

COMITETUL DE REDACȚIE

Director:

Academician MIHAI BĂCESCU

Redactor șef:

PETRU MIHAI BĂNĂRESCU, membru corespondent al Academiei Române

Membri:

Academician NICOLAE BOTNARIUC; academician OLGA NECRASOV; prof. dr. GRIGORE STRUNGARU; prof. dr. IRINA TEODORESCU; dr. NICOLAE TOMESCU; prof. dr. RADU MEȘTER – secretar de redacție

Revista apare de două ori pe an

Pentru a vă asigura colecția completă și primirea la timp a revistei reînnoiți abonamentul dumneavoastră.

În țară, revista se poate procura prin poștă, pe bază de abonament la:

RODIPET S.A., Piața Presei Libere nr. 1, sect. 1, P.O. Box 33-57, Fax 401-222 6407, Tel. 401-618 5103; 401-222 4126, București, România.

ORION PRESS INTERNATIONAL S.R.L., Șos. Olteniței 35-37, sect. 4, P.O. Box 61-170, Fax 401-312 2425; 401-634 7145, Tel. 401-634 6345, București, România.

AMCO PRESS S.R.L., Bd. Nicolae Grigorescu nr. 29A, ap. 66, sect. 3, P.O. Box 57-88, Fax 401-312 5109, Tel. 401-643 9390; 401-312 5109, București, România.

Manuscrisele, cărțile, revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei: Institutul de Biologie, Splaiul Independenței nr. 296, București.

La revue „Studii și cercetări de biologie animală” paraît deux fois par an. Toute commande de l'étranger pour les travaux parus aux Éditions de l'Académie Roumaine sera adressée à:

RODIPET S.A., Piața Presei Libere nr. 1, sect. 1, P.O. Box 33-57, Fax 401-222 6407, Tel. 401-618 5103; 401-222 4126, București, România.

ORION PRESS INTERNATIONAL S.R.L., Șos. Olteniței 35-37, sect. 4, P.O. Box 61-170, Fax 401-312 2425; 401-634 7145, Tel. 401-634 6345, București, România.



EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE
Calea 13 Septembrie, nr. 13,
76117, București
telefon 410 38 46/2123, 2107, 2119

PI 1695

DONATIE

BIOL. INV. 88

Studii și cercetări de BIOLOGIE

-COMITETUL
DE
REDACȚIE-

SERIA BIOLOGIE ANIMALĂ

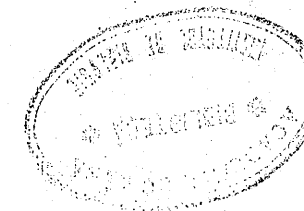
TOMUL 49, NR. 2

iulie – decembrie 1997

SUMAR

25324

- OTILIA ZĂRNESCU, R. MEȘTER, S. LAZĂR, Caracterizarea ultrastructurală a foliculilor ovarieni vitelogenetici la *Rana ridibunda* 121
- OTILIA ZĂRNESCU, R. MEȘTER, Endocitoza în fază fluidă a FITC-Dextran în ovocitele de *Carassius auratus gibelio* in vivo și in vitro 133
- LUCIA MOLDOVAN, MARIA CALOIANU, OTILIA ZĂRNESCU, OANA CRĂCIUNESCU, Aspecte ultrastructurale ale corneei la *Carassius auratus gibelio* 139
- MARIA NĂSTĂESCU, VIRGINIA POPESCU-MARINESCU, VIORICA MANOLACHE, CARMEN MARINESCU, Acțiunea zincului asupra mantalei, branhiilor și hepatopancreasului de la *Anodonta cygnaea* (Molusca-Lamellibranchiata) 147
- ZORICA-ILEANA HERTZOG, M. CRUCE, V. PÎRVULESCU, R. HERTZOG, Instabilitatea cromozomială constituțională în cancerul de colon 157
- ALICE VASILE-ȘERBĂNESCU, AL. G. MARINESCU, D. VIZITIU, Modificarea compoziției chimice și scăderea în greutate la puietul de crap sub influența perioadei de iarnă 165
- I. ROȘCA, AL. BĂRBULESCU, Cercetări privind comportamentul în câmp a masculilor de *Ostrinia nubilalis* Hb. marcați 173
- ANDREA CRISTINA STAIU, R. MEȘTER, Maturarea ovocitelor la Teleosteeni 179



St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 49, nr. 2, p. 119-198, București, 1997

7101 304 67

CARACTERIZAREA ULTRASTRUCTURALĂ A FOLICULILOR OVARIENI VITELOGENETICI LA *Rana ridibunda*

OTILIA ZĂRNESCU¹, R. MEȘTER¹, S. LAZĂR²

The structure of the vitellogenic ovarian follicles in *Rana ridibunda* is described. The vitellogenic follicle consists of several cellular and acellular layers. The oocyte within follicle is immediately invested by the acellular vitelline envelope, which contains microvillar processes from the oocyte. Overlying the vitelline envelope, a follicular epithelium is comprised of a single layer of stellate follicle cells.

In the vitellogenic follicle these cells are periodically interrupted by large intercellular channels. Above the follicle cells is the theca, which contains collagen fibers, blood vessels, and fibroblasts.

The ovarian follicle is covered by the inner ovarian epithelium. The apical plasma membrane of these cells displays a macropinocytotic activity.

The surface of the vitellogenic oocyte exhibits clathrin-coated pits and "macro" pits which uptake a lamellar material. In the ooplasm throughout, vitellogenesis primordial yolk platelets are in close contact with large yolk platelets. Subsequent fusion of two or more crystallizing platelets gives rise to larger yolk platelets, which contain two or more main bodies.

Oocyte of *R. ridibunda* was found to possess two types of mitochondria which contain crystalline inclusions.

Internalizarea substanțelor nutritive reprezintă un mecanism eficient, prin care se asigură creșterea și diferențierea ovocitelor la vertebratele inferioare. Peste 80% din proteinele ovocitului matur sunt reprezentate de vitelus (3). Acumularea proteinelor viteline are loc în cursul perioadei de vitelogeneză și se realizează printr-o endocitoză mediată de receptor, a unui precursor glicofosfolipoproteic numit vitelogenină (VTG). Acest precursor vitelin este sintetizat în ficat și eliberat ulterior în circulație (33, 37, 38).

Observațiile ultrastructurale realizate pe *Xenopus laevis* și diferite specii de *Ranidae*, au permis identificarea compartimentelor intracelulare implicate în transportul vitelogeninei (1, 4, 16, 17, 26, 40, 41). Aceste studii au demonstrat existența unui material electrono-dens asociat invaginărilor și veziculelor cu înveliș, endozomilor, plachetelor viteline primordiale care conțin mase de vitelus condensat și plachetelor viteline mature, formate din proteine cristalizate.

În ovocitele amfibienilor au fost descrise două tipuri de vitelus: (a) plachete viteline delimitate de membrane, care conțin un miez cristalin format din lipovite-

lin, fosvitin și fosvet (43), înconjurat de un matrix alcătuit din glicoproteine, carbohidrați (7, 23) și enzime (30); (b) picături lipidice reprezentate de fosfolipide și lipide neutre (18) ce alcătuiesc „vitelusul lipidic” (40, 41).

Deși ultrastructura plachetelor viteline a fost examinată la mai multe specii de amfibieni, formarea vitelusului, originea proteinelor viteline, stocarea vitelusului în timpul vitelogenezei (12) și utilizarea lui în embriogeneză (9, 24) sunt aspecte incomplet înțelese.

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea ultrastructurală a foliculilor ovarieni vitelogenetici la *Rana ridibunda* și identificarea organelor implicate în formarea vitelusului.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experimentele au fost realizate pe femele de *Rana ridibunda* neinjectate și injectate cu 20 mg peroxidază (tip II, Sigma) dizolvată în 0,64% NaCl. Femele injectate cu peroxidază au fost sacrificate după 4 ore.

Fragmente mici de ovar au fost fixate 3 ore, la 4°C în tampon cacodilat 0,1M (pH=7,4), cu 2% paraformaldehidă și 2,5% glutaraldehidă. După fixare, fragmentele de țesut au fost spălate în același tampon cu 7% sucroză, peste noapte la 4°C.

Fragmentele de ovar provenite de la femele injectate cu peroxidază au fost incubate 30 minute la întuneric în următoarea soluție: tampon Tris-HCl 0,05M (pH = 7,6), 0,1%, 3,3' diaminobenzidină (DAB, Sigma) și 0,01% H₂O₂. După dezvoltarea reacției peroxidazice probele au fost spălate în tampon Tris-HCl 0,05M, pH = 7,4, o oră la 4°C, postfixate peste noapte într-o soluție de 2%, O₅O₄ în tampon cacodilat 0,1M (pH=7,4). După spălare cu apă distilată, probele au fost deshidratate în etanol și incluse în rășini sintetice (Epon 812). Secțiunile tăiate la ultramicrotom au fost colorate succesiv cu acetat de uranil și citrat de plumb și examinate la microscopul electronic PEM-100.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Foliculul ovarian vitelogenetic la *Rana ridibunda* este format dintr-o serie de straturi celulare și acelulare.

Stratul extern al foliculului ovarian poartă denumirea de epiteliu ovarian intern și este alcătuit din celule aplatizate, unite prin joncțiuni celulare de tipul desmozomilor. La baza acestui strat există o membrană bazală. În cazul foliculilor vitelogenetici celulele acestui epiteliu prezintă un intens proces de macropinocitoză la nivelul membranei (fig. 1). De asemenea, în unele celule epiteliale sunt prezente în citoplasmă vezicule acoperite cu clatrină (fig. 2).

S-a demonstrat că în alte tipuri celulare, macropinocitoza este implicată într-un mecanism neselectiv de internalizare a macromoleculor extracelulare (29). Deși

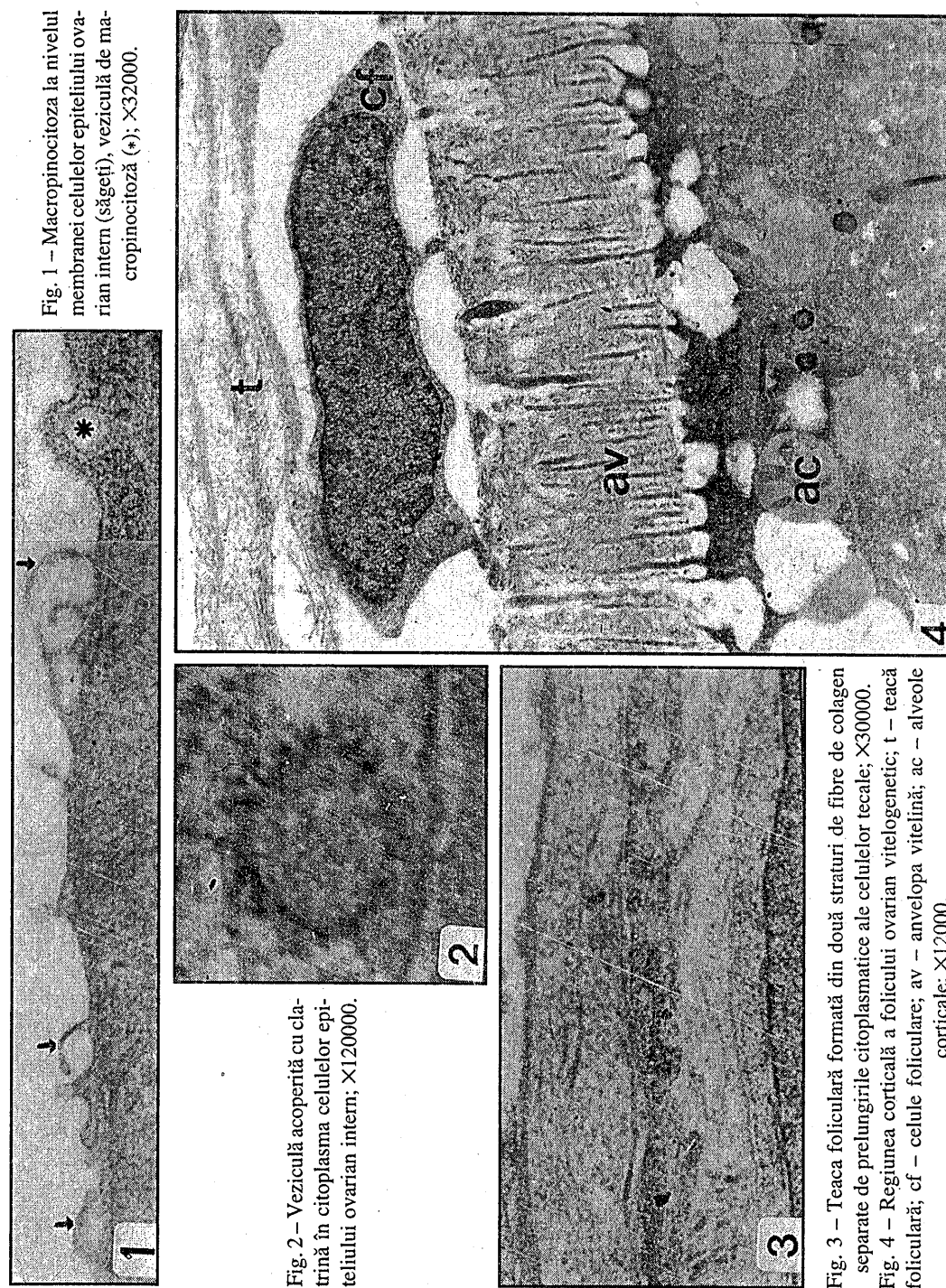


Fig. 1 – Macropinocitoza la nivelul membranei celulelor epitelului ovarian intern (săgeți), veziculă de macropinocitoză (*); X32000.

Fig. 2 – Veziculă acoperită cu clatrină în citoplasma celulelor epitelului ovarian intern; X120000.

Fig. 3 – Teaca foliculară formată din două straturi de fibre de collagen separate de prelungirile citoplasmice ale celulelor tecale; X30000.

Fig. 4 – Regiunea corticală a foliculului ovarian vitelogenetic; t – teacă foliculară; cf – celule foliculare; av – anvelopa vitelină; ac – alveole corticale; X12000.

macropinocitoza nu a mai fost menționată în celulele epiteliale ale foliculului ovarian, studiile anterioare la *Xenopus laevis* au evidențiat că membrana acestor celule prezintă un proces activ de pinocitoză, însă veziculele implicate în endocitoză sunt diferite de cele ale ovocitului și nu posedă înveliș (2, 35).

Între celulele epiteliale de la suprafața foliculilor ovarieni și celulele foliculare există teaca foliculară, formată din fibre de colagen, vase de sânge și fibroblaste (fig. 3). Ocazional, au fost observate celule musculare netede și nervi (6). La *Rana ridibunda* fibrele de colagen sunt dispuse în direcții diferite și formează două straturi separate de prelungirile citoplasmice ale fibroblastelor. Studiile de microscopie electronică scanning au indicat la *Xenopus laevis* că fibrele din țesutul conjunctiv al tecii formează benzi laxe, orientate neregulat (6).

Celulele foliculare formează un monostrat în jurul ovocitului. Ele sunt celule relativ mari, stelate și întrerupte de spații largi (fig. 4). Aceste spații au fost denumite canale (4, 35) și permit trecerea moleculelor exogene odată cu începerea vite-logenezei. S-a demonstrat că suprafața bazală a celulelor foliculare suferă modificări considerabile în cursul dezvoltării foliculare (6). Astfel, începând cu stadiul al II-lea al ovogenezei, suprafața dinspre ovocit prezintă macrovili, care pătrund prin anvelopa vitelină pentru a face contact cu microvili ovocitari.

În jurul ovocitului se găsește anvelopa vitelină, care la *Rana ridibunda* are un aspect lax, fiind formată din filamente de densitate electronică moderată (fig. 4). În regiunea superioară, această anvelopă vitelină prezintă o consistență mai densă. Aspectul electrono-microscopic al anvelopei viteline la *Rana ridibunda* este diferit de cel observat la alte specii de amfibieni.

La începutul vite-logenezei, suprafața ovocitului se caracterizează prin prezența unor cripte adânci care delimitează macrovili, din care se desprind microvili ovocitari lungi și subțiri. În afara numeroaselor invaginări acoperite cu clatrină (fig. 5), la suprafața ovocitului există „macroinvaginări”, care apar a prelua un material exogen lamelar (fig. 6), sau omogen (fig. 7). Acest material apare ulterior în corpii multiveziculari din citoplasma corticală (fig. 8). Invaginări și vezicule cu înveliș au fost observate și în ovocitele vitelogenetice de la alte specii de amfibieni (5, 10, 36, 41).

Diferențierea ovocitului la vertebratele ovipare are loc datorită acumulării în citoplasmă a unor organite caracteristice, numite plachete viteline. La începutul vite-logenezei în citoplasma corticală apar numeroși corpii multiveziculari, la care se observă uneori vezicule fuzionate. Corpii multiveziculari sunt heterogeni ca aspect electrono-microscopic, lumenul lor fiind plin fie cu un material filamentos, sau granular necondensat (fig. 9), fie cu agregate mici care indică începutul unui proces de condensare (fig. 10). La *Xenopus laevis* s-a evidențiat că și ovocitele previtelogenetice în stadiile I și II conțin corpii multiveziculari care sunt grupați la periferia celulei. Deși corpii multiveziculari au fost observați frecvent în stadiile timpurii ale vite-logenezei (12, 26, 27, 40, 41), rolul lor în procesarea vitelogeninei și a proteinelor viteline a fost elucidat recent. Wall și Patel (31, 32) au arătat că

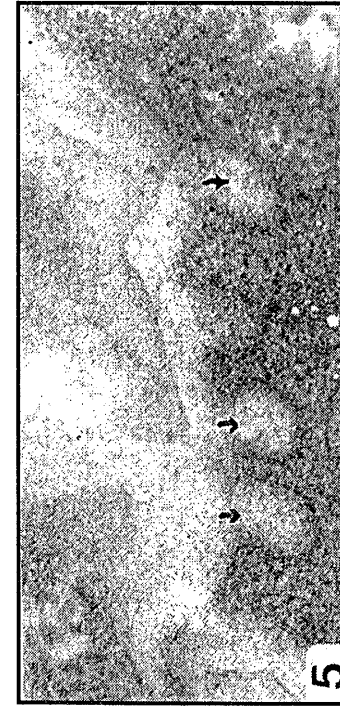


Fig. 5 – Invaginări cu înveliș la nivelul membranei ovocitare (săgeți); X90000.

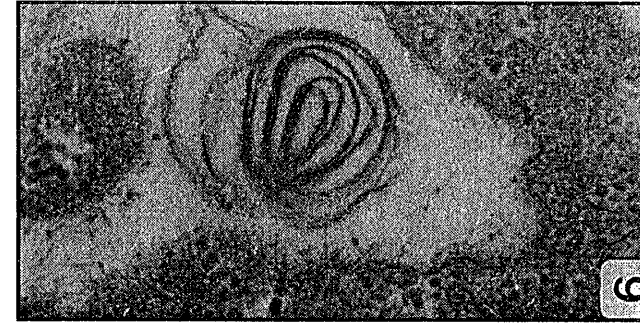


Fig. 6 – „Macroinvaginări” care apar a prelua un material lamelar; X90000.



Fig. 7 – „Macroinvaginări” care internalizează un material omogen; X90000.



Fig. 8 – Corp multivezicular care conține un material lamelar; X90000.

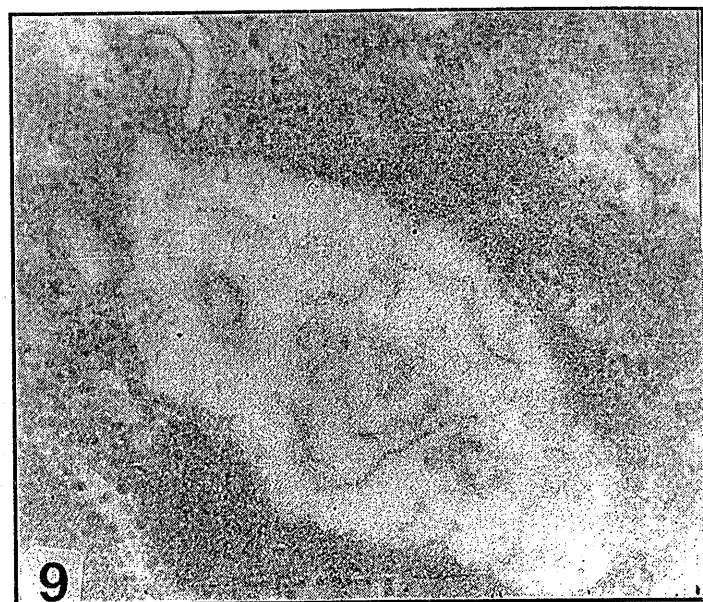


Fig. 9 – Corp multivezicular în lumenul căruia se remarcă un material filamentos; X60000.

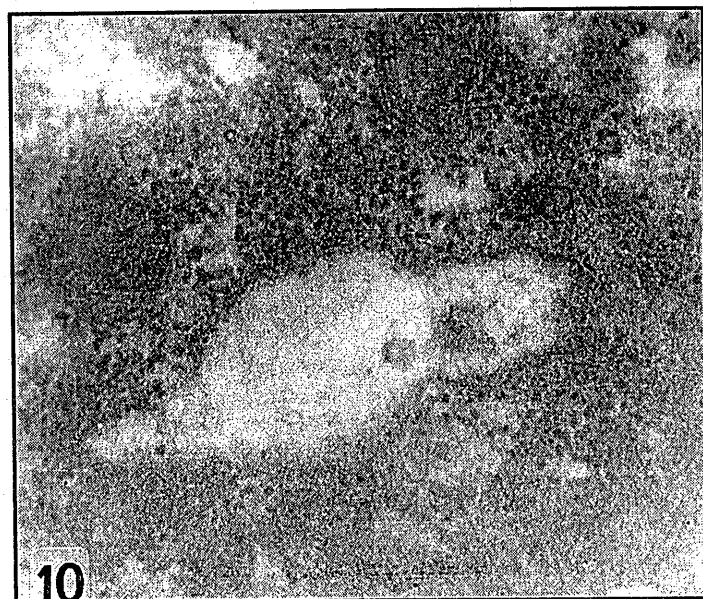


Fig. 10 – Corp multivezicular la care se remarcă fuziunea cu o veziculă acoperită (săgeata); X60000.

acești corpi multiveziculari ovocitari sunt lizozomi modificați, care conțin un număr limitat de hidrolaze lizozomale implicate în decuplarea vitelogeninei de receptorul său (20) și ulterior în clivarea VTG în proteine viteline.

Plachetele viteline primordiale au fost identificate în citoplasma corticală (fig. 11). Aceste structuri prezintă un miez electrono-dens și o matrice înconjurătoare mai laxă. Ulterior aceste structuri se măresc, corpul central devine cristalin și rămâne înconjurat de o zonă electrono-densă, necristalizată (fig. 12). La periferia acestor plachete viteline primordiale se observă corpi multiveziculari fuzionați.

A treia categorie de plachete viteline primordiale, observată de noi, este formată din organite mai mari alcătuite dintr-un miez cristalin, un matrix înconjurător mai dens dispus asimetric (nu acoperă întregul cristal vitelin) și o zonă periferică în care se găsesc numeroase vezicule mici (fig. 13).

Plachetele viteline primordiale odată formate încep să fuzioneze unele cu altele, în cursul acestui proces miezurile cristaline rămân separate. Această fuziune poate avea loc între plachete viteline primordiale cu aceeași dimensiune (fig. 14), sau cu dimensiuni diferite (fig. 15). Astfel de fuziuni au fost observate și la *Xenopus laevis* (21, 31).

Plachetele viteline mature prezintă o structură similară cu cea observată de alți autori la diferite specii de amfibieni (8, 9, 14, 22, 24, 33) și se caracterizează prin prezența unui miez cristalin, un strat median mai dens și un strat extern mai lax (fig. 16). Chiar după formarea plachetelor viteline mature, se mai observă fuziuni între corpii multiveziculari și stratul extern al plachetei (fig. 17).

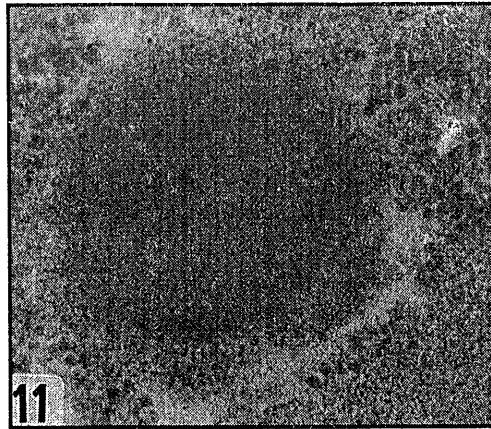
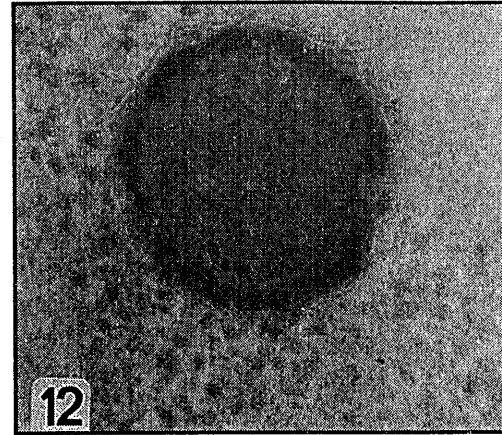
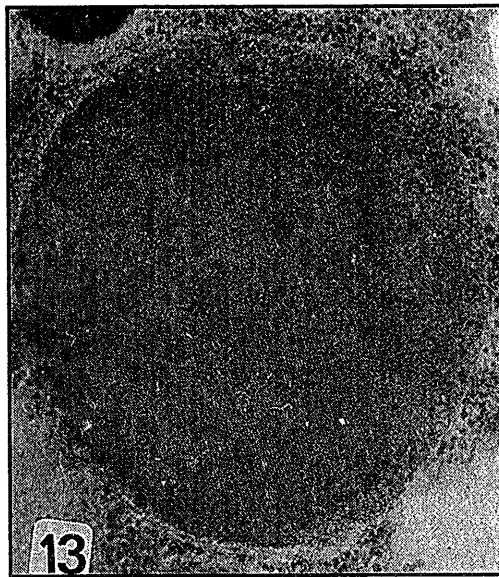
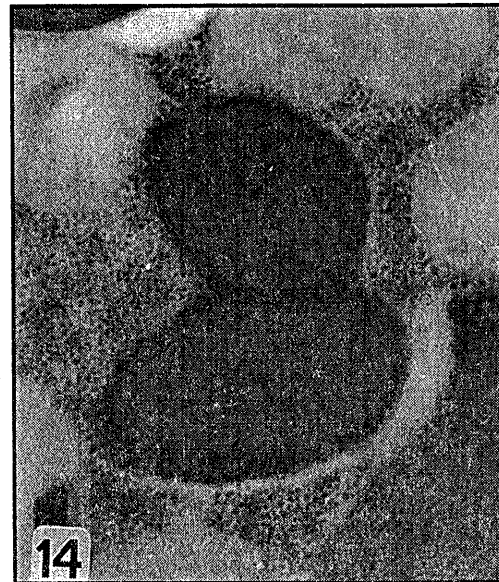
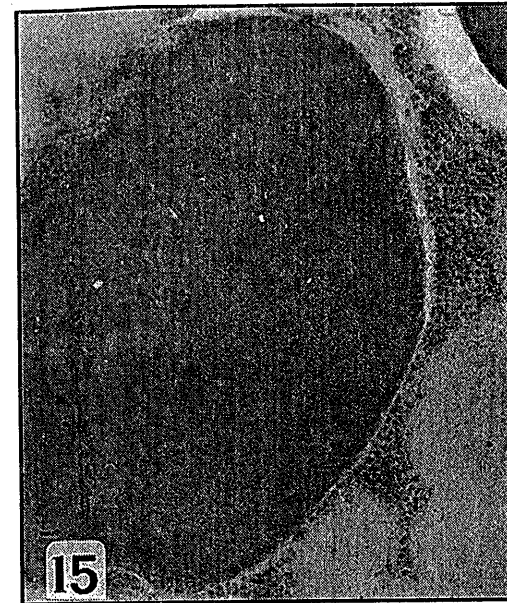
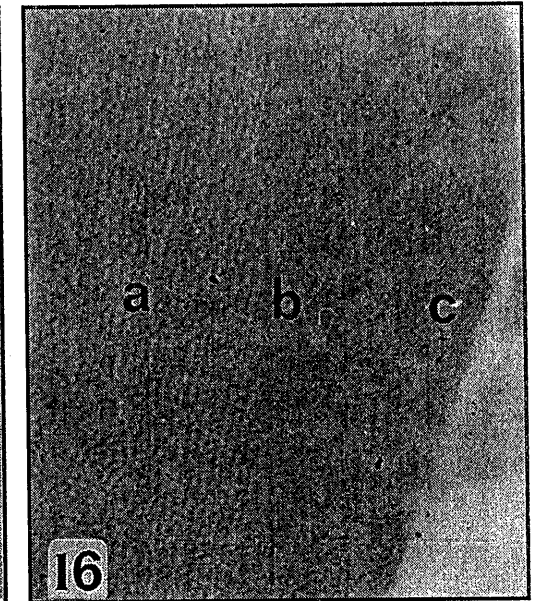
Injectarea de peroxidază în sacii limfatici a demonstrat că foliculii vitelogenetici preiau trăsorul din circulație, acesta fiind identificat ulterior la periferia plachetelor viteline primordiale (fig. 18), sau în stratul superficial al plachetelor viteline mature (fig. 19). Prezența peroxidazei la suprafața plachetelor viteline a fost observată de asemenea la *Xenopus laevis* (5) și ea nu este surprinzătoare, deoarece aceste organite considerate lizozomi modificați reprezintă destinația tuturor moleculelor internalizate de ovocit (20).

În timpul vitelogenezei plachetele viteline primordiale și mature sunt însoțite de picături lipidice cu aspect diferit (fig. 20 a.b.).

Un aspect caracteristic speciilor de *Ranidae* este acela al prezenței cristalelor mitocondriale. Observațiile noastre au indicat prezența în ovocitele vitelogenetice a două tipuri de mitocondrii care conțin cristale. Primul tip este abundent în masele mitocondriale (fig. 21) și cristalul este înconjurat de o membrană dublă, în timp ce mitocondriile înconjurătoare prezintă un matrix dens. Al doilea tip a fost identificat mai ales în citoplasma corticală și în jurul cristalului, există structuri membranare mai complexe (fig. 22).

Observațiile anterioare la *Rana esculenta* și *Rana temporaria* (13) au evidențiat că mitocondriile posedă două tipuri de incluzii cristaline, unul localizat în matrixul mitocondrial și altul în criste (26).

Cristalele mitocondriale reprezintă un procent mic din structurile cristaline din ovocitul complet dezvoltat (9) și au fost identificate la diferite specii de *Rani-*

Fig. 11 – Plachetă vitelină primordială; $\times 60000$.Fig. 12 – Plachetă vitelină primordială; $\times 120000$.Fig. 13 – Plachetă vitelină primordială; $\times 60000$.Fig. 14 – Fuziuni între plachetele viteline primordiale; $\times 45000$.Fig. 15 – Fuziuni între plachetele viteline primordiale; $\times 60000$.Fig. 16 – Periferia unei plachete viteline mature; a – cristal vitelin; b – strat extern dens; c – strat extern lax; $\times 180000$.Fig. 17 – Corp multivezicular fuzionat cu stratul extern al unei plachete mature; $\times 90000$.

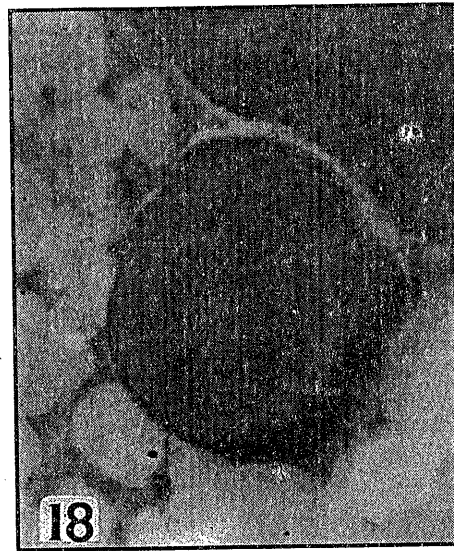


Fig. 18 – După injectarea de HRP, reacția peroxidazică apare la periferia plachetelor viteline primordiale; $\times 24000$.

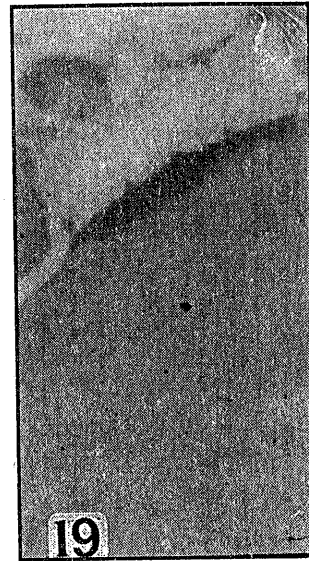


Fig. 19 – Reacția peroxidazică este pozitivă și în stratul extern al plachetelor viteline mature; $\times 18000$.

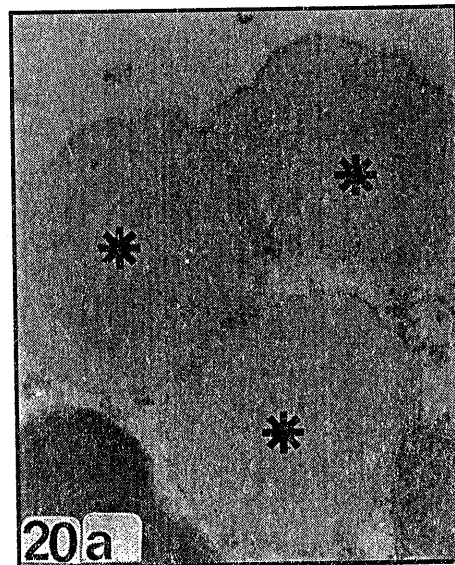


Fig. 20 a, b – În citoplasma ovocitului vitelogenetic există picături lipidice (*) cu o morfologie diferită: omogene (a) sau heterogene (b); $\times 18000$.

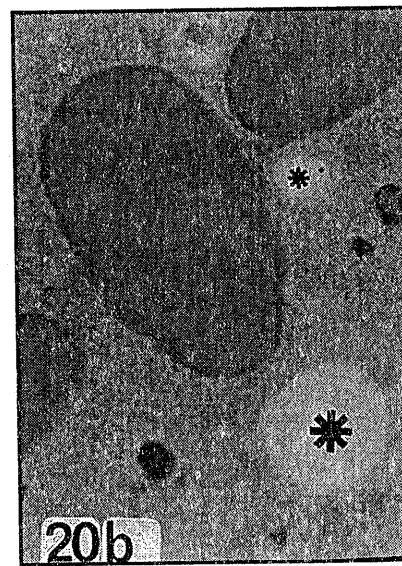


Fig. 21 – Masă mitocondrială în care se remarcă un cristal mitocondrial; $\times 60000$.

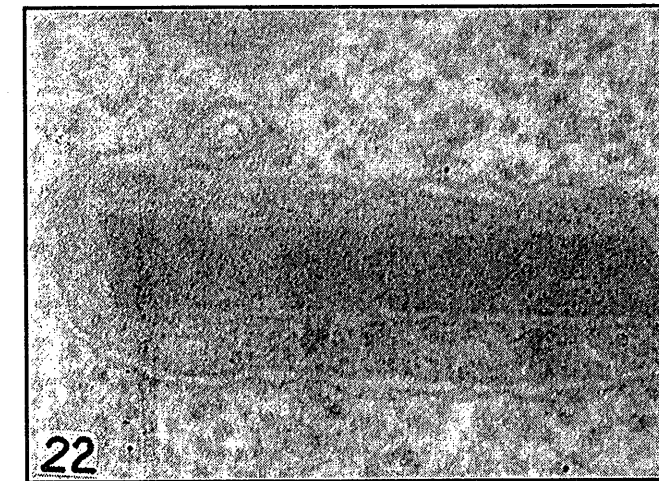
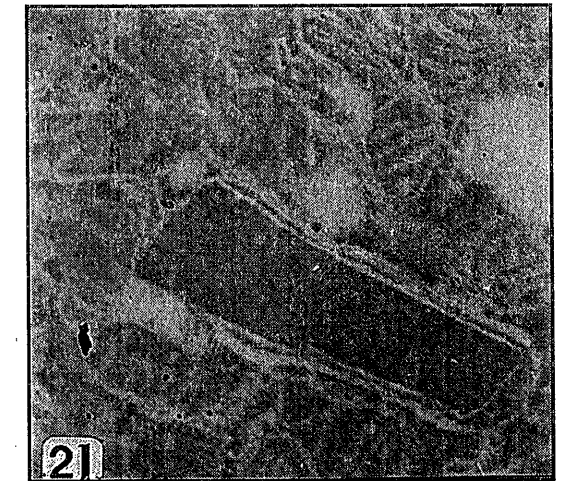


Fig. 22 – Mitocondrie care conține un cristal mitocondrial; $\times 30000$.

dae: *R. pipiens* (11, 39, 40), *R. temporaria* și *R. esculenta* (25), *R. catesbeiana* (42) și *R. nigromaculata* (28).

Deși inițial aceste cristale mitocondriale au fost considerate a sta la originea vitelusului (8, 39), ulterior au fost identificate diferențe între cristalele mitocondriale și cele viteline (38). Aceste diferențe se referă la structura cristalului (15, 16, 25), compoziția chimică (25, 42) și originea acestor cristale (40, 41).

Cu toate că aceste cristale intramitocondriale nu sunt implicate în formarea vitelusului, funcția lor rămâne necunoscută.

În concluzie, observațiile noastre realizate pe *R. ridibunda* au indicat aspecte electrono-microscopice comune cu cele raportate la alte specii de amfibieni, dar și particulare cum ar fi: macropinocitoza celulelor epiteliului folicular, structura anvelopei viteline și prezența unor „macroinvaginări” la nivelul membranei ovocitare.

BIBLIOGRAFIE

1. BALINSKY B.I., DEVIS R., Acta Embryol. Morphol. Exp., 6: 55-108, 1963.
2. BRUMMETT A.R., DUMONT J.N., J. Ultrastruct. Res., 55: 4-16, 1976.
3. CALLEN J.C., TORTE M., DENNEBOU Y.N., MONOLOU J.C., Biol. Cell, 38: 13-18, 1980.
4. DUMONT J.N., J. Morphol., 136: 153-180, 1972.
5. DUMONT J.N., J. Exp. Zool., 204: 193-217, 1978.
6. DUMONT J.N., BRUMMETT A.R., J. Morphol., 155: 73-98, 1978.
7. FAVARD P., FAVARD-SERENO C., J. Submicrosc. Cytol., 1: 91-111, 1969.
8. KARASAKI S., J. Cell Biol., 18: 135-151, 1963.
9. KARASAKI S., J. Ultrastruct. Res., 9: 225-247, 1963.
10. KEMP M.E., STOCK N.L., J. Cell Biol., 34: 111-122, 1967.
11. KESSEL R.G., GANION L.R., J. Submicrosc. Cytol., 12: 647-654, 1980.
12. KRESS A., *Experientia* (Basel), 38: 761-876, 1982.
13. KRESS A., SPORNITZ U.M., *Experientia* (Basel), 30: 786-788, 1974.
14. LANZAVECCHIA G., Intern. Inst. Embryol. Milano, 61-74, 1961.
15. LANZAVECCHIA G., Atti. Accad. Naz. Lincei., Ser VIII, (8): 1-47, 1961.
16. MASSEVER W.H., J. Cell Biol., 48: 266-279, 1971.
17. MASSEVER W.H., J. Cell Biol., 58: 485-491, 1973.
18. MES-HARTREE M., ARMSTRONG J.B., Can. J. Biochem., 54: 578-582, 1976.
19. OPRESKO L.K., WILEY H.S., WALLACE R.A., Cell, 22: 47-57, 1980.
20. OPRESKO L.K., KARP F.R.A., Cell, 51: 557-568, 1987.
21. RICHTER H-P., Roux's Arch. Dev. Biol., 198: 92-102, 1989.
22. RINGLE D.A., GROSS P.R., Biol. Bull., 122: 263-280, 1962.
23. ROBERTSON N., Cell. Differ., 8: 173-185, 1979.
24. SCRIPCARIU D., MEȘTER R., Rev. Roum. Biol., Biol. Anim., 31: 47-52, 1986.
25. SPORNITZ U.M., *Experientia* (Basel), 28: 66-67, 1972.
26. SPORNITZ U.M., KRESS A., Z. Zellforsch., 117: 235-251, 1971.
27. SPORNITZ U.M., KRESS A., Z. Zellforsch., 143: 387-407, 1973.
28. SUNG H.S., Exp. Cell Res., 25: 702-704, 1961.
29. SWANSON J.A., WATTS C., Trends Cell Biol., 5: 424-428, 1995.
30. WALL D.A., MELEKA I., J. Cell Biol., 101: 1651-1664, 1985.
31. WALL D.A., PATEL S., Dev. Biol., 119: 275-289, 1987.
32. WALL D.A., PATEL S., J. Biol. Chem., 262: 14779-14789, 1987.
33. WALLACE R.A., *Developmental biology: A comprehensive synthesis* (L. Browder, Ed.), Vol. 1: 469-502, Plenum Press (New York), 1984.
34. WALLACE R.A., KARASAKI S., J. Cell Biol., 18: 153-166, 1963.
35. WALLACE R.A., DUMONT J.M., J. Cell Physiol., 72: Supl.1, 1-18, 1968.
36. WALLACE R.A., JARED D.W., J. Cell Biol., 63: 345-351, 1976.
37. WALLACE R.A., OPRESKO L.K., WILEY H.S., SELMAN K., *Molecular biology of egg maturation*, CIBA Found. Symp., 98: 228-248, 1983.
38. WALLACE R.A., SEMAN K., J. Electron. Microsc. Techniq., 16: 175-201, 1990.
39. WARD R.T., J. Cell Biol., 14: 309-341, 1962.
40. WARD R.T., Tissue & Cell, 10: 515-524, 1978.
41. WARD R.T., Tissue & Cell, 10: 525-534, 1978.
42. WARD R.T., OPRESKO L.K., WALLACE R.A., Dev. Biol., 112: 59-65, 1985.
43. WILEY H.S., WALLACE R.A., J. Biol. Chem., 256: 8626-8634, 1981.

Primit în redacție
la 22 mai 1997.

¹Universitatea București, Facultatea de Biologie,
Splaiul Independenței, 91-95.

²Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare
pentru Științe Biologice, București,
Splaiul Independenței, 296.

ENDOCITOZA ÎN FAZĂ FLUIDĂ A FITC-DEXTRAN ÎN OVOCITELE DE *Carassius auratus gibelio* „IN VIVO” ȘI „IN VITRO”

OTILIA ZĂRNESCU, R. MEȘTER

The *in vivo* and *in vitro* uptake of a tracer of fluid phase endocytosis (FITC-Dextran; Av. Mol. Wt-580,000 D) into developing oocytes of Crucian carp, *Carassius auratus gibelio*, was studied. For *in vivo* study we have injected FITC-Dextran to young growing females and sampled after 24 hours. Also, the development of a short-term culture system (1, 3, 4 and 24 hours) meant for studying FITC-Dextran sequestration *in vitro* into previtellogenic and early vitellogenic follicles of Crucian carp is described.

In vivo, the size of follicles had a considerable bearing on the rate of exogenous substance sequestration; previtellogenic follicles did not uptake FITC-Dextran in considerable amounts. These results indicate that the ability of oocytes to sequester exogenous molecules with a high molecular weight depends *in vivo* on opening of intercellular channels through the follicular tissues, thus allowing blood-borne compounds to reach the oocyte surface.

In vitro sequestration of FITC-Dextran persisted at temperatures below 4°C, showing that the uptake mechanisms were adapted to low temperatures in this species. Also, *in vitro* studies showed that late previtellogenic follicles divested of the surface epithelium and follicles divested of both the surface epithelium and theca (and sometimes of follicle cells) were capable of sequestering fluorescent tracer at a higher rate.

La vertebratele inferioare, creșterea și diferențierea ovocitului implică preluarea prin endocitoza mediată de receptor a unei proteine plasmatică sintetizată în ficat numită vitelogenină (21, 39). O dată internalizată, vitelogenina este clivată proteolitic și convertită în proteine viteline de tipul lipovitelinului și fosvitinului, molecule care sunt depozitate în granule (pești) sau plachete viteline (amfibieni).

Studierea căii prin care diferite molecule ajung la ovocit s-a realizat folosind markeri electrono-denși ca peroxidază (1, 2, 8, 16, 23, 24, 42), feritină (6, 8), dextran-fier, thorotrast (8) și vitelogenină marcată radioactiv (23, 24, 38), sau cu aur coloidal (41).

Berlin și Oliver (4) au caracterizat FITC-Dextranul ca un indicator al endocitozei în fază fluidă, observându-se ulterior că acest traser nu traversează membrana plasmatică și nu se adsoarbe la suprafața celulelor (33). Dextranii fluorescenți sunt relativ inerti și prezintă toxicitate redusă, fiind folosiți pentru studierea comunicării dintre celule și monitorizarea preluării și procesării moleculelor exogene în cadrul procesului de endocitoză (13).

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 49, nr. 2, p. 133-138, București, 1997

Elaborarea unor sisteme de cultură pe termen lung pentru foliculii ovarieni în dezvoltare este, în general, dificilă (11, 20, 22). În cazul vertebratelor ovipare, numai la amfibieni (*Xenopus laevis*) s-a realizat supraviețuirea și creșterea ovocitului pe parcursul a câteva zile (36, 37, 38).

La peștii teleosteeni au fost raportate o serie de culturi pe termen scurt (până la 24 de ore) în care ovocitul și-a menținut viabilitatea și a sechestrat vitelogenina din mediu (14, 17, 19, 25, 26, 30).

S-a demonstrat că în ovarul mamiferelor comunicarea intercelulară este esențială pentru funcția ovocitară normală. Deși rolul acestei comunicări intercelulare în ovarul peștilor nu este complet elucidat, el poate juca un rol important. În general, procedurile manuale de îndepărtare a straturilor periovocitare pot determina leziuni mecanice care afectează supraviețuirea și creșterea ulterioară a ovocitului.

S-a demonstrat recent la *Oncorhynchus mykiss* (19) că foliculii ovarieni cultivați până la 6 zile, individual sau sub formă de lamelă (grup de 10 foliculi ovarieni) supraviețuiesc și sechestră vitelogenina din mediu, pe care o procesează ulterior prin clivaj proteolitic.

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea preluării în fază fluidă a unui traser fluorescent (FITC-Dextran) *in vivo* și *in vitro* în foliculii previtelogenetici și vitelogenetici timpurii de *Carassius auratus gibelio*.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experimentele au fost realizate pe femele de *Carassius auratus gibelio*, provenite de la Stațiunea de Cercetări Piscicole Nucet.

Administrarea conjugatului FITC-Dextran *in vivo*:

Femele de caras în greutate de 85-90g au fost injectate intraperitoneal cu 1 ml de FITC-Dextran (Sigma, SUA), cu o greutate moleculară de 580,000 D, dizolvat în 0,8% NaCl. Concentrația administrată a fost de 70 mg/ml. Animalele au fost sacrificate după 24 de ore.

Administrarea conjugatului FITC-Dextran *in vitro*:

S-au recoltat fragmente de ovar care au fost plasate în mediu de cultură Leibovitz (L-15, Sigma, SUA), pH 7,7, filtrat prin filtru steril de 0,22 μm (Sartorius AG, Germania).

Foliculii ovarieni izolați din fragmentele ovariene au fost incubați o oră la temperatura camerei în mediul de cultură L-15, suplimentat cu 10% ser fetal de vițel (Gibco, SUA) și antibiotice (streptomycină 250 μg/ml și penicilină G 250 u.i/ml).

După acest interval de timp, s-au îndepărtat din mediu ovocitele alterate. Restul foliculilor ovarieni au fost incubați în mediul de cultură în prezența FITC-Dextran, într-o concentrație de 2,5 mg/ml. S-au cultivat câte 30 de ovocite în plăcuțe sterile de 1 ml.

Incubarea ovocitelor s-a realizat inițial două ore la 4°C, după care au fost aduse la temperatura camerei, unde s-a continuat incubarea la diferite intervale de timp: 1, 3, 4, și 24 de ore.

La sfârșitul perioadelor de incubare, foliculii ovarieni au fost spălați de trei ori cu mediu de cultură L-15, la care s-a adăugat 0,1% albumină serică bovină.

Prelucrarea probelor pentru vizualizarea în microscopia de fluorescență

Fragmente de ovar de la femele de caras injectate intraperitoneal și foliculii ovarieni cultivați în prezența FITC-Dextran au fost fixate peste noapte la 4°C în 10% formaldehidă, în tampon fosfat salin, pH 7,4. La fixator s-a adăugat 1% DMSO.

După fixare probele au fost spălate, deshidratate, clarificate și incluse în parafină cu punct de topire 42-44°C (Merck, Germania).

Lamele cu secțiuni au fost montate în glicerol: PBS (9:1) cu 2 mg/ml phenylendiamină și au fost examinate la un microscop Fluoval (Zeiss, Jena), echipat cu lampă de mercur în sistem epifluorescent și filtre corespunzătoare pentru FITC.

După vizionarea în microscopia de fluorescență, lamele au fost colorate cu hematoxilină-eozină.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ovarul femelelor de *Carassius auratus gibelio* folosit în experimentele de endocitoză *in vivo* și *in vitro* se caracterizează prin prezența foliculilor ovarieni previtelogenetici și vitelogenetici timpurii.

Endocitoza complexului FITC-Dextran *in vivo*

La 24 de ore după administrarea traserului se observă o acumulare intensă în interiorul vaselor de sânge din teaca foliculară (fig. 1A) și în celulele foliculare din jurul ovocitelor previtelogenetice timpurii (fig. 1B) și târzii, cu alveole corticale (fig. 1C).

În citoplasma periferică a ovocitelor vitelogenetice timpurii, ligandul a fost internalizat în cantități reduse, fiind localizat în lizozomii corticali (fig. 1D). Cea mai intensă acumulare a fost observată în această variantă experimentală, în interiorul foliculilor atretici (fig. 1E).

Studierea *in vivo* a căii prin care diferite molecule ajung la ovocit s-a realizat folosind markeri electrono-denși ca peroxidază (1, 2, 9, 16, 23, 24, 42), feritină (6, 9), dextran-fier, thorotrast (9) și vitelogenină marcată radioactiv (23, 24, 39), sau cu aur coloidal (41).

S-a arătat anterior la *Carassius auratus gibelio* (42) că moleculele exogene trebuie să străbată în drumul lor spre ovocit o serie de straturi celulare și aceluare. Moleculele exogene pot fi preluate de către celulele endoteliale ale capilarelor tecale și pot fi identificate în lizozomii celulelor tecale și foliculare din foliculii previtelogenetici și vitelogenetici timpurii.

Transportul moleculelor prin epiteliul folicular se realizează în principal prin canale existente între celule (23, 24, 41). Prezența acestor canale a fost demonstrată la diferite specii de pești (10, 12, 18). Capacitatea foliculilor ovarieni de a sechestra VTG este corelată cu deschiderea canalelor din țesutul folicular, ceea ce permite proteinelor serice să ajungă la suprafața ovocitului (31, 34, 40).

Internalizarea redusă a ligandului în ovocitele previtelogenetice poate fi explicată prin faptul că aceste canale nu sunt încă operaționale pentru a lăsa să treacă molecule de dimensiunea FITC-Dextranului (580 000 D). Greutatea moleculară a vitelogeninei native la *Carassius auratus*, principala proteină serică internalizată de ovocit este de 380 000 D(8).

Endocitoza complexului FITC-Dextran *in vitro*

În figura 2A se remarcă foliculii ovarieni previtelogenetici târzii și vitelogenetici timpurii, precum și lamele ce conțin foliculi previtelogenetici timpurii. Analizele histologice au arătat că majoritatea foliculilor supraviețuiesc bine în cultură și internalizează moleculele exogene.

S-a demonstrat anterior că în cazul peștilor din zonele temperate, mediul de cultură L-15 suplimentat cu ser fetal de vițel și antibiotice reprezintă un mediu adecvat pentru culturile celulare și tisulare (7).

Foliculii ovarieni sunt înconjurați fie de celulele foliculare (fig. 2B), fie celulele foliculare s-au desprins sub formă de teci, astfel încât ovocitul rămâne înconjurat numai de zona radiată (fig. 2C).

Foliculii neviabili se caracterizează prin coalescența citoplasmei și formarea unei zone translucide la periferia ovocitului (fig. 2D). Pierderea viabilității ovocitului reprezintă probabil o alterare a funcției osmotice normale (19).

La *Onchorhynchus mykiss* (30) îndepărtarea epiteliului și tecii foliculare determină o supraviețuire de 50-55% a ovocitelor, în timp ce completa denudare a foliculului (îndepărtarea epiteliului, tecii și celulelor foliculare), determină o supraviețuire de sub 40% (26). S-a demonstrat recent că în cazul cultivării ovocitelor în grup (lamele ovariene cu 10 foliculi), supraviețuirea este mult îmbunătățită (90%, după 6 zile de cultură).

Experimentele noastre au arătat că foliculii previtelogenetici și vitelogenetici timpurii sechestrează FITC-Dextran din mediul de cultură.

După incubare, 2 ore la 4°C ligandul fluorescent a fost detectat la nivelul porilor zonei radiată (fig. 3A) și în citoplasma corticală a ovocitelor vitelogenetice timpurii (fig. 3B), ceea ce sugerează că procesul de internalizare nu este dependent de temperatură.

La 3 ore de incubare la temperatura camerei, ligandul fluorescent a fost identificat în lizozomii corticali din ovocitele vitelogenetice timpurii (fig. 3C), pentru ca ulterior, la 4 ore să existe o acumulare intensă în unii foliculi previtelogenetici târzii cu alveole corticale (fig. 3D).

După 24 de ore de cultură, se remarcă în toată citoplasma ovocitelor vitelogenetice timpurii numeroși corpi multiveziculari care conțin ligandul fluorescent

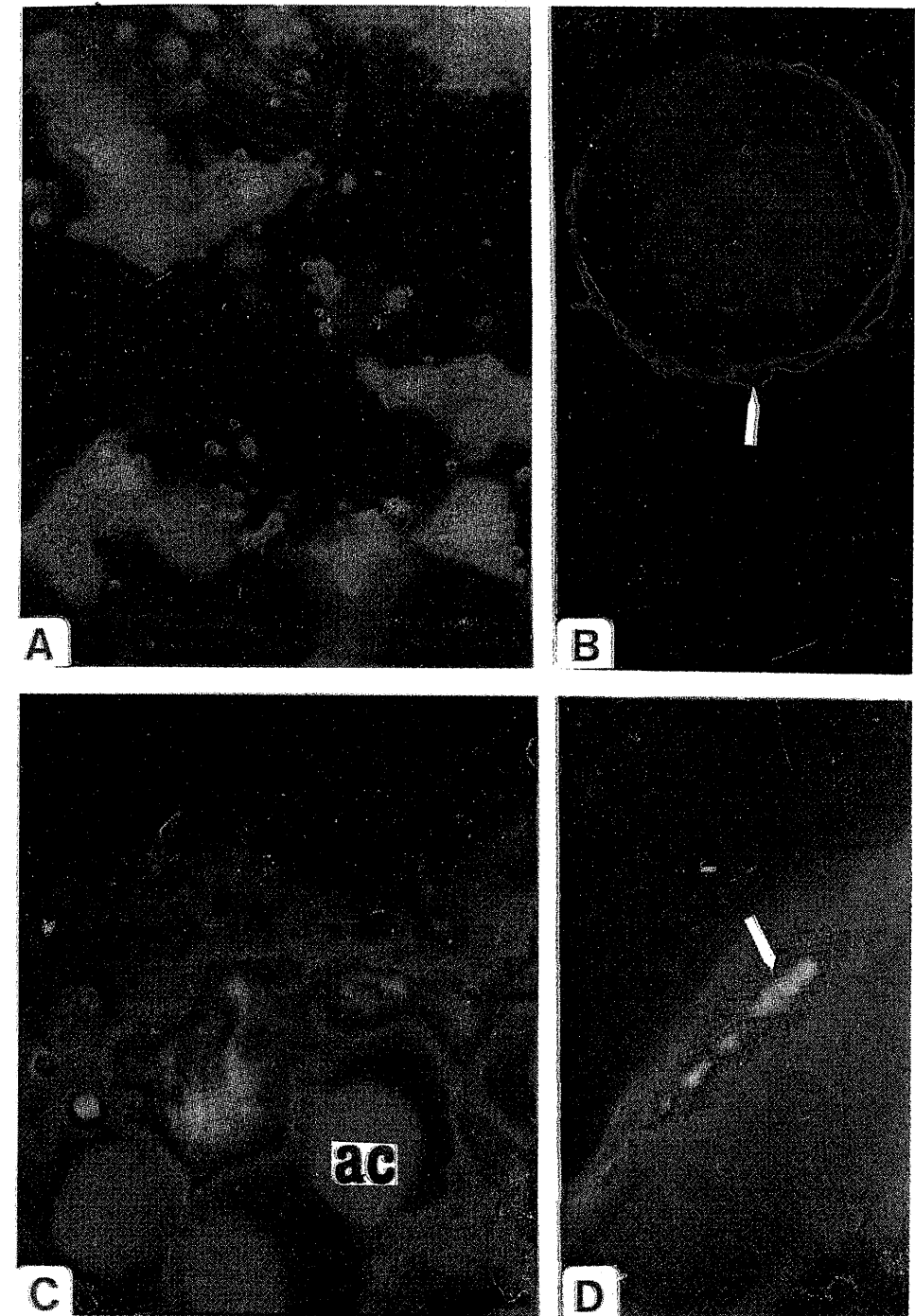


Fig. 4 A-D – Endocitoza complexului FITC-Dextran *in vitro*. A – după 24 de ore de cultură apar numeroși corpi multiveziculari fluorescenți în citoplasma ovocitelor vitelogenetice; B – o acumulare mai intensă a FITC-Dextran în citoplasma corticală a ovocitelor previtelogenetice timpurii și târzii cu alveole corticale – C; D – în cazul în care celulele foliculare și tecale rămân în jurul ovocitului, ele internalizează masiv FITC-Dextran (săgeata) blocând accesul acestuia la ovocit.

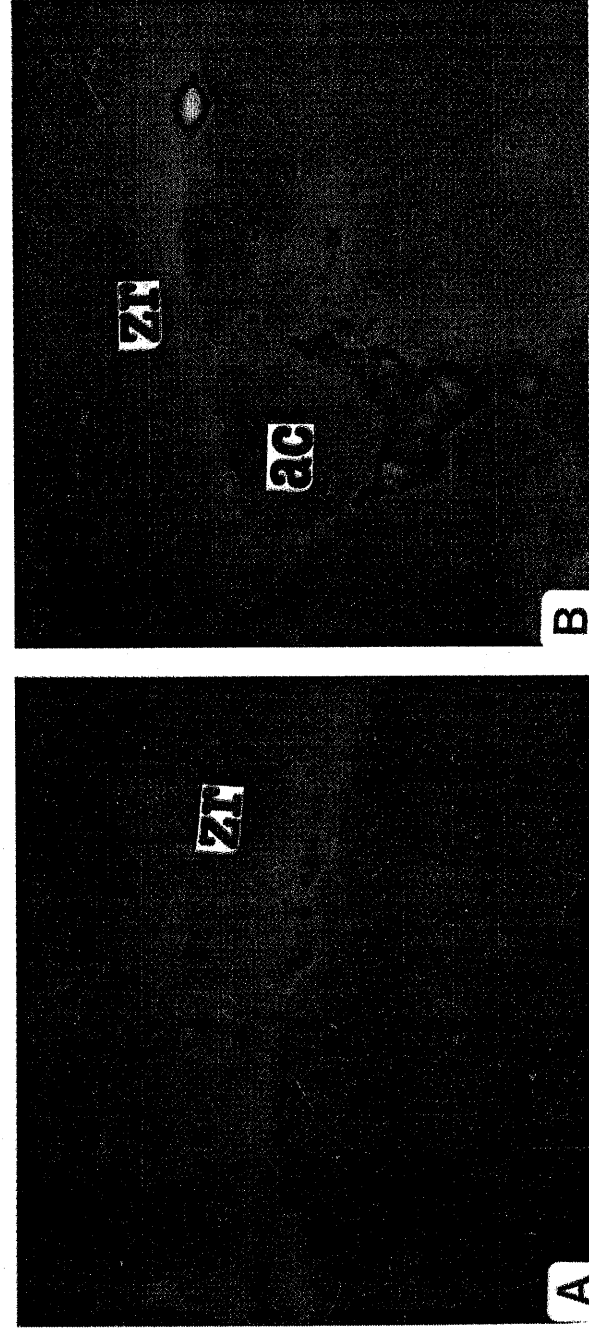


Fig. 3 A-D – Endocitoza complexului FITC-Dextran *in vitro*. A – după incubare 2 ore la 4°C ligandul fluorescent a fost detectat la nivelul porilor zonei radiata și în citoplasma corticală a ovocitelor vitegenetice timpurii – B.

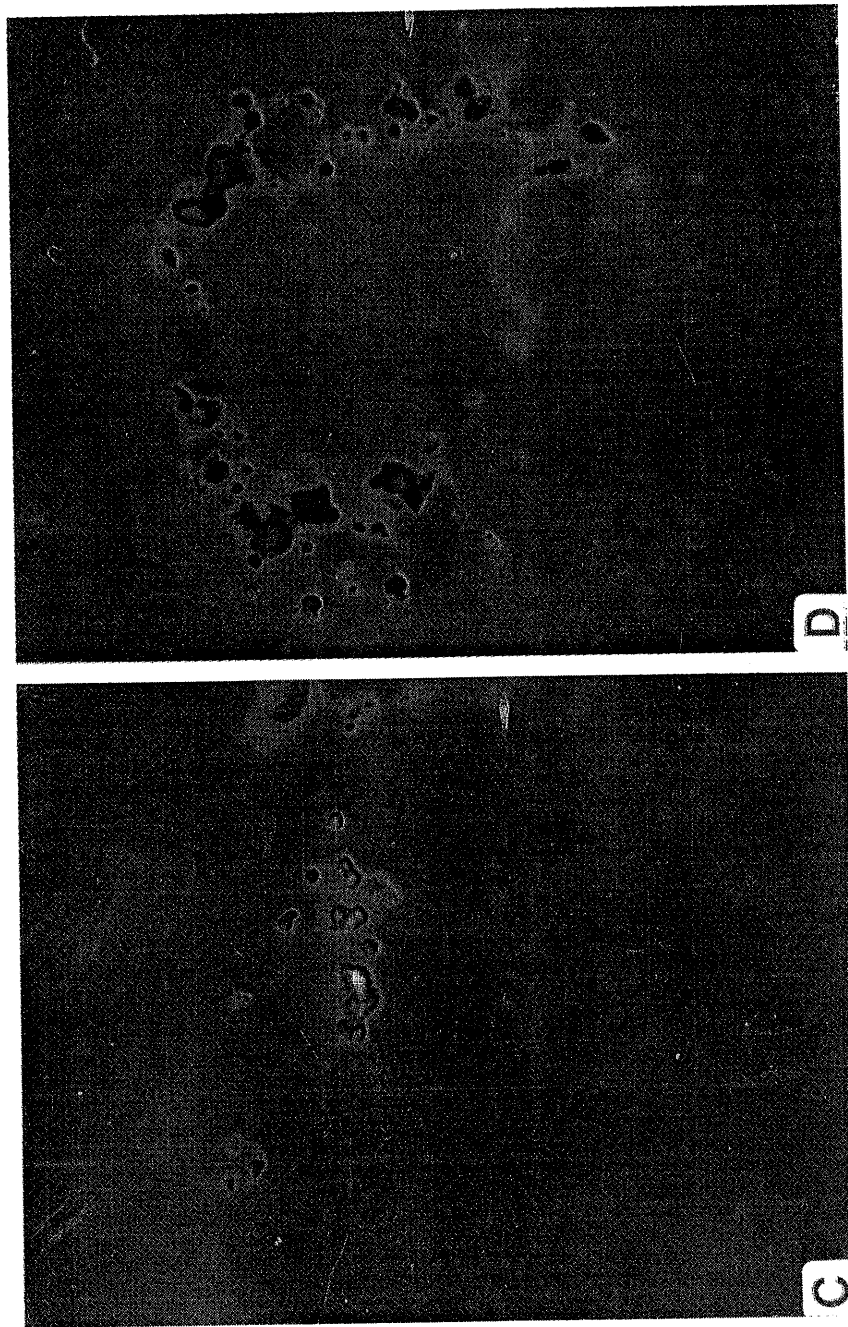


Fig. 3. - C - după 3 ore de incubare, FITC-Dextranul a fost identificat în lizozomii corticali din ovocitele vitelogenetice timpurii și în unii foliculi previtelogenetici târzii cu alveole corticale - D la 4 ore de incubare; ac - alveole corticale; zr - zona radiată.

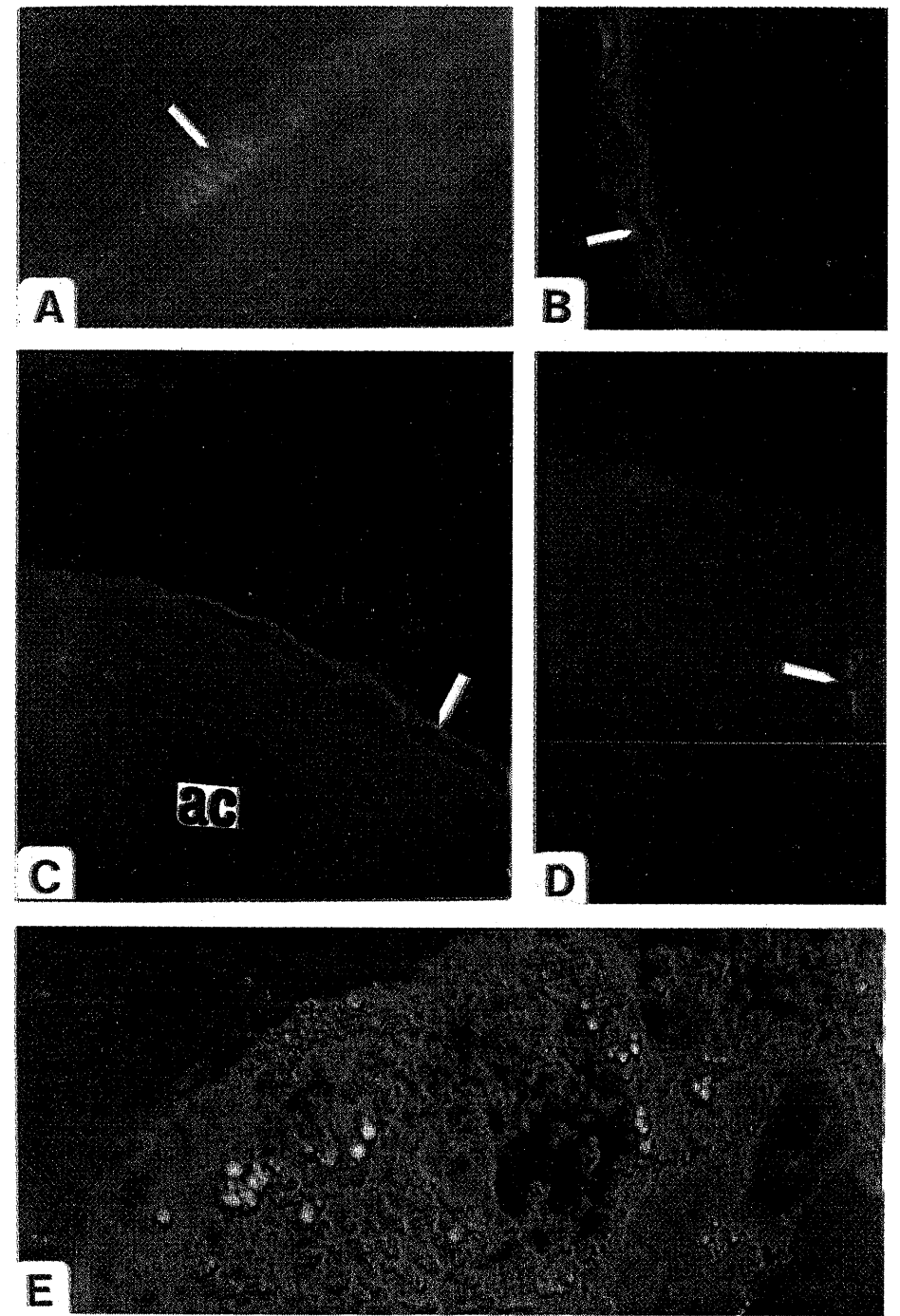


Fig. 1 A-E - Endocitoza complexului FITC-Dextran *in vivo*. A - acumulare intensă în interiorul vaselor de sânge din teaca foliculară (săgeata); B - internalizarea complexului fluorescent de către celulele foliculare din jurul ovocitelor previtelogenetice timpurii (săgeata); C - preluarea complexului fluorescent de către celulele foliculare din jurul ovocitelor previtelogenetice târzii cu alveole corticale (săgeata); D - FITC-Dextranul se acumulează foarte intens în foliculii ovarieni atretici; ac - alveole corticale; E - cea mai puternică acumulare de FITC-Dextran a fost observată în foliculii atretici.

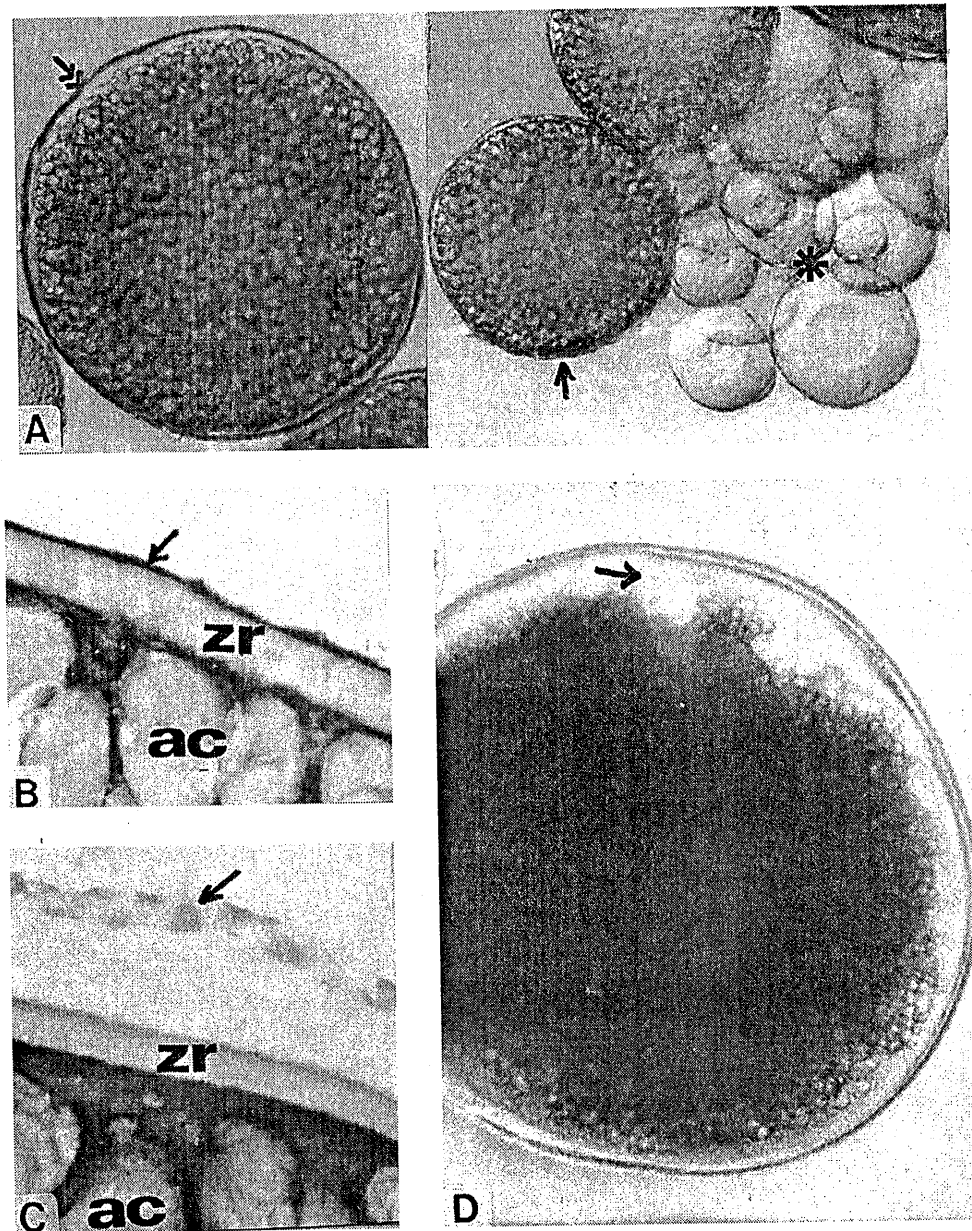


Fig. 2 A-D – Morfologia foliculilor ovarieni viabili (A-C) și neviabili (D) în cultură. A – foliculi ovarieni previtelogenetici târzii (săgeata), vitelogenetici timpurii (→) și lamele ovariene care conțin foliculi previtelogenetici timpurii (*); B – în cultură foliculii vitelogenetici pot fi înconjurați de stratul celulelor foliculare (săgeata); C – acest strat se desprinde de pe suprafața ovocitului (săgeata); ac – alveole corticale; zr – zona radiata; D – alterarea ovocitului este însoțită de apariția unei zone translucide la periferie (săgeata).

(fig. 4A). De asemenea, se constată o acumulare intensă în citoplasma corticală a ovocitelor previtelogenetice timpurii (fig. 4B) și târzii, cu alveole corticale (fig. 4C).

In vitro, în cazul în care celulele foliculare și tecale rămân în jurul ovocitului, ele internalizează masiv FITC-Dextran, blocând accesul acestuia la ovocit (fig. 4D).

O serie de studii au demonstrat că ovocitele pot prelua diferite molecule exogene, dacă sunt prezente în concentrații corespunzătoare în spațiul periovocitar sau, în mediul de incubare (3).

La șoarece s-a demonstrat recent (15) că *zona pellucida* este permeabilă pentru FITC-Dextran cu greutate moleculară cuprinsă între 71,2 kDa și 170 kDa.

Rezultatele noastre demonstrează o acumulare mai intensă a FITC-Dextranului în cazul foliculilor ovarieni în cultură. Aceste rezultate sunt probabil consecința îndepărtării învelișurilor periovocitare în cazul foliculilor cultivați, astfel încât ligandul poate ajunge la suprafața ovocitului și este ulterior internalizat.

În acest sens, s-a demonstrat că la *Xenopus laevis* pinocitoza *in vitro* în foliculii ovarieni fără teacă este mai intensă decât cea *in vivo* (35, 36).

În ovocitele previtelogenetice liganzii internalizați nespecific sunt destinați lizozomilor.

S-a demonstrat că la pești primii lizozomi apar în stadiile timpurii ale ovogenezei, și se găsesc izolați, sau în grupuri în citoplasma corticală (6, 27, 32). Ulterior, ei se acumulează rapid, inițial formând un strat cortical continuu, pentru ca apoi să migreze în toată citoplasma. Din acest moment ei formează cel mai voluminos compartiment al celulei chiar după formarea alveolelor corticale. La începutul vitelogenezei lizozomii pierd activitatea hidrolazică.

Datorită acestui comportament enzimatic diferit al lizozomilor ovocitari, moleculele exogene internalizate de ovocitele previtelogenetice sunt supuse degradării în timp ce o parte din cele care pătrund în ovocitele vitelogenetice se pot integra în plachetele viteline în formare. În acest sens, s-a demonstrat că ovocitele peștilor sunt capabile să internalizeze nespecific diferite molecule (feritină, HRP, BSA) prin endocitoză în fază fluidă, care sunt transportate ulterior la plachetele viteline (5, 6, 24, 28, 29, 42).

În concluzie, rezultatele noastre demonstrează că moleculele exogene cu greutate moleculară de 580,000 D nu pot fi internalizate eficient *in vivo*, în foliculii previtelogenetici și vitelogenetici timpurii, datorită faptului că între celulele foliculare canalele intercelulare nu au devenit permeabile pentru molecule de această dimensiune.

În cultură, reducerea sau absența învelișurilor foliculare permite accesul ligandului fluorescent la ovocit.

BIBLIOGRAFIE

1. ABRAHAM M., HILGE V., LISON S., TIBIKA H., *Isr. J. Zool.*, **30**: 110, 1981.
2. ABRAHAM M., HILGE V., LISON S., TIBIKA H., *Cell Tissue Res.*, **235**: 403-410, 1984.
3. AIZENSHTADT T.B., *Oocyte growth and maturation* (T.A. Detlaff, S.G. Vassetzky, Eds), Plenum Publ. Co. (New York), 1-75, 1988.

4. BERLIN R.D., OLIVER J.M., *J. Cell Biol.*, **85**: 660-671, 1980.
5. BRUMMETT A.R., DUMONT J.M., *J. Ultrastruct. Res.*, **55**: 4-16, 1976.
6. BUSSON-MABILOT S., *Biol. Cell*, **51**: 53-66, 1984.
7. CHEN S.N., KOU G.H., *Invertebrate and fish tissue culture* (Y. Kuroda, E. Kurstak, K. Maramorosch, Eds), Japan Sci. Soc. Press (Tokyo), 218-227, 1988.
8. DE VAMING V.L., WILEY H.S., DELAHUNTY G., WALLACE R.A., *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**: 613-623, 1980.
9. DUMONT J.N., *J. Exp. Zool.*, **204**: 193-217, 1978.
10. DUMONT J.N., BRUMMETT A.R., *J. Morphol.*, **155**: 73-98, 1978.
11. EPPIG J.J., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 379-382, 1992.
12. GURAYA S.S., *The cell and molecular biology of fish oogenesis*, Karger (Basel), 86-102, 1986.
13. HAUGHLAND R.P., *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, Molecular Probe Inc., 400-411, 1996.
14. KANUNGO J., PETRINO T.R., WALLACE R.A., *J. Exp. Zool.*, **254**: 313-321, 1990.
15. LEGEE M., *J. Exp. Zool.*, **271**: 145-150, 1995.
16. Le MENN F., *Proc. Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen, 198, 1982.
17. MATSUBARA T., ADACHI S., IJIRI S., YAMAUCHI K., *Fisheries Science*, **61**: 478-481, 1995.
18. NAGAHAMA Y., CHAN K., HOAR W.S., *Can. J. Zool.*, **54**: 1128-1139, 1976.
19. NAGLER J.J., TYLER C.C., SUMPTER J.P., *J. Exp. Zool.*, **269**: 45-52, 1994.
20. NUTTINCK F., *Theriogenology*, **39**: 811-821, 1993.
21. OPRESKO L.K., WILLEY H.S., WALLACE R.A., *Cell*, **22**: 47-57, 1980.
22. ROY S.K., GREENWALD G.S., *J. Reprod. Fertil.*, **87**: 103-114, 1989.
23. SELMAN K., WALLACE R.A., *Tissue & Cell*, **14**: 555-571, 1982.
24. SELMAN K., WALLACE R.A., *J. Exp. Zool.*, **226**: 441-457, 1983.
25. SELMAN K., WALLACE R.A., SARKA A., QI X., *J. Morphol.*, **218**: 203-224, 1993.
26. SHIBATA N., YOSHIKUMY M., NAGAHAMA Y., *Develop. Growth Differ.*, **35**: 115-121, 1993.
27. SIRE M.F., BABIN P.Y., VERNIER J.M., *J. Exp. Zool.*, **269**: 69-83, 1994.
28. TYLER C.R., SUMPTER J.P., BROMAGE M.R., *J. Exp. Zool.*, **246**: 171-179, 1988.
29. TYLER C.R., SUMPTER J.P., BROMAGE M.R., *J. Exp. Zool.*, **248**: 199-206, 1988.
30. TYLER C.R., SUMPTER J.P., BROMAGE M.R., *J. Exp. Zool.*, **255**: 216-231, 1990.
31. TYLER C.R., SUMPTER J.P., *Fish Fisheries Rev.*, **246**: 171-179, 1996.
32. VARO M.I., MESTER R., SCRIPCARIU D., PECINGINE L., *Rev. Roum. Biol. Anim.*, **22**: 27-32, 1977.
33. VAN DEURS B., ROPKE C., THORBALL N., *Eur. J. Cell. Biol.*, **34**: 96-102, 1984.
34. WALLACE R.A., *Developmental biology* (I. Browder, Ed.), **1**: Plenum Press (New York), 1985.
35. WALLACE R.A., JARED D.W., DUMONT J.N., SEGA M.W., *J. Exp. Zool.*, **184**: 321-334, 1973.
36. WALLACE R.A., MISULOVIN A.Z., JARED D.W., WILEY S., *Gamete Res.*, **1**: 269-280, 1978.
37. WALLACE R.A., DEUFEL R.A., MISULOVIN J., *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 151-155, 1980.
38. WALLACE R.A., SELMAN K., *Am. Zool.*, **21**: 325-343, 1981.
39. WALLACE R.A., OPRESKO L., WILLWEY H.S., SELMAN K., *Molecular biology of egg maturation*, CIBA Found. Symp., **98**, Pitman Books (London), 228-248, 1983.
40. WALLACE R.A., SELMAN K., *Dev. Biol.*, **110**: 492-498, 1985.
41. YOSHIZAH N., *Develop. Growth Differ.*, **34**: 517-527, 1992.
42. ZĂRNESCU O., MESTER R., *St. Cerc. Biol. Anim.*, **49**: 13-26, 1997.

Primit în redacție
la 15 mai 1997.

Universitatea București,
Facultatea de Biologie,
Spl. Independenței, 91-95.

ASPECTE ULTRASTRUCTURALE ALE CORNEEI LA *Carassius auratus gibelio*

LUCIA MOLDOVAN*, MARIA CALOIANU*, OTILIA ZĂRNESCU**,
OANA CRĂCIUNESCU*

The cornea of the Crucian carp, *Carassius auratus gibelio*, was examined at the transmission electron microscopic level. The presence of glycosaminoglycans (GAG) in this fish cornea was revealed by a specific method using Ruthenium Red as a cationic dye.

The layers found in the Crucian carp cornea were: the epithelium, the stroma, a thin and partially broken endothelial basement membrane (instead of the Descemet's membrane), the endothelium. No true Bowman's layer was observed. Posterior to the stroma we identified a thick cellular layer that represented the autochthonous layer.

The corneal stroma contains numerous collagen fibrils lamellas, orientated perpendicularly to neighbouring lamellas and a few scattered keratocytes. Electron micrographs of Ruthenium Red stained corneal stroma show GAG filaments bridging collagen fibrils, in a pattern similar to that observed in bovine corneal stroma.

Corneea este un țesut transparent, avascular și foarte inervat, situat la polul anterior al globului ocular. Este formată din celule și o matrice extracelulară (MEC) abundentă, constituită în principal din colageni și proteoglicani. Celulele corneei sunt reprezentate de keratocite, celule epiteliale și endoteliale (1, 2).

Pe lângă proprietățile sale optice, fiind cea mai importantă lentilă de refracție a ochiului, corneea are și rol de protecție, formând o barieră rezistentă mecanic și impermeabilă chimic între ochi și mediul înconjurător. Principala proprietate a corneei rămâne transparența, care a fost mult studiată atât la vertebratele superioare, cât și la cele inferioare și s-a dovedit a fi rezultatul absorbției minime a luminii de către stroma corneană, ceea ce determină o atenuare a intensității luminoase (3, 4, 5). Numeroase studii au arătat că proprietățile optice și mecanice ale corneei sunt determinate atât de structura și compoziția sa unică cât și de caracteristicile țesuturilor adiacente, cum sunt glandele conjunctivale și lacrimale, care mențin o suprafață corneană anterioară netedă (6, 7, 8).

Din punct de vedere structural, cel mai mult s-a studiat corneea vertebratelor superioare, care prezintă o structură unică, relativ simplă, cuprinzând din direcția anterior-posterioară cinci straturi principale: epitelul, stratul Bowman, stroma, membrana Descemet și endotelul. Studii relativ recente asupra corneei unor vertebrate inferioare acvatice ca de exemplu, teleosteenii, au evidențiat și alte compo-

nente structurale, ca o adaptare la mediul de viață, cum ar fi lentilele sau membranele de protecție, stratul autohton, stratul iridescenț și filtrul cornean galben (9, 10, 11).

Scopul prezentei lucrări a fost caracterizarea electronomicroscopică a corneei de *Carassius auratus gibelio* și evidențierea glicozaminoglicanilor din stroma sa corneeană printr-o metodă de microscopie electronică specifică, utilizând drept colorant roșu de ruteniu.

MATERIAL ȘI METODĂ

Corneile de caras auriu au fost procurate de la Stațiunea de Cercetări Piscicole Nucet. Țesuturile prelevate imediat după sacrificarea peștilor au fost fixate timp de 6 zile în tampon cacodilat de sodiu 0,1M, pH 7,4 conținând glutaraldehidă 2,5% și paraformaldehidă 2%. Fragmentele de corneei astfel fixate au fost postfixate în tampon cacodilat 0,1M, conținând tetraoxid de osmiu 1%, pentru 2h, la 4°C. După deshidratare și includere în Epon 812, secțiunile ultrafine au fost colorate cu acetat de uraniu și citrat de plumb, în vederea analizării prin microscopie electronică (utilizând un microscop PEM-100).

Pentru evidențierea glicozaminoglicanilor (GAG) în corneea de pește, comparativ cu cea bovină am utilizat o metodă modificată de colorare specifică cu roșu de ruteniu (Ruthenium Red-Merck) (12). Fragmente din cele două țesuturi au fost fixate în tampon cacodilat de sodiu 0,1M, pH 7,4 conținând glutaraldehidă 2,5% și roșu de ruteniu 0,3%. După spălarea de trei ori, câte 15 minute, cu soluție de cacodilat de sodiu 0,1M, pH 7,4, probele au fost postfixate în tampon cacodilat de sodiu 0,1M, pH 7,4 conținând tetraoxid de osmiu 1% și roșu de ruteniu 0,3%. Etapele ulterioare sunt comune cu cele prezentate la metoda de mai sus.

REZULTATE

Pentru studiul organizării structurale a corneei de caras auriu (*Carassius auratus gibelio*), am utilizat microscopia electronică de transmisie.

Imaginile obținute au evidențiat că, la suprafața corneei, există un epiteliu pluristratificat, care se continuă cu epiteliul conjunctivei. Celulele epiteliale superficiale prezintă în microscopia electronică numeroase spații intercelulare și interdigitații (fig. 1). Toate celulele epiteliale sunt unite prin joncțiuni celulare de tipul desmozomilor (fig. 2). Sub epiteliu există o membrană bazală redusă ca dimensiune.

Stroma corneeană este alcătuită din numeroase lamele, în care fibrele de collagen ale fiecărui strat sunt strâns împachetate într-o substanță fundamentală, amorfă (fig. 3). Fibrele de collagen din fiecare lamelă sunt orientate în unghi drept față de cele din lamelele adiacente (fig. 4).

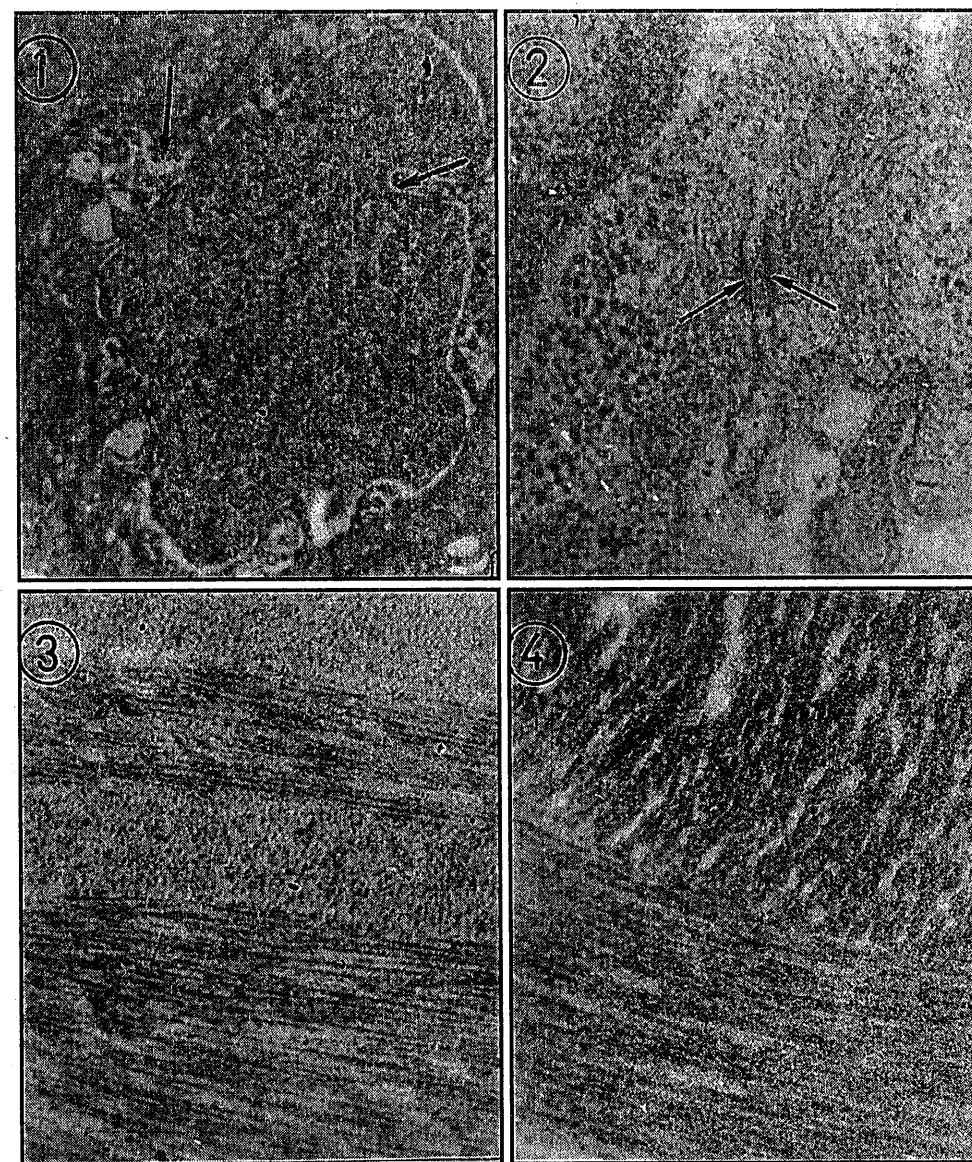


Fig. 1 – Celulă epitelială în corneea de caras auriu. Se remarcă prezența spațiilor intercelulare și a interdigitațiilor (săgeți); $\times 6800$.

Fig. 2 – Celulele epiteliale sunt unite prin joncțiuni celulare de tipul desmozomilor (săgeată); $\times 34000$.

Fig. 3 – Dispoziția lamelilor de collagen din stroma corneei de pește. Fiecare lamelă este compusă din fibrele subțiri de collagen paralele între ele; $\times 13600$.

Fig. 4 – Fibrele de collagen dintr-o lamelă sunt orientate perpendicular față de cele din lamelele vecine; $\times 34000$.

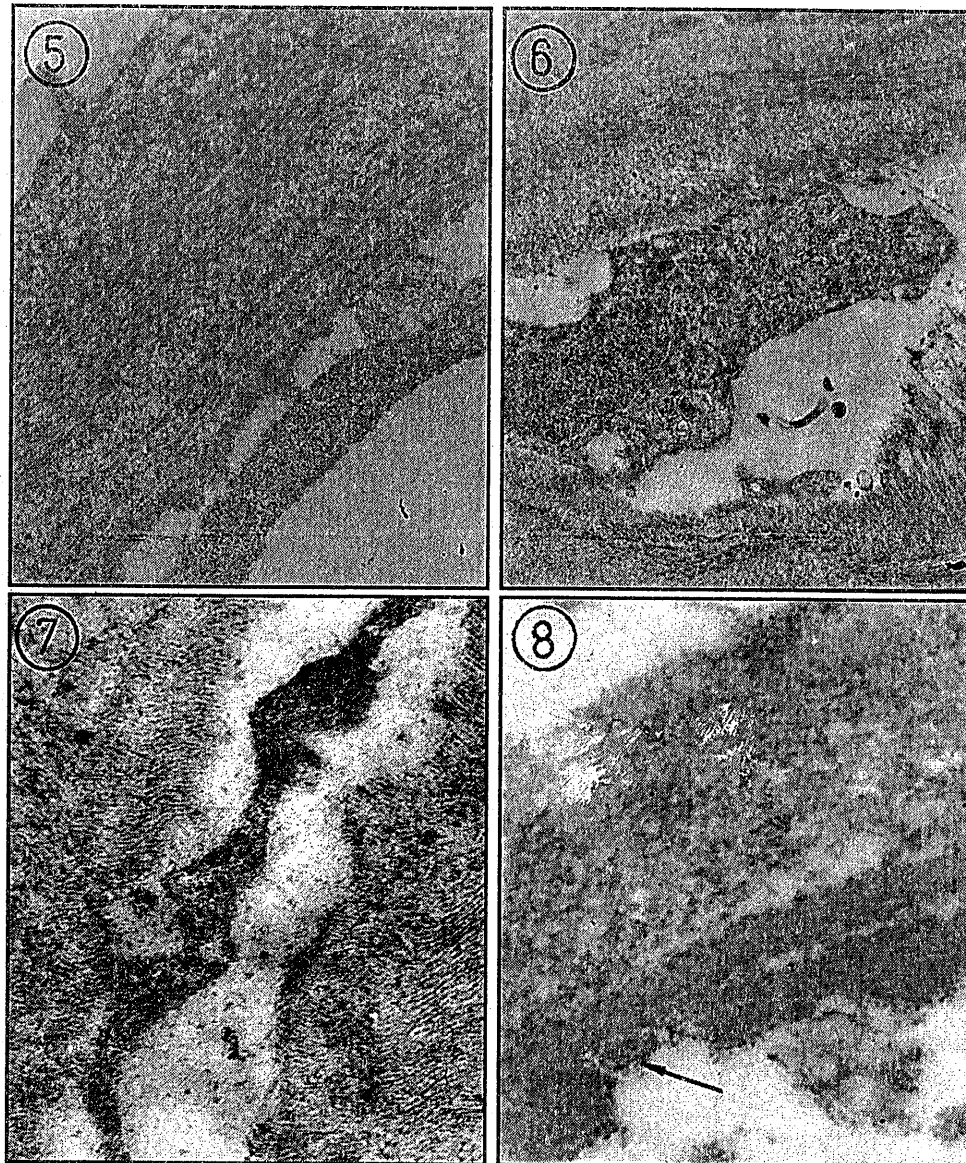


Fig. 5 – În regiunea posterioară a stromei sunt prezente lamele colagenice mai subțiri comparativ cu restul stromei; $\times 17000$.

Fig. 6 – Keratocit dispus între lamelele stromale; $\times 10200$.

Fig. 7 – Prelungire citoplasmatică a keratocitului stromal; $\times 17000$.

Fig. 8 – Membrană bazală endotelială incompletă (săgeată); $\times 34000$.

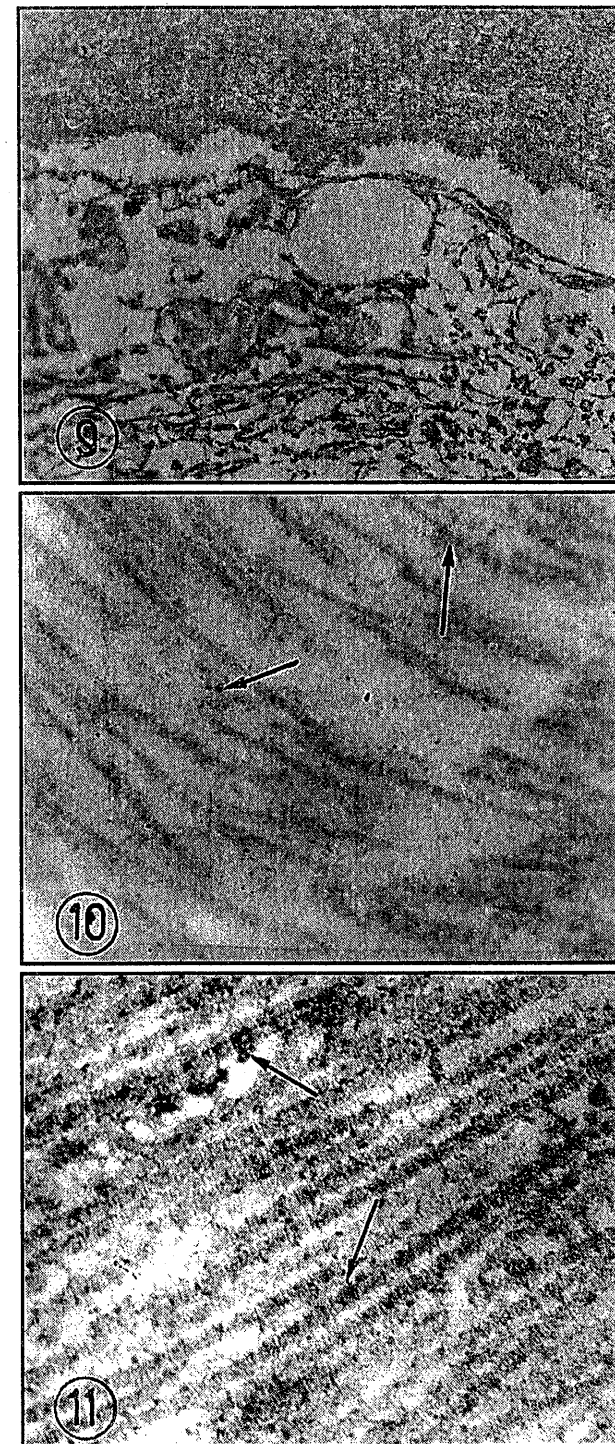


Fig. 9 – Stratul autohton format din celule mari, vacuolizate; $\times 50000$.

Fig. 10 – Imagine de microscopie electronică a glicozaminoglicanilor asociați cu fibrilele de colagen în stroma corneei de caras auriu (săgeți); $\times 34000$.

Fig. 11 – Evidențierea electronmicroscopică a glicozaminoglicanilor în stroma corneei de bovine (săgeți); $\times 50000$.

În regiunea posterioară, în apropierea endoteliului, lamelele stromale sunt mai subțiri (fig. 5), comparativ cu restul stromei. Între lamelele stromale se găsesc keratinocite (fig. 6), care prezintă prelungiri citoplasmice lungi (fig. 7). În citoplasma acestor celule, se găsesc distribuite perinuclear mitocondrii, picături lipidice și glicogen.

La această specie nu s-a putut observa o membrană Descemet deși, uneori, se remarcă, în anumite regiuni, o membrană bazală endotelială incompletă (fig. 8). Sub această membrană s-a evidențiat un strat endotelial foarte subțire. În cazul corneei de pește, în regiunea posterioară a stromei corneene se găsește un strat autohton, alcătuit dintr-un țesut lax, format din celule mari, vacuolizate (fig. 9).

Colorarea cu roșu de ruteniu a evidențiat în microscopia electronică prezența GAG care decorează fibrilele de colagen din stroma corneeană (fig. 10). Modelul de decorare a fibrilelor de colagen cu GAG este similar cu cel observat de noi în cazul fibrilelor de colagen din stroma corneeană bovină (fig. 11).

DISCUȚII

Învelișul extern al globului ocular este reprezentat în partea sa anterioară de o membrană transparentă numită cornee, care se continuă la nivelul limbului sclero-cornean cu o structură alb-gălbuie, sclerotica.

Lumina care ajunge la nivelul corneei este reflectată și refractată, corneea având rolul unei lentile convergente, a cărei putere este determinată de indicele de refracție, care la mamifere are valoarea medie de 1,37 (13). La vertebretele inferioare acvatice, indicele de refracție al luminii este foarte mic în raport cu cel găsit la mamifere. De aceea, rolul principal al corneei acvatice este realizarea unei protecții între ochi și apă și menținerea unei suprafețe optice, transparentă și netedă (14).

Pentru studiul structurii corneei de *Carassius auratus gibelio* și al organizării macromoleculilor sale structurale (colagen și glicozaminoglicani) am folosit microscopia electronică de transmisie. După cunoștințele noastre, acestea sunt primele observații asupra corneei de caras auriu.

Suprafața celulelor epiteliale externe ale corneei de caras auriu prezintă numeroase evaginări sub formă de microvili și micropliuri, într-un aranjament similar cu cel observat în corneea altor teleosteeni ca, de exemplu, *Limnichthyes fasciatus* (14) și *Lepisosteus platyrhincus* (15). Studii anterioare au arătat că aranjamentul acestor spații intercelulare este specific speciei și că, rolul lor important este de a mări suprafața de difuzie și transport activ al sărurilor între ochi și apa din jur. La om și mamifere, cu excepția celor marine, microcutele epiteliale joacă un rol major în stabilizarea lichidului lacrimal esențial pentru vederea clară (16).

În corneea de *Carassius auratus gibelio* s-a evidențiat prezența unei membrane bazale epiteliale fine, dar nu s-a observat un strat Bowman bine definit. În condițiile în care stratul Bowman lipsește, se pare că membrana bazală, alături de

epiteliul pluristratificat au rolul unei bariere pentru fluxul de ioni de sodiu și apă (17). Acest strat nu s-a evidențiat nici la alți teleosteeni, precum *Limnichthyes fasciatus* (14), dar a fost observat la *Petromyzon marinus* (18) și la unele elasmobranhii (19).

Următorul strat corneean evidențiat a fost stroma, care este alcătuită din fibrile de colagen, asociate în lamele orientate perpendicular una față de alta, într-o formă similară cu cea de la corneile vertebratelor superioare. Grosimea lamelilor colagenice este diferită în regiunea posterioară, comparativ cu cea anterioară. Existența lamelilor de colagen mai groase în regiunea de lângă epitelium poate fi rezultatul lipsei stratului Bowman. Dispoziția fibrilelor de colagen în stroma corneei de caras auriu și cea a keratocitelor este similară cu cea observată la bovine în studiile noastre anterioare (5).

În regiunea posterioară a corneei de caras auriu, între stromă și endoteliu, a fost pus în evidență un strat de țesut conjunctiv cu celule mari, denumit stratul autohton. Acest strat a fost inițial sesizat de către Munk (1968) la *Lepisosteus productus* și *Amia* (20). Deși originea și dezvoltarea acestui strat nu sunt pe deplin elucidate, se crede că funcția sa de bază este una de refracție (11). La corneile unor teleosteeni (*Corythoichthyes paxtoni*), acest strat se unește posterior cu un strat celular iridiscent. Culoarea celulelor iridescente depinde de grosimea și indicele de refracție al stratului respectiv și de unghiul de incidență al luminii (11). La *L. fasciatus*, între stratul autohton și cel iridiscent, s-a evidențiat prezența unor filtre colorate, specifice pentru condițiile diurne, precum filtrul corneean galben (14). Peștii bentonici, care se scufundă în nisip, și-au dezvoltat și alte structuri specializate, cum sunt membranele de protecție denumite și lentile (14).

Membrana Descemet apare, la peștele studiat, ca o membrană endotelială întreruptă, asemănător cu cea evidențiată de Collin & Collin la *L. platyrhincus* (15). Studii anterioare au raportat că, la pești, membrana Descemet este foarte subțire, sau chiar lipsește la unele specii precum *Petromyzon marinus* (18), sau *Triglia cuculus* (21). La peștii la care acest strat lipsește s-a evidențiat în stroma corneeană prezența unor fibre de sutură între fibrilele de colagen uniform organizate, care pot avea un rol similar cu membrana Descemet (15).

Endoteliul apare redus ca dimensiune la corneea de caras auriu, în concordanță cu ceea ce s-a găsit și la alți pești, precum *L. platyrhincus* (15). Acest strat lipsește la unele elasmobranhii (19), ceea ce sugerează că are o funcție minimă în menținerea transparenței corneei, dar constituie o barieră majoră pentru transportul apei prin corneea acestor specii.

Evidențierea GAG din corneea de *Carassius auratus gibelio* s-a realizat prin microscopia electronică, folosind tehnica de colorare cu roșu de ruteniu.

Imaginile electronomicroscopice obținute evidențiază prezența GAG în stroma corneeană de caras, sub forma unor granule electronodense, dispuse ordonat între fibrilele de colagen, într-o manieră asemănătoare cu cea observată de noi în cazul stromei de cornee bovină (fig. 11). Această similaritate privind organizarea

glicozaminoglicanilor și fibrilelor de colagen demonstrează că și în corneea de pește, ca și la vertebratele superioare, matricea polianionică de GAG este importantă pentru menținerea constantă a distanțelor interfibrilare colagenice și în hidratarea normală a țesutului, proprietăți absolut necesare menținerii transparenței corneene (22, 23).

BIBLIOGRAFIE

1. MAURICE, D.M., *The eye*, Vol. 1B, Academic Press, New York, 1, 1984.
2. BERMAN, E.R., *Biochemistry of the eye*, Academic Press, New York, 89, 1991.
3. USHIKI, T., IDE, C., *Cell Tiss. Res.*, **260**: 175, 1990.
4. KOMAI, Y., USHIKI, T., *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **32**: 2244, 1991.
5. MOLDOVAN, L., ZĂRNESCU, O., OANCEA, A., TURCU, D., *Rev. Roum. Biol.*, **38** (2):163, 1993.
6. KLYCE, S.D., BEUERMAN, R.W., *The cornea*, Churchill Livingstone Inc., New York, 3, 1988.
7. BEUERMAN, R.W., PEDROZA, L., *Microscopy Res. & Tech.*, **33**: 320, 1996.
8. KREUTZIGER, G.O., *Exp. Eye Res.*, **23**: 285, 1976.
9. NICOL, J.A.C., *The eyes of fishes*, Clarendon Press, Oxford, 1989.
10. SIVAK, J.G., *The visual system of fish*, Chapman and Hall, London, 1990.
11. COLLIN, H.B., COLLIN, S.P., *Histol. Histopathol.*, **10**: 313, 1995.
12. HUNZIGER, E.B., LUDI, A., HERRMANN, W., *J. Histochem. Cytochem.*, **40**: 909, 1992.
13. CERNEA, R., *Fiziologie oculară*, Edit. Medicală, București, 27, 1986.
14. COLLIN, H.B., COLLIN, S.P., *Cornea*, **7**: 190, 1988.
15. COLLIN, S.P., COLLIN, H.B., *Brain Behav. Evol.*, **42**: 98, 1993.
16. HARDING, C.V., BAGCHI, M., WEINSIEDER, A., PETERS, V., *Invest. Ophthalmol.*, **13**: 906, 1974.
17. EDELHAUSER, H.F., *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**: 665, 1968.
18. VAN HORN, D.L., EDELHAUSER, H.F., SCHULTZ, R.O., *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 454, 1969.
19. KELLER, N., POULIQUEN, Y., *The cornea*, Raven Press, New York, 253, 1988.
20. MUNK, O., *Vidensk. Meddr. Dansk Naturh. Foren.*, **131**: 109, 1968.
21. LYTHGOE, J.N., *Light as an ecological factor*, Blackwell, Oxford, 211, 1976.
22. SCOTT, J.E., CUMMINGS, C., BRASS, A., CHEN, Y., *Biochem. J.*, **274**: 699, 1991.
23. HADN, R.A., BIRK, D.E., *Development*, **115**: 383, 1992.

Primit în redacție
la 30 mai 1997.

* Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare
pentru Științe Biologice, București,
Splaiul Independenței, nr. 296.

** Facultatea de Biologie, București,
Splaiul Independenței, nr. 91-95.

ACȚIUNEA ZINCULUI ASUPRA MANTALEI, BRANHIILOR ȘI HEPATOPANCREASULUI DE LA *Anodonta cygnaea* (MOLLUSCA – LAMELLIBRANCHIATA)

MARIA NĂSTĂSESCU, VIRGINIA POPESCU-MARINESCU,
VIORICA MANOLACHE, CARMEN MARINESCU

When zinc-intoxicated, the epithelia, branchiae, mantle and hepatopancreas of *Anodonta cygnaea* undergo strong alterations, e.g. the disappearance of cell membranes and cilia, pycnosis of the nuclei, or even the complete disintegration of the cells. Likewise, important alterations of the conjunctive tissues present in these structures were noticed.

Metalele grele, prin afinitatea puternică și interacțiunea cu anumiți liganzi și macromolecule din organismele vii pot să devină foarte toxice pentru viețuitoarele din mediul acvatic.

Metalele grele traversează membrana plasmatică și interacționează cu structurile citosolice, prin formarea de complexe metaloorganice, sau prin modificarea unor etape din metabolismul intermediar.

Unele metale, ca de exemplu, Cd, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, considerate elemente esențiale, activează anumite enzime și astfel influențează funcțiile fiziologice ale diferitelor organe.

Acțiunea acestor metale, în diferite concentrații, privind modificările produse asupra țesuturilor la nevertebrate, inclusiv la anumite moluște, a mai fost abordată de unii autori (3), (5), (12).

Zincul este un microelement indispensabil organismului, dar în situațiile în care depășește anumite limite de concentrație devine nociv. Însă, există puține date referitoare la metabolismul zincului la nevertebrate (3), (13).

În lucrarea de față, am urmărit modificările cito-histologice la nivelul mantalei, branhiilor și hepatopancreasului, produse prin acumularea zincului în organism.

MATERIAL ȘI METODĂ

De la exemplarele martor și de la cele intoxicate timp de 96 ore cu doze de 0,3 și 0,8 mg/l Zn (din ZnSO₄) s-au prelevat porțiuni de hepatopancreas, branhiile externe și interne, ca și de manta.

Aceste piese fixate în Bouin și formol calcic au fost prelucrate prin tehnici histologice clasice; secțiunile au fost colorate cu hemalaun-eritrozină, Azan, PAS. Menționăm că intoxicarea exemplarelor de *Anodonta cygnaea* a avut loc în condițiile testelor statice, în care variațiile principalilor factori mediali s-au produs în limite strânse.

REZULTATE

Ambele doze utilizate timp de 96 ore s-au dovedit subletale pentru *Anodonta cygnaea*. Dar, testul prelungit la 7 zile a arătat că doza de 0,8 mg/l Zn este toxico-letală.

Mantaua la *Anodonta cygnaea* este căptușită de un epiteliu paleal care mărginește cavitatea mantalei și un epiteliu extrapaleal ce fațăază cavitatea dintre manta și cochilie.

La exemplarele martor, epiteliiile mantalei sunt unistratificate (fig. 1), constituite din celule prismatiche prevăzute cu cili, printre care se găsesc intercalate celule mucoase. Celulele sunt mai joase către cei doi poli ai mantalei, iar spre mijloc mai înalte. Sub epiteliu există țesut conjunctiv cu elemente sanguine. Tot în țesutul conjunctiv sunt prezente vase limfatice și mușchi cu orientare diferită.

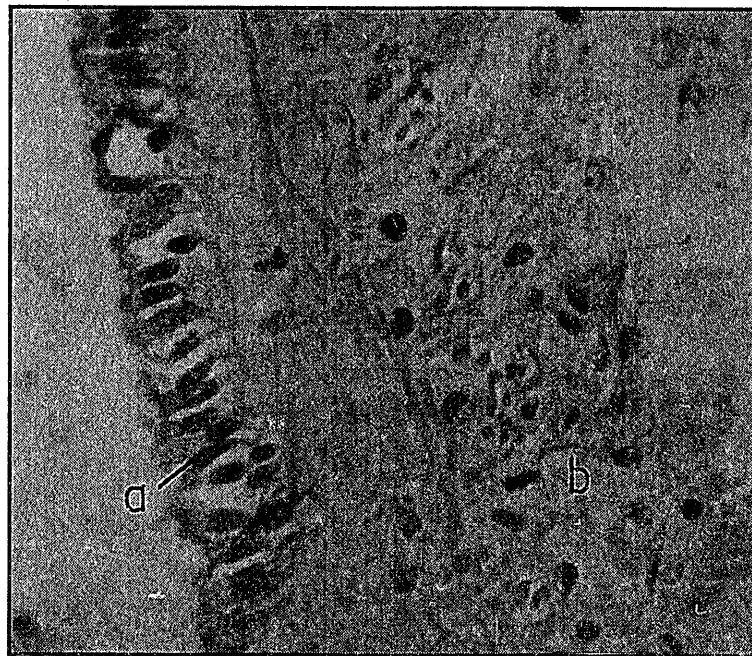


Fig. 1 – *Anodonta cygnaea*, manta de la exemplar martor: a – epiteliu; b – țesut conjunctiv.

În intoxicarea cu doza de 0,3 mg/l Zn, structura mantalei este foarte mult afectată. Astfel, epiteliul apare complet distrus (fig. 2) și nu se mai remarcă ciliile celulelor prismatiche. Celulele mucoase nu se mai disting. La ambele tipuri de celule, limitele celulare dispar, nucleii sunt picnotici. Uneori, epiteliul este pluristratificat. Polurile apicale ale celulelor apar întotdeauna distruse. Țesutul conjunctiv de sub epiteliu este degradat, nucleii celulelor conjunctive ca și ai elementelor figurate sunt picnotici. De asemenea s-au degradat și fibrele musculare.

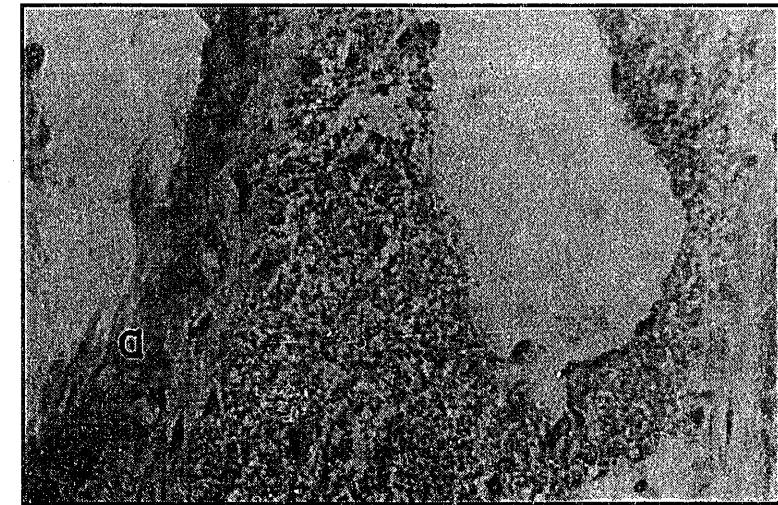


Fig. 2 – *Anodonta cygnaea*, manta de la exemplar intoxicat cu doza de 0,3 mg/l Zn: a – epiteliul mantalei distrus complet.

La doza de 0,8 mg/l Zn, epiteliul mantalei în multe porțiuni își păstrează integritatea; în alte zone, se observă distrugerea completă a acestuia. Uneori celulele își reduc diametrul transversal, apropiindu-se foarte mult; nucleii apar alungiți, alteori complet degradați. Celulele mucoase situate la baza celor ciliate, rar distruse, apar turtite în unele zone; nucleii lor sferici au cromatina bine păstrată, dar citoplasma vacuolizată. Țesutul conjunctiv și cel muscular sunt pe alocuri complet degradate (fig. 3).

Structura **branhiilor interne și externe**, prelevate de la exemplare intoxicate cu Zn, ca și în cazul mantalei, a fost comparată cu structura branhiilor de la lotul martor de *Anodonta cygnaea*. Nu insistăm asupra aspectului normal deoarece acesta a fost deja descris de Manolache și colab. (7).

Astfel, la doza de 0,3 mg/l Zn, branhiile externe își păstrează mai bine structura (fig. 4). Sunt afectate în special branhiile interne, care au epiteliul pe alocuri complet distrus. Celulele sunt dezintegrate și apar risipite. Nucleii sunt picnotici, ciliile distruse. În multe cazuri, la fel de afectate sunt și vasele sanguine care există în axul branhiei. Endoteliul vaselor uneori este degradat. Țesutul conjunctiv se modi-

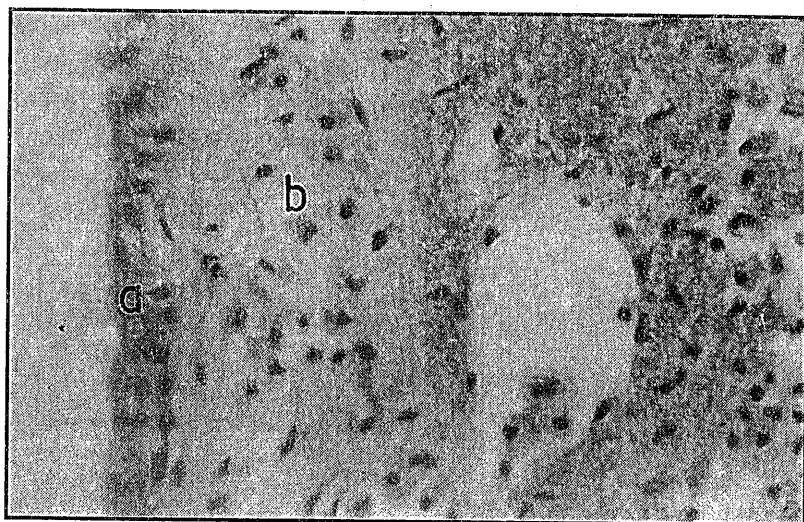


Fig. 3 – *Anodonta cygnaea*, manta de la exemplar intoxicat cu doza de 0,8 mg/l Zn: a – epiteliul mantalei; b – țesut conjunctiv.

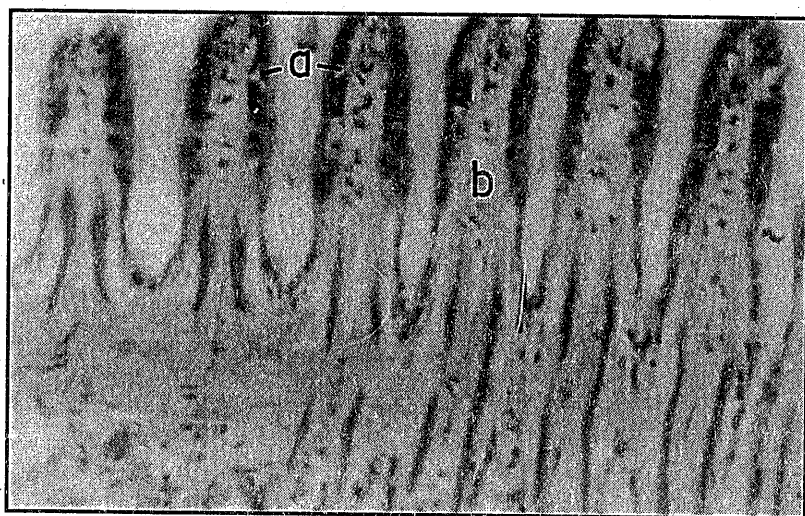


Fig. 4 – *Anodonta cygnaea*, branchie externă de la exemplar intoxicat cu doza de 0,3 mg/l Zn: a – epiteliu branchial; b – țesut conjunctiv.

fică, iar nucleii apar picnotici. În aceeași măsură este afectată și musculatura. În unele zone întreaga structură a branhiei este foarte puternic degradată (fig. 5).

La doza de 0,8 mg/l Zn, în general, branhiile interne își păstrează aspectul normal. Totuși, pe alocuri, lamele branhiale apar rupte și degradate, iar epiteliul

branchiei este afectat: celulele au înălțimea mai mică, limitele celulare uneori dispar nucleii devin picnotici (fig. 6). Parțial, țesutul conjunctiv din interiorul branhiei este lizat. Uneori, se remarcă existența unor celule conjunctive cu nucleii picnotici, care împing celulele bazale ale epiteliului bazal. Sunt distruse de asemenea și celulele sanguine.

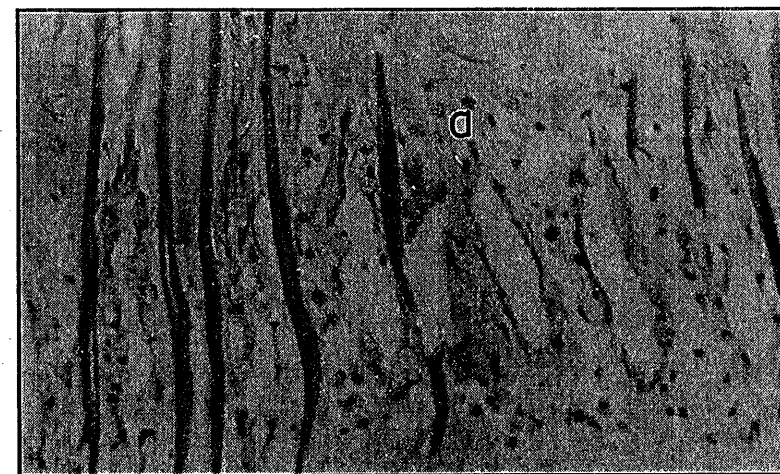


Fig. 5 – *Anodonta cygnaea*, branchie internă de la exemplar intoxicat cu doza de 0,3 mg/l Zn: a – epiteliu branchial; b – țesut conjunctiv.

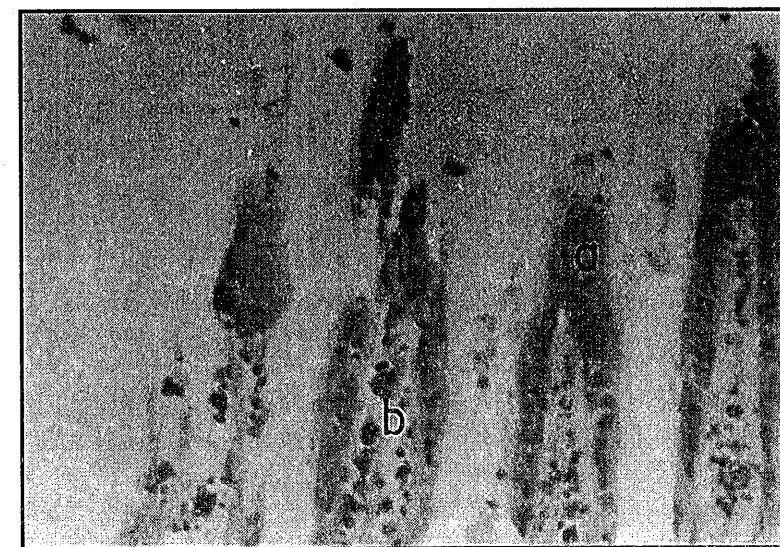


Fig. 6 – *Anodonta cygnaea*, branchie internă de la exemplar intoxicat cu doza de 0,8 mg/l Zn: a – țesut branchial; b – țesut conjunctiv.

În ceea ce privește branhiile externe, acestea pe alocuri își păstrează aspectul normal, altele sunt distruse. Epiteliul branhial este degradat. Suferă modificări și unele componente ale țesutului conjunctiv.

Hepatopancreasul de la exemplarele intoxicate cu zinc a fost comparat ca structură cu cel de la martor. Și la acest organ, aspectul normal a fost descris la *Anodonta cygnaea* și de alți autori (7).

La doza de 0,3 mg/l Zn tubulii hepatopancreasului apar, în general, complet dezorganizați. Sunt porțiuni întregi unde structurile sunt așa de distruse încât nu se recunoaște hepatopancreasul ca organ. Atât celulele clare cât și cele mai întunecate sunt degradate total și întregul preparat apare plin cu nuclei picnotici și dăre de citoplasmă (fig. 7). Rar se mai remarcă forma unui tubul hepatopancreatic, dar în această situație, celulele epitelului apar distruse. Uneori se observă nucleii picnotici. La fel de dezorganizat este țesutul conjunctiv din jurul tubulilor, în care distingem nuclei picnotici ai celulelor conjunctive, sau ai elementelor sanguine, precum și urme de fibre conjunctive.

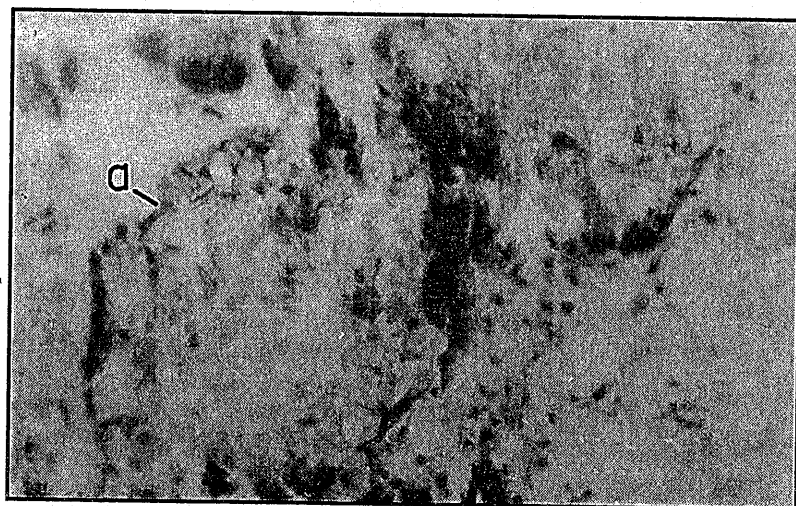


Fig. 7 – *Anodonta cygnaea*, hepatopancreas de la exemplar intoxicaat cu doza de 0,3 mg/l Zn: a – țesut total dezorganizat.

La doza de 0,8 mg/l Zn se întâlnesc în hepatopancreas atât tubuli distruși, dar și tubuli în care integritatea este păstrată (fig. 8). Ceea ce se remarcă în acești tubuli, uneori integri, este faptul că celulele clare apar foarte vacuolizate, limitele dintre ele dispărând și rămânând fie nuclei total picnotici, fie cu cromatină foarte aglutinată. Celulele întunecate se pare că sunt puțin afectate; la ele nucleii au aspect normal. Dar, și la aceste celule, uneori, limitele celulare dispar, altele ele sunt slab distincte. Țesutul conjunctiv prezintă nucleii celulelor conjunctive și sanguine picnotici, uneori se mai păstrează amibocite în care sunt prezente granulații eosinofile.

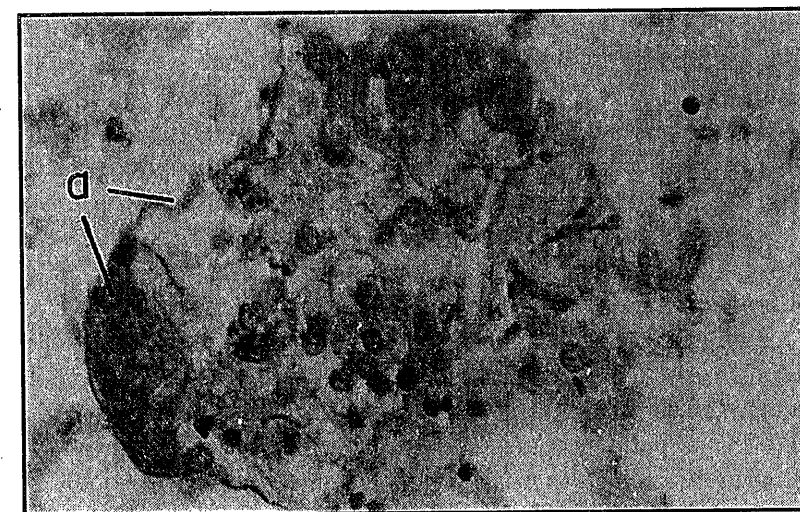


Fig. 8 – *Anodonta cygnaea*, hepatopancreas de la exemplar intoxicaat cu doza de 0,8 mg/l Zn: a – țesut parțial dezorganizat.

DISCUȚII

Toxicitatea unor metale grele a fost studiată în special în ceea ce privește hepatopancreasul, organ în care se produc degradări destul de pronunțate (9). După unii autori, metalele endocitate în celule ajung în diferite compartimente celulare și se acumulează în special în mitocondrii sau lizozomi (3).

La multe specii de nevertebrate, se arată că, prin înglobarea metalelor se formează depozite minerale intracelulare, care constituie granule înconjurate de membrane. Astfel de granule au fost descrise din hepatopancreasul de *Lymnaea stagnalis*, *Helix aspersa* (Gastropoda) (10), (11), *Balanus balanoides* și *Carcinus moenas* (Crustacea) (4), (14). Formarea granulelor este interpretată ca un mecanism de detoxifiere a citoplasmei celulelor digestive.

Atât din observațiile noastre cât și din datele existente în literatura de specialitate reiese că hepatopancreasul este organul cel mai sensibil la acțiunea poluanților.

Astfel, noi am observat degradarea structurii acestuia, sub acțiunea dozelor de 0,3 mg/l și 0,8 mg/l Zn. În acest sens, am remarcat distrugerea uneori totală, în special, a celulelor clare, vacuolizarea citoplasmei, picnoza nucleilor, dispariția membranelor plasmatică și împrăștierea celulelor în lumenul tubulilor. În cazul ruperii membranelor bazale din jurul tubulilor am observat infiltrarea amibocitelor.

Așa cum s-a descris și de către alți autori (3), Zn se acumulează fie în amibocite, fie în granule intracelulare în diverse organe. Lowe (6) a remarcat la *Mytilus edulis* prezența zincului din citoplasma celulelor tubului digestiv.

Efectul metalelor grele asupra mantalei și branhiilor a fost puțin cercetat la moluște; dintre studiile existente asupra acestor organe, mai multe se referă însă la efectul Cu, Cd, Mn, (1), (2), (5), (7), (12), decât la cel al Zn.

În urma unei analize a rezultatelor obținute prin cercetările noastre subliniem că, deși în general, răspunsul unui organism este în relație directă cu doza toxicului utilizată în experiment, nu este surprinzător că o concentrație mai mică a unei substanțe nocive produce efecte mai puternice decât o doză mai ridicată, așa cum s-a întâmplat în cazul exemplarelor de *Anodonta cygnaea*.

În sensul unui răspuns al animalelor invers proporțional cu concentrația toxicului, pledează cercetările lui Salih și colab. (8), care referindu-se la bioacumularea cuprului și zincului menționează că, în musculatura peștelui *Varicorhinus trutta* rata de acumulare este invers proporțională cu concentrația din apă a respectivelor metale. Pe de altă parte, aceiași autori subliniază că rata de acumulare a Mn în mușchii și branchiile de *Varicorhinus trutta* a fost mai mult, sau mai puțin egală la o expunere a animalelor la concentrațiile de la 1 până la 1,5 ppm Mn (8).

CONCLUZII

Rezumând rezultatele cercetărilor noastre, putem afirma că în cazul intoxicației cu zinc am constatat la specia *Anodonta cygnaea* modificări destul de pronunțate ale structurii hepatopancreasului, branchiilor și mantalei. Degradările constau în dispariția limitelor celulare, distrugerea uneori completă a celulelor, picnoza nucleilor, dispariția cililor, atât la celulele mantalei, cât și ale branhiilor. De asemenea, am remarcat distrugerea țesutului conjunctiv și a musculaturii.

Concluzia generală care se desprinde este că, Zn chiar în concentrații subletale, în timp de 96 ore, produce modificări ireversibile la nivelul structurii unor organe vitale. Prin acumularea în timp a toxicului, se ajunge la moartea organismelor.

BIBLIOGRAFIE

1. ANDERSEN J.T., BAATRUPE, *Aquatic Toxic.*, 13: 309-324, 1988.
2. ENGEL D.W., FOWLER B.A., *Marine Pollution*, Function responses, Acad. Press. Inc., London, 239-256, 1979.
3. GEORGE S.G., BRIAN J.S., PIRIE, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 60: 575-590, 1980.
4. HOPKIN S.P., NOTT S.A., *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 56: 867-877, 1979.
5. LAUTIE N., CARRU A.M., TRUCHET M., *Malacologie*, 29: 405-4117, 1988.
6. LOWE D.M., MOORE M.M., *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 59: 851-858, 1979.
7. MANOLACHE V., POPESCU MARINESCU VIRGINIA, NĂSTĂSESCU M., MARINESCU C., *Revue roum. biol., Série Zool.*, 42: (1): 41-48, 1997.
8. SALIH T.N., O.A.N. AL-HABBID, H.N. EHMA YED, Abstracts, XXI, SIL Congress, Kyoto, 235, 1980.
9. SARASQUETTE M.C., GONZALES M.L., GIMENO S., *Eur. J. Histochem.*, 36: 223-232, 1992.

10. SIMINA T., BOSS J.L., *J. of Zoology*, 27: 195-208, 1977.
11. SIMIKINS K., *Bioineralization and detoxification Calcified Tissue Research*, 24: 199-200, 1977.
12. SUNILLA I., *Limologica* (Berlin), 15: 523-527, 1984.
13. THOMAS P.B., RETZ D.A., *Mar. biol.*, 90: 255-260, 1986.
14. WALKER G., RAINBOW P.S., FOSTER P., HOLLAND D.L., *Mar. biol.*, 33: 168-166, 1975.

Primit în redacție
la 30 mai 1997.

* Universitatea București, Facultatea de Biologie.
** Institutul de Biologia Dezvoltării.

INSTABILITATEA CROMOZOMIALĂ CONSTITUȚIONALĂ ÎN CANCERUL DE COLON

ZORICA-ILEANA HERTZOG, M. CRUCE, V. PÎRVULESCU, R. HERTZOG*

It has been established that chromosomal stability is a *sine qua non* condition for a normal development of cellular events. Alteration of ecogenetic equilibrium causes chromosomal instability, generating both an abnormal segregation of genetic material and chromosomal reshaping.

This paper deals with spontaneous and cyclophosphamide-induced chromosomal instability in patients with colon and rectal neoplasms. Chromosome analysis in lymphocyte cultures indicates a spontaneous instability in 20% of the studied cases and an induced one in 80%. Instability consists in various chromosomal aberrations: chromatid and chromosome breaks, centromeric breaks, dicentric chromosomes, or small double chromosomes (dms).

This study sustains the necessity of a genetic consultation for subjects with a high risk for cancer.

Instabilitatea cromozomială constituțională sau indusă poate constitui un marker al predispoziției genetice la cancer (8). Instabilitatea cromozomială se manifestă prin anomalii constituționale cromozomiale, situsuri fragile și hipersensibilitate la mutageni-clastogeni (2).

Anomaliile constituționale cromozomiale pot determina dezvoltarea de tipuri specifice de cancer. De pildă, indivizii cu deleții sau translocatii care implică regiunea 22q11 sunt predispuși la meningioame, aceia care prezintă translocatii ce implică 3p14 sunt predispuși la cancer renal, iar cei cu deleții ale cromozomilor 11p13 și 13q14 sunt predispuși dezvoltării de tumori Wilms și retinoblastom.

Situsurile fragile predispun indivizii purtători la dezvoltarea diferitelor malignități. Exprimarea fenotipică a acestor situsuri reclamă un mediu de cultură al celulelor, lipsit de folat. De pildă, situsul 1p14, care este cunoscut ca un situs fragil comun, apare la majoritatea pacienților afectați de polipoza adenomatoasă familială.

Al treilea tip de anomalități citogenetice, care a fost frecvent corelat cu predispoziția la cancer, este **sensibilitatea la mutageni**. De pildă, pacienții cu sindroame de „rupere cromozomială” sunt predispuși la leucemii. O caracteristică a pacienților cu ataxie telangiectazică (AT) și cu anemie Facioni (AF) o constituie sensibilitatea celulelor la mutageni care induc rupturi cromozomiale, celulele AT sunt sensibile la radiații ionizante și bleomicină, iar celulele AF sunt sensibile la agenți alchilanți. În mod similar, celulele pacienților cu sindrom Gardner, predispuși cancerului de colon, sunt sensibile la radiațiile X (5).

Așadar, determinarea instabilității cromozomiale spontane sau induse este o metodă de diagnostic a stării precanceroase și se impune ca măsură a sfatului genetic în detectarea precoce a indivizilor susceptibili la cancer.

În acest context ne-am propus să efectuăm un studiu citogenetic asupra sensibilității limfocitelor obținute de la pacienți cu cancer de colon la ciclofosamidă – un citostatic cu proprietăți clastogenice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost investigați citogenetic 15 pacienți (11 bărbați și 4 femei) cu cancer de colon, dintre care unii prezentau o dublă localizare. În ce privește repartizarea cancerului de colon pe grupe de vârstă, din cei 15 pacienți luați în studiu, unul aparținea grupei de vârstă de 20–45 de ani, trei aparținea grupei de vârstă 46–55 de ani, șase aparținea grupei de vârstă 56–65 de ani, iar cinci aveau vârsta de peste 65 de ani. De asemenea, zece cazuri proveneau din mediul urban și cinci cazuri din mediul rural.

Cazul care aparținea primului grup de vârstă a prezentat leziuni unice cu degenerare rapidă pe fond genetic, iar cazurile cu vârsta peste 55 de ani au prezentat leziuni multiple care degenerază malign sub influența factorilor de risc ce agresează mucoasa colică.

Pentru fiecare caz, au fost inițiate două culturi de limfocite care au fost crescute pentru 72 de ore în mediu MEM suplimentat cu 10% ser de vițel și PHA-M. O cultură din cele două a fost tratată cu ciclofosamidă (CP) în concentrație finală de 0,2 mg/ml mediu de cultură, urmărind aberațiile cromozomiale induse, iar cealaltă cultură a servit pentru studiul aberațiilor cromozomiale spontane. Paralel, au fost inițiate culturi de limfocite de la donori de sex masculin și feminin, care au servit ca probe de control.

Tehnica preparării cromozomilor a inclus: blocarea mitozelor în metafază cu colcemid în concentrație finală de 0,1 μg/ml pentru două ore la +37°C; hipotonie cu soluție de KCl (0,075 M) pentru 10 minute la +37°C; 3 fixări cu amestec de metanol/acid acetic glacial (3:1) pentru 30 minute la +4°C; efectuarea lamelor cromozomiale care au fost colorate cu soluție Giemsa 10%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele analizei citogenetice a cazurilor prezentate sunt sintetizate în figura 1.

Analiza aberațiilor cromozomiale relevă o rată normală a rupturilor spontane în 11 cazuri și o rată crescută a aberațiilor spontane în 3 cazuri (18%, 15%, 19,06%). În urma expunerii culturilor de limfocite la ciclofosamidă (CP), rata aberațiilor cromozomiale crește semnificativ în 12 cazuri, în 3 cazuri frecvența aberațiilor

nedeșăind 6%. Această observație ne-a determinat să analizăm arborele genealogic al cazurilor luate în studiu. În 10 cazuri, analiza genealogică a relevat diferite forme de cancer și la alți membri ai familiei. Așa cum se observă în figura 2 (cazul 4), fiecare generație este afectată. 1-F2 a prezentat tumora Wilms, 5-F2 – carcinom ovarian, 5-F3 – cancer la stomac.

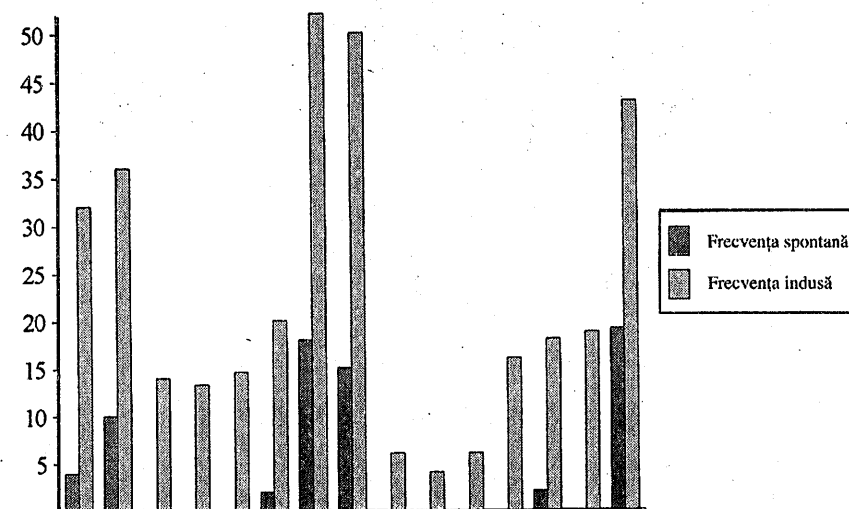


Fig. 1 – Frecvența modificărilor cromozomiale spontane și induse „in vitro”, la pacienții investigați.

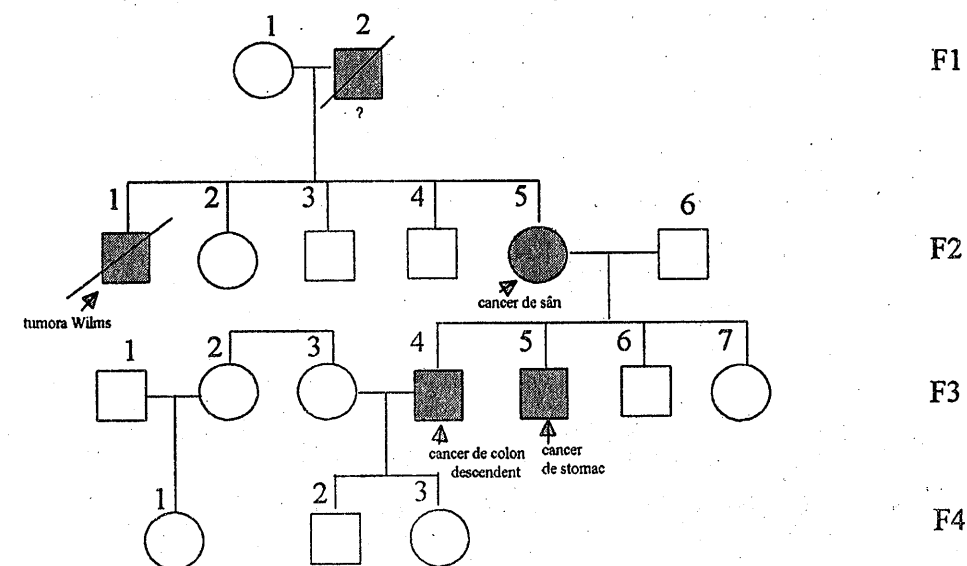


Fig. 2 – Arborele genealogic al cazului 4.



Fig. 3 – Metafază prezentând cromozomi minusculi dubli.

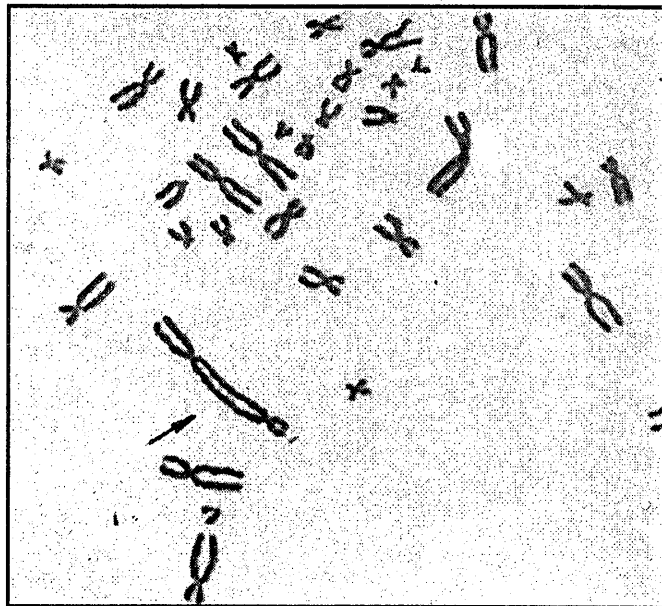


Fig. 4 – Aspect dintr-o metafază prezentând un cromozom dicentric.

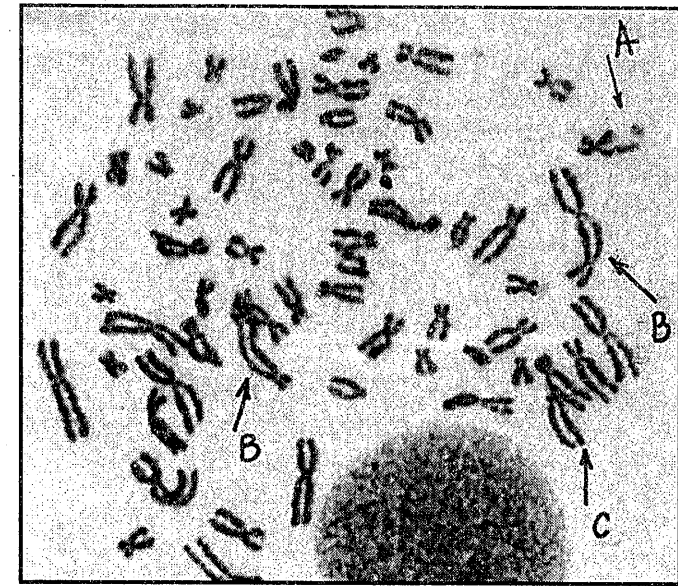


Fig. 5 – Metafază prezentând multiple aberații:

- A – ruptură cromatidică;
- B – translocatie;
- C – deleție.

Spectrul aberațiilor cromozomiale a inclus: rupturi cromatidice și cromozomiale, cromozomi minusculi dubli, cromozomi dicentriți, interschimburi, fragmente acentrice și lacune. Figurile 3, 4 și 5 ilustrează câteva dintre aberațiile cromozomiale identificate mai frecvent. Dintre aberațiile cromozomiale, rupturile și cromozomii dicentriți au apărut cu o frecvență de 70% – în toate cazurile cu frecvență semnificativă a acestora. Cromozomii minusculi dubli au apărut cu o frecvență de 7,6% din totalul aberațiilor.

Adenomatoza colonului și a rectului (ACR) este o boală autozomal-dominantă, asociată cu cancer unde apariția posibilă a instabilității genomice a fost foarte mult cercetată. O serie de studii arată o rată normală a rupturilor spontane și o sensibilitate crescută a celulelor când acestea au fost expuse unui clastogen (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) (5). Dacă rearanjamentele cromozomiale constituie un element esențial în cancerogeneză, atunci fragilitatea cromozomială ar putea fi asociată cu un risc crescut al dezvoltării cancerului. Orice individ cu tendința de a dezvolta rupturi va reflecta doi parametri: expunerea la mutageni și stabilitatea cromozomială inerentă. Este evident că parametrii genetici se asociază cu cei ai mediului pentru a determina efectul unui proces biologic.

În funcție de răspunsul individual la expunerea mutagenică, au fost sugerate 4 oncogene cu risc diferit la cancer: prima oncogenă include cancerul care se dezvoltă din mutațiile spontane cauzate de radiațiile cosmice; a doua oncogenă

include tumorile care se dezvoltă ca răspuns la expunerea mutagenică în exces; a treia oncodemă include tumorile care rezultă din incapacitatea constituțională de a răspunde la provocările induse de clastogeni; a patra oncodemă include cancerul în care influența mediului înconjurător pare să fie neglijabilă. Cele mai frecvente cancere fac parte din oncodemele 2 și 3 (1, 5).

Sensibilitatea celulelor la mutagen nu poate fi explicată decât la nivel molecular. La sfârșitul anului 1993 a fost descoperită prima genă a susceptibilității la cancerul de colon fără polipi. Această genă, numită *hMSH2*, este omoloagă genei *mutS* de la *Escherichia coli*. Prin tehnica RFLP, gena a fost localizată pe cromozomul 2p15-16. La începutul anului 1994 a fost descrisă o a doua genă a susceptibilității la cancerul familial de colon – *hMLH1* – omoloagă genei *mutL* de la *S. cerevisiae*. Alte două gene – *hPMS1* și *hPMS2* – omoloage genei *yPMS1* de la levuri au fost descrise ca fiind implicate în susceptibilitatea la această formă de cancer (4, 6, 7).

Se sugerează că alimentele și proliferarea microbilor în colon supun mucoasa colică unei agresiuni mutagene permanente la care organul poate rezista datorită integrității sistemelor de reparare care elimină leziunile. Anomaliile sistemelor de reparare sensibilizează mucoasa colică la efectul oncogenic al mutagenilor de origine alimentară sau microbiană.

Gena pentru ACP (adenomatoza colică cu polipi) a fost localizată pe cromozomul 5q21 și, în diferite tipuri de cancere digestive, această genă prezintă câte o mutație (7). A fost demonstrată o interacțiune puternică între o regiune de aproximativ 15 aminoacizi, a proteinei ACP și cateninele alfa și beta. Cateninele sunt localizate la nivelul joncțiunilor aderente dintre epiteliu, asigurând inhibiția de contact. Aceste joncțiuni sunt constituite din caderine, proteine transmembranare, a căror porțiune extracelulară intervine în interacțiunile homotipice dintre caderinele celulelor adiacente. Prin domeniul lor intracelular, caderinele interacționează cu cateninele alfa și beta, la care se leagă actinele citoscheletului (3, 9). Relațiile dintre citoschelet și moleculele de aderență intercelulară, pe de o parte, și cancer, pe de altă parte, sunt, deja, cunoscute. Modificarea moleculelor de aderență conduce în mod sigur la dezvoltarea metastazelor.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obținute putem conchide următoarele:

1) Fragilitatea cromozomială spontană, semnalată în trei cazuri și cea indusă de ciclofosamidă în 12 cazuri pledează în favoarea unei relații între stabilitatea/instabilitatea cromozomială și riscul la cancer.

2) Dacă instabilitatea genomică nu poate fi determinată direct, expunerea la clastogeni sau radiații devine obligatorie pentru studiul fragilității cromozomiale la persoanele cu risc crescut la cancer.

BIBLIOGRAFIE

1. AXEL K., Génétique du cancer colo-rectal, Médecine/Sciences, 10: 228-229, 1994.
2. BOONEY D.E., CZEPULKOWSKI B.H., *Human Cytogenetics – A Practical Approach*, IRL PRESS at Oxford University Press, 1992.
3. CRUCE M., CRUCE ROXANA, ZAHARIA B., *Adeziunea celulară și matricea extracelulară*, Edit. Aius, Craiova, 1997.
4. GILGENKRANTZ HÉLÈNE, *Susceptibilité au cancer colique et instabilité de l'ADN: un nouveau gène localisé*, Médecine/Sciences, 9: 15-16, 1993.
5. HEIM S., IOHANSSON B., *Constitutional chromosome instability and cancer risk*, Mutation Research, 221: 39-51, 1989.
6. HERTZOG ZORICA ILEANA, *Elemente de genetică moleculară*, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1996.
7. RUBINFELD B., SOUZA B., ALBERT I., MÜLLER O., *Association of the APC gene product with catenin*, Science, 262: 1731-1734, 1993.
8. ȘTEFĂNESCU D., CĂLIN G., *Genetica și cancerul*, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1996.
9. SU L.K., VOGELSTEIN B., KINZLAR K.W., *Association of the APC tumor suppressor protein with catenins*, Science, 262: 1734-1737, 1993.

Primit în redacție
la 10 martie 1997.

Universitatea din Craiova,
Facultatea de Medicină,
Departamentul de genetică
Craiova, str. Petru Rareș, nr. 4.

* Universitatea de Medicină
și Farmacie „Carol Davila”,
București.

MODIFICAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE ȘI SCĂDEREA ÎN GREUTATE LA PUIETUL DE CRAP SUB INFLUENȚA PERIOADEI DE IERNAT

ALICE VASILE-ȘERBĂNESCU, AL. G. MARINESCU*, D. VIZITIU

The chemical composition of the body, the weight and the condition factor (Fulton) of fingerlings from three races of common carp (Frăsinet, Ineu and Ropsa) were examined before and after the winter season. The values of the condition coefficient (Fulton) of fingerlings from these three races were found before the winter season, over the optimal levels required for a good survival during the winter. The greatest weight, fat and protein content losses during the winter season were found to fingerlings from Frăsinet and Ropsa races, the fingerlings of Ineu races resisting better to winter conditions.

Cunoașterea compoziției chimice a organismului permite aprecierea stării generale de întreținere a materialului piscicol, oferind informații asupra posibilităților de depășire a perioadei de iarnă de către crap, precum și a modului de valorificare a bazei trofice naturale și a diferitelor rețete de furajare. Totodată, poate fi stabilită valoarea comercială a cărnii peștelui și sunt obținute date cu privire la parametrul biochimic care trebuie îmbunătățit în acțiunile de ameliorare (Love, 9; Steffens, 14).

În perioada de iarnă, peștii înregistrează pierderi în greutate influențate de o serie de factori: temperatura apei, starea lor fiziologică generală, vârsta și greutatea peștelui introdus în heleșteele de iernat etc.

Obiectivul acestui studiu este aprecierea modificării nivelului principalilor constituenți chimici ai corpului (apă, grăsime, proteine, substanțe minerale) și a valorilor coeficientului de condiție (Fulton), determinarea reducerii greutății la puietul de crap care aparține raselor Frăsinet, Ineu și Ropsa, datorate perioadei de iarnă.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul experimental care face obiectul acestui studiu este reprezentat de puiet de crap, aparținând raselor Frăsinet, Ineu și Ropsa, din heleșteele experimentale care aparțin S.C.P. Nucet.

* Institutul de Biologie București, Academia Română, Laboratorul de Fiziologie animală

Peștii au fost colectați din heleștee la începutul și la sfârșitul sezonului de iarnat: un număr de 65 de pești (25 exemplare Frăsinet, 20 exemplare Ineu, 20 exemplare Ropsa) în perioada 21 oct.–15 nov. 1996, respectiv 70 de pești (25 exemplare Frăsinet, 20 exemplare Ineu, 25 exemplare Ropsa) în perioada 12 mart.–14 apr.1997.

Materialul experimental a fost transportat din heleștee în laborator și conținut în recipiente umplute cu apă de robinet, fiind supus unei perioade de inaniție de 24 ore în vederea eliminării conținutului intestinal. Ulterior, peștii au fost congelați în pungi de plastic, închise ermetic, pentru o perioadă de maxim 30 zile, timp în care s-a efectuat analiza chimică a acestora.

Toți peștii au fost analizați individual. Au fost urmăriți următorii parametri:

greutatea, lungimea standard și s-a calculat coeficientul Fulton ($K = \frac{W \times 100}{l^3}$),

unde K = coeficientul Fulton, W = greutatea, l = lungimea standard (lungimea corpului fără înotătoarea caudală).

Metodele de analiză utilizate sunt cele folosite în mod curent în laboratoarele de biochimie animală: umiditatea probelor s-a determinat prin uscarea acestora în etuvă la 110°C, grăsimea (lipidele totale) prin metoda Folch modificată de Dumitru (2) proteina brută prin metoda Kjeldahl, iar conținutul în substanța minerală prin calcinare în creuzete de platină până la masa constantă.

REZULTATE

Pe baza rezultatelor obținute au fost calculate valorile medii pentru fiecare parametru investigat (prezentate în tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1

Greutatea, coeficientul Fulton și compoziția chimică la puietul de crap care aparține raselor Frăsinet, Ineu și Ropsa, anterior și la sfârșitul perioadei de iarnă.

RASA	FRĂSINET		INEU		ROPSA	
	Toamna	Primăvara	Toamna	Primăvara	Toamna	Primăvara
SEZONUL						
NR. PEȘTI ANALIZAȚI	25	25	20	20	20	25
GREUTATEA (g)	17,78	14,14	30,12	25,68	11,91	9,82
COEF. FULTON (K)	3,14	2,64	2,50	2,28	2,98	2,48
COMPOZIȚIA CHIMICĂ (%)						
APA (%)	77,11	80,24	79,66	80,79	78,91	81,69
SUBST. USCATĂ (%)	22,88	19,75	20,33	19,20	21,08	18,30
GRĂSIME (%)	4,67	2,09	3,50	2,52	4,13	2,67
PROTEINE (%)	16,37	14,50	15,18	4,85	15,80	13,87
CENUȘĂ (%)	1,03	1,21	0,87	1,06	0,96	1,13

Puietul de crap luat în studiu prezenta la sfârșitul perioadei vegetative, anterior iernării, o greutate medie cuprinsă în intervalul de variație 11,91–30,12 g, la sfârșitul perioadei de iernare greutatea variind între 9,82–25,68 g.

Greutatea cea mai mică s-a înregistrat la exemplarele de crap din rasa Ropsa.

Scăderea în greutate înregistrată la cele trei rase de crap luate în studiu a fost de 20,47% pentru puietul din rasa Frăsinet, 14,74% pentru puietul din rasa Ineu și 17,54% pentru puietul din rasa Ropsa.

Coeficientul Fulton (K) reprezenta anterior perioadei de iernare valorile: K = 3,14 pentru rasa Frăsinet, K = 2,50 pentru rasa Ineu, K = 2,98 pentru rasa Ropsa, iar la sfârșitul iernării K = 2,64 pentru rasa Frăsinet, K = 2,28 pentru rasa Ineu, K = 2,48 pentru rasa Ropsa.

Grăsimea (lipidele totale) conținută în corpul peștilor anterior iernatului variază între 3,50% (nivel corespunzător puietului de crap din rasa Ineu) și 4,67% (nivel corespunzător puietului de crap din rasa Frăsinet). La sfârșitul sezonului de iernat, datorită consumului energetic, nivelul acestui indicator ajunge la 2,52% (pentru puietul de crap Ineu), respectiv 2,09% (pentru puietul de crap Frăsinet).

Proteina brută conținută în corpul peștilor anterior iernatului se caracterizează prin valorile 15,18% (pentru rasa Ineu), 15,80% (pentru rasa Ropsa), 16,37% (pentru rasa Frăsinet), nivelul cel mai scăzut observându-se la exemplarele din rasa Ineu. La sfârșitul perioadei de iernat valorile înregistrate se încadrează în intervalul de variație 13,87%–14,85%, puietul de crap care aparține rasei Ropsa reprezentând procentul cel mai scăzut de proteină brută.

Conținutul în apă al celor trei grupe de pești analizate variază în intervalul 77,11%–79,66% anterior iernării, respectiv 80,24%–81,69% la sfârșitul sezonului de iernat.

Substanța minerală (cenușa) conținută în corpul peștilor luați în studiu, la sfârșitul perioadei vegetative înregistra următoarele valori medii: 1,03% pentru rasa Frăsinet, 0,87% pentru rasa Ineu, 0,96% pentru rasa Ropsa, iar la sfârșitul iernării valorile înregistrate fiind ușor ridicate: 1,21% pentru rasa Frăsinet, 1,06% pentru rasa Ineu, 1,13% pentru rasa Ropsa.

DISCUȚII

În timpul iernării peștii înregistrează pierderi în greutate, nivelul acestor pierderi fiind dependent de starea de întreținere și de temperatura apei. Cu cât iarna este mai caldă, iar peștii mai slabi, cu atât pierderile sunt mai mari, ajungând uneori până la 20–25%; dacă temperatura din timpul iernării este mai scăzută, iar peștii mai grași, procentul de pierderi în greutate este mai mic (9).

Ca urmare a scăderii temperaturii apei în timpul iernării, crapul devine din ce în ce mai puțin activ, iar la temperaturi foarte scăzute (1–0°C), intră în starea de hibernare. Temperatura apei, cea mai potrivită pentru iernat, este de 0,5–1°C, iar

creșterea temperaturii peste acest prag determina crapul să iasă din starea de hibernare, acesta începând să înoate fără a se putea hrăni, consumându-și rezervele energetice și pierzând astfel din greutate (8).

Condițiile hidrochimice, în special concentrația oxigenului solvit în apă și reacția apei, sunt factori care au o influență mare asupra iernării crapului; o supra-saturare a apei cu oxigen activează procesele fiziologice ale organismului, determinându-l să se miște mai mult și să slăbească (8).

Pe toată durata experimentului s-a urmărit variația temperaturii apei, cantitatea de oxigen solvit în apă, pH-ul apei.

Valorile medii lunare ale temperaturii apei, înregistrate în perioada de iarnă au fost: 1,5°C în luna decembrie, 2°C în luna ianuarie, 2,5°C în luna februarie, 6,6°C în luna martie.

Concentrația oxigenului solvit în apă a variat în perioada de iarnă în intervalul 10,28–11,83 mg O₂/l, Havelka recomandând ca în apa heleșteelor de iernat concentrația O₂ solvit să nu scadă sub 4 cm³/l (5), Kirpicinikov considerând un necesar de cel puțin 8–9 mg O₂/l (5).

Reacția apei a fost normală pe toată perioada iernării, pH-ul prezentând valoarea medie de 7,5 (grade pH).

Temperaturile joase și lipsa hranei din timpul iernii conduc la modificarea unor indici morfologici (coeficientul de condiție Fulton) și biochimici (apă, grăsimi, proteine, substanță minerală), fiind afectată starea fiziologică generală a peștelui și astfel capacitatea sa de supraviețuire.

Starea de întreținere a peștelui poate fi apreciată după nivelul principalilor constituenți chimici ai corpului și valorile coeficientului de condiție.

La începutul iernatului, puietul de crap care aparține raselor Frăsinet și Ropsa, spre deosebire de crapul Ineu, se caracterizează prin greutatea medii situate sub greutatea optimă (30 g), care este considerată a asigura o iernare a crapului de o vară, în bune condiții (9).

Luarea în considerare numai a greutății medii înregistrată în timpul perioadei de iernare, nu furnizează informații exacte la rezistența puietului de crap la condițiile precare de viață oferite în timpul iernării, astfel încât trebuie să se ia în considerare și gradul său de îngrășare.

Coeficientul Fulton (factorul de condiție, coeficient de îngrășare), indicator care exprimă gradul de îngrășare al materialului piscicol, permite aprecierea posibilității depășirii perioadei de iarnă de către crap. Pentru o iernare în bune condiții și cu o pierdere în greutate redusă la intrarea în iarnă, crapul în vârstă de o vară, cu greutatea de peste 20 g, ar trebui să aibă un coeficient de îngrășare (K) mai mare de 1,6, cel cu greutatea între 15–20 g, K > 1,7, iar cel cu greutatea între 10–15 g, K > 2,0 (8,9).

Toate cele trei rase de crap au prezentat la începutul perioadei de iarnă o stare de întreținere relativ bună, coeficientul de îngrășare variind între 2,50–3,14.

Starea de întreținere a materialului piscicol la începutul și la sfârșitul perioadei de iarnă, este evidențiată și de compoziția chimică a corpului, în principal de nivelul glucidelor și lipidelor, principalele rezerve energetice ale organismelor animale.

În faza anabolică a metabolismului (biosinteza) are loc depozitarea excesului de substanțe energogene sub formă de glicogen, trigliceride și proteine, rezerve ce vor fi mobilizate gradual în funcție de durata și intensitatea solicitărilor organismului.

Conținutul în grăsime este un indicator biochimic important, care permite aprecierea stării corporale și capacitatea de iernare a crapului.

Este cunoscut faptul că în lunile de toamnă, odată cu scăderea temperaturii, are loc o diminuare a creșterii în lungime, dar și o intensificare a creșterii în greutate a peștelui, pentru acumularea de grăsime. Acumularea de grăsime în toamnă este consecința ritmului sezonier al metabolismului, în scopul pregătirii fiziologice a peștelui pentru iernat (1, 10).

Dinamica conținutului în grăsime al peștelui se află sub un control exogen, factorii trofici (cantitatea și calitatea hranei naturale și suplimentare) punându-și amprenta asupra nivelului substanțelor grase din corpul peștilor (8).

Kostomarov indica pentru o bună supraviețuire a crapului în timpul iernii un conținut total în grăsime de cel puțin 3,5%, Havelka recomandând un conținut minim de 4% (5).

Pierderile de grăsime cele mai mari (tab. 2), datorate condițiilor de iernare, au fost observate la exemplarele de crap care aparțin raselor Frăsinet și Ropsa (55,24%, respectiv 33,35%), rase care la începutul perioadei de iernare prezentau un conținut mediu de grăsime mai mare de 4%.

Tabelul nr. 2

Pierderile în greutate și grăsime înregistrate la sfârșitul perioadei de iarnă la puietul de crap care aparține raselor Frăsinet, Ineu și Ropsa.

RASA	FRĂSINET	INEU	ROPSA
SCĂZĂMÂNT ÎN GREUTATE (%)	20,47	14,74	17,54
SCĂZĂMÂNT ÎN GRĂSIME (%)	55,24	15,43	35,35

După epuizarea rezervei de lipide, următoarea rezervă energetică a organismului ce este atacată o reprezintă proteinele. Conținutul în proteine al corpului peștilor este dependent de stadiul ciclului de viață și dimensiunile peștilor, creșterea % a proteinelor fiind consecința multiplicării numărului de celule și creșterii dimensiunilor celor existente (13), nivelul proteinelor aflându-se sub un control endogen (3).

Cantitatea de proteine (%) conținută în corpul ciprinidelor este cuprinsă în general în intervalul 15–19%, o scădere drastică a proteinelor sub pragul de 15%

prejudiciind starea fiziologică generală organismului, un consum intens al acestora și pe o perioadă îndelungată poate conduce la moartea organismului (3, 9).

La începutul perioadei de iernat, nivelul cel mai scăzut al proteinelor a fost observat la puietul de crap care aparține rasei Ineu (15,18%), crapul Frăsinet caracterizându-se prin procentul cel mai ridicat de proteină brută (16,37%).

La sfârșitul iernării, toate cele trei rase de crap se caracterizează printr-un conținut în proteină situat sub 15%. De semnalat este faptul că, deși rezerva de grăsime a organismului nu a fost complet epuizată, s-a recurs la consumul proteinelor corpului pentru furnizarea energiei metabolice necesare întreținerii organismului în perioada de iarnă. Consumul cel mai intens de proteine a fost observat la puietul de crap din rasele Frăsinet și Ropsa, rase la care au fost înregistrate și cele mai mari pierderi în greutate.

Cantitatea de apă conținută în corpul peștilor variază în raport invers proporțional cu nivelul lipidelor (6), la sfârșitul sezonului de iernat cantitatea de apă din corpul puietului de crap ce face obiectul acestui studiu atingând un nivel superior celui înregistrat la începutul acestei perioade.

În strânsă corelație cu consumul grăsimii (lipidele totale), cea mai mare cantitate de apă acumulată în timpul iernii a fost observată la crapul Frăsinet (de la 77,11% toamna la 80,24% primăvara), nivelul apei din corpul crapului Ineu (exemplarele din această rasă prezentau toamna conținutul în apă cel mai ridicat) a înregistrat în timpul iernii doar o ușoară creștere (de la 79,66% toamna la 80,79% primăvara).

Substanța minerală (cenușa) conținută în carnea peștelui relevă bogăția în săruri minerale a hranei ingerate (5, 7).

Corespunzător celor trei rase de crap luate în studiu, substanța minerală conținută în corpul peștilor a înregistrat pe parcursul perioadei de iernare o ușoară creștere comparativ cu valorile înregistrate toamna.

Scăderea în greutate înregistrată la sfârșitul iernării (tab. 2) a depășit nivelul de 8% considerat normal pentru puiet (9), cele mai mari pierderi în greutate constatându-se la puietul din rasele Frăsinet și Ropsa, rase care la începutul iernatului prezentau greutatea medii cele mai mici.

CONCLUZII

Valorile coeficientului de condiție (Fulton), înregistrate la începutul iernării, au indicat o stare de întreținere bună a puietului care aparține celor trei rase de crap;

Scăderea în greutate înregistrată la cele trei rase de crap luate în studiu a depășit nivelul normal pentru puiet, pierderile cele mai accentuate înregistrându-se la rasele Frăsinet și Ropsa;

Puietul de crap ce aparține raselor Frăsinet și Ropsa este caracterizat la începutul perioadei de iarnă prin greutatea medii situate sub greutatea optimă unei iernări în bune condiții; crapul care aparține rasei Ineu prezenta la începutul iernării o greutate optimă unei iernări în bune condiții;

La puietul de crap Ineu, la începutul iernării, nivelele principalelor rezerve energetice ale organismului, erau inferioare celor înregistrate la rasele Frăsinet și Ropsa; pierderile de grăsime înregistrate la această rasă la sfârșitul perioadei de iarnă fiind situate sub cele constatate la rasele Frăsinet și Ropsa;

La toate cele trei rase de crap, puietul a trecut la utilizarea proteinelor corpului pentru procurarea energiei metabolice necesare întreținerii organismului în perioada de iarnă, deși rezerva de grăsime nu a fost complet epuizată;

Consumul cel mai intens de proteine a fost observat la rasele Frăsinet și Ropsa, rase la care s-au înregistrat și cele mai mari scăzăminte în greutate;

Dintre cele trei rase de crap investigate, puietul de crap ce aparține rasei Ineu, singurul care a avut talia normală, a rezistat mai bine la condițiile de viață oferite în timpul iernii.

BIBLIOGRAFIE

1. BOTTESCH A., *Variații cantitative și calitative ale grăsimii crapului de cultură în timpul unui an*, Buletinul Inst. Cerc. Pisc., 3: 45-54, 1958.
2. DUMITRU I.F., *Lucrări practice de biochimie*, Edit. Didactică și Pedagogică, București, 1967.
3. FAUCONEAU B., ALAMI H.-DURANTE, LAROCHE M., *Growth and meat quality relations in carp*, Aquaculture (special issue), 129: 265-297, 1995.
4. GERIS G., POLI B.M., GUALTIERI M., LUPI P., PARISI G., *Body traits and rearing environment*, Aquaculture (special issue), 129: 329-333, 1995.
5. GHERACOPOL O., *Observații asupra modificării unor indici morfologici și biochimici la crapul de cultură, în perioada de iarnă*, Studii și cercetări piscicole, 4(7): 253-271, 1971.
6. HERZBERG A., PASTEUR R., *Proximate composition and preliminary data on freshness determination of silver carp (H. Molitrix)*, The Israeli Journal of Aquaculture - Bamid-geh, 33(3): 87-99, 1981.
7. HURGHISIU I., MARINESCU A.I.G., *Compoziția chimică organică și anorganică la două specii de pești (crap și caras) sub influența regimului de hrană și a inaniției*, Natura-lia, St. cerc., 1: 211-216, 1995.
8. JOBLIN M., RANKIN C., JENSEN B., *Bioenergetics, feed intake and energy partitioning*, Fish Ecophysiology, London, 1993.
9. LOVE R.M., *The chemical biology of fishes*, Academic Press, London, 1970.
10. MARINESCU A.I.G., O. DRĂGHICI, C.A. PICOȘ, *Cercetări de ecofiziologie experimentală privind influența factorului termic și nutritiv asupra metabolismului energetic și material al peștilor*, Bul. Șt. Univ. Pitești, 5-36, 1994.

11. NICOLAU A., LUSCAN S., *Observații privind scăzământul în greutate la crapul de cultură de doi ani în timpul iernii, Buletinul Institutului de cercetări piscicole*, 4: 51-56, 1956.
12. POJOGA I., *Piscicultura*, Edit. Ceres, 1977.
13. SHEARER K.D., *Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids, Aquaculture*, 119: 63-88, 1994.
14. STEFFENS W., *Grundlagen der Fischernährung*, Gustav-Fischer Verlag, Jena, 1985.

Primit în redacție
la 10 iunie 1997.

Stațiunea de Cercetări pentru Piscicultură Nucet,
0230 Nucet, jud. Dâmbovița.

CERCETĂRI PRIVIND COMPORTAMENTUL ÎN CÂMP A MASCULILOR DE *Ostrinia nubilalis* Hb. MARCAȚI

I. ROȘCA*, AL. BĂRBULESCU**

This paper presents the results registered during 1993-1996 period, regarding the behavior of E.C.B. males, marked with Calco red dye and released in field conditions and recaptured in pheromone traps situated on the N-S and E-W axes, at different distances from the releasing point. On the basis of this experiment, it has been possible to demonstrate that male moths are flying not more than 3,000 m from the releasing point, being possible to estimate the population of pest.

Sfredelitorul porumbului (*Ostrinia nubilalis* Hb.) este unul din cei mai importanți dăunători ai porumbului, atât în lume cât și în România. În țara noastră, sfredelitorul porumbului este întâlnit în toate zonele de cultură a porumbului și produce cele mai mari pagube după apariția paniculelor. Pagubele provocate pot atinge 40% din recolta de boabe (4), dar în mod obișnuit se înregistrează, cu variații mai mari, sau mai mici în funcție de an și zonă, în medie 44 % plante atacate, 1.1 larve/plantă, 23180 larve/ha și 550 kg/ha (sau 7,5 %), pierderi de recoltă (5).

În scopul dezvoltării în România a cercetărilor legate de tehnicile lansării de insecte sterile pentru combaterea dăunătorilor (6-8), având drept model sfredelitorul porumbului (*Ostrinia nubilalis* Hb.), o atenție specială a fost acordată, studiului dinamicii și estimării populațiilor naturale a fluturilor de sfredelitorul porumbului, cu ajutorul capcanelor feromonale, iar începând din 1993, cu ajutorul lansării de fluturi marcați cu „Calco red dye” și recapturării acestora în capcane feromonale.

Capacitatea și abilitatea insectelor de a parcurge prin zbor, sau utilizând curenții de aer favorabili, distanțe cât mai mari, este un mecanism care asigură supraviețuirea cu succes a speciei în ansamblu, de aceea informațiile legate de capacitatea de zbor a sfredelitorului porumbului și cunoașterea modelului de dispersie a dăunătorului a constituit obiectivul major al cercetărilor întreprinse.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a utilizat feromonul sintetic varianta CIS (E-5) și varianta TRANS (I) pentru studiul ciclului biologic al dăunătorului în cursul anilor 1990-1996, și nu-

mai varianta CIS pentru studiile legate de lansarea de masculi marcați și recapturarea masculilor. Capcanele feromonale au fost instalate în perioada iunie–septembrie, la 1 m deasupra solului, la 50 m una de alta în culturile de porumb. Pentru studierea biologiei dăunătorului, momelile au fost schimbate la două săptămâni, iar părțile adezive, ori de câte ori a fost necesar. Pentru studiul dispersiei dăunătorului, masculii marcați au fost lansați în perioadele în care populația dăunătorului era scăzută.

Cercetările preliminare de marcarea a adulților cu fucsină, sau cu vopsea fluorescentă, sau contaminarea hranei cu P^{32} , nu au dat rezultatele scontate în experiențele de câmp sau laborator și de aceea au fost abandonate. Cercetările prezentate au utilizat ca metodă de marcarea, colorarea hranei pe care este crescut dăunătorul cu „Calco red dye” (11). În prezent, în cercetările privind comportamentul și modul de zbor al sfredelitorului porumbului, metoda de marcarea utilizează un amestec de Calco red dye N-1700 (150 mg/kg de dietă (0,015%) și ulei de floarea soarelui 5 ml/kg). Colorantul utilizat în dieta în care are loc creșterea larvelor de sfredelitorul porumbului marchează indubitabil toți adulții, astfel că ei pot fi recunoscuți cu ușurință în câmp prin examinarea vizuală a spațiilor fine dintre segmentele abdominale, sau prin strivirea abdomenului, astfel încât, conținutul acestuia, de culoare roșie, poate fi evidențiat. În cazuri cu totul speciale, adulții marcați au putut fi identificați prin mojararea lor într-o cantitate mică de acetonă, trecând extractul prin hârtie de filtru.

Pentru creșterea în masă a dăunătorului și marcarea acestuia, s-a folosit procedura standard utilizată în laboratorul de protecție a plantelor de la Fundulea (1). Cercetările anterioare, au arătat că există posibilitatea de a utiliza capcanele feromonale de tip Fundulea-1 și feromoni sexuali de sinteză pentru a captura masculii speciei *Ostrinia nubilalis* Hb. (9, 10), de aceea ei au fost utilizați pentru capturarea masculilor marcați cu Calco red adăugat în mediul de creștere a larvelor, în scopul marcării adulților. Masculii marcați au fost crescuți în laborator, lansați în câmp și recaptați în capcane feromonale situate la diferite distanțe de locul de lansare, în direcția celor 4 puncte cardinale (N, S, E și V). Capcanele au fost instalate la 25, 100 și 200 m în 1993, la 100, 200 și 300 m în 1994, la 300, 600, 900, 1200 și 1500 m în 1995 și la 1000, 2000, 3000, 4000 și 5000 m în 1996.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele prezentate în tabelul 1, demonstrează faptul că, în zona Fundulea majoritatea populației de sfredelitorul porumbului este alcătuită din ferotipul CIS (E-5), populația TRANS (I), este mică. Numărul capturilor speciei țintă diferă în funcție de an și varianta feromonală utilizată.

Perioada de zbor a speciei *Ostrinia nubilalis*, monitorizată cu ajutorul capcanelor feromonale, este prezentată în tabelul 2.

Tabelul nr. 1

Numărul de masculi de *Ostrinia nubilalis* Hb. capturați/capcană/an – FUNDULEA

Pherotype	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
E	1,75	1,25	0,75	2,75	1,5	0,5	0
Z	8,25	14,75	23,25	29,5	35,25	17,2	10,5

Tabelul nr. 2

Evoluția numărului de masculi capturați/capcană – FUNDULEA

DATA	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
17-23 V	0	0	0	0	0	0	0
24-30 V	0	0	0,75	0	0,5	0	0
31 V-6 VI	0	0,25	0,25	0,5	0,5	0	0
7-13 VI	2,5	0,75	0,5	1	0	0	0,75
14-20 VI	0,5	1,5	3,25	2	1	0,5	3,5
21-27 VI	1	2,25	6,5	6	1,5	3,25	2,5
28 VI-4 VII	0,5	3,25	3,25	7	4	4	1,25
5-11 VII	1	1,5	2,25	4,5	10,5	0,75	0,25
12-18 VII	0	0,25	1,5	0	7	0,25	0
19-25 VII	0	0,25	0,25	0,5	2,5	0	0
26 VII-1 VIII	0	0	0,25	0,5	0,5	0	0
2-8 VIII	0	0,25	0,5	2,5	0	0	0,5
9-15 VIII	0,5	0,25	0	3,5	0,5	5,5	1,25
16-22 VIII	0,75	0,75	0,25	1	1,5	2,25	0,25
23-29 VIII	1,25	1,75	1,25	0	3,75	0,75	0,25
30 VIII-5 IX	0,25	1,25	2,25	0,5	1,5	0	0
6-12 IX	0	0,5	0,25	0	0	0	0
TOTAL	8,25	14,75	23,25	29,5	35,25	17,25	10,5

Rezultatele noastre evidențiază faptul că, majoritatea capturilor s-au înregistrat în cursul primei generații, generația a doua este formată din mai puțini indivizi, cel puțin în culturile de porumb unde capcanele feromonale au fost instalate și ea apare la sfârșitul lunii august, începutul lunii septembrie, neavând practic nici o importanță pentru cultura porumbului care este trecut de faza de maturizare (tab. 3).

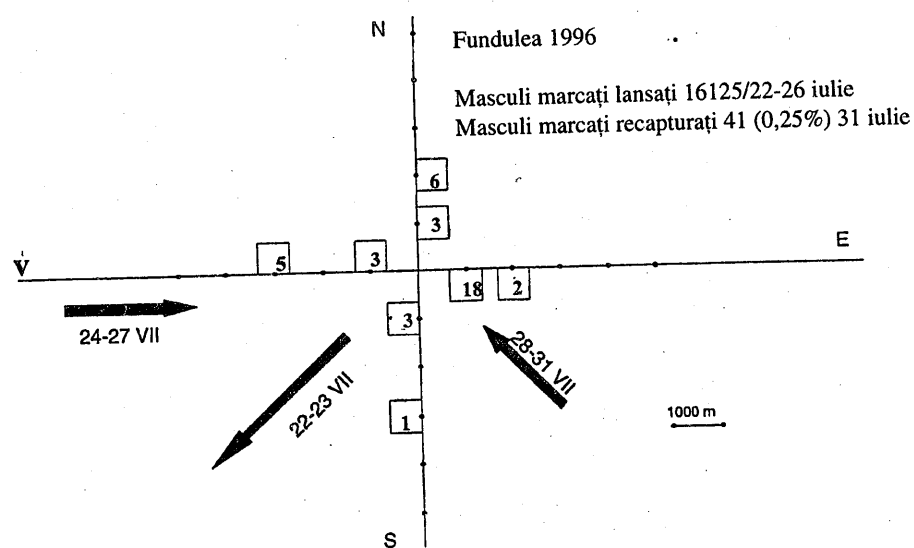
Distanța la care o insectă zboară atunci când se răspândește în natură este deosebit de importantă, iar despre aceasta, în cazul speciei *Ostrinia nubilalis* Hb., părerile sunt diferite. În anul 1969, Jermy și Nagy (3) consideră că în natură adulții pot migra pe distanțe lungi, dar cercetările anterioare întreprinse, pentru prima dată în România, indică faptul că adulții dăunătorului nu sunt zburători de

performanță, dispersia lor se face cu 300 m/zi, depinzând însă puternic de condițiile meteorologice, în special de direcția vântului. Experiențele realizate în cursul anilor 1993–1996, de lansare și recapturare a masculilor marcați, au arătat că în condițiile locale de la Fundulea, procentul de recapturare a fost de 5,9% în 1993, 3,9% în 1994, 0,2% în 1995 și 0,3% în 1996. Testele din 1995 și 1996 au arătat că masculii nu pot zbura mai mult de 3000 m de la punctul de lansare (fig. 1).

Tabelul nr. 3

Numărul de masculi de *Ostrinia nubilalis* Hb., capturați/capcană/an și mărimea celor două generații – FUNDULEA

	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
TOTAL	8,25	14,75	23,25	29,5	35,25	17,25	10,5
Generația I	5,5	10	19,25	21	28	8,75	8,25
Generația a II-a	2,75	4,75	4	8,5	7,25	8,5	2,25

Fig. 1 – Comportarea sfredelitorului (*Ostrinia nubilalis* Hb.)

Ca o concluzie preliminară din examinarea datelor prezentate, se poate afirma că, în condițiile experimentale date, un adult poate zbura cel mult 300 m/zi. În general, zborul adulților marcați a fost puternic influențat de direcția vântului. Astfel, în 1993, fluturii marcați au fost lansați pe 11 iunie în câmp, cu 10 zile înainte de apariția naturală a zborului dăunătorului. În zilele de 12–14 vântul a suflat în direcția sud-est, nord-vest, iar toate capturile au fost în această direcție, față de punctul de lansare. În zilele următoare, direcția vântului s-a schimbat cu

180 de grade, iar adulții marcați au fost purtați de vânt într-o nouă direcție, sud-est. O situație similară se înregistrează și în cursul anilor 1994–1996, modificările direcției vântului determinând o altă caracteristică, variabilă, a dispersiei în natură a masculilor marcați.

Cercetările de câmp efectuate prin folosirea tehnicii de lansare-recapturare a masculilor marcați permit investigarea posibilităților de dispersie pe distanțe lungi, confirmând rezultatele obținute cu o altă specie similară. Astfel, în China cercetările efectuate de Wang și colab. în perioada 1987–1988 și reluate în 1991–1992 (comunicare personală), au demonstrat că *Ostrinia furnacalis* Guenée, dăunătorul similar din China pentru porumb, deși poate zbura până la 45,5 km distanță de locul de lansare, peste 93% din masculii marcați recapturați sunt dispersați în interiorul unei arii de dispersie cu raza de 2 km.

Metoda creșterii și lansării de insecte marcate, în populații naturale și recapturarea atât a insectelor naturale cât și a celor marcate, oferă posibilitatea de a determina mărimea unei populații la un anumit moment, prin aplicarea formulei

lui JENKINS (2): $P_t = \frac{N_m \times N_r}{N_{mr}}$, în care P_t = populația totală, N_m = numărul de

insecte marcate și lansate în natură, N_r = numărul total de insecte capturate și N_{mr} = numărul de insecte marcate și recapturate. Aplicând această formulă, pe baza numărului de masculi de *Ostrinia nubilalis* marcați și lansați, și pe baza numărului de masculi marcați și nemarcați, capturați în capcane feromonale, s-a determinat populația dăunătorului în condiții experimentale date.

Datele obținute sunt prezentate în tabelul 4, unde se remarcă faptul că densitatea estimată a dăunătorului pe suprafețe relativ mari, poate fi apreciată cu ajutorul acestei metode.

Tabelul nr. 4

Estimarea populației de *Ostrinia nubilalis* Hb. prin metoda lansării și recapturării de masculi marcați cu „Calco red dye”

Data lansării	Nr. masculi marcați lansați	Nr. masculi marcați recapturați	Total masculi capturați	Suprafața urmărită (ha)	Densitatea dăunătorului natural (ha)
12 VI–1993	714	42	63	10,5	34
21 VI–1994	876	34	49	9,0	43,8
5 VIII–1995	15132	35	45	225	13,22
21 VII–1996	16125	41	42	2500	1,36

CONCLUZII

În condițiile experimentale date un mascul adult poate zbura cel mult 300 m/zi, până la 3000 m și în general zborul adulților marcați a fost puternic influențat de direcția vântului.

Din numărul total de masculi capturați în capcane feromonale, cei aparținând generației a doua sunt mai puțini.

Utilizarea formulei lui Jenkins, oferă posibilitatea de a determina mărimea populației sfredelitorului porumbului într-o anumită perioadă și pe o anumită suprafață.

BIBLIOGRAFIE

1. BĂRBULESCU AL., ROȘCA I., *Possibilities of using radiation-induced F-1 sterility for control of European corn borer in Romania. The Third FAO/IAEA Proceedings of the final research coordination meeting on "Radiation-Induced F-1 Sterility in Lepidoptera for Area-Wide Control"*, Phoenix, Arizona, September 9-13, 1991, 1993.
2. JENKINS D.W., *Radioisotopes in entomological studies of endemic and tropical diseases*, în: *Radioisotopes in tropical medicine* (Proc. Symp. Bangkok, 1960), IAEA, Vienna, 235-266, 1962.
3. JERMY I., NAGY J., *Sterile-male technique studies in Hungary. Sterile-male technique for eradication or control of harmful insects*, Proceedings of a panel, Vienna, May 27-31, 1968, 91-95, 1969.
4. PAULIAN F. și colab., *O contribuție la cunoașterea biologiei și combaterii sfredelitorului porumbului (Pyrausta nubilalis Hb.)*, An. I.C.C.A., Ser. B, 29: 397-420, 1961.
5. PAULIAN F. și colab., *Evoluția sfredelitorului european al porumbului (Ostrinia nubilalis Hb.) și potențialul de dăunare înregistrat între 1971-1975*, Prob. Prot. Plant., 6(1): 23-48, 1976.
6. ROȘCA I., BĂRBULESCU AL., *Gamma radiation sterilisation of Ostrinia nubilalis Hb., an important pest of maize crops in Romania*, Rev. Roumaine de Biologie, 34(2): 107-111, 1989.
7. ROȘCA I., BĂRBULESCU AL., *Sterility inheritance in the irradiated European corn borer, Ostrinia nubilalis Hb.*, Rev. Roumaine de Biologie, 35(1): 27-30, 1990.
8. ROȘCA I., BĂRBULESCU AL., *Evaluation of the potential control of the European corn borer (Ostrinia nubilalis Hb.) in the field by radiation-induced F-1 sterility*, Proceedings of the International Symposium on Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques, Vienna, October 19-23, 1992, 379-394, 1993.
9. ROȘCA I. et al., *Researches on the behaviour of Ostrinia nubilalis by the use of pheromone traps as related to sterile insect release technique*, Rev. Roumaine de Biologie, 35(2): 105-115, 1990.
10. ROȘCA I., et al., *Achievements and perspectives in the use of sex pheromone in cereal and technical crops in Romania*, Proc. Conf. Insect. Chem. Ecol., Tabor 1990, SPB Acad. Publ., The Hague, 373-388, 1991.
11. ROȘCA I. și colab., *Marcarea și urmărirea dispersiei sfredelitorului european al porumbului (Ostrinia nubilalis Hb.)*. Lucrările celei de a treia Conf. Naț. pentru Prot. Mediului prin Mijloace Biologice și Biotehnice, 177-182, 1996.

Primit în redacție
la 30 mai 1997.

* Universitatea de Științe Agronomice și
Medicină Veterinară,
Facultatea de Agricultură, București.
** Institutul de Cercetări pentru
Cereale și Plante Tehnice - Fundulea.

MATURAREA OVOCITELOR LA TELEOSTEENI

ANDREA CRISTINA STAICU, RADU MEȘTER

Fish postvitellogenetic oocytes are arrested at the first meiosis prophase, exactly at the border G₂/M phases. Pituitary gonadotropin is the signal triggering the meiotic maturation. GnRH released under the environmental pressure checks gonadotropin level. Gonadotropin is recognized by specific membrane receptors from thecal cells and granulosa cells and triggers an intracellular signaling mechanism involving G proteins, adenylyl cyclase and AMPc. The interaction between the two follicular layers causes the synthesis of the maturation inducing hormone (MIH). MIH, opposed to the manner of steroid hormone action, recognizes a surface membrane receptor. MIH effects are mediated in oocyte by a cytoplasmic factor, maturation promoting factor (MPF). MPF is a complex that contains a serin/reoninkinase (cdc2), and a cyclin. It becomes active through the phosphorylation of a cdc 2Thr residue (Thr 161) and a cyclin Ser residue. MPF influences the structural and biochemical events of maturation. The oocyte ends its first meiotic division and begins the second one arresting it at the second metaphase until a spermatozoon meets the oocyte. The second metaphase arrest is determined by CSF, a cytoplasmic factor, codified by a protooncogene, c-mos. CSF is destroyed at the moment of spermatozoon penetration.

Studiul ovogenezei face în continuare obiectul preocupării multor echipe de cercetători. Una dintre etapele care a captat interesul științific al ultimilor ani este maturarea ovocitului, moment decisiv în controlul ciclului celular meiotic, de care depinde succesul fertilizării.

Ovocitele peștilor sunt oprite, în mod fiziologic, la limita G₂/M a primei profaze meiotice. Pentru ca ovocitele să fie fertilizate ele trebuie să finalizeze prima diviziune meiotică, declanșată de o stimulare hormonală adecvată și să înceapă a doua diviziune meiotică.

Meioza va fi din nou oprită în metafaza a doua. Blocajul este înlăturat în momentul fertilizării, după penetrarea spermatozoidului, când are loc formarea celui de-al doilea globul polar.

Intervalul de timp cuprins între momentul reluării meiozei și a doua metafază meiotică se numește maturare meiotică. Este o etapă care se derulează cu mare rapiditate (aproximativ 24 de ore) și este controlată de o serie de reglatori majori, dintre care amintim: gonadotropina, hormonul care induce maturarea și factorul promotor al maturării.

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 49, nr. 2, p. 179-197, București, 1997

STRUCTURA FOLICULILOR OVARIENI LA TELEOSTEENI

Ovocitele vitelogenetice ale teleosteenilor sunt înconjurate, în întregime, de stratul folicular diferențiat în două categorii de celule: celulele tecale și celulele granuloasei.

Învelișul tecal mai conține fibroblaste, capilare, fibre de colagen, celule glandulare mari, denumite și celule tecale speciale. Acestea din urmă posedă mitocondrii cu criste tubulare, reticul endoplasmatic tubular agranular, caractere care le apropie de celulele steroidogenetice (55).

Granuloasa este alcătuită dintr-o populație omogenă de celule care conțin enzimele steroidogenetice. În timpul maturării ovocitului aceste celule suferă alterări citologice din care se pot aminti: proliferarea aparatului Golgi, însoțită de acumulare de material secretor, creșterea numărului cisternelor reticulului endoplasmatic granular, uneori bogat în material amorf intracisternal, care se concentrează în spațiul dintre lamele (79).

GONADOTROPINA: MEDIATORUL PRIMAR AL MATURĂRII OVOCITULUI

HORMONUL DE ELIBERARE AL GONADOTROPINEI

S-a demonstrat că la peștii osoși neuronii implicați în elaborarea hormonului de eliberare al gonadotropinei sunt asociați nervului terminal (54, 64, 15, 30). Neuronii pornesc din afara creierului, trec din cavitatea nazală prin placa cribiformă în creierul anterior. La *Clarias batrachus* anumiți neuroni GnRH rămân în epiteliul olfactiv, la *Carassius auratus*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus masou*, neuronii GnRH sunt identificați la extremitatea anterioară, ca nervi olfactivi (41, 8), dar la multe specii de teleosteeni acești neuroni se găsesc la limita dintre nervul olfactiv și bulb sau la nivelul bulbului olfactiv anterior (84, 70, 2).

La *Xiphophorus maculatus*, *Lepomis macrochirus*, *Dicentrarchus labrax*, *Solea solea*, *Clarias batrachus*, *Poecilia latipinna*, *Poecilia reticulata* apar corpuri celulare în nuleul *olfactoretinalis*, la joncțiunea bulbilor olfactivi cu telencefalul ventral. La teleosteenii neuronii GnRH există aproape întotdeauna în telencefal, pe partea ventrală sau în ariile preoptice, uneori în diencefal, sau în nucleul lateral tuberal. Axonii se întind de la neuronii preoptici sau hipotalamici, în hipofiza anterioară și uneori în neurohipofiză, ventriculul III și zonele creierului din afara hipotalamusului. Majoritatea teleosteenilor, cu excepția unor specii primitive, sunt lipsite de un sistem sanguin portal necesar transportului GnRH.

La salmonide apar două tipuri de GnRH dintre care doar sGnRH reglează sinteza și eliberarea de GTH. La *Oncorhynchus masou* s-a remarcat o creștere a nivelului sGnRH din telencefal în cursul maturării gonadei. Se poate afirma deci că, neuronii din telencefal (aria preoptică și partea ventrală a telencefalului) sunt implicați în maturarea gonadei, având nivele ridicate de ARNm care codifică

sGnRH. Amano, formulează ipoteza că acești neuroni ar putea să inerveze hipofiza și să regleze secreția de GTH. Același autor demonstrează că, expresia genei sGnRH a putut fi reglată prin manipularea fotoperioadei; o scădere a fotoperioadei a accelerat activitatea sintetică a sGnRH, în timp ce o fotoperioadă lungă a inhibat activitatea sa.

Eliberarea GnRH din neuronii hipotalamici este influențată de factori externi și interni, care acționează pe căi nervoase centrale.

Răspunsul biochimic la acțiunea GnRH este un proces complex de semnalizare, care determină o creștere a turn-over-ului fosfoinositolului, o creștere a concentrației Ca^{2+} intracelular, activarea protein-kinazei C, (12, 62, 10), modificarea nivelului AMPc (11).

Există două secvențe de ADN care ar putea media efectul GnRH asupra genei care codifică subunitatea α a hormonului glicoproteic: GCTAATTA; TT(C/T)CT(A/C/T)(C/T).

CARACTERIZAREA GONADOTROPINEI LA PEȘTII OSOȘI

La *Oncorhynchus keta* au fost identificate două gonadotropine distincte din categoria hidraților de carbon: GTH I, GTH II. Acestea sunt diferite una de cealaltă în trăsăturile lor chimice și structurale, dar omoloage hormonului folicular stimulator (FSH) și hormonului luteinizant (LH) al tetrapodelor.

Fiecare gonadotropină constă din subunități α (113 aminoacizi) și β (119 aminoacizi), subunitățile β având o identitate a secvenței de aminoacizi de 31%. Nivelele celor două gonadotropine variază semnificativ în timpul dezvoltării reproductive.

GTH I (α , I β) este gonadotropina predominantă în plasma și hipofiza femelelor vitelogenetice și crește pe parcursul gametogenezei. Ea promovează producția de 17 β -estradiol la femelă și de 11-ketotestosteron, la mascul, precum și încorporarea vitelogeninului în ovocite. Aceste observații sugerează că GTH I reglează gametogeneza.

GTH II (α , II β) înregistrează nivele ridicate în momentul maturării finale a ovocitului, fiind o gonadotropină mai activă decât GTH I în stimularea secreției de 17 α , 20 β , dihidroxi-4-pregnen-3-onă în ovocitele postvitelogenetice și a 17 α -hidroxiprogesteronului în stratul tecal. GTH II stimulează maturarea gameților și este implicată în procesul de ovulație și spermiație.

Ovocitele femelelor pot fi stimulate să se matureze și să ovuleze prin administrarea unei varietăți de preparate gonadotropinice. Ovocitele denudate sunt însă incapabile să răspundă la gonadotropină, ceea ce conduce la ideea că acțiunea gonadotropinei, în inducerea maturării ovocitului, este dependentă de sinteza unui mediator steroid al maturării meiotice (83, 50, 57, 38).

Secreția de gonadotropină este controlată și de anumite substanțe nesteroidale din gonade. Extractele obținute din ovarele și testiculele de caras au avut efecte

stimulatoare asupra eliberării GTH II hipofizare. Acțiunea stimulatorie s-a modificat în funcție de stadiul de dezvoltare al ovarului.

Inhibina și activina, din fluidul folicular porcine, au acțiuni stimulatorie asupra eliberării GTH II de carac (24).

Insulina sporește acțiunile stimulatorie ale gonadotropinei asupra producției de AMPc și testosteron din foliculii prematuraționali, favorizează conversia 25-hidroxicolesterolului în testosteron, acționând prin intermediul AMPc, în mobilizarea colesterolului la nivelul mitocondrii (53, 75).

HORMONUL INDUCTOR AL MATURĂRII: MEDIATORUL SECUNDAR AL MATURĂRII OVOCITULUI

Pentru inducerea maturării în ovocitele teleosteenilor au fost testați mai mulți steroizi C21: progesteron, 17 α -hidroxiprogesteron, 17 α , 20 β -21trihidroxi-4-pregnen-3-onă, cortizol, deoxicorticosteron. Dintre ei, doar doi, 17 α , 20 β -21trihidroxi-4-pregnen-3-onă și 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă acționează în mod natural, ca hormoni inductori ai maturării, iar 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă a fost cel mai eficient. Imediat după formarea sa, acesta este transformat într-un metabolit mai puțin activ din punct de vedere biologic, 17 α , 20 β dihidroxi 5 β pregnan-3-onă.

MODELUL BICELULAR AL SINTEZEI HORMONULUI INDUCTOR AL MATURĂRII

Young și Nagahama propun modelul bicelular al producerii foliculare de MIH, conform căruia situsul primar al producerii de MIH este stratul folicular, care înconjoară ovocitul. Young subliniază faptul că ambele straturi sunt necesare pentru producerea 17 α , 20 β -DP.

Conform acestui model, stratul tecal produce un precursor steroid, 17 α -P care traversează membrana bazală și este transformat în 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă la nivelul granuloasei, unde gonadotropina acționează prin stimularea activității 20 β -hidroxisteroiddehidrogenazei, enzimă care catalizează conversia 17 α -P în 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă (fig. 1).

La *Fundulus heteroclitus* producția de 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă nu cere participarea celor două tipuri celulare.

În cursul vitelogenezei, sub influența gonadotropinei, stratul tecal secretă un hormon androgen, probabil testosteron, care traversează lamina bazală și este convertit în 17 β -estradiol, la nivelul granuloasei unde este exclusiv localizată enzima cheie a conversiei testosteronului în 17 β -estradiol, aromataza (40, 58). Capacitatea stratului tecal de a produce testosteron, ca răspuns la gonadotropină, crește gradat în cursul dezvoltării ovocitului și ajunge la un nivel maxim, în perioada postvitelogenetică. Activitatea aromatazei în stratul celulei granuloase a crescut în

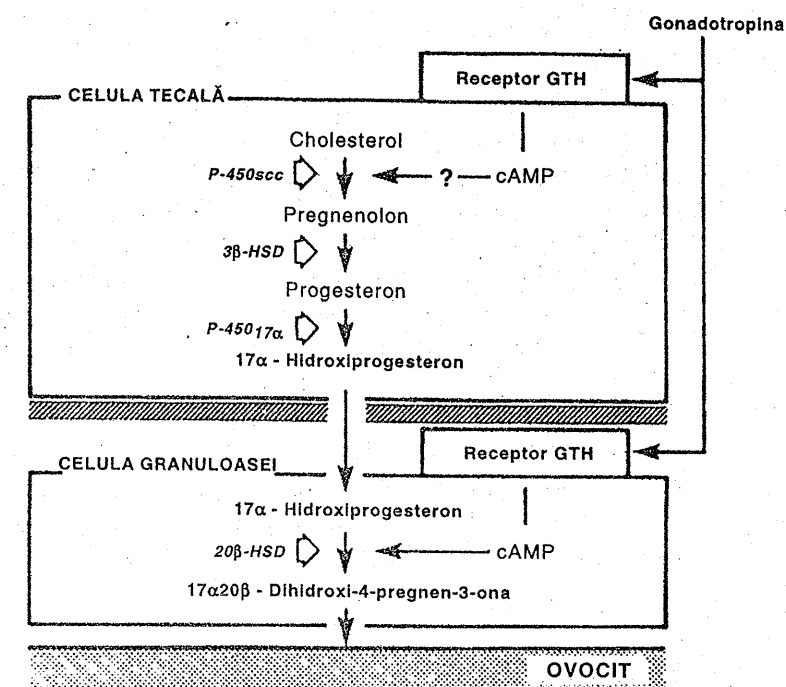


Fig. 1 – Modelul bicelular al producerii 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona în foliculii postvitelogenetici. Nagahama Y., 1994.

timpul vitelogenezei și a scăzut rapid, în asociație cu maturarea ovocitului, ca răspuns la gonadotropină (89, 43). Se pare că scăderea activității 17, 20 liazei și/sau 17 β hidroxisteroiddehidrogenazei din celulele tecale și creșterea activității 20 α hidroxisteroiddehidrogenazei în celulele granuloase par a fi cei doi factori majori responsabili pentru creșterea producției de 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă, realizată de foliculii intacti în timpul maturării ovocitului.

Gonadotropina are cel puțin două situsuri de acțiune: stratul tecal și granuloasa, la nivelul cărora există receptori specifici pentru gonadotropi. Există cel puțin două tipuri de receptori de gonadotropină: receptori tip I, care leagă atât GTH I cât și GTH II, dar cu afinitate mai mare pentru GTH I și receptorul tip II, care leagă GTH II în mod specific și poate avea doar interacțiuni limitată cu GTH I (87). Receptorul tip I există atât în stratul tecal cât și în celulele granuloase, în timp ce receptorul tip II există doar în celulele granuloase. Numărul receptorilor pentru gonadotropină crește în ambele straturi în timpul ovogenezei (43).

În stratul tecal producția de 17 α -P a crescut prin folosirea unor agenți care măresc concentrațiile intracelulare ale AMPc într-o manieră dependentă de doză (forskolin, dibutyryl AMPc) (43). Producția aceluiași hormon, indusă de gonadotropină și AMPc, este abolită de cicloheximidă și puromicină, ceea ce sugerează

că efectul stimulator al gonadotropinei din stratul tecal necesită sinteza unei noi proteine (59).

În membranele celulelor granuloase la *Oncorhynchus rhodurus* există proteine reglatoare care leagă nucleotide guaninice și adenilil ciclaza. Gonadotropina a stimulat activitatea 20 β HSD din celula granuloasă printr-o etapă mediată de receptor dar care antrenează și proteina G, adenilil ciclază, AMPc. Nivelul activității acestei enzime este controlat și de concentrația Ca²⁺, fapt dovedit prin experimentele efectuate în prezența ionoforului de calciu A₂₃₁₈₇, ester forbolului PMA, inhibitorilor calmodulinei, trifluoroperazin, N, N-(6-aminohexil) 1 naftalensulfonamidhidroclorid și N-aminohexil-5-cloro-1-naftalensulfonamid (78). Experimentele prin care s-a încercat inhibarea sintezei de ARN, cu ajutorul actinomicinei D, cordycepinului, α amanitinei, sau s-a încercat blocarea sintezei proteice cu cicloheximidă și puromicină, au condus la diminuarea producției de 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-onă. Concluzia care se desprinde este că, una dintre acțiunile majore prin care gonadotropina activează 20 β -HSD în celulele granuloase este creșterea nivelului ARN și a sintezei proteice (56, 57) (fig. 2).

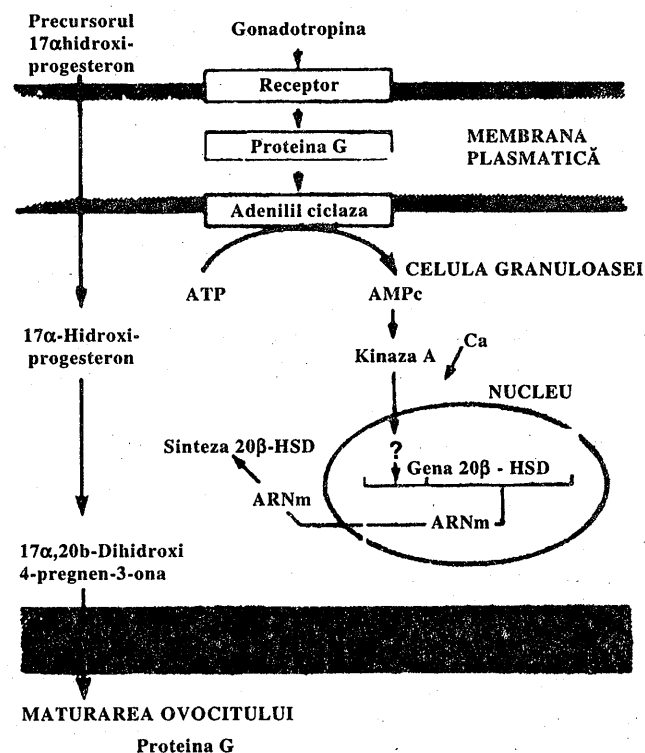


Fig. 2 – Mecanismul activării 20 hidroxisteroiddehidrogenazei în celulele granuloasei.

RECEPTORII HORMONULUI INDUCTOR AL MATURĂRII

Spre deosebire de modul în care acționează majoritatea hormonilor steroizi și anume la nivelul receptorilor nucleari, hormonul inductor al maturării acționează la nivelul unui situs de suprafață, sau aproape de suprafață. Se presupune că modul de acțiune al hormonului inductor al maturării la pești este asemănător cu acela descris la stelele de mare și care implică proteinele G (76, 36).

Traducerea semnalului prin receptorul 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-onă este mediată de proteinele G inhibitorii, hormonul activând proteinele G_i (88).

Hormonul inductor al maturării a inhibat activitatea adenilil-ciclazei în preparatele membranare rezultat semnalat și în anul 1981 (48). Această observație aduce dovada indirectă a faptului că se produce activarea proteinei G_i, ca urmare a stimulării cu 17 α , 20 β , dihidroxi-4-pregnen-3-onă și că are loc scăderea activității adenilil-ciclazei la nivelul membranelor ovocitelor, urmată de scăderea nivelului AMPc din celulă. Probabil că diminuarea concentrației AMPc reprezintă factorul care mediază acțiunea MIH în ovocitele peștilor (37, 19).

FACTORUL DE PROMOVARE AL MATURĂRII, MEDIATORUL TERȚIAR AL MATURĂRII OVOCITULUI

Existența receptorilor pentru hormonul inductor al maturării la suprafața ovocitelor face necesară prezența unui factor citoplasmatic care trebuie să medieze acțiunea MIH și să declanșeze evenimentele morfologice ale maturării.

Acest factor, denumit factor promotor al maturării (MPF) a fost pentru prima oară detectat în ovulele nefertilizate de amfibieni, din care a fost extrasă citoplasma și apoi microinjectată în ovocite blocate în profaza I a meiozei, în care el a stimulat maturarea (50).

S-a presupus că și în ovocitele de pește este produs un factor citoplasmatic similar MPF de la amfibieni, sub influența 17 α , 20 β , dihidroxi-4-pregnen-3-onă.

Activitatea MPF a fost caracterizată în ovocitele de caras, maturate cu gonadotropină corionică umană *in vivo*. Activitatea MPF a oscilat în concordanță cu ciclul celular al ovocitelor. A crescut înainte de distrugerea veziculei germinative, a ajuns la maximum în prima metafază meiotică, apoi a descreșcut temporar când a fost eliminat primul globul polar. A crescut din nou și a rămas la nivel înalt până la fertilizare (84) (fig. 3).

MPF este un factor reglator al ciclului celular, identificat la toate eucariotele, atât în celulele somatice cât și în cele ale liniei germinale, la plante și animale (59, 45, 21, 22, 47).

MPF este alcătuit dintr-o subunitate catalitică, un omolog al serin/treonin kinazei (cdc 2), care folosește histona H₁, ca substrat (6) și o subunitate reglatoare, ciclina (22) (fig. 4).

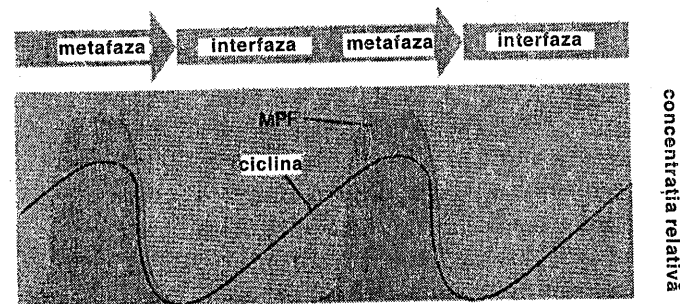


Fig. 3. – Creșterea și scăderea nivelului MPF și ciclului în cursul ciclului celular.

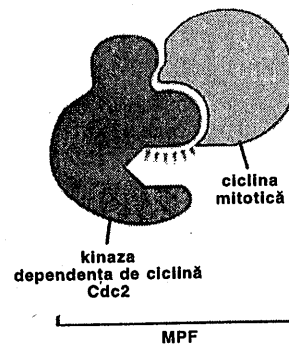


Fig. 4 – Structura factorului promotor al maturării.

Ciclina B nu este detectabilă în ovocitele imature de caras, acestea conțin doar cdc2 de 35kDa (42), fapt care sugerează că cdc2 kinaza se află într-o formă monomerică.

Ciclina B urmează să fie sintetizată *de novo* brusc, chiar înaintea distrugerii veziculei germinative și formează un complex cu cdc 2 de 35 kDa (44).

Activitatea MPF este controlată prin fosforilări și defosforilări ale cdc2 kinazei, care se produc după legarea de ciclina B.

Cdc2 kinaza inactivă (35 kDa), existentă în ovocitele imature de caras, este deja defosforilată la reziduurile Thr 14 și Tyr 15.

Complexul se va activa după fosforilarea reziduurilor de Thr161 al cdc2 (44, 86), în prezența unei treoninkinaze (p40^{MO15}), numită și kinaza activatoare a cdc2 (73). Subunitatea catalitică a acestei enzime este MO15 (18, 65, 74). Activarea MPF coincide cu modificarea greutatea moleculară de la 35 la 34 kDa.

Un alt moment important al activării MPF, dar a cărui importanță este încă discutată, îl constituie fosforilarea unui reziduu de serină al moleculei de ciclina B. Prin înlăturarea situsurilor de fosforilare ale cdc2 (Ser79 și Ser94) a fost blocată fosforilarea serinei din molecula de ciclina B, dar nu a fost afectată activarea cdc2.

Este foarte posibil ca fosforilarea serinei ciclului B să fie catalizată chiar de cdc2, dar să nu fie necesară activării cdc2.

Mecanismul activării MPF este, în linii generale, asemănător în toată lumea vie, are totuși anumite detalii specifice speciei. La *Xenopus laevis*, la diferite specii de stele de mare se cunoaște faptul că ciclina B formează un complex cu cdc2 kinaza (pre-MPF) chiar în stadiul de ovocit imatur. O pondere deosebită în mecanismul activării MPF revine stării de fosforilare a reziduurilor Tyr 15 și Thr 161 de către enzimele *wee 1* respectiv MO15. În cursul activării ovocitului Thy 15 este defosforilată de către cdc25 fosfataza și dobândește activitate kinazică pentru histona H₁ (16, 17, 39, 35). Reziduu de Thr 161 rămâne fosforilat, producând MPF activ după ce a fost fosforilat și reziduu de Ser94 sau Ser96 al ciclului B₁ sau Ser90 al ciclului B₂ de către cdc2 (fig. 5). În cazul maturării ovocitelor de *Xenopus* activarea MPF este dependentă de defosforilarea Thy 15 și de ciclina B.

Deosebirile care au fost sesizate în mecanismele de activare ale MPF la caras și la *Xenopus* nu se datorează doar ciclului B și modalității în care ea evoluează în cursul creșterii și maturării ovocitului, ci și deosebirilor care există între activitatea kinazelor și fosfatazelor care controlează starea cdc2 kinazei. La aceste aspecte se adaugă și faptul că ovocitele imature sunt blocate în momente diferite ale primei profaze meiotice.

La caras ovocitul este blocat într-un stadiu mai timpuriu al primei profaze meiotice, comparativ cu ovocitul de *Xenopus*. Vezicula germinativă a ovocitului de caras este plasată în centrul ovocitului și urmează să migreze spre polul animal în cursul maturării.

În ovocitul de *Xenopus* se observă că vezicula germinativă este plasată excentric, la nivelul polului animal.

EVENIMENTELE DIVIZIUNII CONTROLATE DE MPF

MPF condiționează numeroase modificări în celulă pentru a declanșa faza M: cromozomii condensează, aneloa nucleară trebuie distrusă, iar citoscheletul se reorganizează în vederea formării fusului de diviziune. MPF induce toate aceste evenimente esențiale prin intermediul activității sale proteinkinazice. Alte procese pot fi induse indirect, de exemplu prin fosforilări care activează alte proteinkinaze care acționează în cascadă pentru a altera starea celulei.

Distrugerea nucleului necesită dezasamblarea laminei nucleare, formată din filamente laminale polimerizate. MPF catalizează în mod direct acest proces, forțând moleculele laminale să se dezasambleze prin fosforilarea lor la reziduurile de serină.

Printre moleculele pe care MPF le poate fosforila direct, se numără și histona H₁, care intervine în împachetarea cromatinei. MPF produce modificări la nivelul microtubulilor, fosforilând proteinele asociate acestora. În interfază cen-

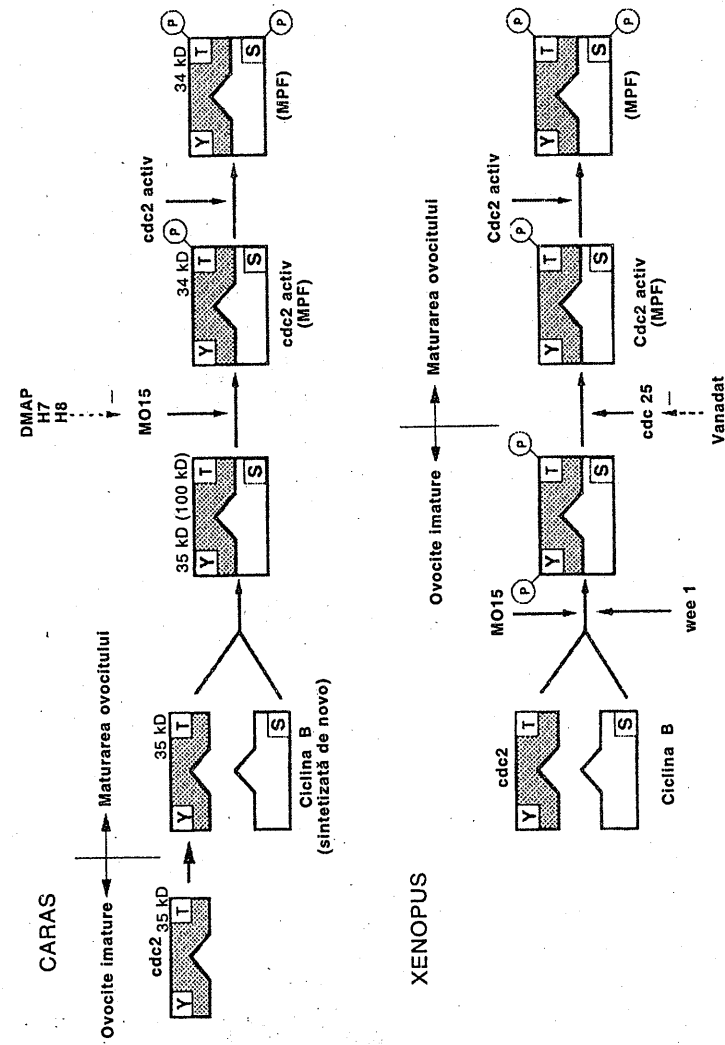


Fig. 5 - Mecanismele moleculare ale formării și activării MPF în cursul maturării ovocitului la Caras și Xenopus. T, Thr161; Y, Txr15. (Yamashita M., 1995).

trozomul concentrează microtubuli lungi care se întind pretutindeni în citoplasmă. Ulterior, acest aranjament dezassemblează și centrozomii concentrează un număr mai mare de microtubuli mai scurți, mai puțin stabili, care interacționează pentru a forma fusul de diviziune. Ambele componente ale MPF, ciclina și cdc2 kinaza sunt legate puternic de centrozomi, în celula vie. Se presupune că ciclina recunoaște componente ale centrozomului și mobilizează kinaza cdc2 la situs. Durata, viteza de sinteză și activarea complexelor cdc2/ciclina joacă un rol major în asamblarea corectă și localizarea fusului metafazei I și în pregătirea tranziției metafaza I/metafaza II. Cu toate că nu se cunosc încă toate detaliile, MPF induce direct, sau indirect fosforilări ale multor proteine.

Ulterior, pentru a ieși din diviziune celulele trebuie să revină la starea normală. Mutații care inactivează proteinfosfataza I, una dintre fosfatazele celulare importante, vor împiedica sau vor întârzia puternic evenimentele ulterioare inactivării MPF, de exemplu reconstrucția anvelopei nucleare.

FACTORUL CITOSTATIC (CSF), ELEMENT DE CONTROL AL CICLULUI CELULAR MEIOTIC

Factorul citostatic realizează o activitate care apare în cursul maturării meiotice, după distrugerea veziculei germinative. El răspunde de menținerea repausului în metafaza II și a fost pentru prima oară descris de Masui-Markert în anul 1971. Toate observațiile experimentale, precum și modelele de reglaj celular au fost realizate până în prezent pe ovocite de *Xenopus*, dar cu siguranță, mecanismele moleculare sunt asemănătoare cu cele de la pești.

CSF are multe trăsături comune cu MPF: sensibilitatea la Ca^{2+} (52), inactivarea în momentul fertilizării, sensibilitatea la fosfataze (72), dar se deosebește de MPF prin faptul că activitatea sa devine aparentă doar după distrugerea veziculei germinative, în timp ce activitatea MPF este înregistrată anterior distrugerii veziculei germinative (49). Momentul apariției CSF sugerează posibilitatea ca el să fie activat de MPF.

Natura CSF a fost lămurită în mod neașteptat prin studiul protooncogenei *c-mos* și este exprimată doar în celulele liniei germinale, neavând nici un rol în mitoză. ARNm al *c-mos* se acumulează în cursul ovogenezei, dar sinteza activă a proteinei *c-mos* se desfășoară doar când ovocitele sunt stimulate cu hormon inductor al maturării. Apoi ea este fosforilată în cursul maturării ovocitului, concentrația sa atingând un nivel maxim în perioada blocajului metafazei a II-a.

Sinteza de *c-mos* favorizează apariția MPF în cursul primei diviziuni meiotice și dispariția spontană a acestuia, stabilizându-l, prin protejarea ciclonei, împotriva degradării (72).

C-mos este o proteină necesară și celei de a doua diviziuni a meiozei, întrucât ovocitele lipsite de acest factor, dar care au suferit deja distrugerea veziculei ger-

minative și au un nivel scăzut de MPF, au fost incapabile să înceapă a doua diviziune meiotică.

Ovocitele injectate cu *c-mos* și tratate cu cicloheximidă, nu ajung niciodată în meioza a doua, ceea ce sugerează că există cel puțin încă o proteină necesară pentru încheierea maturării meiotice. Ea ar trebui să acționeze împreună cu *c-mos* pentru a activa cdc2 kinaza, complexată cu ciclina B și să conducă la a doua ridicare a nivelului MPF.

Factorul citostatic care conține cel puțin o componentă *c-mos*, oprește ovocitele în a doua diviziune meiotică și împiedică distrugerea ciclului, care se desfășoară, în mod obișnuit, ca o consecință a inactivării MPF. CSF este considerat un inhibitor al ciclului celular, care permite ciclului să progreseze până la a II-a metafază meiotică și apoi determină un blocaj stabil până la primirea unui semnal, probabil un val de calciu, care însoțește pătrunderea spermatozoidului.

C-mos are o activitate proteinkinazică prin care controlează starea de fosforilare a ciclului și tubulinei (68), dar și a unei kinaze a MAPK (proteinkinază activată mitogen), (MKK), pe care o fosforilează la reziduurile de serină și treonină (9, 27, 51). MKK activează MAP kinaza (MAPK), enzimă necesară formării fusului de diviziune, care trebuie fosforilată la reziduu de treonină și tirozină din subdomeniul kinazic (7, 66).

Toate cele trei semnale: *mos*, MAPK, MKK induc individual intrarea ovocitelor în meioza I și își atenuază efectul în absența sintezei proteice. Există o buclă feed-back între MAPK și *mos* în cursul maturării meiotice, în care rolul MAPK ar fi acela de a favoriza sinteza și acumularea de *mos*, necesară încheierii meiozei și stabilizării MPF, prin inhibarea unui reglator negativ al MPF (69).

Proteinkinaza A s-a dovedit a fi un antagonist al funcției *mos*, care inhibă translația *mos*, indusă de progesteron.

Activarea cdc2-kinazei, mediată de *mos*, este necesară pentru a împiedica ovocitele, aflate în cursul maturării, să intre în faza S după prima diviziune meiotică (20), în absența acestei proteine ADN se replică chiar după meioza I. Distrugerea proteinei *mos*, în timpul metafazei I, provoacă reintrarea în interfază și face imposibilă trecerea de la metafaza I la metafaza a II-a.

S-a demonstrat că și alte protooncogene *ras*, *tpo*, *met* sintetizează proteine cu efect de inducere a maturării și efect citostatic (5, 14).

ASPECTE MORFOLOGICE ALE MATURĂRII OVOCITULUI LA TELEOSTEENI

În ovocitul de pește, blocat în profaza I a meiozei, există un nucleu mare, sau veziculă germinativă cu cromozomi în „perie de lampă”, implicați în sinteza de ribonucleoproteine. Vezicula germinativă a ovocitelor este acoperită de ooplasmă opacă, plină de vitelus. După tratarea cu anumite lichide fixatoare, transparența vitelusului este crescută și vezicula germinativă poate fi văzută ca o structură brun-aurie, în lumină transmisă (25, 26).

Ovocitele de caras iau o formă ușor aplatizată în timpul ultimului stadiu al vitelogenezei (55). Odată cu maturarea ovocitului, vezicula germinativă își modifică poziția: dacă inițial este plasată ușor excentric, ea urmează să se deplaseze spre polul animal, unde este localizat micropilul. Cu toate acestea durata și gradul în care se realizează trecerea în poziție periferică, variază între specii (26). După migrarea veziculei germinative la periferie, anvelopa nucleară se distruge, conducând la amestecul componentelor nucleare cu ooplasmă înconjurătoare.

Se produc modificări citoplasmice, cum ar fi fuziunea picăturilor lipidice de vitelus și a globulelor proteice de vitelus (79), fuziunea corpurilor vitelini într-o masă centrală de vitelus fluidificat (80), proteoliza parțială a multor peptide vitelice (82, 81, 28, 9), pierderea incluziilor cristaline din corpii vitelini (71), creșterea rapidă a dimensiunii ovocitului cauzată de hidratare (31, 79, 80, 13, 29) și o creștere totală a transparenței (80, 26).

În cursul maturării ovocitelor la *Fundulus heteroclitus* a fost semnalată proteoliza suplimentară a proteinelor vitelice (81, 82). Ulterior, ea a fost descoperită la multe alte specii, în particular la peștii marini, care depun ponta pelagică (28). Procesul constă în clivajul lipovitelinului în peptide mai mici (81, 28), care coincide cu pierderea capacității de fosforilare a fosvitinului (82, 28).

De exemplu, la *Verasper moseri* s-a demonstrat că proteinele vitelice sunt clivate de două ori: prima oară, în cursul înglobării vitelogeninului și a doua oară, în cursul maturării ovocitului. Lipovitelinul dimeric conținut în vitelogenin se transformă în monomeri atunci când se încorporează în ovule. De asemenea, fosvitinul teleosteenilor prezintă variații marcante ale masei moleculare. În cursul vitelogenezei la *Verasper moseri* a fost identificată o proteină suplimentară, în afară de lipovitelin și fosvitin. Vitelogeninul acestei specii, care are o greutate moleculară de 520 kDa este descompus în lipovitelin de 410 kDa, componentul β de 19 kDa și fosvitin de 38 kDa, în cursul primului clivaj proteolitic al ovocitelor vitelogenetice. Modificarea discontinuă a greutății moleculare pare să reflecte schimbarea structurală a lipovitelinului de la forma dimerică, la cea monomerică în cursul maturării (fig. 6).

Modelul electroforetic al lipovitelinului începe să se schimbe în stadiul III și se încheie în stadiul V.

Între proteoliza vitelusului și hidratarea ovocitelor pare să existe o relație strânsă. Aminoacizii liberi, al căror nivel crește în cursul maturării ovocitului datorită proteolizei, sunt probabil efectori osmotici, care determină influxul de apă în ovocite.

Proteoliza vitelusului afectează și fertilitatea și supraviețuirea ovulelor, prin modificarea flotabilității acestora. Nu se cunosc enzimele care controlează cele două clivaje, dar cel de-al doilea clivaj nu implică mai mult de o enzimă și se consideră că este reglat direct sau indirect de steroidul care induce maturarea, pentru că se desfășoară în cursul scurtei perioade a maturării finale a ovocitului.

Modificările ultrastructurale care au loc în citoplasma ovocitului speciilor *Oryzias latipes* și *Misgurnus anguillicaudatus*, includ dispariția lamelilor inelate,

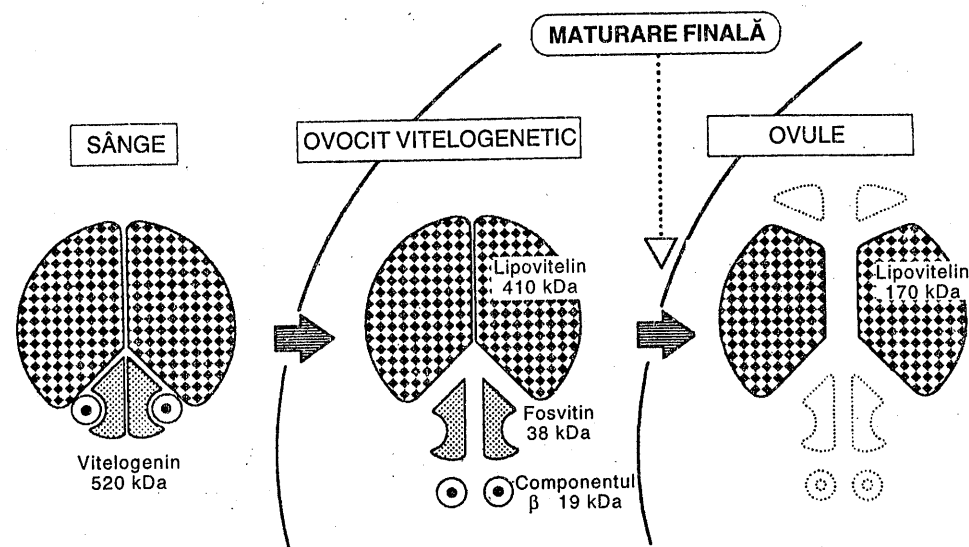


Fig. 6 – Schema modelelor structurale ale vitelogeninului seric și proteinele viteline în ovocitele vitelogenetice și ovulele de *Verasper moseri*.

alterări ale formei mitocondriei, care devine sferică (32, 33). În stadiile târzii ale maturării, ooplasmă prezintă plachete largite de vitelus și reticul endoplasmatic tubular în toată ooplasmă iar alveolele corticale sunt plasate sub *zona pellucida*.

Aceste modificări ale componentelor ooplasmice sugerează faptul că au loc anumite alterări moleculare și biofizice în timpul maturării.

Microvili, care în cursul ovogenezei stabilesc contactul ovocitului cu celulele granuloase, în cursul maturării, se retrag din canalele corionului. În momentul ovulației se observă un strat cu o structură veziculară pe suprafața corionului, deși el nu este recunoscut în momentul ovulației (61).

Celulele granuloase formează în apropierea micropilului câteva straturi suprapuse, în timp ce în alte regiuni, care înconjoară ovocitul, sunt aranjate într-un singur strat. În momentul distrugerii veziculei germinative, celulele granuloase sunt în contact atât cu membrana bazală, cât și cu corionul. Suprafața adiacentă membranei bazale este relativ netedă, în timp ce partea opusă, partea corionică, prezintă mulți microvili. Aceștia invadează canalele porilor din corion și sunt în contact cu cei ai ovocitelor din canale. Nucleul celulei granuloase este localizat în centrul celulei sau spre ovocit. Regiunea dintre nucleu și membrana bazală conține mai ales mitocondrii, care dezvoltă creste (34). Un aspect caracteristic al celulelor granuloase în această perioadă este existența mitocondriilor cu matrix electro-dens și creste bine dezvoltate (34), granule electro-dense sau vezicule vacuolizate (vezicule lizozomale), strâns asociate cu complexe Golgi. La câteva ore după distrugerea veziculei germinative, celula granuloasă își distruge legătura

cu ovocitul, dar nu și cu membrana bazală. Microvili lungi ai celulelor granuloase și ovocitului nu se mai inseră în lumenul canalelor porilor radiali ai corionului. O celulă foliculară se modifică dând naștere micropilului (67, 46, 77). La *Oryzias latipes* celula micropilară este identificată în stadiul V al dezvoltării ovocitului, în contact cu corionul care se formează, celula micropilară, deplin dezvoltată, prezintă în procesele citoplasmice sinuoase, legături mari contorsionate ale microtubulilor, având în centru o legătură de tonofilamente. Corpul celular principal prezintă o mare masă de tonofilamente, mitocondrii, complexe Golgi și reticul endoplasmatic granular (60).

Microtubulii și tonofilamentele funcționează, ca elemente principale ale citoscheletului; în menținerea formei celulare. De aceea, este posibil ca aceste elemente să joace un rol în diferențierea protuziei citoplasmice, structură caracteristică celulei micropilare, care vine în contact cu oolema și conține câteva organele celulare.

Legăturile tonofilamentelor sunt orientate de-a lungul axei lungi a protuziei citoplasmice, care este răsucită în spirală. După distrugerea veziculei germinative, în regiunea distală a protuziei citoplasmice, microtubulii sunt dezorganizați, masa principală a mitocondriilor pare să fie translocată spre regiunea proximală a protuziei. Apoi aceasta începe să se retragă din canalul micropilar, pierzându-și legătura cu oolema. În momentul ovulației se constată o scădere a legăturilor tonofilamentelor în jurul nucleului celulei micropilare, urmată de scurtarea protuziei citoplasmice.

După retragerea completă a protuziei, celula micropilară devine ovală și corpul celular va conține doar cantități mici de tonofilamente.

Celulele micropilare se deosebesc de celulele granuloase, cu care se învecinează, prin modul de distribuție al veziculelor lizozomale și al organelor proeminente (de exemplu reticulul endoplasmatic granular din citoplasmă corticală, care se află în vecinătatea corionului). Elongarea canalului micropilar încetează în momentul finalizării formării stratului intern al corionului.

În momentul distrugerii veziculei germinative celula micropilară, care contactează suprafața ovocitului, prin regiunea apicală a protuziei sale spiralate citoplasmice, este deplin dezvoltată.

La câteva ore după distrugerea veziculei germinative, chiar înainte de ovulație, protuzia citoplasmică se detașează de pe suprafața ovocitului și se retrage din canalul micropilar, prin scurtare. Nu se mai observă nici legături spiralate ale microtubulilor, nici tonofilamente în protuzia citoplasmică, care se scurtează, dar există o cantitate mică de tonofilamente în corpul celular principal.

Din aceste observații se poate conchide că suplimentar pierderii comunicării joncționale dintre protuzie și ovocit, degradarea sau refacerea organelor citoscheletului, cum sunt microtubulii și tonofilamentele, determină contractarea protuziei citoplasmice, urmată de retragerea canalului micropilar în momentul ovulației.

În cursul maturării ovocitului, nucleii celulelor granuloasei se mută de pe partea care se învecinează cu corionul spre partea opusă. În plus granulele dense strâns asociate cu complexe Golgi, dispar. În apropierea momentului ovulației, mulți microvili, atât ai celulelor granuloasei, cât și ai ovocitului, inserați în porii canalelor corionului, se retrag și protruza citoplasmatică a celulei micropilare se detașează de pe suprafața ovocitului. Schimbări degenerative, cum ar fi creșterea numărului corpiilor asemănători lizozomilor sunt sincron detectate în celulele granuloasei în momentul ovulației (61).

La peștii teleosteeni corionul sau *zona radiata*, care protejează vitelusul este foarte gros. Corionul ovulelor de *Oryzias latipes*, de exemplu, constă din două sau trei straturi: un strat exterior subțire, cu structură veziculară și lamele electrono-dense, un strat intern gros (lamele electrono-dense cu interlamele mai puțin electrono-dense).

Corionul ovulelor prezintă, de asemenea modificări progresive, cum ar fi întărirea și reducerea grosimii, scăderea solubilității proteinelor componente și creșterea durtății.

Aceste schimbări corespund ridicării și întăririi membranei viteline a ovulelor ariciului de mare și ale amfibiilor. Modificările corionului depind de exocitoza alveolelor corticale, care traversează toată citoplasma corticală, începând din punctul în care penetrează spermatozoidul. Anumite substanțe din cortexul ovular participă la întărirea corionului, de exemplu ionii de calciu, substanța alveolelor corticale, fosfolipidele, enzime, o proteină corionică, ce conține grupări SH și aldehide.

CONCLUZII

Factorii din mediul înconjurător acționează asupra unor structuri ale sistemului nervos condiționând producția de GnRH.

Gonadotropina este declanșatorul maturării meiotice, care acționează indirect, prin producția foliculară a unui hormon steroid inductor al maturării. Mecanismul molecular care mediază acțiunea gonadotropinei implică proteine reglatoare G, adenilat ciclaza și AMPc.

17a, 20b-DP este cel mai activ hormon inductor al maturării, elaborat prin interacțiunea stratului tecal și granuloasei, care acționează la suprafața ovocitului.

Etapă care succede acțiunii MIH, implică formarea unui factor citoplasmatic, MPF, o serin/treonin kinază care controlează direct sau prin intermediul altor proteinkinaze, modificări importante în plan structural și biochimic.

Blocajul ovocitului în metafaza a II-a este controlat de un factor citoplasmatic constituit din, cel puțin o componentă codificată de o protooncogenă.

BIBLIOGRAFIE

1. AHN N. G., SEGER R., KREBS E., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**: 992-999, 1992.
2. AMANO M., OKA Y., AIDA K., OKUMOTO N., KAWASHIMA S., HASEGAWA Y., *J. Comp. Neurol.*, **314**: 587-597, 1991.
3. AMANO M., HYODO S., KITAMURA S., IKUTA K., SUZUKI Y., URANO A., AIDA K., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **99**: 13-21, 1995.
4. AMANO M., HYODO S., KITAMURA S., IKUTA K., SUZUKI Y., URANO A., AIDA K., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **99**: 22-27, 1995.
5. BIRCHCHMER C., BROEK D., WIGLER M., *Cell*, **43**: 615-621, 1985.
6. BRIZUELA L., DRAETTA G., BEACH D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 4362-4366, 1989.
7. BOULTON T., NYE S., ROBBINS D., IP N., RADZIEJEWSKA E., MORGENBESSER S., De PINHO R., PANAYOTATOS N., COBB M., YANCOPOULOS G., *Cell*, **65**: 663-675, 1991.
8. BRETON B., MOTIN A., BILLARD R., KAH O., GEOFFRE S., PRECIGOUX G., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **61**: 109-119, 1986.
9. CARNEVALI O., MOSCONI G., RONCARATI A., BELVEDERE P., ROMANO M., LIMATOLA E., *Comp. Biochem. Physiol.*, **103A**: 955-962, 1992.
10. CHANG J.P., JOBIN R.M., LEEUW R., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **81**: 447-463, 1991.
11. CHANG J.P., WONG A.O., VAN DER KRAAK G., VAN GOOR F., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86**: 359-377, 1992.
12. CONN P.M., HUCKLE W.R., ANDREWS W.V., McARDLE C.A., *Recent Prog. Horm. Res.*, **43**: 29-68, 1987.
13. CRAIK J.C.A., HARVEY S.M., *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **67**: 169-182, 1987.
14. DAAR I.O., WHITE G.A., SCHUH S.M., FERRIS D.K., *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 5985-5991, 1984.
15. DEMSKI L.S., *Am. Zool.*, **24**: 809-830, 1984.
16. DUNPHY W.G., BRIZUELA L., BEACH D., NEWPORT J., *Cell*, **58**: 181-191, 1989.
17. FERRELL J.E., WU M., GERHART J.C., MARTIN G.S., *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 1965-1971, 1991.
18. FESQUET D., LABBE J.C., DERANCOURT J., CAPONY J.P., GALAS S., GIRARD F., LORCA T., SHUTTLEWORTH J., DOREE M., CAVADORE J.C., *EMBO J.*, **12**: 3111-3121, 1993.
19. FINET B., JALABERT B., GARG S.K., *Gamete Res.*, **19**: 241-252, 1988.
20. FURUNO N., NISHIZAWA M., OKAZAKI K., TANAKA H., IWASHITA J., NAKAJO N., OGAWA Y., SAGATA N., *EMBO J.*, **13**: 2399-2410, 1994.
21. GAUTIER L., NORBURY S., LOHKA M., NURSE P., MALLER J., *Cell*, **54**: 433-439, 1988.
22. GAUTIER L., MINSHULL J., LOHKA M., GLOTZER, HUNT T., MALLER J.L., *Cell*, **60**: 487-494, 1990.
23. GAUTIER J., MALLER J.L., *EMBO J.*, **10**: 177-182, 1991.
24. GE W., CHANG J.P., PETER R.E., VAUGHAN J., VÁLE W., *Endocrinology*, **131**: 1922-1929, 1992.
25. GOETZ F.W., BERGMAN H.L., *Can. J. Zool.*, **56**: 348-350, 1978.
26. GOETZ F.W., *Fish Physiology*, W.S. Hoar, D.J. Randall, E.M. Donaldson, Eds, Academic Press, New York, vol. **IX**, 117-170, 1983.
27. GOMEZ N., COHEN P., *Nature*, **353**: 170-173, 1991.
28. GREELEY M.S., CALDER D.R., TAYLOR M.H., HOLS H., WALLACE R.A., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **62**: 281-286, 1986.
29. GREELEY M.S., HOLS H.Jr., WALLACE R.A., *Comp. Biochem. Physiol.*, **100A**: 639-647, 1991.

30. GROBER M. S., BASS A.H., BURD G., MARCHATERRE M.A., SEGIL N., SCHOLZ K., HODGSON T., *Brain Res.*, **436**: 148-152, 1987.
31. HIROSE K., *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **33**: 989-994, 1976.
32. IWAMATSU T., OHTA T., NAKAYAMA N., SHOJI H., *Annotes Zool. Jap.*, **49**: 28-37, 1976.
33. IWAMATSU T., OHTA T., *Develop. Growth. Differ.*, **19**: 213-226, 1977.
34. IWAMATSU T., OHTA T., *Dev. Growth. Differ.*, **31**: 45-53, 1989.
35. IZUMI T., WALKER D.H., MALLER J.L., *Mol. Biol. Cell*, **3**: 927-939, 1992.
36. JAFFE L.A., GALLO C. J., Lee R.H., HO Y.-K., JONES, T.Z., *J. Cell Biol.*, **121**: 775-783, 1993.
37. JALABERT B., FINET B., *Fish Physiol. Biochem.*, **2**: 65-74, 1986.
38. JALABERT B., FOSTIER A., BRETON B., WEIL C., *Vertebrate endocrinology. Fundamentals and biomedical implications*, (P.K.T. Pang, M.P. Schreiber, Eds), Academic Press, New York, vol. IX, Part A, 23-90, 1991.
39. JESSUS C., RIME H., HACCARD O., VAN LINT J., GORIS J., MERLEVEDE W., OZON R., *Development*, **111**: 813-820, 1991.
40. KAGAWA H., YOUNG G., ADACHI S., NAGAHAMA Y., *Salmonid reproduction* (R.N. Iwamoto, S. Sower, Eds), 20-25, Washington Sea Grant Program, University of Washington, Seattle, 1985.
41. KAH O., BRETON B., DULKA J.G., NUNEZ-RODRIGUEZ J., PETER R.E., CORRIGAN A., RIVIER J.E., VALE W.W., *Cell Tissue Res.*, **244**: 327-337, 1986.
42. KAJIURA H., YAMASHITA M., KATSU Y., NAGAHAMA Y., *Dev. Growth Differ.*, **35**: 647-654, 1993.
43. KANAMORI A., ADACHI S., NAGAHAMA Y., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**: 13-24, 1988.
44. KATSU Y., YAMASHITA M., KAJIURA H., NAGAHAMA Y., *Dev. Biol.*, **160**: 99-107, 1993.
45. KISHIMOTO T., *Dev. Growth Differ.*, **30**: 105-115, 1988.
46. LAALE H.W., *Copeia*, 210-225, 1980.
47. LABBE J.-C., PICARD A., PEAUCELLIER G., CAVADORE J.-C., NURSE P., DOREE M., *Cell*, **57**: 253-263, 1989.
48. MALLER J. L., KOONZ J. W., *Dev. Biol.*, **85**: 309-316, 1981.
49. MASUI Y., MARKERT C.L., *J. Exp. Zool.*, **177**: 129-146, 1971.
50. MASUI Y., CLARKE H.J., *Int. Rev. Cytol.*, **57**: 185-282, 1979.
51. MATSUDA S., GOTOH Y., NISHIDA E., *J. Biol. Chem.*, **268**: 3277-3281, 1993.
52. MEYERHOF P.G., MASUI Y., *Dev. Biol.*, **7**: 182-187, 1979.
53. MILLER K.E., KRIEBEL R.M., *Gen. Comp. Endocrinol.*, **64**: 396-400, 1986.
54. MUNZ H., CLAAS B., STUMPF W.E., JENNES L., *Cell Tissue Res.*, **222**: 313-323, 1982.
55. NAGAHAMA Y., *Fish Physiology* (W.S. Hoar, D.J. Randall, E.M. Donaldson, Eds), vol. IXA, 223-275, Academic Press, New York, 1983.
56. NAGAHAMA Y., ADACHI S., *Dev. Biol.*, **109**: 428-435, 1985.
57. NAGAHAMA Y., *Dev. Growth. Differ.*, **29**: 1-12, 1987.
58. NAGAHAMA Y., *Zool. Sci.*, **4**: 209-222, 1987.
59. NAGAHAMA Y., *Endocrine control of oocyte maturation. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles* (D.O. Norris; R.E. Jones, Eds), 171-202, Plenum Press, New York, 1987.
60. NAKASHIMA S., IWAMATSU T., *J. Morphol.*, **202**: 339-349, 1989.
61. NAKASHIMA S., IWAMATSU T., *J. Exp. Zool.*, **270**: 547-556, 1994.
62. NAOR Z., *Endocr. Rev.*, **11**: 326-353, 1990.
63. NOZAKI M., TSUKAHARA T.M., KOBAYASHI H., *Endocrine correlates of reproduction* (K. Ochiai, Y. Arai, T. Shioda, M. Takahashi, Eds), 3-27, Springer-Verlag, New York, 1984.
64. NOZAKI M., TSUKAHARA T., KOBAYASHI H., *Biomed. Res.*, **4**: 135-145, 1984.

65. POON R.Y., YAMASHITA K., ADAMCZEWSKI J.P., HUNT T., SHUTTLEWORTH, EMBO J., **12**: 3123-3132, 1993.
66. POSADA J., COOPER J.A., *Science*, **255**: 212-215, 1992.
67. RIEHL R., *Zool. Anz., Jena*, **198**: 313-327, 1977.
68. ROY L. M., SINGH B., GAUTIER J., ARLINGHAUS B., NORDEEN S.K., MALLER J.L., *Cell*, **61**: 825-831, 1990.
69. SAGATA N., *Bioessay*, **19**(1): 13-21, 1997.
70. SCHREIBMAN M.P., MARGOLIS-KAZAN H., HALPERN-SEBOLD L., O'NEILL P.A., SILVERMAN R.C., *Brain Res.*, **302**: 180-183, 1984.
71. SELMAN K., WALLACE R.A., SARKA A., QI X., *J. Morphol.*, **218**: 203-224, 1993.
72. SHIBUYA E.K., MASUI Y., *Dev. Biol.*, **129**: 253-264, 1988.
73. SOLOMON M.J., *Mol. Biol. Cell*, **3**: 13-27, 1992.
74. SOLOMON M., *Cell Biol.*, **5**: 180-186, 1993.
75. STRAUSS J.M., MILLER W.L., *Ovarian endocrinology* (S. G. Hiller, Eds), 25-72, Blackwell Scientific, New York, 1991.
76. TADENUMA H., TAKAHASHI K., CHIBA K., HOSHI M., KATADA T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**: 114-121, 1992.
77. TAKANO K., OHTA H., *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **33**: 65-78, 1982.
78. VAN DER KRAAK G.J., JACOBSON P.M., *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish* (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, M.S. Rolfe, Eds), Fish Symp., Sheffield, **91**: 215-217.
79. WALLACE R.A., SELMAN K., *Dev. Biol.*, **62**: 354-369, 1978.
80. WALLACE R.A., SELMAN K., *Am. Zool.*, **21**: 325-343, 1981.
81. WALLACE R.A., SELMAN K., *Dev. Biol.*, **110**: 492-498, 1985.
82. WALLACE R.A., BERGOVAC P.C., *J. Biol. Chem.*, **260**: 11268-11274, 1985.
83. WASSERMAN W.J., SMITH L.D., *The vertebrate ovary*, (R.E. Jones Ed), Plenum Press, New York, 443-468, 1978.
84. YAMASHITA M., FUKADA S., YOHKUNI M., BULET P., HIRAI T., YAMAGUCHI A., LOU Y.-H., ZHAO Z., NAGAHAMA Y., *Dev. Biol.*, **149**: 8-15, 1992.
85. YAMASHITA M., FUKADA S., YOHKUNI M., BULET P., HIRAI T., YAMAGUCHI A., YASUDA H., OHBA Y., NAGAHAMA Y., *Eur. J. Biochem.*, **205**: 537-543, 1992.
86. YAMASHITA M., KAJIURA H., TANAKA T., ONOE S., NAGAHAMA Y., *Dev. Biol.*, **168**: 62-75, 1995.
87. YAN L., SWANSON P., DICKHOFF W.W., *Biol. Reprod.*, **47**: 418-427, 1992.
88. YOHKUNI M., NAGAHAMA Y., *Dev. Biol.*, **166**: 615-622, 1994.
89. YOUNG G., KAGAWA H., NAGAHAMA Y., *Biol. Reprod.*, **29**: 310-315, 1983.
90. YOUNG G., ADACHI S., NAGAHAMA Y., *Dev. Biol.*, **118**: 1-8, 1986.

Primit în redacție
la 22 mai 1997.

Facultatea de Biologie,
Splaiul Independenței, nr. 296,
București.

