

Ljiljana Vapa, J. J. Purger i Dragana Radović

TKIVNA SPECIFIČNOST IZOZIMA KOD APODEMUS AGRARIUS
(RODENTIA, MAMMALIA)
TISSUE SPECIFICITY ISOZYMES OF APODEMUS AGRARIUS
(RODENTIA, MAMMALIA)

Посебан отисак — Reprint

НОВИ САД
1992.

TKIVNA SPECIFIČNOST IZOZIMA KOD *APODEMUS AGRARIUS* (RODENTIA, MAMMALIA)

Ljiljana Vapa, J. J. Purger, Dragana Radović
Institut za biologiju, PMF, Novi Sad

Rod *Apodemus* je u Evropi predstavljen sa šest vrsta: *A. agrarius Pallas*, 1771; *A. mystacinus* Danford i Alston, 1877; *A. sylvaticus* Linne, 1758; *A. flavicollis* Melchior, 1834; *A. microps* Kratochvil i Rosicky, 1952, i *A. alpicola* Heinrich, 1952. Srodnost između ovih vrsta se u poslednje vreme sve češće određuje biohemij-sko-genetičkim metodama, tj. proučavanjem gensko enzimske varijabilnosti (Avisé, 1974; Gemmeke, 1980; Gemmeke i Niethammer, 1981; Ayesha et al., 1986; Yasuda et al., 1990).

Gensko enzimska varijabilnost proučavana je različitim elektroforetskim metodama i na različitim tkivima, tako da su dobijeni i različiti rezultati pri određivanju genetičke bliskosti (I) ili udaljenosti (D) između i unutar vrsta, što predstavlja poteškoće pri upoređivanju rezultata.

Cilj ovog rada je da se prouči tkivna specifičnost najčešće proučavanih enzima, laktat dehidrogenaze (LDH) i izocitrat dehidrogenaze (IDH), na primeru vrste *A. agrarius*.

MATERIJAL I METODIKA

Ekspresija izozima ispitivana je kod 10 mužjaka *Apodemus agrarius* koji su izlovljeni tokom jeseni 1991. godine u Koviljskom ritu (AP Vojvodina). Za elektroforezu su uzimani uzorci tkiva iz sledećih organa: srce, jetra, želudac, crevo, slezina, bubreg, butni mišić i mozak. Tkiva su homogenizovana u destilovanoj vodi u odnosu 1:1 (w/v), zatim centrifugirana 3 minuta na 6000 obrtaja, pri temperaturi od 4°C.

Ispitivana je tkivna specifičnost enzima:

laktat dehidrogenaze, LDH—1 i LDH—2, E. C. 1.1.1.27

izocitrat dehidrogenaze, IDH—1 i IDH—2, E. C. 1.1.1.42.

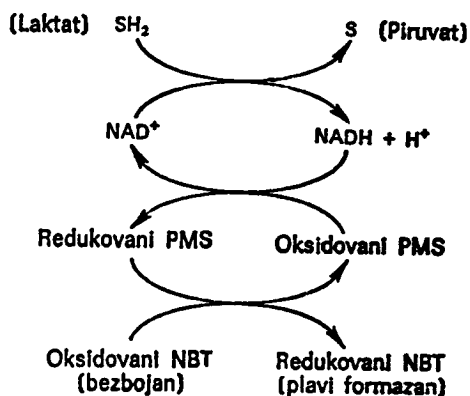
U radu je upotrebljena horizontalna elektroforeza i 12% skrobni gel. Pufferi i boje su korištene prema metodi Selander et al. (1971). Utvrđivanje aktivnosti izozima LDH na zimogramu je prikazano na Sl. 1, a na sličan način određena je i aktivnost IDH.

REZULTATI I DISKUSIJA

Kod svih ispitivanih životinja zapažena je ista tkivna specifičnost izozima LDH i IDH, što znači da su životinje bile homozigotne.

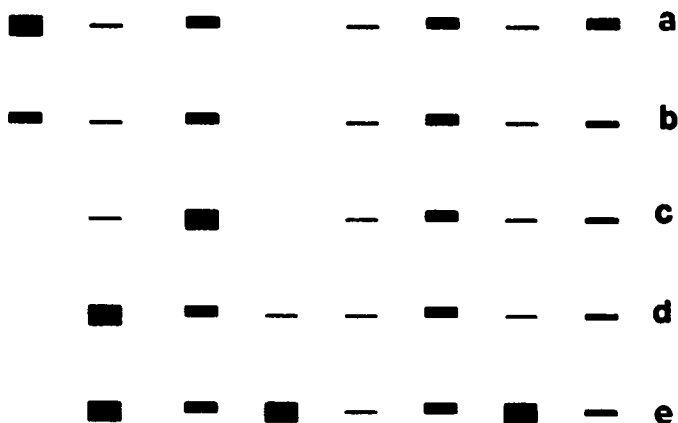
Poznato je da sintezu enzima laktat dehidrogenaze kontrolišu geni sa dva lokusa *Ldh—1* i *Ldh—2*. Svaka molekula enzima se sastoji od 4 podjedinice, tako da je moguće dobiti pet različitih kombinacija (AAAA, AAAB, AABB, ABBB, BBBB). Tako je prilikom elektroforetskih analiza i nađeno pet alela, tj. traka na gelu (a, b, c, d, e). Relativna količina izozima (broj traka i intenzitet njihove obojenosti) različita je i varira od organa do organa.

U uzorcima tkiva iz bubrega, želuca i mozga na zimogramu bilo je prisutno po pet traka sličnog intenziteta obojenosti (Sl. 2). U tkivu jetre, takođe su bile zastupljene sve trake, ali su trake a, b i c bile slabog intenziteta oboje-



Slika 1. Prikaz reakcija za utvrđivanje aktivnosti LDH na zimogramu.

nosti. U uzorku tkiva mišića su se jedva uočavale trake a, b, c i d, dok je traka e bila intenzivno obojena. Kod slezine sve trake su bile prisutne, ali veoma blede obojene. U tkivu creva mogla se uočiti samo svetla tanka traka d i tamno obojena traka e. U uzorku iz srca nađene su samo dve trake, tamna a i svetla b.

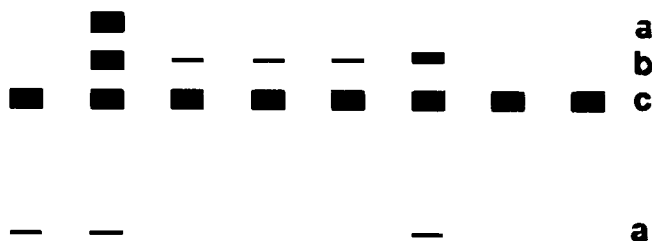


Slika 2. Šematski prikaz ekspresije izozima LDH kod *A. agrarius* u organima: 1. srce, 2. jetra, 3. želudac, 4. crevo, 5. slezina, 6. bubreg, 7. butni mišić, i 8. mozak

Sintezu enzima izocitrat dehidrogenaze kontrolišu geni sa lokusa *Idh-1* i *Idh-2*. U lokusu *Idh-1* nađena su tri alela, tj. trake na gelu (a, b, c), a u lokusu *Idh-2* samo jedan alel, u vidu trake a.

Na zimogramu IDH—1 su se samo u tkivu jetre mogle uočiti sve tri trake intenzivno obojene (Sl. 3). U uzorku iz bubrega su se zapažale dve trake, traka b slabo i traka c intenzivno obojena. U tkivima želuca, creva i slezine su bile prisutne po dve trake, traka b svetlo obojena i traka c tamnija. U uzorcima iz ostalih organa mogla se uočiti samo intenzivno obojena traka c.

Na zimogramu IDH—2 pojavljivala se samo jedna traka (a), u tkivima jetre i srca i bubrega. U uzorcima iz ostalih organa nije se uočavala ekspresija genskog lokusa *Idh-2*.



Slika 3. Šematski prikaz ekspresije izozima IDH—1 i IDH—2 kod *A. agrarius* u organima: 1. srce, 2. jetra, 3. želudac, 4. crevo, 5. slezina, 6. bubreg, 7. butni mišić, i 8. mozak

Yasuda et al. (1990) su proučavali tkivnu specifičnost izozima LDH kod laboratorijskih miševa na poliakrilamid gelu i pri tom ustanovili da je svih pet formi LDH aktivno u srcu, mozgu, bubregu, želucu i veoma slabo u mišiću. Izozimi LDH1*, LDH2 i LDH5 bili su dominantni u kičmenoj moždini i mozgu, LDH4 i LDH5 u crevu mišiću i slezini, dok je varijanta LDH5 dominirala u jetri. Iako je pristup istraživanja našeg rada identičan sa Yasuda et al. (1990), a upotrebljene su različite metode kao i laboratorijske životinje, može se reći da su se u oba slučaja tkiva bubrega, zatim želuca, pa mozga pokazala kao najpogodnija za ispitivanje gensko enzimske aktivnosti LDH. U uzorcima ovih organa bile su prisutne sve moguće trake, ali različitog intenziteta obojenosti.

Za proučavanje gensko enzimske varijabilnosti IDH kao najpogodnije se pokazalo tkivo iz jetre, jer je ekspresija izozima IDH—1, kao i IDH—2 bila tu najizraženija.

Na osnovu rezultata ovih istraživanja se može uočiti da je tkivna specifičnost često uzrok drastične razlike u broju alela istog enzima kod iste vrste životinja. Tako na primer kod nekih vrsta roda *Apodemus* u lokusu *Ldh-1* opisan je samo po jedan alel (Ayesha et al., 1987; Gemmeke, 1980) ili po dva alela (Filippucci et al., 1989) ili na suprot tome po pet alela (Yasuda et al., 1990; Engel et al., 1973). I rezultati ovog rada ukazuju na postojanje 1—5 alela u zavisnosti od organa koji se ispituje.

Pored utvrđivanja genetičke srodnosti individua unutar i između vrsta koje nalazi primenu u genetici, biosistematici i evoluciji, proučavanje tkivne specifičnosti izozima ima značaja u dijagnostici raznih bolesti. Tako se izozim LDH—1 koristi za otkrivanje infarkta miokarda, ili izozim IDH za dijagnostiku bolesti jetre i nekih drugih organa.

* LDH 1, 2, 3, 4, 5, = LDH a, b, c, d, e.

LITERATURA

- Avise JJ (1974) Systematic value of electrophoretic data. *Syst Zool* 23: 465–481.
- Aysha GB, Petrov B., Živković S., Rimsa D. (1986) Biochemical comparisons in Yugoslavian rodents of the families Arvicolidae and Muridae. *Z f Säugetierkunde* 52: 247–256.
- Engel W., Vogel W., Voiculescu I., Ropers HH. Zanzas MT, Bender K. (1973). Cytogenetic and biochemical differences between *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* possibly responsible for the failure to interbreed. *Comp Biochem Physiol* 44: 1165–1173.
- Filippucci MG, Simpson S., Nevo E. (1989) Evolutionary biology of the genus *Apodemus* Kaup, 1829 in Israel. Allozymic and biometric analyses with description of a new species: *Apodemus hermonensis* (Rodentia, Muridae). *Boll Zool* 56: 361–376.
- Gemmeke H. (1980). Proteinvariation und Taxonomie in der Gattung *Apodemus* (Mammalia, Rodentia). *Z f Säugetierkunde* 45: 348–365.
- Gemmeke H., Niethammer J. (1981): Die Waldmäuse *Apodemus sylvaticus* und *A. flavicollis* vom Monte Gargano (Süditalien). *Z f Säugetierkunde* 46: 162–168.
- Selander RK, Smith MH, Yuang SY, Johnson WE, Gentry JB (1971): Biochemical polymorphism and systematic in the genus *Peromyscus*. I Variation in the Old-field Mouss (*Peromyscus polionotus*). *Stud Genetics* 6: 49–90.
- Yasuda J., Tateyama K., Syto B. (1990): Lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase isoenzymes in tissues of laboratory animals. *Jpn J. Vet Res* 38: 19–29.

Zahvaljujemo se Prof. dr Paul Ramsey-u za poklon-hemikalije. Rad je finansiran od strane Fonda za naučni rad u okviru istraživanja koja su od značaja za razvoj naučnih disciplina.

TISSUE SPECIFICITY ISOZYMES OF *Apodemus agrarius*
(Rodentia, Mammalia)

Ljiljana Vapa, J. J. Purger, Dragana Radović

SUMMARY

An expression of lactate dehydrogenase (LDH) and isocitrate dehydrogenase (IDH) isozymes in different tissues of heart, liver, gaster, intestine, spleen, kidney, femoral muscle, and cerebrum of *Apodemus agrarius* is analyzed by the method of starch gel electrophoresis. *A. agrarius* was trapped in Koviljski rit, Vojvodina.

LDH isozyme was separated into two bands in heart and intestine tissues, whereas in gaster, cerebrum, kidney, liver and muscle five bands were observed. Isozyme IDH—1 showed three bands in the liver tissue, and two dark bands in kidney, and IDH—2 was expressed only in liver, heart and kidney. Therefore, the use of kidney tissue for LDH, and liver tissue for IDH isozymes variability may be recommended.