

CONTRIBUȚII LA STUDIUL ELECTROFORETIC AL UNOR ENZIME GLICOLITICE DIN ERITROCITELE DE MESOCRICETUS AURATUS, MESOCRICETUS NEWTONI, MESOCRICETUS BRANDTI ȘI SPALAX LEUDOCON

D. SCRIPCARIU, R. MEȘTER și ȘT. TORCEA

Cercetarea activității enzimatică și a formelor moleculare a diferitelor enzime, suscită un deosebit interes în explicarea funcțiilor metabolice la diferite animale. Dezvoltarea cercetărilor în acest domeniu a dus la evidențierea unor interesante deosebiri și asemănări între animalele aparținând diferitelor categorii taxonomice, ceea ce a făcut pe mulți cercetători să încerce a stabili și justifica pe această bază înrudiri între diferite specii, precum și a fundamenta și explica pe baze biochimice legături filogenetice (Manwell și col. 1966, Jacobson și col. 1969, Valdivieso și col. 1968, Hochachka 1966, Iakovleva 1968, Wilkinson 1965).

Numeroase date existente în literatură atestă faptul că în organe diferite se găsesc fracțiuni enzimatică distincte specifice de țesuturi, forme moleculare cu funcții distincte adaptate la condițiile funcționale ale țesuturilor.

Prin structura lor și funcția deosebită ce o îndeplinesc în organism, eritrocitele prezintă un interes aparte pentru studiile de enzimologie. Eritrocitele adulte ale mamiferelor, celule anucleate fără aparat Golgi și mitocondrial, fără o proteosinteză decelabilă, își datorează energia necesară menținerii structurii și funcțiilor lor glicolizei anaerobe.

În lucrarea de față ne-am propus să studiem unele enzime cu rol important în metabolismul anaerob al glucidelor din eritrocitele celor trei specii de *Mesocricetus*, specii de rozătoare, cu areale geografice de răspândire deosebite dar cu o biologie asemănătoare și *Spalax leucodon*, animal cu o biologie aparte trăind exclusiv în galerii, în condiții de temperatură și umiditate relativ constante și cu o atmosferă de o compoziție gazoasă deosebită.

Au fost studiate enzimele: Glucozo-6-fosfat dehidrogenază, (G6PDH), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază (GA3PDH) și lactico-dehidrogenază (LHD). Într-o lucrare anterioară am efectuat un studiu electroforetic al hemoglobinelor aceluiași specii (Scripcariu și col. 1971).

MATERIAL ȘI METODA

Speciile de *Mesocricetus* utilizate în studiul nostru provin de la crescătoria laboratorului de genetică al Institut. de Biologie „Tr. Săvulescu”. Specia *Spalax leucodon* a fost colectată din Dobrogea. Sîngele a fost prelevat pe heparină prin puncție cardiacă și centrifugat timp de 10 minute la 2 000 r/min pentru separarea eritrocitelor. Sedimentul a fost spălat prin resuspendare de trei ori în soluție de NaCl 0,9% și recentrifugat în aceleași condiții.

Prepararea hemolizatului s-a făcut după Singer și col. (1959) suspendînd eritrocitele într-un volum egal de apă și 0,5 ml toluen pe ml de hemolizat și centrifugare 30 min. la 5 000 r/min. Hemolizatul după adăugare de sucroză s-a supus electroforezei. Electroforeza s-a efectuat după sistemul disc-electroforeză (Davis 1964) timp de 3 ore la 3,12 mA/tub pe gel de Cyanogum 41, în tampon tip Ornstein (1964), la pH 8,6. S-a lucrat cu 0,1 ml probă pe tub. După terminarea electroforezei gelurile au fost scoase din tuburi, clătite cu apă distilată și apoi spălate timp de 15 min. cu o soluție tampon 0,2M tris -HCl 0,2M, pH 7,4, după care au fost supuse incubării în medii adecvate.

Astfel pentru punerea în evidență a glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, gelurile au fost incubate în mediu preparat după Thulline și col. (1967), iar gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza și lactico-dehidrogenaza în mediu preparat după Lush (1970) în care pentru GA3PDH lactatul a fost înlocuit în aceeași concentrație molară cu gliceraldehid-3-fosfat. Gelurile au fost incubate între 2 și 7 ore la 37°C, apoi spălate cu apă distilată și păstrate în acid acetic 7,5%.

Numerotarea formelor de izoenzime s-a făcut de la anod, după Webb (1964).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Modelele electroforetice ale enzimelor: glucozo-6-fosfat dehidrogenază (G6PDH), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază (GA-3-PDH) și lactico dehidrogenază (LDH) din hemolizatul celor 4 specii de rozătoare studiate prezintă un aspect destul de omogen. Astfel G.6.PDH (Fig. 1) prezintă un spectru izoenzimatic relativ asemănător la cele 3 specii de *Mesocricetus*, în electroforegramă apărînd trei benzi majore. La *M. auratus* și *M. newtoni* banda izoenzimatică 2 prezintă o activitate mai redusă decît la *M. brandti*. Din hemolizatul de *M. newtoni* se izolează o bandă secundară, notată cu 3, cu activitate situată sub banda 4, care ca reacție și poziție în gel ar corespunde izoenzimei 3 de la *M. auratus* și *M. brandti*. Electroforegrama de la *Spalax* prezintă două forme izoenzimatică cu o migrare lentă. Prima bandă lată prezintă o activitate slabă, banda 2 foarte îngustă, cu activitate intensă situată imediat sub start.

GA-3-PDH (Fig. 2) este perfect asemănătoare la cele 3 specii de *Mesocricetus*, apare ca 2 benzi cu activitate slabă situate spre partea

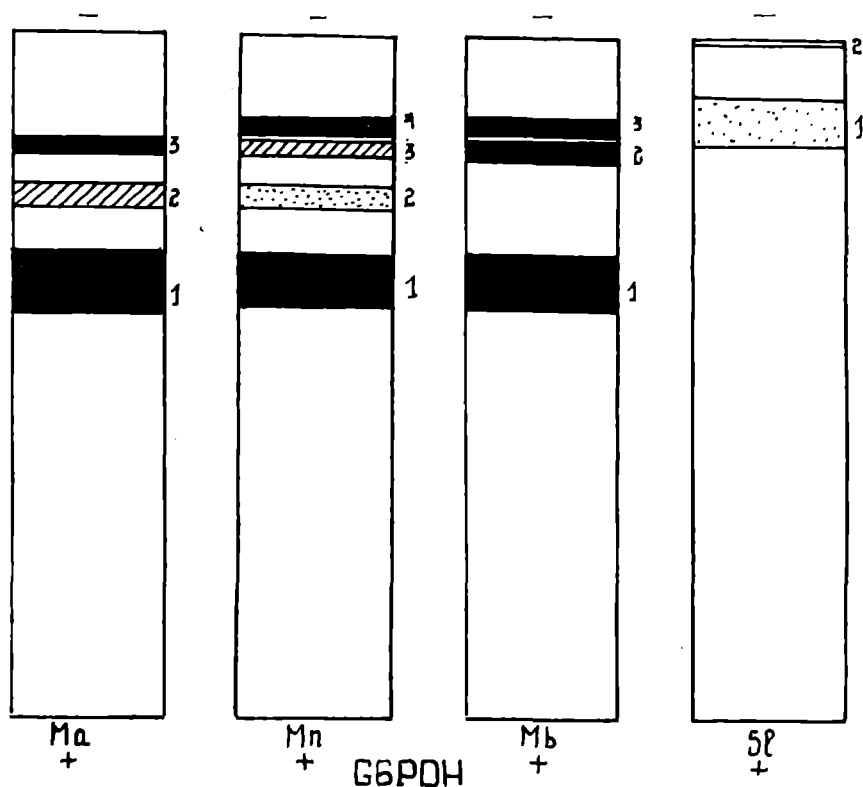


Fig. 1 — Electroforegrama glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6-PDH) dihemolizatul celor 4 specii

mediană a gelului. Electroforegrama acestei enzime din hemolizatul de *Spalax* prezintă o singură bandă cu activitate slabă, situată în imediata apropiere a liniei de start.

LDH (Fig. 3) prezintă în hemolizatul celor 3 specii de *Mesocricetus* 5 fracțiuni izoenzimice. La *M. newtoni* și *M. brandti* fracțiunile electroforetice ale lactico-dehidrogenazei prezintă aceeași viteză de migrare distingându-se prin aceea că fracțiunile 2 și 3 au o activitate mult mai intensă la *M. newtoni*, activitate prin care se aseamănă cu fracțiunile 3 și 4 de la *M. auratus*. La *M. auratus* fracțiunile 2 și 5 au o viteză de migrare mai mare decât la celelalte două specii, iar fracțiunea 5 prezintă o activitate foarte slabă.

La *Spalax leucodon* se izolează doar 4 fracțiuni izoenzimice cu migrare mai lentă, fiind grupate în treimea atodică a gelului.

Fracțiunile 2 și 3 se aseamănă prin activitate cu benzile corespunzătoare de la speciile *M. newtoni* și *M. brandti* având o activitate enzimatică mai mare.

Din analiza rezultatelor noastre reiese că în extractele speciilor studiate se desfășoară o activitate glicolitică complexă fapt sugerat de

separarea electroforetică din hemolizate a mai multor forme moleculare a enzimelor studiate. Datele noastre concordă cu rezultatele obținute de diferiți cercetători, care pun în evidență în eritrocite numeroase enzime legate de glicoliza anaerobă (Lundsgaard 1963, Murphy 1960, Bartlett și col. 1953, Velick și col. 1963, Rose și col. 1964, Vesell și col. 1962, Tusuboi și col. 1966, Schrier 1963, Green 1965).

Faptul că structura eritrocitelor de mamifere este simplă, ele fiind lipsite de nucleu și organite celulare, iar metabolismul lor este limitat la glicoliza anaerobă face ca ele să constituie un foarte bun material pentru studiul glicolizei și biochimismul autoreglării ei.

Astfel, Temkine (1966) și Rapaport (1968) studiază metabolismul eritrocitelor la om și la animalele de laborator, izolează și discută interrelația metabolică a peste 20 de enzime glicolitice.

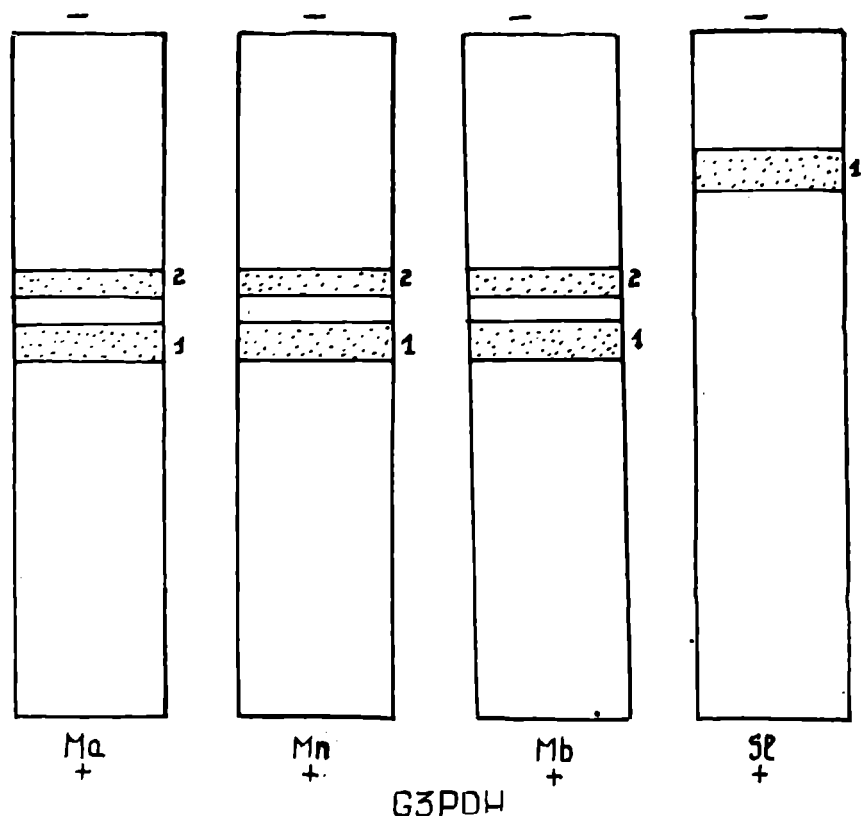


Fig. 2 — Electroforegrama gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei (GA-3-PDH) din hemolizatul celor 4 specii.

Enzimele studiate de noi, joacă un rol important în realizarea metabolismului glicolitic anaerob și prin aceasta în întreaga dinamică morfo-funcțională a eritrocitului. Astfel, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, enzimă având drept cofactor NADP și care este situată în etapa inițială

a ciclului pentozo-fosfatic prin activitatea sa asupra substratului ia de la acesta $2H$, astfel că $NADP$ trece în $NADPH_2$, co-factor care este reoxidat de către $NADPH_2$ -methemoglobin reductază în procesul reducerii methemoglobinei.

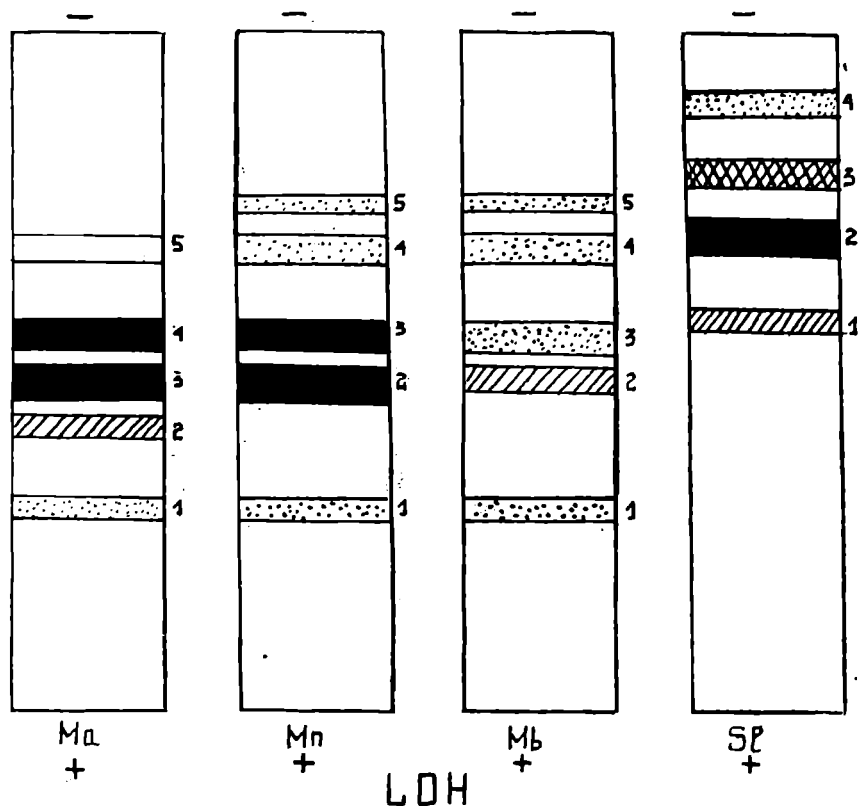


Fig. 3 — Electroforegrama lactico-dehidrogenazei (LDH) din hemolizatul celor 4 specii.

- Ma = *Mesocricetus auratus*
Mn = *Mesocricetus newtoni*
Mb = *Mesocricetus brandti*
Sl = *Spalax leucodon*
— = sensul migrării electroforetice de la catod la anod.
+ =

LEGENDA :

- activitate enzimatică foarte intensă
▨ activitate enzimatică intensă
▧ activitate enzimatică medie
▩ activitate enzimatică slabă
□ activitate enzimatică foarte slabă.

Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza și lactico-dehidrogenaza enzime avind cofactor NAD-ul, prin acțiunea lor asupra substratului furnizează NADH_2 , implicat în activitatea NADH_2 -methemoglobin reductazei pe de o parte și produși finali, acidul 1-3difosfoglicerice și respectiv acidul piruvic cu rol important în sinteza ATP-ului, și a echilibrului ionic eritrocitar (Minakami și col. 1964, 1966. Rapaport și col. 1939, Rapaport 1968, Tusuboi și col. 1966, Schrier, 1963 și Yashikawa 1965).

Rezultatele obținute de noi scot în evidență o diversitate mai mare de forme moleculare la speciile de *Mesocricetus* decât la *Spalax*. Diagramele electroforetice prezintă o specificitate de specie relativă, deosebindu-se mai mult prin diferențele de activitate a diferitelor forme moleculare. Acest fapt pare să concorde cu datele existente în literatură asupra valorii reduse a electroforegramelor enzimelor în taxonomie și filogenie (Thornber și col. 1968, Hori și col. 1969, Meșter și col. 1971, Cotariu și col. 1969, Bloom și col. 1967, Lebherz și col. 1967).

Diversitatea mai mare de forme moleculare la speciile de *Mesocricetus* față de *Spalax* poate să reflecte necesitățile metabolice ale speciei în raport cu condițiile de viață. *Spalax leucodon* fiind un animal adaptat la o viață permanent subterană, fiind puțin influențat de factorii de mediu foarte diferiți, reflectă aceasta în tabloul electroforetic al enzimelor studiate, printr-un număr mai mic de fracțiuni moleculare și printr-o activitate mai slabă a acestora. Speciile de *Mesocricetus* și *Spalax* studiate, aparțin la două genuri diferite de rozătoare, care s-au diferențiat și au evoluat în condiții de viață diferite.

Heterogenitatea formelor moleculare glicolitice ale unor celule atit de specializate ca eritrocitele mamiferelor, reflectă mai de grabă complexitatea de adaptare a organismelor la diversele variații ale mediului, care cu timpul au căpătat o stabilitate genetică. Diferitele forme moleculare ale unei enzime, prin proprietățile lor cinetice diferite, sînt modulate la activitatea metabolică a celulelor în funcție de variația diferiților factori interni sau externi.

CONCLUZII

Studiul electroforetic al enzimelor glicolitice eritrocitare G-6-PDH, GA-3-PDH, LDH evidențiază la speciile de *Mesocricetus* studiate mai multe forme moleculare distincte: 3—4 la G-6-PDH, 2 la GA-3-PDH și 5 la LHD. În comparație cu speciile de *Mesocricetus*, *Spalax leucodon* prezintă un număr mult mai mic de fracțiuni 2 pentru G-6-PDH, 1 pentru GA-3-PDH și 4 pentru LDH. Activitatea fracțiunilor izoenzimatică din spectrele electroforetice ale enzimelor de *Spalax* este mai mică decât la speciile de *Mesocricetus*. Se consideră că deosebirile în ceea ce privește activitatea și numărul de fracțiuni moleculare a enzimelor studiate ar fi legate de deosebirile metabolice în raport cu condițiile eco-fiziologice ale speciilor. Se poate afirma că la speciile studiate aparținînd la două genuri diferite de rozătoare o seamă de diferențe rezidă și din diferențele genetice între cele două entități taxonomice.

BIBLIOGRAFIE

1. COTARIU D., ȘERBAN M. (1969), *Șt. și Cerc. Biochim.* 12, 35.
2. BARTLETT G. R., MARLOW A. A. (1953), *J. Lab. Clin. Med.* 24, 188.
3. BLOOM D. A., KSANORI N. T. (1967), *Science* 156, 979.
4. DAVIS J. B. (1964), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 494.
5. DOMINIQUE G., VERGNES H. (1970), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 1289.
6. GREEN D. E., MURER R., HULTINHO, RICHARDSON S. N., SALMON B., BRIERLEY G. P. și BAUM H. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.* 112, 635.
7. HOCHACHKA P. W. (1966), *Comp. Biochem. Physiol.* 18, 261.
8. HORI S. H. și MAKINO S. (1969), *In Nucleic acid Metabolism Cell differentiation and Cancer growth.* Ed. Cowdry E. W. și Seno S. Pergamon Press London, p. 131—141.
9. IAKOLEVA V. I. (1968), *Hsp. Biol. Him.* 9, 55.
10. JACOBSON K. B., MURPHY J. B., DUNAVAY P. B. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 1 135.
11. LOW B. A., RAMOT B., LONDON I. M. (1953), *Nature Lond.* 181, 324.
12. LUNDSGAARD E. (1933), *Ergebn. Enzymforsch.* 2, 179.
13. LEBHERZ G. H. RUTTER W. (1967), *Science* 157, 1198.
14. MANWELL C., KERST K. W. (1966), *Comp. Biochim. Physiol.* 17, 741.
15. MEȘTER R., SCRIPCARIU D., MEȘTER L. (1971), *Șt. și Cerc. Biol. Seria Zool.* 23, 243.
16. MINAKAMI S., SAITO T., SUZUKI C., YASHIKAWA H. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 17, 748.
17. MINAKAMI S., YASHIKAWA H. (1966), *J. Biochem. Tokio*, 59, 145.
18. MURPHY J. R. (1960), *J. Lab. Clin. Med.* 55, 286.
19. NISSELBAUM J. S., BODANSKY O. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 969.
20. ORNSTEIN L. (1964), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 322.
21. RAPAPORT S. (1968), *Assays in Biochemistry* Vol. IV pag. 69—103. Edit. by P.N. Campbele and G. D. Greville. Academic Press N.Y.
22. RAPAPORT S., GUEST G. M. (1939), *J. Biol. Chem.* 131, 675.
23. SCHRIER S. L. (1963), *J. Clin. Invest.* 24, 756.
24. SCRIPCARIU D., MEȘTER R., TESIO C., TORCEA S., SCRIPCARIU I. A. (1971), *Șt. și Cerc. Biol. seria Zool.* 23, 445.
25. SINGER K., CHERNOFF A. I., SINGER I. (1959), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 45, 174.
26. TEMKINE E. (1966), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 771.
27. THULLINE H. C., MARROW C. A., WORBY E. D., MOTULSKY G. A. (1967), *Science*, 157, 431.
28. THORNBUR E. J., OLIVER J. T., SCUTT P. B. (1968), *Comp. Biochim. Physiol.* 25, 973.
29. TUSUBOI K. K., ALLAN J. F., FUKUNAGA K. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 1616.
30. TSUTSUI E. A., MARKS P. A. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Com.* 8, 338.
31. VALDIVIESO D., CONDE E., TROMSITT J. R. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 133.
32. VELICK S. F., FURFINE C. (1963), *In The Enzymes II-a ed.* Vol. 7, p. 243—273. Ed. by Boyer P.D., Lardy H și Myrbäck K. New York, Academic Press.
33. VESELL E. S., BEARN A. G. (1962), *J. Gen. Physiol.* 45, 553.
34. WEBB E. C. (1964), *Experientia* 20, 592.
35. WILKINSON J. H. (1965), *Isoenzymes Spon LTD*, London.
36. YASHIKAWA H., MINAKAMI S. (1965), *Folia Hemat. Lpz.* 83, 101.
37. ROSE I. A., O'CONNELL E. L. (1964), *J. Biol. Chem.* 12, 239.

ELECTROPHORETIC STUDIES ON THE SOME RED BLOOD CELLS
GLICOLITIC ENZYMES OF RODENT SPECIES: *MESOCRICETUS*
AURATUS, *M. NEWTONI*, *M. BRANDTI*, *SPALAX LEUCODON*

S U M M A R Y

The isoenzymic pattern of glucose-6-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from erythrocytes of *Mesocricetus auratus*, *Mesocricetus newtoni*, *Mesocricetus brandti* and *Spalax leucodon*, were determined by electrophoresis on polyacrylamide gel. Electrophoretic analyses of glycolytic enzymes from erythrocytes of investigated animals, shows some qualitative (number of bands with enzymic activity) and quantitative (proportional to the staining intensity of the enzymic fractions) differences. Data presented in this paper show the importance of glycolytic enzymes, different in intensity for the two group of rodents, in connection with thier environmental conditions.

Comunicare prezentată la cea de a II-a sesiune
științifică de comunicări a Muzeului județean
Argeș — Pitești 24—25.V.1971.