju potrebu poduzimanja širih i kombiniranih istraživanja na različitim populacijama pojedinih vrsta riba roda *Leuciscus*, u kojima bi bili angažirani morfolozi, kariozozi i biokemičari. Tek ovakva ispitivanja, provedena na većem broju jedinki, mogu dati definitivno objašnjenje pojave i porijekla »prekobrojnih« frakcija LDH, zapaženih u ovom radu.

ZAKLJUČAK :

Elektroforezom na akrilamidnom gelu su razdvojeni izoenzimi laktat dehidrogenaze (LDH) iz ekstrakta skeletnog mišića *Leuciscus cephalus*, *L. idus*, *L. svallize* i *L. turskyi*.

Istraživanja su pokazala da se kod riba roda *Leuciscus* nalazi pet izoenzima LDH, koji su rezultat kombiniranja dviju subjedinica, kodiranih od posebnih genskih lokusa.

Kod nekih jedinki je zapažena pojava šeste frakcije LDH. Diskutirana su moguća objašnjenja ove pojave. Kao najvjerojatnije objašnjenje iznesena je pretpostavka, zasnovana na podacima iz literature i vlastitim opažanjima, da je povećani broj izoenzima LDH rezultat intra- i interspecijske hibridizacije unutar roda *Leuciscus*.

SUMMARY :

The isoenzymes of lactate dehydrogenase (LDH) from the extract of skeletal muscle of *Leuciscus cephalus*, *L. idus*, *L. svallize* and *L. turskyi* have been separated by acrylamide gel electrophoresis.

The results showed that in the fishes of the genus *Leuciscus* normally exist five LDH isoenzymes, as the result of tetrameric assembly of two different kinds of sub-units, coded by two separate genes.

In some specimens, the appearance of the sixth LDH fraction was observed. Possible explanations of

this fact were discussed. It seems to be the most likely that the increase of the number of LDH isoenzymes in these fishes arose as the result of inter- and intraspecies hybridization in the genus *Leuciscus*. This explanation should be in the accordance both with the literature data, and with author's previous experiences.

LITERATURA :

1. Bender K., Ohno S. (1968): Duplication of the autosomally inherited 6-phosphogluconate dehydrogenase gene locus in tetraploid species of Cyprinid fish *Biochem. Genetics*, 2, 101
2. Berberović Lj. (1967): Podaci o kariotipovima slatkovodnih riba iz voda Bosne i Hercegovine *Godišnjak Biološkog Instituta, Sarajevo*, 20, 5
3. Bloemendaal H. (1963): »Zone Electrophoresis in Blocks and Columns« Elsevier, Amsterdam
4. Goldberg E, Cuerrier J. P, Ward J. C. (1969): Lactate dehydrogenase ontogeny, paternal gene activation, and tetramer assembly in embryos of brook trout, lake trout and their hybrids *Biochem. Genetics*, 2, 335
5. Hochachka P. W. (1966): Lactate dehydrogenase in poikilotherms: Definition of a complex isozyme system *Compl. Biochem. Physiol.* 18, 261
6. Hodgins H. O, Ames W. E, Utter F. M. (1969): Variants of lactate dehydrogenase isozymes in sera of Sockeye salmon (*O. nerka*) *J. Fisch. Res. Bd. Canada*, 26, 15
7. Jadrić S, Winterhalter M, Perić B, Vranešić M. (1972-): Lactate dehydrogenase isoenzymes in fresh-water fishes of the family Cyprinidae *Abstr. VIII-th FEBS Meeting, Amsterdam*, 304
8. Klose J, Wolf U, Hitzeroth H, Ritter H, Ohno S. (1969): Polyploidization in the fish family Cyprinidae, order Cypriniformes. II.: Duplication of gene loci coding for lactate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 27) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 44) in various species of Cyprinidae. *Humangenetik*, 7, 245
9. Markert C. L. (1963): Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits *Science*, 140, 1329
10. Markert C. L, Faulhaber I. (1965): Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish *J. Exp. Zool.* 159, 319
11. Morrison W. J. (1970): Nonrandom segregation of two lactate dehydrogenase subunit segregation of trout *Trans. Amer. Fish. Soc.* 99, 193
12. Nikolić V. (1972): Genski potencijal riba i polimorfizam proteinskih frakcija (Rukopis)
13. Odense P. H, Allen T. M, Leung T. C. (1966): Multiple forms of lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in herring (*Clupea harengus*) *Canad. J. Biochem.* 44, 1319
14. Ohno S. (1970): »Evolution by Gene Duplication« Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York
15. Ohno S, Muramoto J, Christian L, Atkin N. B. (1967): Diploid-tetraploid relationship among Old-world members of the fish family Cyprinidae *Chromosoma*, 23, 1
16. Schneiderka P, Kadlecova L, Štepan J, Večerek B, Winterhalter M, Stojkov K. (1970): Zmjeny isoenzymoveho spektra v jatrech a v seru pri akutni otrave tetrachlormetanom

- VI. Celoštatne Biokemicke Dni ČSSR, Martin
17. Štepan J, Večerek B. (1969): Dissociation of LDH-5 and mitochondrial GOT in ionic strength and pH gradients
Abstr. VI-th FEBS Meeting, Madrid, 251
 18. Večerek B, Schneiderka P, Winterhalter M, Stojkov K, Schinkmannova L, Kadlecova L, Štepan J. (1971): Isoenzymic changes in rat liver cytoplasm and blood serum in course of acute trachlormetan poisoning
III. Kongres Med. biokemičara Jugoslavije, Bled
 19. Whitt G. S, Childers W. F, Wheat T. E. (1971): The inheritance of tissue specific lactate dehydrogenase isozymes in interspecific Bass (*Micropterus*) hybrids
Biochem. Genetics, 5, 257
 20. Winterhalter M. (1972): »Elektroforetska analiza izoenzima laktat dehidrogenaze kod nižih kičmenjaka na gelu akrilamida«
Magistarski rad, Sarajevo
 21. Winterhalter M, Jadrić S, Perić B, Abinun A. (1971-a): Elektroforetska analiza serumskih proteina, LDH i MDH kod endemskih slatkovodnih riba s Kraškog područja Bosne i Hercegovine
Zbornik VI. Kongresa fiziologa Jugoslavije, 170
 - 22.2 Winterhalter M, Jadrić S, Perić B, Abinun A,
 22. Winterhalter M, Jadrić S, Perić B, Abinun A, Vuković T. (1971-b): Komparacija izoenzima LDH i MDH iz seruma i mišića nekoliko vrsta slatkovodnih riba
I. Jugoslavenski simpozijum iz sistematike, Sarajevo, 39
 23. Winterhalter M, Jadrić S, Perić B, Abinun A, Vuković T. (1971-c): Komparacija elektroforetske slike izoenzima laktat dehidrogenaze u serumu i mišiću nekoliko vrsta salmonidnih riba
Zbornik radova I. simpozijuma sistematičara Jugoslavije, 195
 24. Winterhalter M, Švob M, Jadrić S, Švob T. (1972): The electrophoretic patterns of serum proteins and serum and muscle dehydrogenases in *Proteus anguinus* Laur.
Folia Medica, 7, 35
 25. Winterhalter M, Jadrić S, Ayou S, Abinun, A Perić B. (1972-a): Upotreba kolorimetrijskog testa »Lac Dehydrate« za detekciju izoenzima laktat dehidrogenaze nakon elektroforetske separacije
Socijalna medicina, 19
Socijalna medicina, 19
 26. Winterhalter M, Jadrić S, Perić B. (1972-b): Elektroforetska analiza izoenzima laktat dehidrogenaze iz seruma i mišića *Barbus barbus* i *Barbus meridionalis* petenyi na gelu akrilamida
Ribarstvo Jugoslavije, 27, 49
 27. Winterhalter M, Jadrić S, Ayou S, Perić B. (1973): Molecular variations of lactate dehydrogenase isoenzymes in the muscle of two subspecies of the fresh-water fish *Alburnus alburnus* (L)
Folia Medica, 8 (in press)
 28. Winterhalter M, Jadrić S, Perić B. (1973): Elektroforetska analiza izoenzima LDH u oštrulje (*Aulopyge hügelii* Heck.) na gelu akrilamida
 29. Wright J. E, Atherton L. M. (1970): Polymorphisms for LDH and Transferrin loci in Brook trout populations
Trans. Amer. Fish. Soc. 99, 179



Mihajlo D. Ristić

IZ RIBARSKE PRAKSE

Izgradnja novih ribnjačkih kapaciteta u podunavlju (SAP Vojvodina i SR Srbija) gledana u svetlu ekonomskih problema slatkovodnog ribarstva u SR Hrvatskoj

PRILOG ZA DISKUSIJU

U broju 2. lista »Ribarstvo Jugoslavije« od marata — aprila 1973. godine, publikovan je rad Dr K. Pažura, pod naslovom: »Ekonomske problemi slatkovodnog ribarstva u SR Hrvatskoj«. Kako ovaj rad svojim opsegom i zahvatom prelazi okvire ekonomski-

ke ribarstva i ribnjačarstva Hrvatske i zalazi u domen problematike i razvoja ribnjačarstva i u Republici Srbiji i SAP Vojvodini, te otuda prerasta i u opšte jugoslovenski problem ekonomike i razvoja ribnjačarstva, to, da bi se ovi problemi mogli sagledati svestranije i objektivnije i sa čisto tehničko-tehnološkog, hidropedološkog, hidrobiološkog kao i hi-