

REVUE ROUMAINE DE
BIOLOGIE

— SÉRIE DE ZOOLOGIE —

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef :

EUGEN PORA, membre de l'Académie de la République
Populaire Roumaine.

Rédacteur en chef adjoint :

GRIGORE ELIESCU, membre correspondant de l'Académie
de la République Populaire Roumaine.

Membres :

MIHAI BĂCESCU, R. CODREANU, VASILE GHETIE,
VIRGIL GLIGOR, MIHAI A. IONESCU, OLGA NECRA-
SOV, membres correspondants de l'Académie de la R. P.
Roumaine; MARIA CALOIANU, secrétaire de rédaction.La «Revue roumaine de biologie—série de zoologie» paraît 6 fois
par an.

Le prix d'un abonnement est de 60 lei.

En Roumanie, les demandes d'abonnement peuvent être adres-
sées aux offices postaux, aux agences de poste et aux facteurs.Toute commande de l'étranger (fascicules ou abonnements)
sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134-135, Bucarest,
Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger.Les manuscrits, les livres et les revues
proposés en échange, ainsi que toute
correspondance seront envoyés à la
rédaction : 296, Splaiul Independenței,
Bucarest, Roumanie

TOME 10

1965

N° 1
591 (05)

SOMMAIRE

	Page
MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL et ELENA HIRLEA, Quelques données sur l'efficiance des méthodes de fixation du tissu musculaire strié	3
C. PRUNESCO, Contribution à l'étude anatomique et anatomico-microscopique du système génital femelle de l'ordre <i>Lithobiomorpha</i>	11
MATILDA LĂCĂTUȘU, Nouvelle contribution à l'étude de l'armature génitale des mâles des Braconidés (Hyménoptères)	17
E. A. PORA and I. V. DIACIUC, Influence of <i>in vitro</i> rapic factor modifications on oxygen consumption and acetylation of <i>p</i> -aminobenzoic acid	25
P. JITARIU, N. LAȘCU, N. TOPALĂ and M. LAZĂR, The influence of magnetic fields on the antitoxic-antiteticanic immunity in Guinea pigs	33
V. TOMA, E. A. PORA and I. MADAR, Hormonal influences on the <i>in vitro</i> incorporation of glucose in white rats thymus	39
C. VLĂDESCU, Glycaemia in the <i>Vipera berus</i>	43
A. ABRAHAM, E. A. PORA and V. TOMA, Influence of sexual hormones on the methionine-S ³⁵ incorporation into the thymus proteins	47
V. TOMA, Z. KIS and E. A. PORA, Action of the growth hormone (STH) upon the P ³² uptake in the thymus gland of white rats	53
MARIA GHIRCOIAȘIU, E. A. PORA, ECATERINA ROVENȚA et ILDIKO HINTZ, Influence de la surrénalectomie sur les acides nucléiques, l'activité transaminasique et le glycogène hépatique et tégumentaire	57
C. WITTENBERGER and MARTA GĂBOS, On the adenylnucleotides of the rat muscle in the course of ontogenesis.	63

QUELQUES DONNÉES SUR L'EFFICIENCE DES MÉTHODES DE FIXATION DU TISSU MUSCULAIRE STRIÉ

PAR

MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL et ELENA HÎRLEA

Dans cette étude sont présentées les plus efficaces méthodes pour la fixation du tissu musculaire strié.

Les résultats optima sont dus à l'introduction de la pièce immédiatement après le prélèvement, directement dans le sérum physiologique (30 minutes) ou bien à l'humectation (1 à 3 heures) puis à la fixation jusqu'à une semaine.

Si dans l'étude du tissu musculaire on poursuit aussi son analyse histo-chimique, le fixateur optimum à employer, c'est le formol à 10 % ; la durée de la fixation arrive jusqu'à un mois. L'acide picrique, le sublimé et ses combinaisons, ne sont pas recommandables.

Le tissu musculaire subit, à cause de ses propriétés structurales et fonctionnelles, d'importantes modifications au cours du processus de fixation. Etant donné la nécessité de trouver une méthode optimum pour le traitement et l'obtention des préparations où la structure du tissu musculaire soit conservée intacte, de nombreuses substances, seules ou combinées, ont été proposées comme fixateurs [1] [3] [4] [6], etc. Parmi celles-ci on peut mentionner les hormones, l'acide trichloracétique, le sublimé, l'acide picrique, les mélanges de Meves, Flemming, Shaffer, Sussa, etc. Mais, selon Lison [5], « il est toujours nécessaire de choisir parmi tous les fixateurs possibles, les meilleurs. Cette condition est d'autant plus importante qu'une plus grande finesse s'impose. Pour une simple localisation topographique, un fixateur médiocre peut donner des résultats douteux ; même pour les recherches histo-chimiques une fixation histologique correcte est nécessaire... ».

En nous étayant de ces considérations, nous nous sommes proposé d'établir le fixateur possédant les meilleures qualités et qui, en même temps, n'exige pas une technique compliquée et coûteuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Nos études ont porté sur un tissu musculaire prélevé sur le porc (le muscle psoas, le muscle iléo-spinal) et sur la vache (le muscle iléo-spinal).

On a utilisé comme fixateurs l'acide trichloracétique à 5 %, le sérum et l'acide trichloracétique à 5 %, et le sublimé dans le mélange suivant : sublimé, acide trichloracétique et formol ; le formol à 10 %, le sérum et le formol, le mélange de Bouin.

Au cours de la préparation la plus grande attention a été observée afin de ne pas provoquer la contraction de la partie du muscle prélevé. On a maintenu la position naturelle au moyen de la fixation sur du liège à l'aide de piquants de hérisson.

Lorsqu'on a utilisé l'acide trichloracétique à 5 %, les pièces — immédiatement après le prélèvement — ont été introduites directement dans le fixateur et maintenues pendant 3 jours, après quoi elles ont été passées directement dans quelques bains d'alcool de 96°.

La seconde série de fixations à l'acide trichloracétique a été exécutée selon deux variantes : a) avant la fixation, les parties de muscle prélevées ont été conservées pendant une période de temps variant entre 10' et 60', directement dans du sérum physiologique, puis introduites dans le fixateur fraîchement préparé ; b) une partie de muscle roulée dans une gaze humectée d'une solution physiologique a été tenue dans un vase fermé pendant une heure, après quoi on a exécuté la fixation proprement dite.

Pendant la seconde variante, on a fixé le matériel aussi dans une solution de formol à 10 %. Dans le premier cas, les pièces prélevées ont été introduites dans du formol à 10 %, où elles ont été maintenues pendant 48 heures jusqu'à un mois. Dans le second cas, la partie de muscle a été préalablement tenue dans une solution physiologique ou bien dans une gaze humectée.

Dans le cas du mélange de Bouin ou du sublimé, le traitement s'est déroulé selon les données habituelles. Après la fixation, tout le matériel a été traité de manière identique. Au cours de la déshydratation, on a fait usage de l'alcool amylique, comme substance clarifiante, car il ne durcit pas trop les pièces.

Après l'inclusion à la paraffine des pièces, on a exécuté des coupes de 7 à 8 μ jusqu'à 3—2 μ . Les colorations générales ont été faites à l'hémalum-éosine, au bleu de méthyle, au vert lumière, à l'Azan et à l'hématoxyline ferrique selon la méthode de Heidenhain ; à l'orcéine azotique (méthode de R. Duval).

Au cours du traitement du matériel on a fait des observations sur la qualité et la finesse des sections pendant la coupe au microtome, le mode de coloration des sections longitudinales et transversales, selon les méthodes générales, ainsi que sur la structure du tissu par rapport au fixateur utilisé.

PLANCHE I

Fig. 1. — Muscle psoas fixé dans l'acide trichloracétique à 5 % par traitement préalable au sérum physiologique.

A. Coupe longitudinale ; B. coupe transversale (oc. 10 \times ; ob. 65 \times).

Fig. 2. — Muscle psoas après fixation dans l'acide trichloracétique à 5 %.

A. Coupe longitudinale ; B. coupe transversale (oc. 10 \times ; ob. 65 \times).

Fig. 3. — Aspect du tissu musculaire strié (muscle psoas) après fixation dans du formol à 10 %.

A. Coupe longitudinale ; B. coupe transversale.

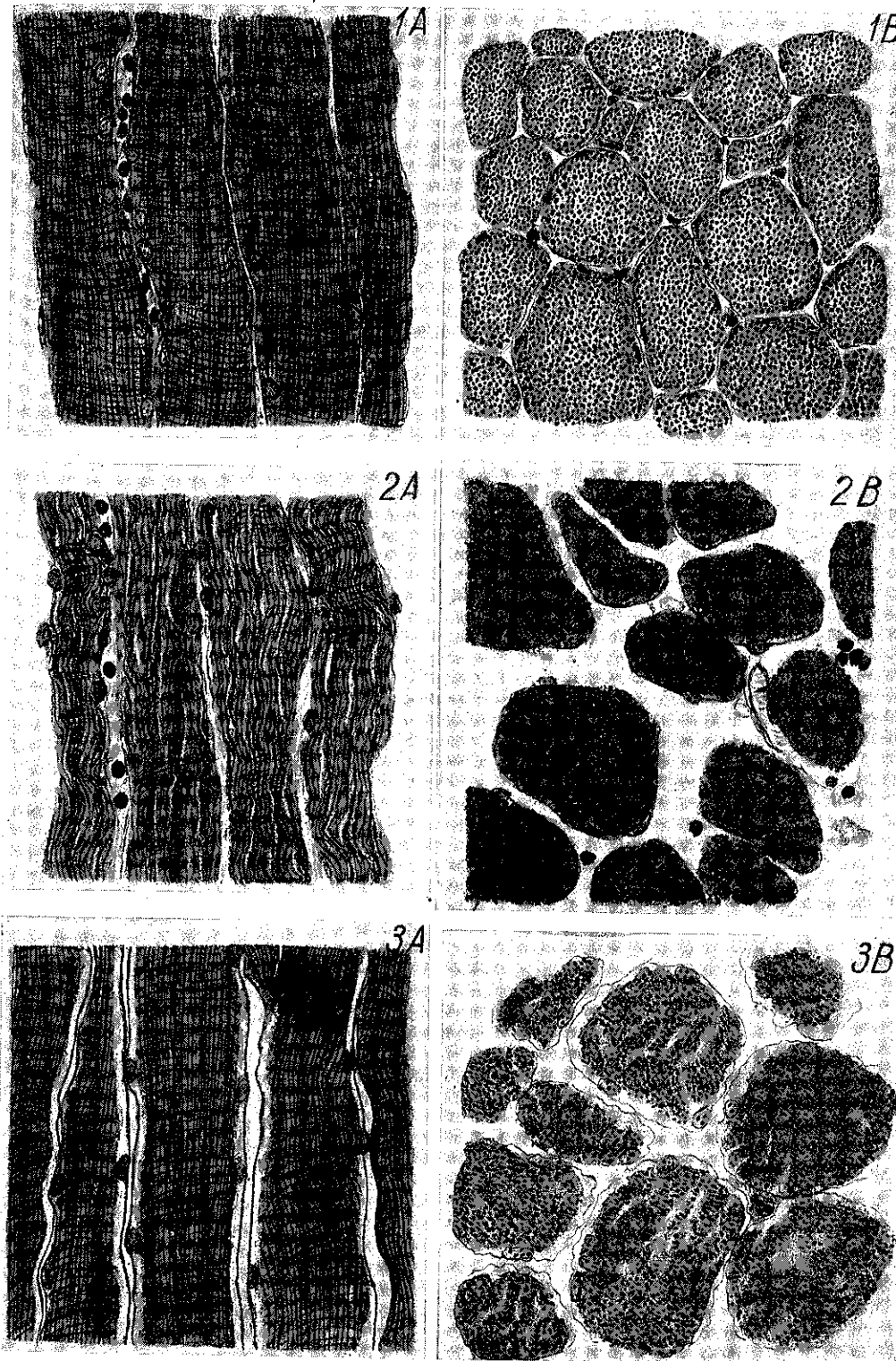


PLANCHE II

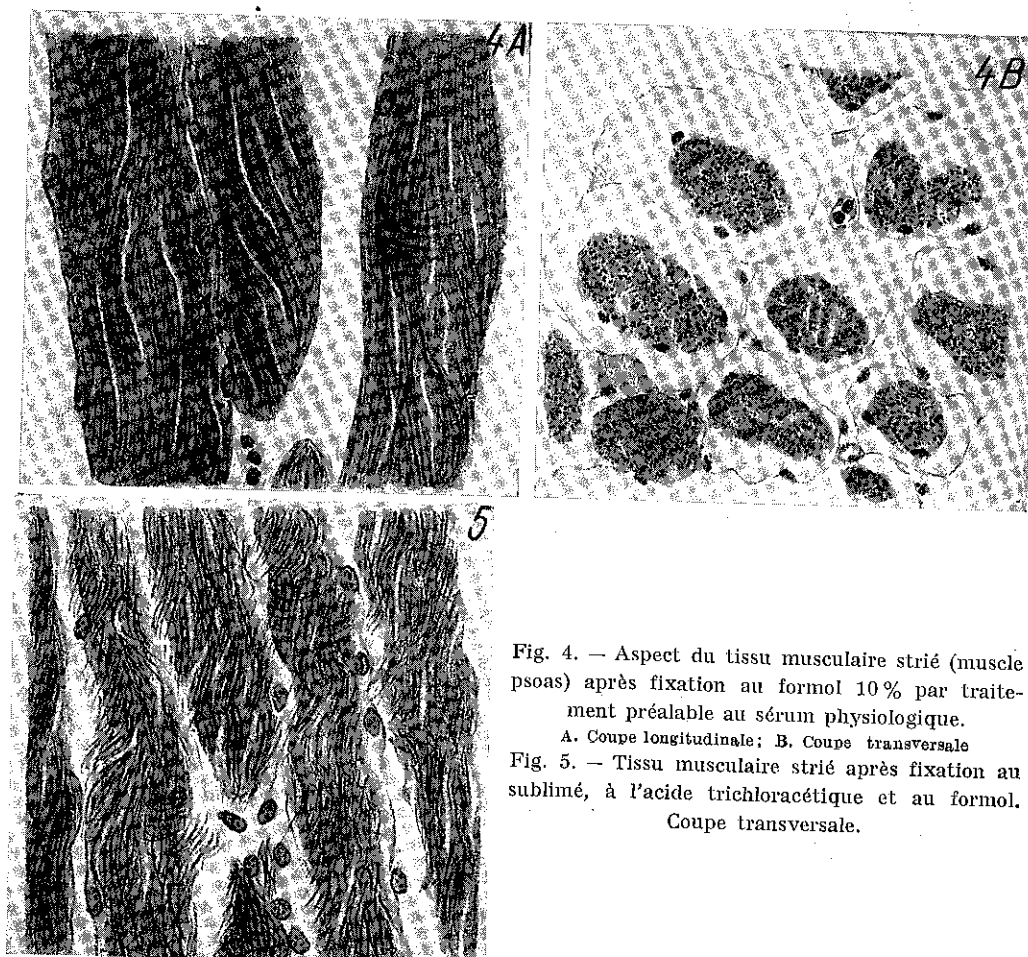


Fig. 4. — Aspect du tissu musculaire strié (muscle psoas) après fixation au formol 10% par traitement préalable au sérum physiologique.

A. Coupe longitudinale; B. Coupe transversale

Fig. 5. — Tissu musculaire strié après fixation au sublimé, à l'acide trichloracétique et au formol. Coupe transversale.

RÉSULTATS

Les coupes de tissu musculaire strié obtenues par l'utilisation de plusieurs fixateurs présentent des aspects variés.

Dans le cas du sérum et de l'acide trichloracétique, on a obtenu des coupes jusqu'à une épaisseur de 2μ . La fibre musculaire sous coupe longitudinale se présente bien contournée, avec une endomixie évidente entre le sarcolemme des fibres musculaires (pl. I, fig. 1 A). Le sarcoplasme, suffisamment transparent, contient le long de la fibre musculaire de nombreux noyaux de forme ovale-ronde, riches en substance chromatique. Les myofibrilles permettent de voir leur structure caractéristique (les disques Q et I, ainsi que la membrane Z et la strie de Hansen). Les myofibrilles, dans le cas du muscle psoas, sont disposées de manière régulière et homogène dans le sarcoplasme, fait mis en évidence par les coupes transversales (pl. I, fig. 1 B). La disposition régulière des fibres, l'intégrité du sarcolemme, de l'endomixie et même la mise en évidence du périnysium interne et des éléments sanguins, mènent à la conclusion que le fixateur n'a produit aucune influence négative sur le tissu.

Il est à souligner que les meilleurs résultats s'obtiennent par la fixation du matériel dans l'acide trichloracétique traité au préalable par une solution physiologique. La structure du tissu musculaire ne subit aucune dénaturation pendant la conservation de la pièce — avant sa fixation — dans une gaze humectée de solution physiologique (dans un vase fermé) pendant 1 à 2 heures. La structure de la fibre musculaire se présente normale même lorsque la pièce est conservée préalablement en contact direct avec la solution physiologique pendant 15' à 30'. Si ce contact dure plus de 60', les fibres ont tendance à s'imbibber de liquide et, par conséquent, il se produit une dénaturation de la structure normale du tissu.

Les coupes obtenues par l'introduction de la pièce directement dans le fixateur présentent d'importantes modifications de la structure des fibres musculaires.

Malgré que la coupe au microtome soit bien faite, les fibres se groupent par 2 à 5, laissant de grands espaces libres. Par la contraction du sarcoplasme il se forme des espaces vides entre les myofibrilles mêmes (pl. I, fig. 2 A), par endroit le sarcolemme se rompt, et les noyaux sont brutalement déplacés en présentant une structure brouillée. Les myofibrilles sont disposées de façon peu régulière et leur structure peut être difficilement mise en évidence et seulement partiellement, étant donné que les stries ne se conservent plus sur toute sa longueur.

Sous coupe transversale les faisceaux des fibres musculaires apparaissent contractés et séparés entre eux par des espaces libres. Les fibres paraissent sillonnées par endroit, et chez la plupart d'entre elles le sarcolemme est rompu. Bien que les noyaux gardent leur emplacement à la périphérie du sarcolemme, ils perdent leur forme ovale-ronde, prenant un aspect irrégulier (pl. I, fig. 2 B).

L'individualisation des fibres, l'apparition de fissures entre elles aussi bien qu'à leur intérieur, la rupture du sarcolemme nous font supposer que le fixateur est dur et qu'il provoque une brusque contraction de tout le tissu. En faveur de cette opinion plaide aussi le fait que les éléments sanguins qui pénètrent au niveau du périmysium interne, font leur apparition à la suite de cette fixation for contractée.

Le tissu musculaire obtenu à l'aide de la fixation au formol présente lui aussi certains traits caractéristiques. Cette fixation permet une bonne coupe au microtome (2 μ), même si la pièce a été maintenue longtemps dans le fixateur. Logitudalement les fibres musculaires se présentent intimement unies et légèrement contractées (pl. I, fig. 3 A), à sarcolemme entier nettement mis en évidence par les colorants généraux utilisés. De même, les stries apparaissent distinctement, à l'exception de la membrane Z et de la strie de Hansen qui par endroits disparaît. Le sarcolemme des fibres musculaires sous coupe transversale se présente légèrement ondulé et les myofibrilles, bien que réparties de manière homogène, ne sont pas aussi régulières (pl. I, fig. 3 B).

En faisant usage du sérum physiologique avant la fixation, dans les deux variantes, le tissu musculaire strié sectionné présente les mêmes traits caractéristiques : les fibrilles gardant autour d'elles le sarcolemme intact, apparaissent très séparées les unes des autres, ayant les stries des myofibrilles irrégulièrement mises en évidence (pl. II, fig. 4 A). Sous coupe transversale on remarque un important déplacement du sarcolemme et l'apparition d'un grand espace entre celui-ci et la masse de myofibrilles groupées irrégulièrement au centre. Les noyaux dont la structure est brouillée sont dispersés (pl. II, fig. 4 B).

La coloration à l'Azan, la méthode trichromique, donnent de bons résultats et de belles coupes. Les seuls inconvénients sont, d'une part l'action puissante du fixateur sur les fibres musculaires (en cas de fixation au formol) et la dénaturation partielle de la structure ; d'autre part, la tendance à l'imbibition si on utilise le sérum physiologique comme médiateur.

Le mélange de Bouin pris comme fixateur, de même que le sublimé, offrent des résultats moins bons (pl. II, fig. 5). La pièce est dure, elle se coupe assez difficilement et sur les préparations colorées, les fibres musculaires, bien que disposées normalement en apparence, présentent un sarcolemme rompu, les noyaux déplacés en dehors de celui-ci et agglomérés en gerbes, soit au-dessus des fibres, soit dans les espaces libres restés entre elles. Les myofibrilles présentent la même dispersion, se détachent de la fibre, en évadant irrégulièrement au dehors.

DISCUSSIONS

On a depuis longtemps essayé de trouver une substance qui réunisse toutes les qualités d'un bon fixateur du tissu musculaire strié. Par exemple, déjà en 1918 Heidenhain [1], en partant de l'idée, fort juste d'ailleurs, que pendant la préparation le muscle doit être exempt de toute

atteinte, propose que l'introduction du muscle dans le fixateur ne soit pas faite immédiatement après le prélèvement, mais qu'il soit roulé dans un morceau de gaze humectée de solution physiologique et laissé quelques heures dans un vase fermé. Ensuite les muscles s'étendent sur le liège dans la position naturelle à l'aide de piquants de hérisson et l'on fixe à l'acide trichloracétique à 5% pendant 24 heures, après quoi les pièces sont directement passées à l'alcool de 96°.

Selon le même auteur, de bons résultats sont obtenus aussi par des mélanges d'acide trichloracétique comme le Sussa, ou bien par la solution aqueuse saturée de sublimé, acide trichloracétique et acide acétique glacial (connue aussi sous la dénomination de subtrue), ainsi que par l'alcool-formol.

Si nous examinons le matériel que nous avons préparé, il semble que les meilleurs résultats soient obtenus par le maintien des pièces dans la gaze humectée tout au plus une heure, ou bien directement dans du sérum physiologique pendant 15 à 30 minutes. Si le temps de conservation du muscle dans le sérum physiologique est dépassé, il se produit un début d'imbibition et de gonflement de la fibre par le liquide. On peut toutefois prolonger ce temps jusqu'à une semaine.

Si on utilise d'autres fixateurs (par exemple le formol), le traitement au sérum physiologique avant la fixation (proposée par le même auteur) ne donne pas les meilleurs résultats.

Au cours de la même année, Romeis [6] fait des essais, dont les résultats lui paraissent très bons, avec le mélange de sublimé, acide trichloracétique et formol. Sur nos coupes la structure du tissu musculaire se présente fortement dénaturée, ce qui prouve que ce mélange n'est pas recommandable.

Selon Krause [3], la meilleure conservation des muscles striés se fait dans du formol à 10% ou dans du chlorure de platine mais à une condition — qui est essentielle : que les sections des muscles soient très petites.

Le formol, en tant que fixateur, ainsi que nous l'avons vu dans l'expérience précédente, ne conduit pas aux meilleurs résultats. Après un court laps de temps de fixation, le tissu apparaît contracté, le sarcolemme légèrement ondulé et les stries estompées. Si la fixation se prolonge, il existe une tendance d'hydratation de la fibre. Malgré tout, le fixateur peut être tenu pour valable en l'utilisant pour les sections d'ensemble et surtout dans les cas où l'on poursuit une étude histochimique du tissu respectif (étant donné la propriété de la formaldéhyde de se combiner avec une série de groupes de substances).

Il n'est pas recommandable d'utiliser le sérum physiologique avant la fixation, car il produit le gonflement de la pièce. La meilleure méthode semble être celle d'une fixation plus prolongée (jusqu'à 1 mois) dans du formol à 10%. A l'encontre de Krause, on a pu obtenir des pièces bien fixées dont les dimensions étaient assez grandes (2 à 3 cm).

L'acide picrique est proposé par Stieve [8] comme un autre bon fixateur des muscles. La formule indiquée par l'auteur est connue sous

la dénomination de « tripiforme » et contient une solution saturée d'acide picrique, d'acide trichloracétique et de formol.

Bien qu'on puisse faire usage du mélange de Bouin à la fixation des muscles, ces résultats ne sont pas particulièrement favorables. Ce mélange a prouvé son efficacité seulement dans la fixation des muscles embryonnaires. (Il est probable que la concentration et la grande puissance de pénétration du fixateur soient diminuées par le tissu embryonnaire qui est plus lâche et contient plus de liquide). S'il est appliqué à un animal âgé, il produit dans le tissu de brusques modifications qui, ensuite, se reflètent dans la structure intime des fibres musculaires striées.

La technique microscopique moderne propose encore d'autres fixateurs. Ainsi Roskin [7] indique comme bons fixateurs des muscles les mélanges de Flemming, de Meves, de Shaffer, de Sussa; Kiszely [4] l'acide trichloracétique et le mélange de Sanomiya.

Nous n'avons pas trouvé absolument nécessaire de recourir, dans nos expériences, à ces mélanges de substance, étant donné que, primo, ils contiennent une partie des substances étudiées (formol, acide trichloracétique, acide picrique, etc.) et, secundo, ils ne correspondent pas à notre but qui est de trouver le plus simple fixateur.

CONCLUSIONS

L'obtention d'une structure complète et d'ensemble du tissu musculaire strié, est conditionnée par une fixation adéquate.

Les résultats optima sont dus à l'introduction de la pièce immédiatement après le prélèvement, directement dans le sérum physiologique (30 minutes) ou bien à l'humectation (1 à 3 heures) puis à la fixation dans l'acide trichloracétique à 5%. Durée de la fixation — jusqu'à une semaine.

Si dans l'étude du tissu musculaire on poursuit aussi son analyse histochimique, le fixateur optimum à employer est le formol à 10%. Durée de la fixation — jusqu'à un mois.

L'acide picrique, le sublimé et ses combinaisons, ayant une puissante action sur le tissu musculaire, provoquent la dénaturation de la structure normale et, par conséquent, ne sont pas recommandables.

BIBLIOGRAPHIE

1. HEIDENHAIN M., *Das Anhauchen des Blokes als Hilfsmittel beim Abziehen der Paraffinschnitte*. Z. wiss. Mikr., 1916, 33, 235.
2. — *Über progressive Veränderungen der Muskulatur bei Myotonia atrophica*. Ziegler's Beiträge, 1918, 64, 198.
3. KRAUSE R., *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik*, 1926—1927 (cit. d'après B. Romeis, 1948).

4. KISZELY GYÖRGY, *Практическая микротехника и гистология*, Akad. Kiadó, Budapest, 1962, p. 129.
5. LISON L., *Cytochimie et histochimie animale*, t. I, Masson, Paris, 1960.
6. РОМЕИС Б., *Микроскопическая техника*, Москва, Изд. Иностран. лит., 1954, 401.
7. РОСКИН Г. И., ЛЕВИНСОН Л. Б., *Микроскопическая техника*. Изд. Советская Наука, Москва, 1957, 352.
8. STIEVE H., *Muskulatur und Bindegewebe in der Wand der menschlichen Gebärmutter ausserhalb und während der Schwangerschaft, während der Geburt und des Wochenbettes*. Z. mikr.-anat. Forsch., 1929, 17, 371.

Reçu le 5 août 1964

Institut de Biologie « Traian Săvulescu »
Laboratoire de morphologie, cytologie et histologie

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANATOMIQUE
ET ANATOMO-MICROSCOPIQUE DU SYSTEME
GÉNITAL FEMELLE DE L'ORDRE *LITHOBIOMORPHA*

PAR

C. PRUNESCO

Les principales contributions de ce travail sont les suivantes :

La description détaillée des rapports des glandes annexes (2 paires), de l'ovaire (impair), de ses deux oviductes bien développés, des réceptacles seminaux (une paire) et de la formation glandulaire péri-atriale, avec l'atrium génital.

La comparaison des systèmes génitaux étudiés ici indique pour la tribu *Lithobiini* un certain degré de primitivité.

Semblable aux *Scutigermorphes* le système génital femelle des *Lithobiomorphes* est tout à fait primitif en comparaison aux Chilopodes épimorphes. Cette primitivité s'exprime par les nombreuses glandes annexes, ainsi que par les oviductes bien développés.

Le système génital femelle a été étudié seulement chez l'espèce *Lithobius forficatus* et seulement par dissection. Nous relevons les études de Fabre [1] et de Schaufler [5] qui ont sommairement décrit ce système. Dans une ample étude sur la morphologie et la systématique des Chilopodes, Fahlander [2] n'a plus repris la recherche du système génital femelle de l'ordre *Lithobiomorpha*, de sorte que nous citons comme plus récentes les recherches ci-dessus.

Notre travail présente la première étude anatomo-microscopique, de même que la première étude comparée du système génital femelle de cet ordre.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Nos études ont porté sur plusieurs individus des espèces suivantes : *Lithobius forficatus*, *L. bulgaricus*, *L. muticus*, *L. (Monotarsobius) burzenlandicus*, *L. (Dacolithobius) domogledicus*, *Harpolithobius banaticus*, *Eupolybothrus transsylvanicus* et *E. leptopus*.

Les individus que nous avons récoltés et déterminés proviennent de Bâile Herculane (région de Banat), des communes de Cernica et de Comana (région de Bucarest) et de la commune de Babadag (région Dobrogea). Ils ont été sacrifiés pendant les mois de mai, septembre et octobre 1963, et au mois d'avril 1964. Une partie en a été étudiée par dissection; une autre a été fixée aux liquides de Duboscq-Brasil et de Bouin puis incluse à la paraffine. Les coupes sériées ont été colorées à l'hémalum-érythrosine et à l'Azan.

ÉNUMÉRATION DES ORGANES DU SYSTÈME GÉNITAL FEMELLE

Un ovaire allongé, une paire d'oviductes, un atrium génital, deux réceptacles séminaux, une paire de glandes dorsales annexes, une paire de glandes ventrales annexes, une masse glandulaire péri-atriale.

DESCRIPTION DE L'ANATOMIE DU SYSTÈME GÉNITAL FEMELLE

Les espèces que nous avons étudiées appartiennent à la famille des *Lithobiidae* et font partie de la tribu des *Lithobiini* et des *Polybothriini*.

Nous décrirons de manière plus détaillée le système génital de la tribu des *Lithobiini*. Quant à la tribu des *Polybothriini*, nous ne nous occuperons que des différences qu'elle présente en comparaison avec la précédente.

1. Tribu des LITHOBINI

L'ovaire long, bien développé, est situé dorsalement par rapport au tube digestif. A l'extrémité caudale, de l'ovaire partent deux oviductes qui se réunissent plus loin en direction caudale, donnant naissance à l'atrium génital femelle. A travers l'anneau formé par les oviductes passe l'intestin postérieur qui aura dorénavant une position dorsale par rapport au système génital.

Les réceptacles séminaux, au nombre de deux, ont une forme cylindrique ou ovoïde. Généralement leur position est à peu près verticale. Ils sont limités par l'espace créé par les deux oviductes. Chaque réceptacle séminal est lié à l'atrium par un canal mince et droit qui, à son extrémité caudale, finit par une spirale de 2 ou 3 tours, puis pénètre dans la zone cranienne de la paroi dorsale de l'atrium génital.

Les glandes dorsales, au nombre de deux, sont bien développées et allongées, ayant la forme de plumes. Elles débouchent chacune dans un diverticule dorsal de l'atrium par un long canal. Le diverticule atrial est fortement aplati en direction dorso-ventrale et reçoit, à ses extrémités latérales, les canaux des glandes dorsales.

Les glandes ventrales, au nombre de deux, sont bien développées et ont le même aspect que les précédentes. Leurs canaux, également longs, débouchent dans les extrémités latéro-ventrales de l'atrium génital.

La masse glandulaire péri-atriale est une formation glandulaire ayant une zone dorsale et l'autre ventrale, qui entourent l'atrium. Jusqu'à présent cette formation n'a pas été décrite, probablement à cause du fait qu'à la dissection on la confond avec les parois de l'atrium. Elle débouche progressivement dans l'atrium en plusieurs canaux qui maintiennent leur paroi extérieure mais en modifiant de la sorte la forme de l'atrium.

L'atrium génital. C'est une formation aplatie en sens dorso-ventral qui prend naissance par la fusion des oviductes. Les extrémités atriales sont arquées vers la partie dorsale. Comme nous l'avons déjà dit, l'atrium est recouvert dans sa partie antérieure par la couche glandulaire péri-atriale. De l'atrium génital, à la partie dorsale et dans la limite du tiers cranien, il se forme un diverticule fortement aplati en sens dorso-ventral dans les extrémités latérales duquel débouchent les canaux glandulaires dorsaux. Les canaux des réceptacles séminaux pénètrent dans la zone comprise entre l'atrium et son diverticule dorsal. Au même endroit où se fait la fusion entre le diverticule et l'atrium ou bien immédiatement après, les canaux débouchent dans l'atrium par un renflement semblable à un entonnoir, dont le but est de capter les spermatozoïdes libérés par le spermatophore. Les canaux glandulaires ventraux s'ouvrent dans l'atrium, plus en arrière, dans la zone des ses extrémités latéro-ventrales. Dans les parties médiane et dorsale nous voyons une formation chitineuse formée par une plaque chitineuse mince qui s'insère à la paroi dorsale de l'atrium et qui se prolonge par une tige dont le bout finit par un renflement lui aussi chitineux. La tige et l'atrium forment un angle d'approximativement 45° qui est parfaitement médian. La tige ainsi que son renflement terminal sont donc dirigés en direction médiane-dorsale vers l'extrémité craniale de l'atrium. Sur le renflement, sur la tige et sur la plaque adhérente se trouvent insérés des faisceaux de muscles striés. Ceci démontre que le rôle de la formation chitineuse est de permettre les mouvements de l'atrium par l'intermédiaire d'un appareil musculaire spécialement créé dans ce but. La zone caudale de l'atrium est munie aussi sur sa partie ventrale d'une couche chitineuse sur laquelle s'insèrent également des

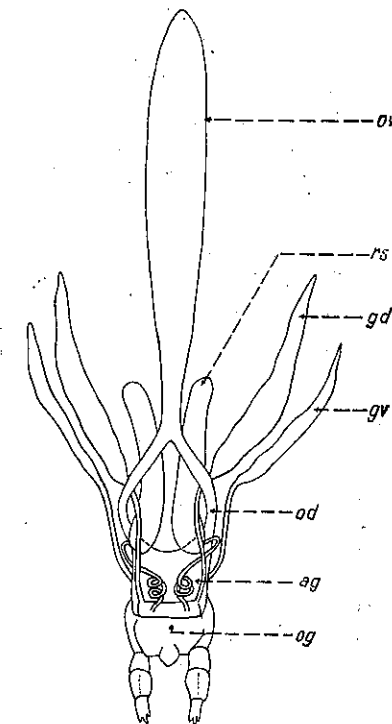


Fig. 1. — *Lithobius muticus*. Système génital femelle, vue dorsale.

ov. Ovaire; ag, atrium génital; rs, réceptacle séminal; gd, glande dorsale annexe; gv, glande ventrale annexe; ga, glande péri-atriale; od, oviducte; dd, diverticule dorsal; cd, canal de la glande dorsale; cv, canal de la glande ventrale; r, rectum; og, orifice génital; fc, formation chitineuse; cs, canal du réceptacle séminal.

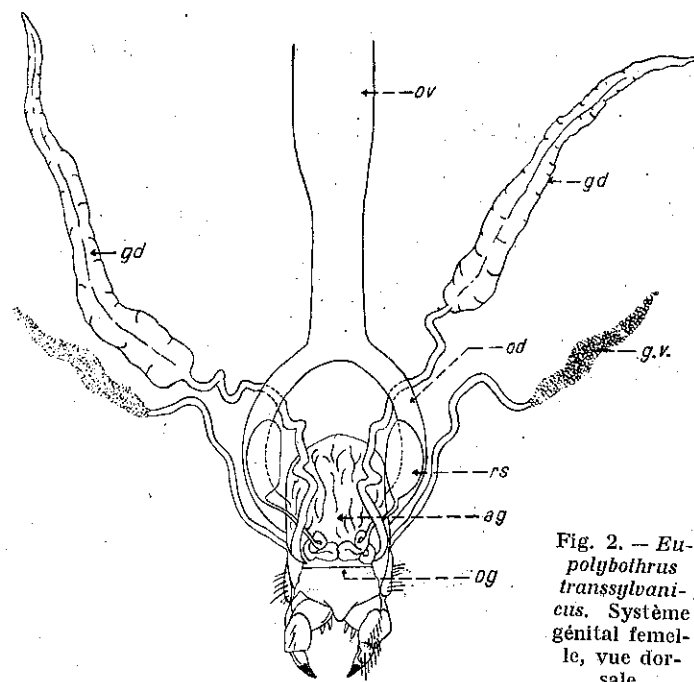


Fig. 2. — *Eupolybothrus transylvanicus*. Système génital femelle, vue dorsale.

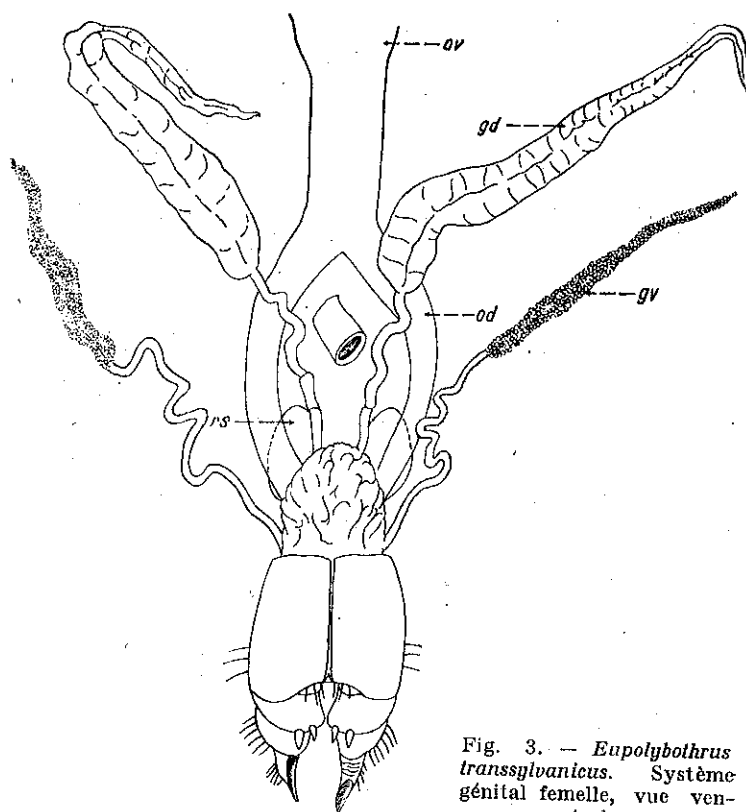


Fig. 3. — *Eupolybothrus transylvanicus*. Système génital femelle, vue ventrale.

muscles striés. D'ailleurs, dans les parois de l'atrium il n'existe aucune sorte de musculature ; aussi les mouvements et les modifications de volume de cet organe sont-elles assurés par une musculature externe. L'atrium communique avec l'extérieur par une ouverture égale à ses diamètres, ce qui permet l'entrée du spermatophore et l'expulsion des œufs.

2. Tribu des POLYBOTHRIINI

Son système génital femelle ressemble à celui de la tribu des *Lithobiini*. L'atrium génital est plus particulier. Il est formé par une cavité à parois minces entourées par la masse glandulaire péri-atriale. Dû à cette cause, l'atrium, au moins dans sa partie craniale, apparaît comme un canal très volumineux aplati en sens dorso-ventral de cette formation glandulaire. Les deux oviductes débouchent à la limite du tiers cranial, dans les extrémités latérales de l'atrium. Une autre différence par rapport à la tribu des *Lithobiini* est celle de ses canaux par lesquels la masse glandulaire péri-atriale élimine sa sécrétion dans l'atrium. Ces canaux, fortement aplatis en sens dorso-ventral se forment autant dans la partie dorsale que dans celle ventrale de l'atrium. Ils sont superposés et placés toujours en direction médiane. Plusieurs canaux (3 à 4) superposés perdent leurs parois de la zone médiane en maintenant la structure de celles des extrémités latérales. Ce phénomène est plus évident dans la zone ventrale de l'atrium à cause du plus grand développement de la masse glandulaire ventrale et implicitement du nombre accru des canaux. Ce fait conduit à la modification considérable de l'atrium qui présente un agrandissement du diamètre dorso-ventral et un plancher à degrés qui descend symétriquement vers la ligne médiane. Une autre particularité qui distingue cette tribu de celle des *Lithobiini* c'est la formation d'une communication sur la ligne médiane entre le diverticule dorsal et l'atrium, en avant du point où s'effectue la fusion totale entre le diverticule et l'atrium.

CONCLUSIONS

Ce travail étant la première recherche d'étude comparative et anatomo-microscopique du système génital femelle de l'ordre des *Lithobiomorpha*, il apporte quelques contributions dans ce domaine qui peuvent être résumées comme suit :

1. Description d'une formation glandulaire péri-atriale, commune aux deux tribus, mais qui est plus développée chez la tribu des *Polybothriini*.

2. Description de deux variantes concernant les rapports oviductes-atrium génital, chez les deux tribus étudiées :

— chez la tribu des *Lithobiini* l'atrium prend naissance par la fusion des oviductes ;

— chez la tribu des *Polybothriini* les oviductes débouchent dans un atrium qui, se trouvant placé avant la zone d'ouverture des oviductes,

se présente dans sa partie craniale comme un canal renflé de la masse glandulaire péri-atriale.

3. Description de l'appareil musculaire extra-atrial et des formations chitineuses par lesquelles cet appareil s'insère aux parois de l'atrium.

4. Description détaillée des rapports des glandes annexes, de l'ovaire et des réceptacles séminaux avec l'atrium génital.

5. En rapportant ces résultats à ceux du système génital mâle des *Lithobiidae* [3] [4], nous inclinons toujours à attribuer à la tribu des *Lithobiini* un certain degré de primitivité. Nous devons remarquer le fait que, par comparaison au système génital mâle, celui femelle a un caractère plus constant chez les types étudiés, mais ceci, par revanche, nous fournit moins de données concernant les lignes évolutives des *Lithobiidés*.

6. Semblable à l'ordre *Scutigermorpha* et opposé aux ordres épimorphes (*Scolopendromorpha*, *Geophilomorpha*), le système génital femelle de *Lithobiomorpha* est nettement primitif. Sa primitivité se traduit par :

a) la présence de deux paires de glandes annexes par rapport à une seule paire chez les ordres épimorphes sus-cités ;

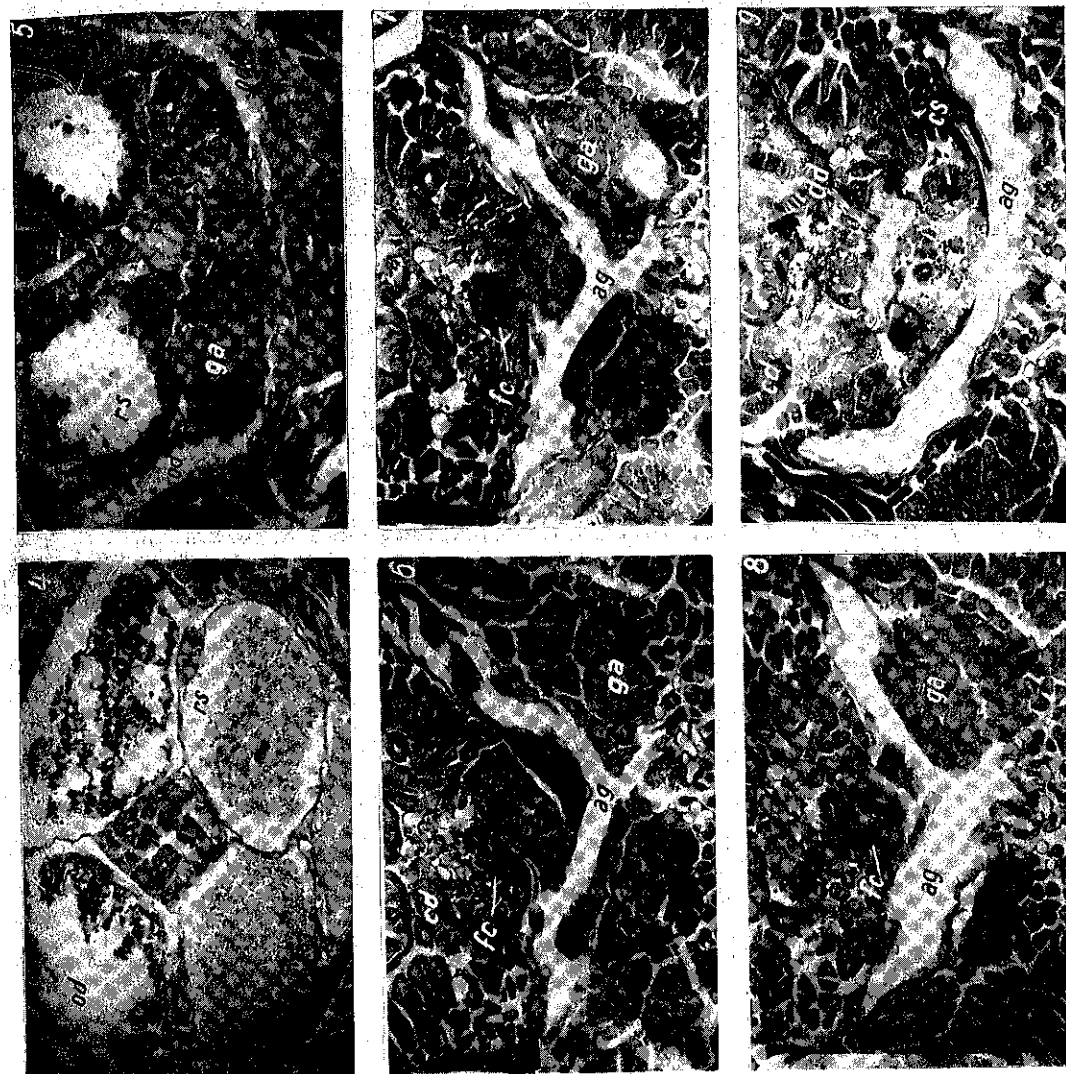
b) la présence de deux longs oviductes bien développés par rapport aux oviductes courts et minces de *Geophilomorpha*, à celui impair, le second étant rudimentaire (*areus genitalis*) de *Scolopendra*, ainsi qu'à la disparition totale d'un oviducte chez *Cryptops*, qui n'en conserve qu'un seul.

BIBLIOGRAPHIE

1. FABRE J. H., Ann. Sci. Nat., Paris, 4^e série, 1885, 3, 257.
2. FAHLANDER K., Zool. Bidr. Fr., Uppsala, 1938, 17, 81.
3. PRUNESCO C., Rev. Biol., 1963, 8, 3, 357.
4. — Rev. Roum. Biol., 1964, 9, 2.
5. SCHAUFLEER B., Verh. Zool. Bot. Ges., Wien, 1889, 39, 465.

Reçu le 5 août 1964

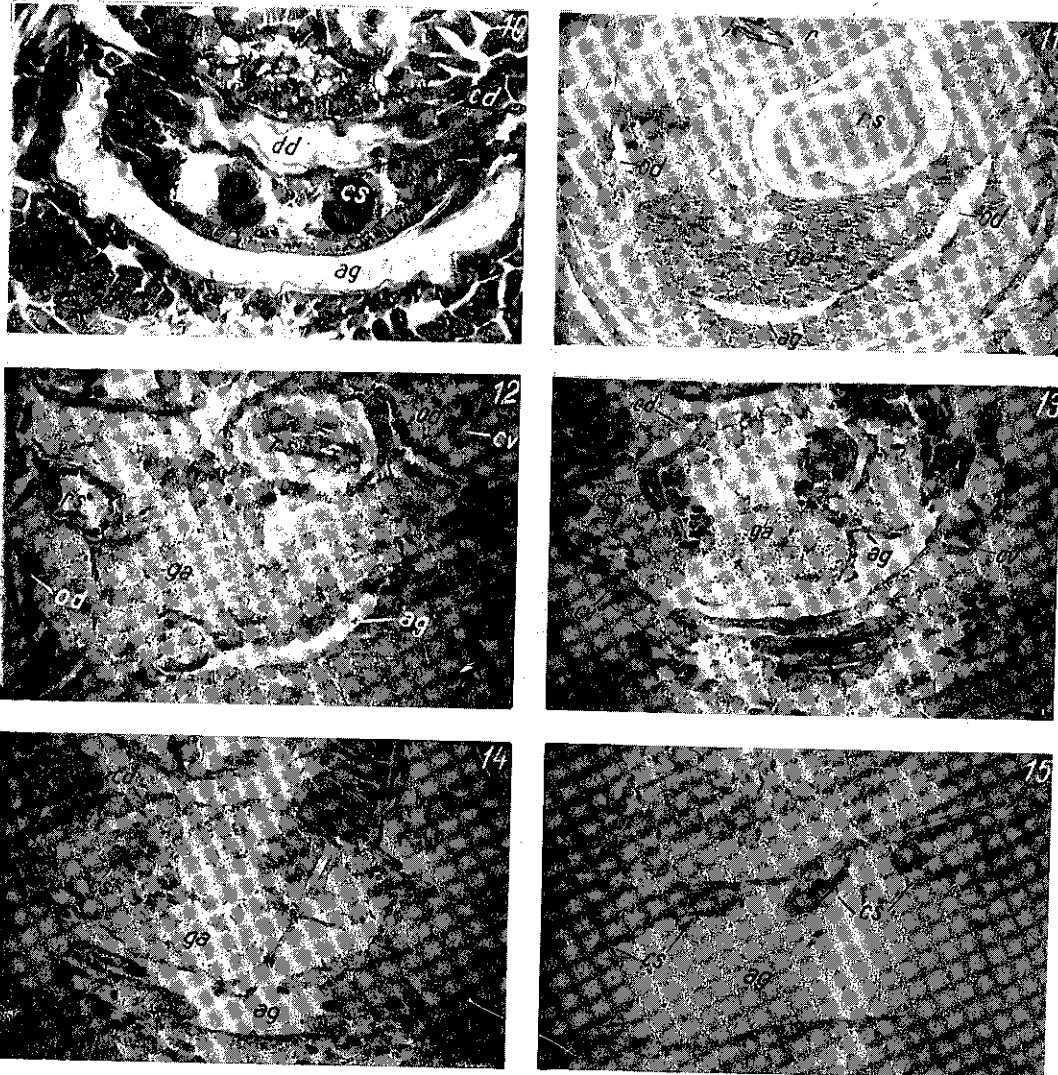
Institut de Biologie « Traian Săvulescu »
Laboratoire de Morphologie animale



Lithobius forficatus

4, Aspect général : section à travers les oviductes, les réceptacles séminaux, les canaux des glandes annexes ; 5, genèse de l'atrium génital : les oviductes s'unissent en traversant la masse glandulaire péri-atriale ; 6, 7, 8, l'atrium génital et la formation chitineuse par laquelle l'appareil musculaire extra-atrial dorsal s'insère à l'atrium ; 9, le diverticule dorsal de l'atrium.





Lithobius forficatus

10, Les canaux des glandes dorsales débouchant dans le diverticule dorsal de l'atrium.

Eupolybohrus leptopus

11, Les oviductes débouchant dans le canal central de la glande péri-atriale.

Eupolybohrus transsylvanicus

12, Section à travers les oviductes, les réceptacles séminaux et le canal central de la glande péri-atriale.

13, 14, Les canaux ventraux, étagés, de la glande péri-atriale, avant et après leur débouchement dans l'atrium.

15, Atrium, section caudale : les canaux des réceptacles séminaux avec leurs extrémités atriales fortement dilatées.

NOUVELLE CONTRIBUTION À L'ÉTUDE
DE L'ARMATURE GÉNITALE DES MÂLES
DE BRACONIDÉS (HYMÉNOPTÈRES)

PAR

MATILDA LĂCĂTUȘU

L'auteur présente les résultats des recherches de l'armature génitale chez les mâles des Braconidés suivants : *Coeloides scolyticida* Wesm. ; *Chelonella microphtalma* (Wesm.) ; *Cremnops deserti* (L.) ; *Macrocentrus collaris* Spin. ; *Meteorus rubripes* Nees ; *Perilitus cerealis* Haliday ; *Euphorus pallidipes* Curtis ; *Diospilus oleraceus* Haliday ; *Opius irregularis* Wesm. ; *Alysia manducator* Panzer ; *Aphaereta cephalotes* Haliday ; *Phenocarpa ruficeps* Nees ; *Aspilota fuscicornis* Haliday ; *Dacnusa egregia* Marshall ; *Chenon anceps* Curtis ; *Polemon liparæ* Giraud.

La conformation des sclérites qui composent l'armature génitale chez les mâles des Braconidés peut servir de critérium principal dans l'établissement des relations phylogénétiques entre les différents genres de cette famille ; mais il doit être envisagé dans l'ensemble des autres caractères taxonomiques. Hormis la forme des sclérites, il faut accorder ensuite une importance tout à fait particulière aux caractères suivants : les rapports dimensionnels entre les sclérites ; la chétotaxie de tous les sclérites ; l'ornementation de la partie apicale du forceps interne ; la présence et la distribution des papilles sur les sclérites et la présence de la volselle.

L'étude de l'armature génitale offre un critérium certain, de nature à faire comprendre la place que doivent occuper les Braconidés parmi les autres familles d'Hyménoptères et des relations phylogénétiques qui existent entre les différents genres et espèces de cette famille.

Le chercheur soviétique N. A. Telenga (1952) présente une esquisse phylogénétique des genres et des espèces, basée sur les caractères de la nervation des ailes et sur la conformation des sclérites génitaux, en tenant en même temps compte de la dépendance des Braconidés, en tant que parasites de leurs hôtes.

Cet auteur met surtout l'accent sur la forme des sclérites génitaux, sur l'absence ou la présence de la volselle, en montrant que les autres particularités n'ont pas été prises en considération, bien qu'elles démontrent d'une façon très complète l'évolution de la famille. Il montre ensuite que

les organes génitaux caractérisent bien les sous-divisions taxonomiques supérieures : tribus, supertribus. Les données de Telenga sont très importantes et bien que nous les ayons connues assez tard, après avoir pris en considération le critérium de l'armature génitale, elles se sont montrées utiles à nos recherches.

Nous avons, par opposition à Telenga, mis l'accent sur les différences constatées entre les genres et même entre les espèces. Dans ce but nous avons étudié l'armature génitale chez les genres suivants : *Vipio*, *Glyptomorpha*, *Atanycolus*, *Habrobracon*, *Bracon*, *Heterospilus*, *Eophylus*, *Hecabolus*, *Dendrosoter*, *Doryctes*, *Rhogas*, *Phanerotoma*, *Phanerotomella*, *Chelonus*, *Triaspis*, *Apanteles*, *Microplitis*, *Microgaster*, *Cardiophiles*, *Disophrys*, *Agathis*, *Microdus*, *Caenocoelius*, *Calyptus*, observations exposées dans les travaux antérieurs [2], [3].

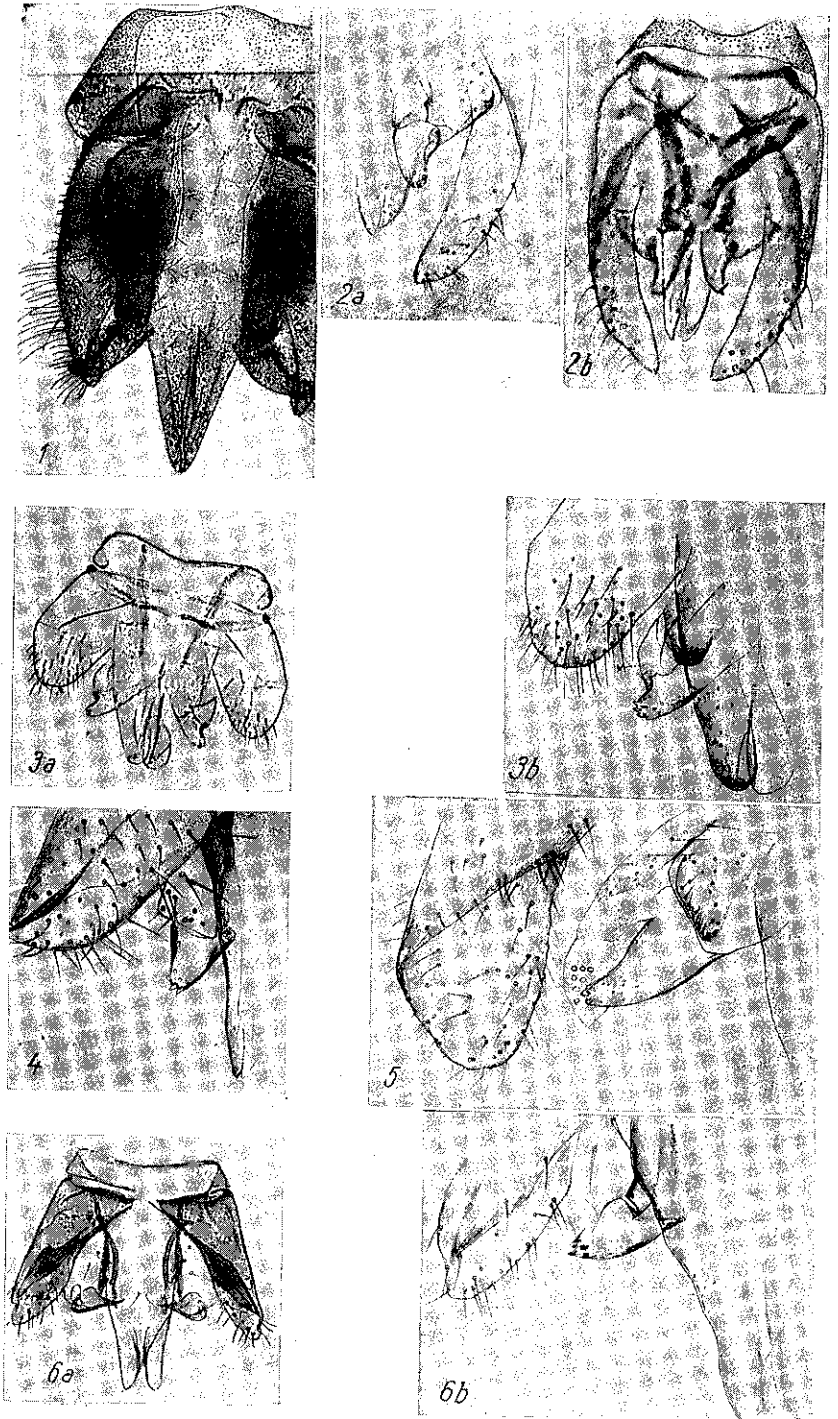
En ce qui concerne la forme des pièces composantes, nos données concordent avec celles de Telenga.

Comme nous l'avons montré dans nos travaux antérieurs, on constate que les sclérites génitaux caractérisent très bien les genres de Braconidés ; quant à la volselle, sa présence ou son absence est d'une grande importance phylogénétique. Chez les différentes espèces du même genre, les différences dans la structure des sclérites génitaux sont plus subtiles, plus difficiles à saisir.

Dans ce travail nous présentons les résultats de nos recherches effectuées chez 16 autres genres de Braconidés, c'est-à-dire : *Coeloides scolyticida* Wesm. (sous-famille des *Braconinae*) ; *Chelonella microphtalma* (Wesm.) (sous-famille des *Sigalphinae*) ; *Cremnops desertor* (L.) (sous-famille des *Agathinae*) ; *Macrocentrus collaris* Spin. ; *Meteorus rubens* Nees ; *Perilitus cerealium* Haliday ; *Euphorus pallidipes* Curtis ; *Diospilus oleraceus* Haliday ; *Opius irregularis* Wesm. (sous-famille des *Helconinae*) ; *Alysia fuscipennis* Haliday ; *Aphaereta cephalotes* Haliday ; *Phaenocarpa ruficeps* Nees ; *Aspilota fuscicornis* Haliday (sous-famille des *Alysiinae*) ; *Dacnusa egregia* Marshall ; *Chaenon anceps* Curtis ; *Polemon liparæ* Giraud (sous-famille des *Dacnusinginae*).

PLANCHE I

- Fig. 1. — Armature génitale chez *Coeloides scolyticida* Wesm. Aspect général.
 Fig. 2. — Armature génitale chez *Chelonella microphtalma* (Wesm.).
 a, Détails des sclérites génitaux ; b, aspect général.
 Fig. 3. — Armature génitale chez *Cremnops desertor* (L.). a, Aspect général ; b, détails des sclérites génitaux.
 Fig. 4. — Armature génitale chez *Macrocentrus collaris* Spin. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 5. — Armature génitale chez *Meteorus rubens* Nees. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 6. — Armature génitale chez le *Perilitus cerealium* Haliday.
 a, Aspect général ; b, détails des sclérites génitaux.



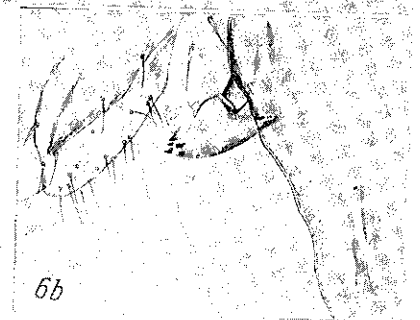
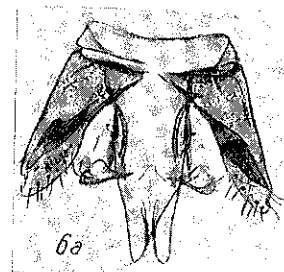
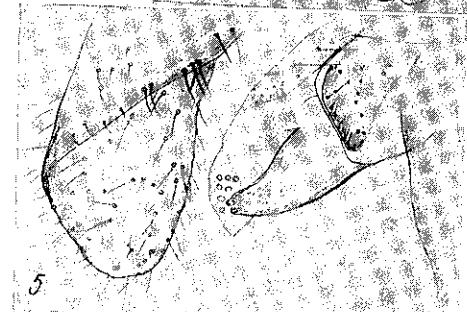
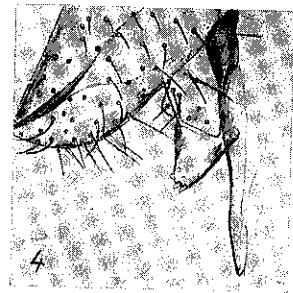
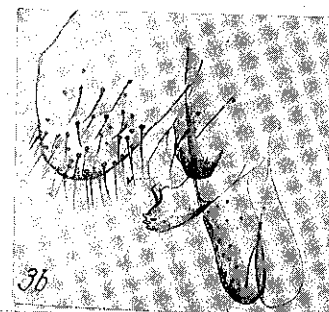
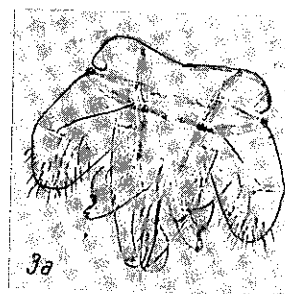
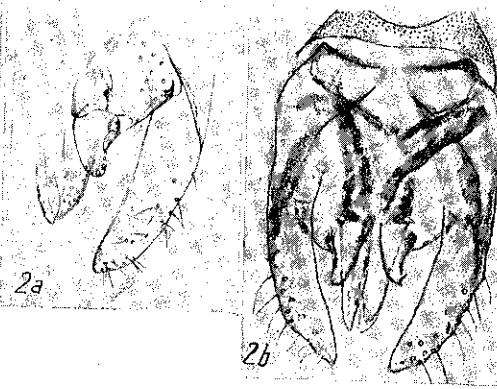
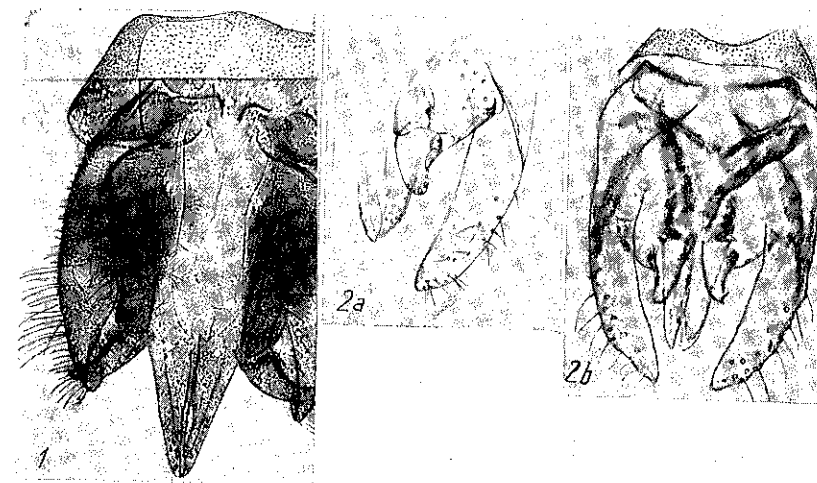


PLANCHE II

- Fig. 7. — Armature génitale chez *Euphorus pallidipes* Curtis. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 8. — Armature génitale chez *Diospilus oleraceus* Haliday. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 9. — Armature génitale chez *Opius irregularis* Wesmael. a, Aspect général; b, détails des sclérites génitaux.
 Fig. 10. — Armature génitale chez *Alysia fuscipennis* Haliday. a, Aspect général; b, détails des sclérites génitaux.
 Fig. 11. — Armature génitale chez *Aphaereta cephalotes* Haliday. a, Aspect général; b, détails des sclérites génitaux.

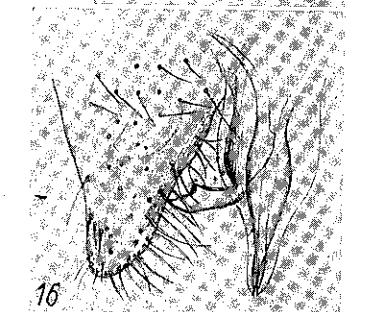
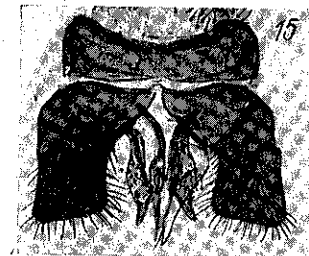
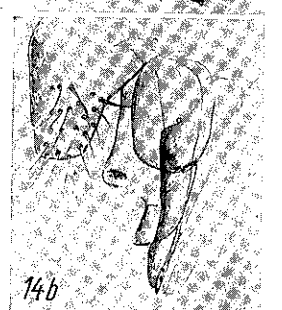
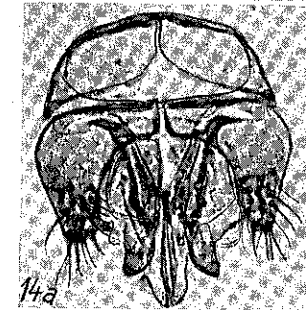
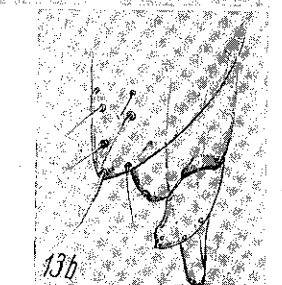
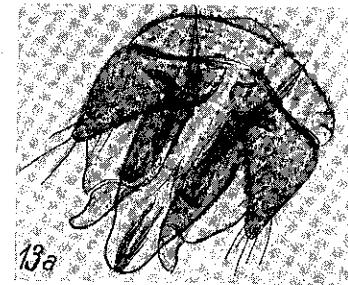
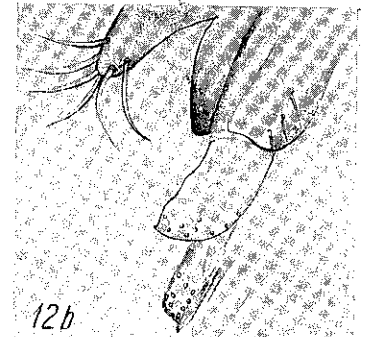
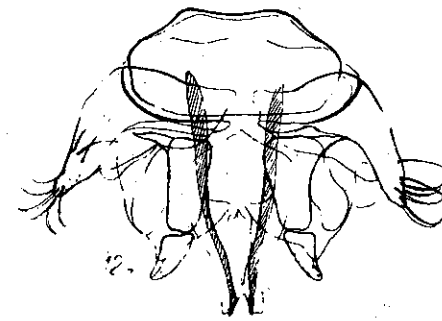


PLANCHE II

- Fig. 7. — Armature génitale chez *Euphorus pallidipes* Curtis. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 8. — Armature génitale chez *Diospilus oleraceus* Haliday. Détails des sclérites génitaux.
 Fig. 9. — Armature génitale chez *Opilus irregularis* Wesmael. *a*, Aspect général; *b*, détails des sclérites génitaux.
 Fig. 10. — Armature génitale chez *Alysia fuscipennis* Haliday. *a*, Aspect général; *b*, détails des sclérites génitaux.
 Fig. 11. — Armature génitale chez *Aphaereta cephalotes* Haliday. *a*, Aspect général; *b*, détails des sclérites génitaux.

Sous-famille des **BRACONINAE**

1. **Coeloides scolyticida** Wesm. La plaque ventrale est haute, ayant le bord externe arrondi. Les forceps externes sont étroits, ayant la même longueur que ceux internes, et présentant de très longs et épais poils sur leur moitié apicale. Les forceps internes ont les parties basales massives avec des poils courts et épais vers leur base. Les régions apicales ont la forme étalée et se terminent par deux dents. L'aedeagus est beaucoup plus long que les forceps externes et pourvu de fréquentes papilles au bout (pl. I, 1).

Sous-famille des **SIGALPHINAE**

2. **Chelonella microphtalma** (Wesm.). La plaque ventrale transversale de largeur moyenne. Les forceps externes, étroits foliacés, très longs, beaucoup plus longs que l'aedeagus. Sur leur bord externe on trouve des poils courts et épais. Les forceps internes sont très courts, les parties basales larges et pourvues de poils. Les parties apicales sont petites et terminées par deux dents et des papilles peu fréquentes qui se trouvent à leur surface. L'aedeagus relativement large pourvu de papilles au bout (pl. I, 2 a, b).

Sous-famille des **AGATHINAE**

3. **Cremnops desertor** (L.). La plaque ventrale transversale, les forceps externes larges, pourvus de nombreux poils dans leur moitié apicale, ceux-ci sont moins courts que les forceps internes. Les parties basales des forceps internes bien développées, pourvues de trois longs poils. Les parties apicales sont terminées par six dents et présentent de nombreuses papilles, sur toute leur surface. L'on observe la volselle individualisée, liée par un bout à la partie basale du forceps interne et par l'autre bout à la partie apicale de celui-ci.

La volselle présente des papilles sensibles. L'aedeagus très large, plus long que le forceps interne et pourvu de papilles nombreuses sur son bord et plus rares sur son tiers apical (pl. I, 3 a, b).

Sous-famille des **HELCONINAE**

4. **Macrocentrus collaris** Spin. La plaque ventrale large, transversale. Les forceps externes ont la longueur de ceux internes, très larges, avec des poils épais situés sur toute leur surface. Les forceps internes ont presque la longueur de ceux externes, avec leurs parties basales triangulaires et pourvues de poils. Les parties terminales petites, toujours triangulaires, terminées par trois dents. Sur leur bord l'on peut observer de rares papilles.

L'aedeagus est étroit, surtout vers le bout et pourvu de rares papilles sur son bord externe (pl. I, 4).

5. *Meteorus rubens* Nees. La plaque ventrale transversale, creuse du côté externe. Les forceps externes larges et ayant la longueur de l'aedeagus, présentant des poils rares dans leur moitié apicale. Les forceps internes un peu plus courts que ceux externes, larges, pourvus de poils seulement vers le côté apical. Leurs parties terminales, triangulaires, légèrement creuses vers l'extérieur, terminées par deux dents; de nombreuses papilles s'observent à leur surface. La volselle peu développée, liée seulement à la partie apicale du forceps interne, ornementée de papilles et de petits poils. L'aedeagus extrêmement large, rhomboïdal, plus étroit vers le bout, où il présente une concentration de papilles (pl. I, 5).

6. *Perilitus cerealium* Haliday. La plaque ventrale transversale relativement étroite. Les forceps externes très larges, plus courts que l'aedeagus, ornementés de poils rares dans leur moitié apicale. Les forceps internes plus courts que les externes, les parties basales larges et pourvues de deux poils; leurs parties apicales, trapézoïdes, terminées par cinq dents. La volselle bien visible, liée seulement à la partie terminale du forceps interne. L'aedeagus est étroit vers son bout, pourvu de papilles presque jusqu'à sa moitié (pl. I, 6 a, b).

7. *Euphorus pallidipes* Curtis. Plaque ventrale ronde, les forceps internes massifs et aussi longs que l'aedeagus. Ils sont ornementés de longs poils situés en bordure sur leur bord distal.

Les forceps internes droits, plus courts que les externes. Leurs parties basales pourvues d'un poil très long et terminées par trois dents robustes. La volselle rudimentaire, clairement visible, liée à la partie apicale au forceps interne. Elle est également ornementée de papilles. L'aedeagus est large avec de très nombreuses papilles dans le tiers apical (pl. II, 7).

8. *Diospilus oleraceus* Haliday. La plaque ventrale haute, légèrement recourbée sur le côté externe. Les forceps externes massifs, ayant presque la longueur de l'aedeagus. Ils sont pourvus de nombreux poils situés sur toute leur étendue. Les forceps internes un peu plus courts que ceux externes. Leurs parties basales larges et glabres. Leurs parties apicales trapézoïdales terminées par 4 dents. Sur leur étendue on trouve de très nombreuses papilles. L'aedeagus est large, un peu plus long que les forceps externes, avec de nombreuses papilles dans leur moitié apicale (pl. II, 8).

9. *Opius irregularis* Wesmael. La plaque ventrale est haute, ayant le bord externe arrondi. Les forceps externes de largeur moyenne aussi longs que la partie basale du forceps interne. Vers leur partie apicale on trouve des poils longs et rares. Les forceps internes un peu plus courts que l'aedeagus, aux parties basales massives et ornementées de poils courts et rares, avec une petite proéminence dans leur angle basal. Les régions apicales du forceps interne presque triangulaires et terminées par une dent. Leur surface est pourvue de rares papilles. L'aedeagus est élargi vers sa base, très étroit et pourvu de rares papilles vers son bout (pl. II, 9 a, b).

Sous-famille des ALYSIINAE

10. *Alysia fuscipennis* Haliday. La plaque ventrale transversale légèrement arrondie vers son milieu. Les forceps externes étalés vers la base, courts et ornementés de très longs poils. Leurs parties basales sont droites, glabres et les parties apicales étalées, terminées à leur bout par une forte dent. Vers le bout sont concentrées des papilles sensibles. Dans l'angle basal du forceps interne une proéminence sclérifiée représente les restes de la volselle. L'aedeagus est très large, il dépasse en longueur les forceps internes et présente de nombreuses papilles au bout (pl. II, 10 a, b).

11. *Aphaereta cephalotes* Haliday. La plaque ventrale transversale, extrêmement étroite, un peu arrondie vers son milieu. Les forceps internes courts, allongés vers leur base, pourvus de très longs poils rares et situés seulement au bout. Les parties basales des forceps internes droites et pourvues d'un seul poil, les parties apicales terminées à leur bout par une dent. Dans l'angle basal du forceps interne on observe les traces de la volselle (pl. II, 11 a, b). L'aedeagus large, plus long que les forceps internes et présentant de rares papilles au bout.

12. *Phaenocarpa ruficeps* Nees. La plaque ventrale transversale, un peu plus large que chez *Alysia*. Les forceps internes larges vers la base, étroits vers le bout, ayant des poils rares et longs, distribués vers leur bout. Les parties basales des forceps internes droites, pourvues de trois poils. Les parties apicales élargies, terminées par une dent et pourvues de papilles rares. Dans l'angle basal du forceps interne on observe une proéminence développée. L'aedeagus large avec de nombreuses papilles au bout. Il est plus long que le forceps interne (pl. III, 12 a, b).

13. *Aspilota fuscicornis* Haliday. La plaque ventrale transversale avec le bord externe arrondi. Les forceps externes de largeur moyenne et ornementés de poils rares et très longs, beaucoup plus courts que les parties basales du forceps interne. Les forceps internes sont droits avec deux poils courts. Les parties apicales allongées, étroites, terminées par une dent. Sur toute leur étendue on trouve des papilles. L'aedeagus est large, un peu plus long que le forceps interne, avec des papilles seulement vers leur bord externe (pl. III, 13 a, b).

Sous-famille des DACNUSINAE

14. *Dacnusa egregia* Marshall. La plaque transversale, large, avec son bord externe arrondi. Les forceps externes larges vers leur base, un peu rétrécis vers le bout, courts, avec de nombreux poils dans leur moitié apicale. Les parties basales parallèles, courtes, pourvues de quatre poils. Les parties apicales étroites, terminées par une dent tandis que vers leur bout on trouve des papilles concentrées. Dans l'angle basal du forceps interne on observe une proéminence. L'aedeagus est étroit avec des papilles sur les côtés externes (pl. III, 14 a, b).

15. *Chaenon anceps* Curtis. La plaque ventrale transversale large, creuse vers le côté externe. Les forceps externes très larges sur toute leur étendue, ils ont la longueur de ceux internes et sont extrêmement poilus, surtout sur leur moitié apicale. Les forceps internes ont presque la même longueur que l'aedeagus, avec les parties basales étroites pourvues de petits poils (11). Les parties apicales de ceux-ci sont aiguës, terminées par deux dents. L'aedeagus est étroit et dépasse la longueur du forceps externe, il présente des papilles nombreuses vers le bout (pl. III, 15).

16. *Polemon liparæ* Giraud. La plaque ventrale transversale, large, ayant le bord externe bouclé. Les forceps externes larges pourvus de poils très denses dans leur moitié apicale, plus longs que ceux internes. Les forceps internes droits, presque parallèles, pourvus de quelques poils (3-4). Les parties apicales de ceux-ci en forme de pantoufle « à la poulaine » et terminées par une dent et légèrement dentelées sur leur côté interne. L'aedeagus est large vers la base, très étroit vers le bout, avec de fines dentelures sur les côtés externes et pourvu de rares papilles (pl. III, 16).

CONCLUSIONS

Les recherches effectuées sur notre matériel nous permettent de tirer les conclusions présentées ci-dessous :

1. L'armature génitale des Braconidés offre des critères sûrs de différenciation des genres et même des espèces, et non seulement pour les unités taxonomiques supérieures.

2. Hormis la forme des sclérites, le seul caractère pris en considération par N. A. Telenga, il faut aussi accorder une importance tout à fait particulière aux caractères suivants :

- a) les rapports dimensionnels entre les différentes parties composantes de l'appareil copulateur ;
- b) la chétotaxie de tous les sclérites et surtout des forceps ;
- c) l'ornementation de la partie apicale du forceps interne ;
- d) la présence et la distribution des papilles sur les différents sclérites.

3. La volselle est bien développée chez quelques genres ; chez d'autres, elle souffre une réduction progressive, de la manière suivante :

a) chez le genre *Cremnops*, comme chez les autres genres de la sous-famille des *Agathinae*, la volselle est individualisée, réunie par l'un de ses bouts à la partie basale du forceps interne et par l'autre bout à sa partie distale.

b) Chez les genres *Euphorus*, *Perilitus*, *Meteorus* de la sous-famille des *Helconinae*, la volselle est moins développée, réunie seulement à la partie distale du forceps interne.

c) Chez les genres *Alysia*, *Aphaereta*, *Phaenocarpa*, *Aspilota* de la sous-famille des *Alysiinae*, *Dacnusa* de la sous-famille des *Dacnusiinae*, on observe seulement les vestiges de la volselle sous la forme d'une proéminence de l'angle externe appartenant à la partie basale du forceps interne.

4. Les genres appartenant à la sous-famille des *Helconinae* se caractérisent par la plaque ventrale transversale de largeur moyenne et par les forceps externes massifs.

5. Les genres appartenant à la sous-famille des *Alysiinae* ont la plaque ventrale transversale, étroite et les forceps externes larges et courts.

6. L'aspect des sclérites génitaux du genre *Chelonella* est très proche de celui du genre *Chelonus*, avec de très petites différences qui prouvent que l'existence de ce genre n'est pas tout à fait justifiée.

7. Le critérium de l'armature génitale, bien qu'ayant une grande importance, doit être considéré dans l'ensemble des autres caractères taxonomiques, étant donné que les exagérations pourraient mener à des conclusions erronées.

8. La conformation des sclérites qui composent l'armature génitale chez les mâles des Braconidés peut servir de critérium principal dans l'établissement des relations phylogénétiques qui existent entre les différents genres de cette famille.

BIBLIOGRAPHIE

1. KONIGSMAN E., Beiträge zur Entomologie, 10, 5-6.
2. LĂCĂTUȘU M., Ann. Univ. « C. I. Parhon », série Sciences Naturelles, 1957, 14.
3. — L'étude des Braconidés de la République Populaire Roumaine (au point de vue morphologique, systématique, biologique et zoogéographique). Thèse de dissertation, Bucarest, 1963.
4. MICHENER D. C., Hymenoptera, in TUXEN S. L., Taxonomist's Glossary of Genitalia in Insects, Copenhagen, 1956.
5. PEREZ J., Ann. Soc. Entom. France, 1893, 62.
6. SNODGRASS E. R., Smithson Misc. Coll., Washington, 1941, 103.
7. — Smithson Misc. Coll., Washington, 1957, 135, 6.
8. ТЕЛЕНГА А. Н., Происхождение и эволюция паразитизма у насекомых-наездников и формирование их фауны. Киев, 1952.
9. ТОВНАС Н. И., Зоологический журнал, Leningrad, 1961, 40, 4.
10. TUXEN L. S., Taxonomist's Glossary of Genitalia in Insects, Copenhagen, 1956.

Reçu le 8 octobre 1964

Faculté de Biologie
Laboratoire d'Entomologie

INFLUENCE OF *IN VITRO* RAPIC FACTOR MODIFICATIONS ON OXYGEN CONSUMPTION AND ACETYLATION OF *p*-AMINOBENZOIC ACID

BY

E. A. PORA and I. V. DIACIUC

The influence of different values of K/Ca and Na/K ratio as well as of inorganic phosphate concentration of the incubation mixture on the oxygen consumption and PAB acetylation was studied, using pigeon liver slices. The modification of K/Ca values caused variations in PAB acetylation and QO_2 , only if Ca concentration varies. Decrease of Na/K ratio, by increasing the K concentration induced, in the absence of Ca and Mg, decrease of PAB acetylation, but in presence of the two cations the acetylation is enhanced. The results also show the dependence of PAB acetylation by the inorganic phosphate concentration.

In previous works [7], [8], [9], [10], [11] and [12], we reported that the ratio of few cation concentration, especially Na^+ , K^+ , Ca^{++} and Mg^{++} , is an important factor in the development of some physiological functions.

Some authors [2], [3] show the influence of this factor upon the dynamical development of the metabolic processes, suggesting the complex character of this little studied phenomenon. In this connection we studied the effect of the various values of the K/Ca and Na/K ratio in the incubation media, on the oxygen consumption (QO_2) and PAB acetylation in pigeon liver slices.

MATERIAL AND METHODS

For the experiment we used 57 pigeons (of both sexes) weighing 250—350 g each. For the study of the acetylation processes we utilized pigeon liver, as this organ shows a higher capacity of acetylation than the rat liver [5], and the concentration of acetylating enzymes is higher [4]. From the existing data it can be concluded that PAB is a more corresponding substrate for the acetylation reactions than the other aryl amines [1], [6].

The animals, fasted 14–16 hours, were killed by decapitation and exsanguination. The liver was quickly removed and cut into slices at 0°C. Liver slices, weighing 200–220 mg were incubated in Warburg vessels containing 3 ml of Krebs-Ringer solution with 50 µg of PAB each. For CO₂ fixation 0.30 ml of KOH 30% was used. After 10 minutes of thermal equilibration at 37°C, the manometers were closed and the oxygen consumption at every 15 minutes was measured. The enzymic activity after 60 minutes of incubation was stopped by adding 0.50 ml trichloroacetic acid of 43 per cent. The mixture was homogenized in a Potter-type homogenizer and after the centrifugation, the free PAB was spectrophotometrically determined by the Sytinskaya's method [14], using 1-amino, 8-naphtol-3,6-disulphonic acid [13]. From the difference obtained between the free PAB concentration before and after incubation, we calculated the quantity of the acetylated PAB. From the control vessels (in which the enzymic reactions were stopped by addition TCA at 0 minute) the recovery of PAB was 97.5–100 per cent. The results are expressed in µmoles of acetylated PAB per 1 g wet tissue/hour.

For incubation media 14 series of solutions (I–XIV) with Krebs-Ringer bicarbonate and phosphate buffer were used, in which the ratio of K/Ca and Na/K was modified in comparison with the initial solutions. These media had a constant pH and osmotic pressure.

In tables 1 a and 1 b the multiplying coefficient of the ion ratio is given against the absolute value of initial solution. For example: K/Ca × 2 (solution I) shows the double increase of this ratio, respectively from 2.33 to 4.66. The second ratio indicates that cation, the modification of which determines the change of the value of the first ratio, e.g. for solution I, Na/K =

Table 1 a
Series of Krebs-Ringer solutions with bicarbonate buffer

Solution	I	II	III	IV	V	VI
Ratio and multiplying coefficient	<u>K/Ca</u> × 2 Na/K = k	<u>K/Ca</u> × 1/2 Na/K = k	<u>K/Ca</u> × 4 Na/Ca = k	<u>K/Ca</u> × 1/4 Na/Ca = k	<u>K/Ca</u> × 4 Na/Ca = k	<u>K/Ca</u> × 1/4 Na/Ca = k
µmoles PO ₄ ^{'''} per ml	0.96	0.93	3.40	0.24	1.00	1.00

Table 1 b

Solution	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ratio and multiplying coefficient	<u>K/Ca</u> × 4 Na/K = k	<u>K/Ca</u> × 1/4 Na/k = k	without K	<u>Na/K</u> × 1/312	<u>Na/K</u> × 1/20	<u>Na/K</u> × 1/164	without K	<u>Na/K</u> × 1/15.6
µmoles PO ₄ ^{'''} per ml	111.9	111.9	111.9	111.9	111.9	99.1	99.1	99.1
	Ca and Mg are present					Without Ca and Mg		

Note. The underlined cation is that which causes modification of ratio.

= constant (k), shows that the double increase of K/Ca ratio was the result of Ca concentration decrease. In tables 1 a and 1 b the concentration of inorganic phosphate is also given, as it seems that between the cation ratio and phosphate concentration a relationship may exist. It must be mentioned that these experiments were carried out in 5 series with respective control tests.

Table 2
Concentration of inorganic phosphate and absolute value of some ratios from initial solutions

Ratio	Krebs-Ringer solution	
	with bicarbonate buffer	with phosphate buffer
K/Ca	2.33	2.33
Na/Ca	56.40	53.94
Na/K	24.19	23.12
µmoles PO ₄ ^{'''} per ml	1.00	111.90

RESULTS AND DISCUSSIONS

In tables 3–7 the statistically computed data are given.

The changes in the osmotic pressure and pH are not given in these experiments, the variations obtained being due exclusively to the modifications of the cation ratio. In case of the solutions containing phosphate

Table 3

	µmoles PAB acetylated/g fresh tissue/hour				
	Initial solution	I	II	III	IV
n	20	12	12	8	8
M ± S.E.	0.291 ± 0.014	0.295 ± 0.010	0.321 ± 0.012	0.317 ± 0.004	0.241 ± 0.010
p	—	>0.10	<0.01	<0.01	<0.01
± %	—	—	+10.3	+8.9	-17.2

	µmoles O ₂ /g fresh tissue/hour				
	Initial solution	I	II	III	IV
n	20	12	12	8	8
M ± S.E.	50.2 ± 2.1	57.9 ± 2.6	53.2 ± 1.9	62.3 ± 2.8	47.8 ± 3.0
p	—	0.05 > p > 0.02	>0.10	0.02 > p > 0.01	>0.10
± %	—	+15.3	+5.9	+24.1	-4.8

n = number of animals; M = mathematical average; S.E. = standard error; p = probability.

Table 4

	$\mu\text{moles PAB acetylated/g fresh tissue/hour}$		
	Initial solution	V	VI
n	9	9	8
M \pm S.E.	0.274 \pm 0.018	0.277 \pm 0.013	0.281 \pm 0.014
p	—	>0.10	>0.10
\bar{x} %	—	—	—
n	$\mu\text{moles O}_2/\text{g fresh tissue/hour}$		
	8	8	9
M \pm S.E.	41.8 \pm 0.9	46.1 \pm 1.8	45.8 \pm 2.8
p	—	>0.10	>0.10
\bar{x} %	—	+9	+9

Table 5

	$\mu\text{moles PAB acetylated/g fresh tissue/hour}$		
	Initial solution	VII	VIII
n	9	9	8
M \pm S.E.	0.864 \pm 0.077	0.854 \pm 0.086	0.799 \pm 0.091
p	—	>0.10	>0.10
\bar{x} %	—	-1.2	-7.6
n	$\mu\text{moles O}_2/\text{g fresh tissue/hour}$		
	9	9	9
M \pm S.E.	41.9 \pm 2.7	46.9 \pm 3.3	46.6 \pm 2.9
p	—	>0.10	>0.10
\bar{x} %	—	+11.9	+11.9

Table 6

	$\mu\text{moles PAB acetylated/g fresh tissue/hour}$			
	Initial solution	IX	X	XI
n	9	10	10	10
M \pm S.E.	0.797 \pm 0.037	0.889 \pm 0.043	0.910 \pm 0.070	0.963 \pm 0.059
p	—	>0.10	>0.10	0.05 > p > 0.02
\bar{x} %	—	+11.5	+14.1	+20.8
n	$\mu\text{moles O}_2/\text{g fresh tissue/hour}$			
	9	10	10	6
M \pm S.E.	36.3 \pm 1.7	39.9 \pm 2.0	45.0 \pm 2.5	40.6 \pm 0.7
p	—	>0.10	0.02 > p > 0.01	>0.05
\bar{x} %	—	+9.9	+23.9	+11.8

Table 7

	$\mu\text{moles PAB acetylated/g fresh tissue/hour}$			
	Initial solution	XII	XIII	XIV
n	9	9	9	9
M \pm S.E.	1.191 \pm 0.070	0.917 \pm 0.103	1.023 \pm 0.050	0.960 \pm 0.042
p	—	<0.01	>0.05	0.02 > p > 0.01
\bar{x} %	—	-23	-14.2	-19.4
n	$\mu\text{moles O}_2/\text{g fresh tissue/hour}$			
	8	8	9	8
M \pm S.E.	49.8 \pm 1.4	53.0 \pm 1.8	54.7 \pm 2.7	56.8 \pm 2.1
p	—	>0.10	>0.10	=0.01
\bar{x} %	—	+6.4	+9.8	+14

buffer (VII—XIV), the rate of acetylation is 3—4 times greater than in the case of bicarbonate buffer (I—VI), irrespective whether the cation ratio was changed or not, while QO_2 did not show any changes. We believe that the variations in the efficiency of acetylation are due to the difference of phosphate concentrations of the incubation media, which can be esterified by the oxidative phosphorylation; this process furnished the ATP for the acetate activation. Variations obtained in the case of solutions III and IV are due to similar factors. The increase of QO_2 (solution I) and of the rate of acetylation (solution II) is due to the modifications of the K/Ca ratio. The acceleration in the acetylation rate in solution III is not carried out by any effect of K/Ca ratio modifications; because an equal K/Ca ratio is given in solutions III and V (in solution V the effect is absent), but solution III contained bigger quantity of PO_4^{3-} ions than the initial and V solutions.

The increase of QO_2 in solution III could be explained by the modification of the K/Ca ratio.

It can be concluded that the four times variations of the K/Ca ratio (solutions III—VIII) had no significant influence on the PAB acetylation.

It is known that the Na and K are antagonistic in the acetyl-group transferring reactions of the biosynthesis of acetylcholine [3]. Our results demonstrate a similar effect of these cations in the acetyl-group transferring reactions for the aryl amines. The decrease of Na/K ratio (solution XII) determined a diminution of the PAB acetylation, and at the same concentration of the two cations (solution XIV), also an increase of QO_2 . The increase of QO_2 in solutions with a high K concentration (solutions X and XIV) was observed by other authors [15] too.

The modifications obtained in the rate of the acetylation reactions (compare the solution XI and XIV), show that they are dependent by the presence of Ca and Mg in the incubation media. The absence of K in the media, together with the absence or presence of Ca and Mg (see solutions XIII and IX), did not influence QO_2 and PAB acetylation. These data are in good agreement with the inefficacy of action of K/Ca ratio modifications upon these phenomena in some solutions (III—VII).

CONCLUSIONS

Our results tend to indicate:

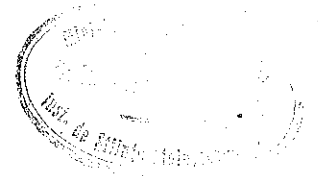
1. The four times increase or decrease of K/Ca values from the incubation media, with the corresponding modification of K concentration, does not influence the QO_2 and the PAB acetylation *in vitro*. However, the modification of this ratio, by varying the Ca concentration, is a factor which determines variations of these two parameters.
2. In a higher measure the PAB and QO_2 acetylation is influenced by the modification of the Na/K ratio. The action of this ratio depends, however, of the presence of Ca and Mg in the media.
3. The concentration of the inorganic phosphate in the media is an important factor of the rate regulation for PAB acetylation.

REFERENCES

1. BONOMI U., *Acta vitaminol.*, 1961, **15**, 2, 151.
2. CAHILL G. F., ASHMORE J., ZOTTU S., HASTINGS A. B., *J. biol. Chem.*, 1957, **224**, 1, 237.
3. GOUDOT A., Труды V М. Б. К., Изд. Акад. Наук СССР. Москва, Рефераты секции сообщ., 1—13, 329.
4. KAPLAN N. O., LIPMAN F., *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 1, 37.
5. LE VAN HUNG, C. R. Soc. Biol. Fr., 1959, **153**, 6, 1007.
6. NOVELLI G. D., in *Methods of biochemical analysis*. Ed. by D. Glick, 1955, vol. II, p. 189. Intersc. Publ. Inc., New York-London.
7. PORA A. E., *Journ. Physiol.*, Paris, 1958, **50**, 2, 464.
8. PORA A. E., *Proceed. XV-th Congr. internat. Zoology*, London, 1958, p. 1061.
9. PORA A. E., *Vol. omag. Tr. Săvulescu*, Ed. Acad. R.P.R., București, 1959, p. 633.
10. PORA A. E., *Rapp. Proc. Verb.*, CIESMM, 1960, **15**, fasc. 3, 171.
11. PORA A. E., RUȘDEA D., STOICOVICI FL., WITTENBERGER C., KOLASOVITH H., ROȘCA D. I., *Ibid.*, **15**, fasc. 3, 199.
12. PORA A. E., STOICOVICI FL., RUȘDEA D., WITTENBERGER C., KOLASOVITH H., *Ibid.*, **15**, fasc. 3, 189.
13. РОМАНЦЕВ Е. Ф., ЖУЛАНОВА З. И., *БЮХИМИЯ*, 1956, **21**, 6, 663.
14. СЫТИНСКАЯ Н. О., *Вопр. мед. хим.*, 1956, **2**, 3, 214.
15. TAGAKAKI G., TSUKAD T., *J. Neuroclin.*, (G.B.), 1957, **2**, 21.

Received July 14, 1964

The Cluj Branch of the Academy of
the R.P.R., Section of Comparative
Animal Physiology



THE INFLUENCE OF MAGNETIC FIELDS ON THE ANTITOXIC-ANTITETANIC IMMUNITY IN GUINEA PIGS

BY

P. JITARIU, N. LAȘCU, N. TOPALĂ and M. LAZĂR

The authors pursued the influence of pulsatile magnetic fields of low frequency—employed with or without break-ups (3'' excitation, 1'' resting time) for 3 minutes every one day, during 15 days consecutively — on the formation of antitetanic antitoxin in Guinea pigs.

They have found that under such experimental conditions the antitetanic antitoxin titre, depending on the season, grows from 83 to 160 % in comparison with the control-animals.

If the animals are immunized with tetanic anatoxin associated to Cl_2Ca , the magnetic fields lead to an increase of the antitoxin titre up to 250 % as against the animals vaccinated in much the same conditions, but not subjected to the influence of magnetic fields, and up to 375 % as against the control animals inoculated only with tetanic anatoxin.

In the last few years the biologists have been concerned with the biological influence of the magnetic fields. Thus, in 1956, J. M. Barnothy, M. F. Barnothy, I. Boszormeny and I. Nagy [1] noticed occurrence of leucocytosis processes in laboratory animals exposed to the influence of magnetic fields.

In 1960, Leo Gross [2], [3], studying the growth of tumors in mice under the influence of nearly uniform magnetic fields of 4 000 Gauss yielded by electromagnets observed an inhibitory effect on the development of the tumor. A year later he tried to determine the healing duration of wounds and found in it a certain delay.

In 1962, also Leo Gross [4] observed that mice become markedly resistant to any infection if inoculated with tumoral Ehrlich cells, to which Ehrlich cells attenuated by X-rays are added. Such animals kept on magnetic fields of 4 000 Gauss survive less, whereas the tumors are developing more rapidly. As the author points out, it is obvious that the

REV. ROUM. BIOL. — ZOOLOGIE, TOME 10, No 1, p. 33-38, BUCAREST, 1965

protective mechanism against the tumor of Ehrlich ascite is altered by the influence of magnetic fields. At the same time there is a drop in the number of antibodies in mice kept on magnetic fields.

We want also to remind C. Solomon and M. Kapri's paper [5] in which the authors show their results concerning the influence of low frequency electromagnetic fields on the excitability of the medular nervous centres and on the periferic neuromotor apparatus. They have found that the influence of electromagnetic fields brings about a drop of rheobasis and chronaxia and an increase of the contractile capacity of the motor apparatus.

In the researches, started in 1959, we used pulsatile magnetic fields, with or without break-ups, of small intensity of 100 oersteds yielded by recovered current of 50 and 100 Hertz. By using such fields, we studied, among other things, the dynamics of the formation of anti-Proteus OX₁₉ agglutinins in rabbits vaccinated with antigen Proteus OX₁₉ [6] and obtained an immunologic response higher than the titre of the agglutinins in the control-animals.

Starting from these results, we followed up the influence of magnetic fields on the antitoxic-antitetanic immunity in Guinea pigs. The aptitude of the tetanic antitoxin to confer a lasting antitoxic immunity has been verified from the very first attempts at vaccinating animals and men by inoculation of antigen in two or three doses at different intervals and by titrating the specific antitoxin in the blood of the vaccinated subjects.

In order to get the best results, researches carried out earlier, particularly by G. Ramon [7], suggested the necessity of employing some adjuvant substances, which lacking immunologic specificity could bring about an increase of the antigenic power of the tetanic antitoxin. Nonspecific substances like Cl₂Ca or tapioca powder inoculated in animals together with tetanic anatoxin may engender antitoxic titres which are higher than those obtained by ordinary vaccinating methods with equal quantities of antitoxin.

Potentialization obtained with the aid of an adjuvant may lead to a higher increase of the efficiency of the original tetanic antigen. It should be recalled that a positive effect is obtained by administering some tetanic antigen absorbed in different mineral supports, i.e. aluminium phosphate, aluminium hydroxide, alaun, etc.

The present paper deals with the influence of magnetic fields, as an adjuvant factor, on the immunologic response of the Guinea pigs vaccinated with native anatoxin.

MATERIAL AND METHOD

In a first series of experiments, carried out in Autumn 1963, we selected a number of 18 Guinea pigs weighing 350–450 g each. The animals received subcutaneously two injections of 2 ml tetanic native anatoxin; the series 579/1963 had a 30 days interval between the injections.

The animals have been divided into two groups. The first group, including 9 vaccinated animals, was a control-group; the second, also including 9 vaccinated animals, was subjected to the influence of magnetic fields.

The first inoculation of 2 ml tetanic anatoxin has been considered as a preparatory sensitizing dose, being used in both groups. Some 7 days before a fresh inoculation was made, the second group of 9 animals has been subjected to the influence of magnetic fields of about 100 oersteds yielded by a recovered electric current of 10–14 amperes applied for 3 seconds in the form of rectangular impulses, followed by break-ups of a second at a duration of 3 minutes and at an interval of 24 hours, for 15 days consecutively.

This group of animals has been subjected to the influence of magnetic fields 7 days before and 8 days after the second inoculation was made.

Some 30 days after the second inoculation of tetanic anatoxin the Guinea pigs of both groups have been bled in order to determine — with the aid of Hallapina's method described by Shumakova [8] — the titre of the tetanic antitoxin. The titration was performed on a mixture of equal parts of 2–3 serums.

A second serie of experiments, in March-June 1964, were performed on 4 groups of Guinea pigs. A number of 24 animals weighing 350–450 g each received two injections of 2 ml native tetanic anatoxin. The series 579/1963 had an interval of 30 days between the injections.

The animals have been divided into 4 groups:

- 1st group, including 9 control animals, vaccinated according to the above mentioned method;
- 2nd group, including 7 animals, vaccinated according to the same method and subjected to the influence of magnetic field, in the same conditions as the second group in the first series of experiments;
- 3rd group, including 4 animals, vaccinated with tetanic anatoxin to which the adjuvant of Cl₂Ca sol. 1% was added;
- 4th group, including 4 animals, in which the association tetanic anatoxin + Cl₂Ca was followed by subjecting the animals to the influence of magnetic fields in the same conditions as the second group in the first and second series of experiments.

The bleeding of the animals and the titration of the tetanic antitoxin have been performed in the same way as in the first series of experiments.

RESULTS

The data obtained in the first series of experiments show that with the Guinea pigs belonging to the control-group the antitoxin titre, some 30 days after the second inoculation of tetanic anatoxin, was of 2.5 UA/ml serum; those belonging to the second group, subjected to the influence of magnetic fields, revealed, after the same interval, a tetanic antitoxin titre ranging from 4 to 8 UA/ml serum, with an average value of 6.5 UA/ml serum — that is a titre 2.6 times higher than the titre obtained in the control group (Table 1).

The active resistance of all 18 Guinea pigs to the tetanic toxine doses they have received was generally running parallel with the antitoxin titre obtained. The favourable influence of the magnetic fields

on the development of the antitoxic-antitetanic immunity has been shown by the results of the second series of experiments (Table 2).

The data recorded in table 2 attest that the immunologic response of the Guinea pigs belonging to the second series of experiments carried out in March-June 1964 was rather weak, most likely because of the

Table 1

Titre of the antitetanic antitoxin in Guinea pigs vaccinated with tetanic anatoxin and subjected to the influence of magnetic fields as compared to control-animals

Control-group 1		Group 2 subjected to the influence of magnetic fields	
Mixture of serums	Titre of the antitoxin in UA/ml serum	Mixture of serums	Titre of the antitoxin in UA/ml serum
10+11+12	2.5	1+2+3	4.0
13+14+15	2.5	4+5+6	7.5
16+17+18	2.5	7+8+9	8.0
Average value	2.5	Average value	6.5

feeding regimen lacking vitamins. The average antitoxin titre of the group subjected to the influence of magnetic fields has not exceeded, in this case, twice the figure given by the control-group, although it was 83 per cent higher.

The speciality literature brings very few data regarding the influence of magnetic fields on immunity. Except Leo Gross' works [4] quoted by some of us in previously published papers, we did not find any other writings on this matter.

Taking into account our working conditions and in contrast to Leo Gross' results, we have obtained in rabbits vaccinated with Proteus OX₁₉ and subjected to the influence of pulsatile magnetic fields, with or without break-ups, an increase of the immunologic response up to and above 100 per cent as compared to the vaccinated rabbits not subjected to the influence of magnetic fields.

The growth of the titre of antimicrobial antibodies was higher in animals subjected to the influence of magnetic fields applied in the form of alternating impulses than in those subjected to continuing impulses. The marked positive influence of the magnetic fields on the antimicrobial immunity extends also to the antitoxic immunity.

From the data obtained in our two series of experiments performed on 42 Guinea pigs, as recorded in tables 1 and 2, it results that the tetanic antitoxin in the animals vaccinated with native tetanic anatoxin and subjected to the influence of magnetic fields is, as a function of season, 83-160 per cent higher than in the control animals.

By using a solution of 1% Cl₂Ca as an adjuvant factor for the vaccination with antitetanic anatoxin of a group of 4 Guinea pigs, we obtained an increase of the antitoxin titre up to 50 per cent. At the same

Table 2
Titre of the antitetanic antitoxin in the Guinea pigs vaccinated with tetanic anatoxin, associated to Cl₂Ca and subjected to the influence of magnetic fields

Group-control vaccinated		Group 2 vaccinated and subjected to the influence of magnetic fields		Group 3 vaccinated in association with Cl ₂ Ca		Group 4 vaccinated in association with Cl ₂ Ca and subjected to the influence of magnetic fields	
Mixture of serums	Titre in UA/ml	Mixture of serums	Titre in UA/ml	Mixture of serums	Titre in UA/ml	Mixture of serums	Titre in UA/ml
1+2+3	2	10+11+12	4	17+18	3	22+21	8
4+5+6	3	13+14	3	19+20	3	23+24	7
7+8+9	1	15+16	4	-	-	-	-
Average value	2	Average value	3.66	Average value	3	Average value	7.50

time, another group of 4 Guinea pigs vaccinated with anatoxin associated to Cl_2Ca , subjected to the influence of magnetic fields on rectangular impulses and break-ups, showed an antitoxine titre 250 per cent higher than in the group of animals vaccinated with anatoxin associated to Cl_2Ca , and 37 per cent higher than the titre of the control-group vaccinated only with anatoxine.

These results are an evident proof of the stimulating influence of the magnetic fields of small intensity on the organism's capacity to form specific antibodies. They open up a broad prospect for using this device either alone or together with a chemical adjuvant in order to obtain serums with higher titre.

CONCLUSIONS

1. The magnetic fields of about 100 oersteds yielded by recovered electric current in rectangular form, applied for 3 seconds with break-ups of a second every 5 minutes during a 15 days period have a stimulating effect on the antitoxic antitetanic immunity.
2. The immunologic response of the Guinea pigs in Spring is somehow weaker than in Autumn, most likely because the feeding regimen is poor in vitamin factors.
3. The influence of magnetic fields on the Guinea pigs vaccinated with tetanic anatoxin associated to Cl_2Ca provides the best results, which are reflected by the titre of the antibodies exceeding the control values by 375 per cent.

REFERENCES

1. BARNOTHY J. M., BARNOTHY M. F., BOSZORMENY I., NAGY I., Nature, 1956, 177, 577.
2. GROSS LEO, Biophys. soc. paper, L.S., 1960.
3. GROSS LEO, SMITH L. W., Fed. Proc. 1961, 20, 146 D.
4. GROSS LEO, Nature, 1962, 195, 4842, 662.
5. SOLOMON C., KAPRI M., Fiziologia normală și patologică, 1962, 2.
6. JITARIU P., TOPALĂ N., AILIESEI O., Revue roumaine de biologie, série de zoologie, 1964 9, 3, 196.
7. RAMON G., C. R. Acad. Sciences, 1925, 181, 157.
8. ШУМАКОВА С. В., Вопросы инфекционной патологии и иммунологии, Медгиз, 1954, 2, 125.

Received October 16, 1964

"Al. I. Cuza" University
Laboratory of Human and Animal
Physiology, Laboratory of Microbiology and
"Dr. I. Cantacuzino" Institute
Jassy

HORMONAL INFLUENCES ON THE *IN VITRO* INCORPORATION OF GLUCOSE IN WHITE RATS THYMUS

BY

V. TOMA, E. A. PORA and I. MADAR

It was found that thymus of white rats is capable to utilize glucose *in vitro*. The insulin enhanced this phenomenon by 64 per cent ($P < 0.01$) while hydrocortisone inhibited the glucose uptake by 45 per cent ($P < 0.01$). In our experimental conditions the ACTH and STH did not show significant actions ($P > 0.05$).

In previous papers [8-11] we have shown that the involution of thymus caused by corticoids is connected with metabolic modifications marked by decrease of the number of free aminoacids, of the -SH groups, of the oxygen consumption and of the radioactive phosphorus (P^{32}) uptake. As we found that hormones influence the thymus metabolism in a very sensitive way, we deemed it of interest to follow experimentally the glucose uptake of this gland under the influence of some hormones.

MATERIAL AND METHODS

a) Male white rats, weighing $25 \text{ g} \pm 3$, were killed by chloroforming and afterwards 50 mg of thymus were collected. The tissue was incubated for 90 minutes in 2 ml bicarbonate Krebs-Henseleit buffer, which contained 3 mg glucose/ml. The incubation medium was at the beginning of the experiment flushed with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 and kept on a temperature of 37.6°C . The flask was shaken with 90/min. frequency and 5 cm ampl. in a Warburg apparatus. After incubation, the glucose concentration was again determined by the Somogyi-Nelson method. The difference thus obtained permitted the calculation of the glucose uptake of the thymus expressed in mg %/100 mg fresh tissue.

To follow up the actions of the hormones we used the following compounds:

1. Hydrocortisone "CIBA" in 50 gamma/ml
2. ACTH "CIF" in 1 I.U./ml
3. Insulin "NOVO-LENTE" in 1 I.U./ml
4. Somatotropin (STH) "SPOFA" in 1 E.U./ml

b) In order to establish the effect of adrenalectomy on the glucose uptake of the thymus, we used a group of male rats weighing 120 g each. The experiments were made 9 days after the operation, during which period the animals were kept on a NaCl diet. A group of 5 were sham operated and were used as controls.

RESULTS AND DISCUSSION

The data obtained are shown in the table below. It can be seen that the thymus is able to incorporate glucose *in vitro* just in the same way as do the diaphragms or the isolated epididimal fat pads of the rats [2], [7], [13]. It must be noted that while other biochemical phenomena such

Table

Incorporation of glucose *in vitro* in the thymus of white rats and the influence of insulin, hydrocortisone, ACTH, STH and adrenalectomy on this phenomenon

Number of animals	Control 25 g (8)	Insulin (8)	Hydrocortisone (8)	ACTH (8)	STH (8)	Control 120 g (5)	Adrenalectomy (11)
Glucose uptake in mg%/100 mg fresh tissue	44.2 ± 0.84	72.1 ± 2.03	24.3 ± 0.84	40.1 ± 4.63	43.9 ± 2.23	47.0 ± 1.81	50.0 ± 1.36
% Difference against controls	—	+63	-45	-9	-1	—	+6
P	—	< 0.01	< 0.01	> 0.05	> 0.05	—	> 0.05

as variation of free aminoacids [9], nucleic acids [10], ascorbic acid [15] or the P³² uptake [12] undergo ontogenetic changes, the glucose uptake does not change with age.

After adrenalectomy, the phenomenon in the hypertrophied thymus is enhanced only by 6 per cent, difference which is not significant statistically (P > 0.05).

From the hormones used, glucose uptake in the thymus is stimulated especially by insulin, the mean values being 63 per cent higher than in the controls (P < 0.01). In the literature the thymus is considered as possessing an anti-insulinic action [3], [6]. It could not be verified in our experimental conditions. This action of the thymus may be dependent on a series of neuro-hormonal mechanisms, which under the conditions of isolated organ could not operate. The hypothesis that the anti-insulinic effect of the thymus appears only after a certain insulin concentration may also be taken into consideration.

Hydrocortisone decreased the glucose uptake of the thymus by 45 per cent. These data are concordant with the uptake values of other isolated organs under the influence of this hormone [7]. At the same time our observations confirm that hydrocortisone has a strong thymolytic effect

[3], [5], [9]. On the other hand, our results agree with the observations of Bartlett *et al.* [1], according to which the cortisol inhibits rapidly the incorporation of C¹⁴D-glucose in the thymus *in vivo*. According to him the inhibition of glucose utilization is the primary metabolic alteration produced by glucocorticoids in the thymus.

The ACTH and STH, added to the incubation medium of the isolated thymus had no effect upon the glucose uptake (P < 0.05).

Summing up the results of our experiments, we may state that the thymus is an organ capable of utilizing glucose *in vitro*. Insulin increased this phenomenon by 64 per cent while hydrocortisone inhibits the glucose uptake by 45 per cent. In our experimental conditions the ACTH and STH did not show significant actions.

REFERENCES

1. BARTLETT D., MORITO Y., MUNCK A., Nature G.B., 1962, 4857, 897.
2. BUCKLE R. M., BECK J. C., Metabolism, 1962, 11, 235.
3. COMŞA J., *Physiologie et physiopathologie du thymus*. 1959, Ed. Doin, Paris.
4. DORFMAN R., DORFMAN A., Endocrinology, 1961, 69, 2, 283.
5. ITO T., HOSHINO T., Zellforsch, 1962, 56, 4, 445.
6. MLCU ŞT. M., APOSTOL N., Bull. St. Acad. R.P.R. Ser. şt. med., 1950, 2, 23.
7. MUNCK A., Biochem. Biophys. Acta, 1962, 57, 318.
8. PORÄ E. A., TOMA V., FABIAN N., C.R. Soc. Biol., 1962, 255, 2207.
9. PORÄ E. A., TOMA V., ORÖS I., ABRAHAM A., Revue de Biologie, 1962, 1, 129.
10. PORÄ E. A., ŞILDAN N., ABRAHAM A. (in press).
11. PORÄ E. A., TOMA V., MUREŞAN I., BÄBAN L., Revue de Biol. 1964 9, 2, 109.
12. SHIBATA K., Gunma J. Med., 1953, 2, 1, 93.
13. TESSERAUX H., *Physiologie u. Pathologie des Thymus*, 1959. J. A. Ambrosius Vrig. Leipzig.
14. TOMA V., PORÄ E. A., GABOS M., MADAR I. (in press).

Received June 11, 1964

"Babeş Bolyai" University
Department of Animal Physiology
Cluj

GLYCAEMIA IN THE *VIPERA BERUS*

BY

C. VLĂDESCU

The paper brings new data concerning reptile glycaemia. Blood glucose was dosed by the Hagedorn-Jensen method. The average value of the glycaemia in this adder is 59 ± 3.8 (27-82). This value was determined during October-November-December in animals kept under fast in the laboratory at a temperature of 16-18° C. Signs of glycaemic homeostasis were noted in these reptiles, so that the average glycaemia recorded in October was 60 ± 4.8 ; in November, 60 ± 1.1 ; in December, 55 ± 5.1 .

Comparative physiology possess very scanty information on snake glycaemia. Up to the present, the latter has been studied only in a small number of species: *Bothrops jararaca* [11], [12], *Xenodon merremii* [4], *Lampropeltis*, *Coluber*, *Natrix*, *Agkistrodon* [5] and *Vipera aspis* [1], [2].

From these investigations it has been seen that the glycaemia of the above-mentioned species is generally similar to that of the inferior reptiles (chelonians), showing great individual variations. As far as the regulation of their glucide metabolism is concerned, this has not been studied as yet.

As things stand, we have considered that a presentation of our observations on the glycaemia in the common adder (*Vipera berus*) will not be devoid of interest.

MATERIALS AND METHOD

We have determined the glycaemia in a number of 20 specimens of *Vipera berus* L., captured in the Hunedcara region, towards the end of September (1963). Transported after a few days to our laboratory, they were kept in a terrarium at the temperature of + 16- + 18°C.

The blood samples were taken over NaF, immediately after the slaughtering of the animals by decapitation.

The dosing of glycaemia was done according to the Hagedorn-Jensen method.

Four specimens were slaughtered in October, 8 in November and another 8 in December.

RESULTS

The individual average values expressed in mg/100 ml blood, obtained by dosing, are presented in the following table :

October	November	December
48	34	27
57	42	46
67	57	49
70	58	54
	62	56
	70	69
	81	69
	82	72
M = 60 ± 4.8	60 ± 1.1	55 ± 5.1

$$M = 59 \pm 3.8 (27-82)$$

By analysing the above data it results that the average individual values are comprised between 27 and 82 mg/100 ml blood, the majority being near the general average value, represented by 59 ± 3.8 mg/100 ml.

Considering the distribution of the glycaemic values during the 3 months of the experiment, it may be observed that there are no significant differences between them, although the length of the fasting period for the specimens slaughtered in December was three times greater.

DISCUSSION OF RESULTS

On comparing our results with those existing in the literature we have found that the glycaemia of this species of adders is similar to that of other species of snakes. The comparative table on page 45 is conclusive in this respect.

Thus, although these species of snakes are adapted to extremely different living conditions, their glycaemia shows rather similar values. At the same time it may be observed that it varies between very large limits. This phenomenon was observed in other species of reptiles, too, as well as in various representatives of the two inferior classes of vertebrates (amphibians and fishes). An exception to this rule was observed only in lizards [3], [8], [9], the normal glycaemia of which was thrice as high as that of birds.

Normal glycaemic values in various species of snakes

No.	Species	mg % glucose	Author
1	<i>Bothrops jararaca</i>	54-58	Prado (1946)
2	<i>Coluber viridiflavus</i>	65	Saviano and De Francis (1948)
3	<i>Xenodon merremii</i>	48-61	Houssay and Biasotti
4	<i>Crotalus atrox</i> " <i>oregonus</i>	48-68	Luck and Keeler
5	<i>Natrix natrix</i>	30-85 60 (37-75) ♂ 57.1 (36-95) ♀	Saviano and De Francis (1948) Apostol Gh. (1962)
6	<i>Natrix sipedon</i>	48	Hutton (1958)
7	<i>Lampropeltis getulus</i>	91 (55-128) 60.4	Rhoney (1948) Hutton (1958)
8	<i>Coluber constrictor</i>	77	Hutton (1958)
9	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	49	
10	<i>Vipera aspis</i>	25 20-55 40-72	Dastugue (1943) Agid <i>et al.</i> (1962) Izard (1961)
11	<i>Vipera berus</i>	50 ± 3.8 (27-82)	Vlădescu C. (1964)

Another important finding of our experiment was the fact that during a long fast (of 3 months), the glycaemic level in the adder remained nearly unchanged. This phenomenon was observed also by Agid *et al.* in the *Vipera aspis*; it was not observed in inferior vertebrates [7], [10] but, as everybody knows, it is characteristic of the superior vertebrates. Thus, it may be concluded that the glycaemic homeostasis in adders, though the limits of the normal variations are rather wide, constitutes an evidence of the beginning of a transition towards a superior stage of regulation.

In the *Vipera aspis*, Agid *et al.* [1], [2] have reported the existence of significant seasonal variations of the glycaemia: 7 mg/100 ml in December, 20 mg in January, 27 mg in March-April, 29 mg in June, 40 mg in August-September and 32 mg in October. It was not possible for us to study this aspect of the problem, yet, in the adders studied by us, we have not observed any significant differences between the glycaemic values of October and of December. Maybe the variations observed by Agid *et al.* were not due to the seasonal rhythm proper, but to some other causes.

CONCLUSIONS

1. The glycaemic values in the *Vipera berus* during October-December are comprized between 27—82 mg/100 ml blood, the average being 59 ± 3.8 .

2. The glycaemia does not change significantly during the fast. This fact indicates the beginnings of a glycaemic regulation with homeostatic effects.

REFERENCES

1. AGID R., DUGUY R., H. SAINT GIRONS, J. Physiol., 1961, 53, 807—824.
2. AGID R., DUGUY R., MARTOJA H., HUBERT S. G., C. R. Acad. Sc., 1961, 252, 13, 2007—2009.
3. APOSTOL GH., St. și cerc. de biol. Seria biol. anim. 1962, 14, 2, 253—265.
4. HUTTON K. E., J. Ceell. Com. Physiol., 1958, 52, 2, 319.
5. IZARD V., DETRAIT J., BOQUET P., Ann. Inst. Pasteur, 1961, 100, 4, 539—545.
6. HOUSSAY B. A., C. I. PENHOS, Acta End., 1960, 35, 650.
7. MATEI-VLĂDESCU C., Revue de Biol., 1961, 6, 2, 170—175.
8. MILLER M. R., Comp. Physiol. of Carb. Metab. in Heterotermic Animals, 1961, 125—147.
9. MILLER M. R., WURSTER D. M., End., 1958, 63, 191—200.
10. MOTELICA I., Stud. și cerc. de biol. Seria biol. anim. 13, 2, 257—265.
11. PRADO I. L., Rev. Canad. Biol., 1946, 5, 564.
12. — Rev. Canad. Biol., 1947, 2, 225.

Received May 27, 1964

"Traian Săvulescu" Institute of Biology
of the Academy of the R.P.R.
Laboratory of Animal Physiology
Bucharest

INFLUENCE OF SEXUAL HORMONES ON THE METHIONINE-S³⁵ INCORPORATION INTO THE THYMUS PROTEINS

BY

A. ABRAHAM, E. A. POŢA and V. TOMA

The authors investigated the thymolytic action of testosterone, estradiol-17 β and progesterone, administered in albino rats in doses of 25 mg/100 g. Among these steroids, testosterone had the highest activity, determining a decrease of thymus relative weight by 51.3% and of methionine-S³⁵ incorporation into thymus proteins by 59.6%. Estradiol-17 β caused also the thymus weight decrease by 8.9% and the inhibition of methionine-S³⁵ incorporation by 34.7%; in case of progesterone administration we observed a decrease of these tests by 16.0% and 23.0 respectively.

Total protein concentration decreased slightly after treatment with sexual hormones, indicating a protein catabolism in thymus gland.

The changes occurred in spleen were insignificant from statistical point of view.

It is known that the sexual hormones determine an involution process in the thymus [1], [2]. Kochakian and Harrison, in 1962, have shown that administration of androgen hormones in mice, induced a decrease of the thymus weight and of its nucleic acid content [3].

In the last few years many investigations were undertaken aiming at elucidating the mode of action of sexual hormones; still we don't know with precision what kind of changes of the biochemical processes are taking place in the thymus, spleen and the adrenals, organs which respond in an opposite manner to sexual hormones administration, as compared to the other tissues.

In this work we investigated the change of the total protein content and of the methionine-S³⁵ incorporation capacity of the proteins isolated from the thymus, spleen and the adrenals of white rats, after the *in vivo* administration of sexual hormones with high activity: testosterone, estradiol 17- β and progesterone.

MATERIAL AND METHODS

In the experiments we used albino rats, weighing 100 ± 10 g each. Testosterone (C.I.F.), estradiol-17 β (pur., FLUKA) and progesterone (pro anal., SYNTEX) were administered subcutaneously in oil suspension, for 3 days, a total dose of 25 mg/100 g. The control animals were treated with an equal volume of solvent oil. Methionine-S³⁵ was injected 18 hours before killing the animals, in a dose of 3.5 C/100 g. The separation of proteins was made by a method described by Ivanov *et al.* [4]. The radioactivity of proteins was measured in case of testosterone and of estradiol-17 β treated rats by a "TESLA" nuclear counter (G.M.-1364), and in case of progesterone treated rats by a "VAKUTRONIK" U.A.-Z apparatus (320/2.8 mg/cm²).

RESULTS AND DISCUSSIONS

From table 1 can be observed that in these conditions the testosterone and estradiol-17 β showed marked thymolytic action. On the one hand, this action is manifest by the relative decrease of thymus weight (e.g.: testosterone having the strongest activity, the thymus weight decreased by 51.3 per cent). In this connection, testosterone is followed by progesterone, in which case the thymus weight decreased by 16.0 per cent, and estradiol-17 β , with a thymus weight decrease of 8.9 per cent. On the other hand, it must be mentioned that the incorporation level of labelled amino acid did not follow exactly the weight values found after hormone administration as mentioned above. It is to be noted that though testosterone was the most active (-59.6 per cent), it was followed not by progesterone (-23.0 per cent) but by estradiol-17 β (-34.7 per cent). It may be concluded that methionine-S³⁵ incorporation in thymus proteins diminished significantly in each case of the treatment ($P < 0.05$).

The decrease of total protein content of thymus corroborated with the above data show that after sexual hormones administration an enhancement of protein catabolism in thymus gland occurs.

These results suggest that use of the thymolytic test, for appreciation of changes in the thymus weight, is a method of a relative precision. It seems however, that any of the metabolic transformation in this gland may reflect more sensitively and accurately the thymolytic potential of sexual hormones. Our earlier experiments showed that in case of progesterone administration, there is a determined relationship between the doses used and the variation of the nucleic acid content and Na₂HP³²O₄ uptake [5], [6].

The data in literature in relation with the mechanism of action of the sexual hormones on the thymus are very contradictory. We do not know if these hormones act directly or through the intermedium of other neuro-endocrine mechanisms. Comşa [7] reported that estradiol-17 β could have a direct action upon the thymus, although others showed that this hormone caused an adrenal hypertrophy, which may suggest an interaction of the adrenal hormones in the thymus involution process [8]. Our results showed also that the estradiol-17 β determined an adrenal

Table 1

Variation of the relative weight and methionine-S³⁵ incorporation into the thymus, spleen and adrenal protein after sexual hormones administration

Organ	Group I		Group II		Group III		
	Testosterone (♂)		Estradiol-17 β (♀)		Progesterone (♀)		
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	
Thymus	No. exp.	10	10	10	10	8	8
	Org. weight mg % \pm S.E.	91.1 \pm 7.6	44.4 \pm 4.4	105.3 \pm 9.2	96.7 \pm 8.3	132.2 \pm 10.2	111.8 \pm 8.0
	P	-	< 0.01	-	> 0.05	-	> 0.05
	D \pm %	-	- 51.3	-	- 8.9	-	- 16.0
	No. exp.	9	9	9	9	9	9
	Imp/min/0.1 \pm S.E.	279.7 \pm 28.8	120.2 \pm 8.7	303.7 \pm 25.8	198.1 \pm 31.0	196.0 \pm 14.3	151.0 \pm 10.2
	P	-	< 0.01	-	< 0.02	-	< 0.02
	D \pm %	-	- 59.6	-	- 34.7	-	- 23.0
Spleen	No. exp.	10	10	10	10	10	10
	Org. weight mg % \pm S.E.	272.5 \pm 30.3	280.3 \pm 47.6	305.7 \pm 34.3	289.7 \pm 46.3	433.7 \pm 37.5	425.8 \pm 52.1
	P	-	> 0.05	-	> 0.05	-	> 0.05
	D \pm %	-	+ 3.3	-	- 5.3	-	- 1.9
	No. exp.	9	9	9	9	9	9
	Imp/min/0.1 \pm S.E.	230.6 \pm 35.0	372.2 \pm 69.3	243.0 \pm 31.8	219.2 \pm 30.7	172.5 \pm 17.9	146.5 \pm 15.0
	P	-	> 0.05	-	> 0.05	-	> 0.05
	D \pm %	-	+ 61.7	-	- 9.0	-	- 16.4
Adrenals	No. exp.	10	10	10	10	-	-
	Org. weight mg % \pm S.E.	18.5 \pm 0.8	18.7 \pm 1.2	21.8 \pm 1.8	23.7 \pm 3.1	-	-
	P	-	> 0.05	-	> 0.05	-	-
	D \pm %	-	+ 1.0	-	+ 8.7	-	-
	No. exp.	9	9	9	9	-	-
	Imp/min/0.1	424.5	384.0	467.5	712.5	-	-
	D \pm %	-	- 9.3	-	+ 52.3	-	-

S.E. = standard error

D \pm % = per cent difference reported to the control value

Imp/min/0.1 = counts per minute per 0.1 g of protein

Table 2

Variation of the thymus and spleen total protein concentration after sexual hormones administration

Sexual hormones administrated	Animals	No. exp.	THYMUS			SPLEEN		
			Prot. conc. mg/g \pm S.E.	P	D \pm %	Prot. conc. mg/g \pm S.E.	P	D \pm %
Lot I Testosterone sex: ♂	C	6	146.5 \pm 25.6	—	—	188.0 \pm 40.0	—	—
	T.	6	131.5 \pm 27.5	>0.05	-10.3	155.5 \pm 16.2	>0.05	-17.5
Lot II Estradiol-17 β sex: ♀	C	6	158.3 \pm 34.0	—	—	213.3 \pm 71.6	—	—
	T.	6	127.5 \pm 21.2	>0.05	-19.7	170.8 \pm 50.2	>0.05	-20.2
Lot III Progesterone sex: ♀	C	6	158.3 \pm 34.0	—	—	213.3 \pm 71.6	—	—
	T.	6	154.0 \pm 14.5	>0.05	-2.5	181.2 \pm 36.2	>0.05	-15.4

S.E. = standard error
D \pm % = per cent difference reported to the control value
T = treated animals
C = control animals

hypertrophy, characterized by increase of the organ weight and enhancement of methionine-S³⁵ incorporation.

Comşa [7] and Shibata [9] demonstrated that testosterone and progesterone act upon the thymus by an indirect way, through the thyroid gland. Our data suggest that after testosterone administration the adrenal weight is not modified, but methionine-S³⁵ incorporation decreases by 9.3 per cent. Telegdy *et al.* [10] observed that progesterone do not influence the adrenal weight, though the corticosterone secretion increases slightly.

In case of the spleen we found only insignificant changes from the statistical point of view, the individual differences being too high. We also showed that there exists an essential functional difference between the thymus and other lymphatic organs [5].

From these results it can be concluded:

1. Testosterone, estradiol-17 β and progesterone show thymolytic activity. Among these steroids, testosterone had the highest activity, determining in the weight of rat thymus a 51.3 per cent decrease, and the inhibition of methionine-S³⁵ uptake in thymus proteins by 59.6 per cent.
2. After estradiol-17 β administration, the thymus weight decreased by 8.9 per cent and methionine-S³⁵ uptake by 34.7 per cent.
3. Progesterone activity was more reduced, as compared to that of testosterone (the thymus weight decreased by 16.0 per cent and the methionine-S³⁵ incorporation by 23.0 per cent).
4. The changes occurred in the spleen were insignificant from statistical point of view.

REFERENCES

1. I. COMŞA, *Physiologie et physiopathologie du Thymus*. Ed. Doin, Paris, 1959.
2. H. TESSERAUX, *Physiologie und Pathologie des Thymus*. Ed. J. Barth, Leipzig, 1959.
3. C. KOCHAKIAN and D. HARRISON, *Endocrinology*, 1962, 70, 99.
4. I. I. IVANOV, V. K. MODESTOV, I. M. STUKKENBERG, E. F. ROMANŢEV and E. J. VOROBIEV, *Izotopi radioactivi în medicină şi biologie*. Ed. Med., Bucharest, 1957, p. 171.
5. E. A. PORA, A. ABRAHAM and V. TOMA, *Rev. roum. biol.* 1964-9 (1), 3.
6. E. A. PORA, A. ABRAHAM, V. TOMA and N. ŞILDAN, *Comun. Acad. R.P.R.*, 1963-XIII (11), 977.
7. I. COMŞA, *Ann. Univ. Saaraviensis Med.* 1956 - II (3), 213.
8. I. MILCU, *Studii şi cerc. endocr. (Bucureşti)*, 1963, XIV(2), 157.
9. K. SHIBATA, *Gunma. J. Med. Sci.* 1953, II (1), 93.
10. Gy. TELEGDY, L. HUSZÁR, E. ENDRÖCZY and K. LISSÁK, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 1962-22 (2), 175.

Received June 19, 1964

The Research Centre of Biology
of the Academy of the R.P.R.,
Animal Physiology Department
Cluj

ACTION OF THE GROWTH HORMONE (STH) UPON THE P³² UPTAKE IN THE THYMUS GLAND OF WHITE RATS

BY

V. TOMA, Z. KIS and E. A. PORA

Prolonged STH treatment (6 months) with 2 U.R./100 g daily dose, in white rats, elicit an increase of body weight of about 34 per cent against the controls. The thymus of these animals is enlarged with 36 per cent and P³² uptake is 44 per cent higher than in the controls. The data obtained on the spleen are statistically not significant, what proves the functional differences of the two organs.

The researches of Shibata [8] have shown that the uptake of radio-phosphorus indicates in a significant way the ontogenetic changes of the thymus metabolism. Our experiments with P³²-phosphate and S³⁵-methio-nine have proved that the radiobiological method is very sensitive for observing the different types of involution of the thymus gland [4], [5], [6], [7].

Starting from this consideration we traced the influence of the STH on labelled phosphorus uptake in the thymus-gland, as this problem is still controversial in the literature [2].

MATERIALS AND METHODS

White female rats were used, which weighted at the beginning of experiments 35–40 g. One group of 10 animals were treated for 6 months with 2 U.R. daily injections of Somathor-mone "BYLA" (ser. 03621) per 100 g body weight. A similar group, as normal controls, were injected with an identic volume of the solvent. Both groups were kept under the same condi-tions. After 6 months, to both groups, the labelled phosphate was subcutaneously administered in a dose of 4 microCurie/100 g rat, 24 hours prior to killing with chlorophorm. Thymus and spleen were weighed on the torsion-balance. From their homogenate 50 mg were put on a plate and after drying it 24 h at 100°C the radioactivity of the samples were measured on a B₂

Soviet apparatus with one end-window counter. The obtained values were related to 100 mg fresh tissue and minute, the average values the S.E., the per cent difference against the controls and the significance test after Student were calculated.

RESULTS AND DISCUSSIONS

From our results as summed up in the table bellow it can be seen that the animals treated during 6 months with STH have increased in weight by 34 per cent more than the controls.

The average weight of the thymus gland of these animals was also 36 per cent bigger than in the controls.

Between weight values and P^{32} incorporation a parallelism was found, as the STH treatment increases the P^{32} uptake in the thymus by 44 per cent.

The changes in weight of spleen and of its labelled phosphorus uptake are not directed nor significant. The spleen does not show a dependence of STH, what indicates that it has not a direct action upon the endocrine system.

Our results reveal also the hormonal interaction of the thymus. Smith [2], [3] demonstrated involution of the thymus in hypophisectomized young animals. The works of Bomskov [1] seem to demonstrate that STH would be a thymotrop hormone, its action of growth stimulation being realized through the thymus. Contrary to this opinion are the recent experiments of Comşa [2], which attribute to the thymus only an adjuvant role of the hypophyseal growth hormone, as in thymo-hypophysectomized animals the STH has a quite marked substitutive effect, contrary to thymus extracts, which have no action.

Our experiments, as well as data found in the literature, make us assume that STH administration makes possible the maintenance of thymus gland in function even after puberty, hindering the normal involution of the gland. Keeping in mind that the STH secretion reaches also its maximum in childhood, when the thymus is in full activity, the hypothesis of Bomskov [1] on the thymotrop action of the STH deserves to be reinvestigated. In any case it is sure that the thymus gland has complex relations with the hypophysis, being very sensitive qualitatively to the pituitary factors: ACTH and the Gonadotropines causing its involution, while STH its stimulation.

Summing up, we may assert that prolonged STH treatment (6 months) with 2 U.R./100 g daily dose, in white rats determines an increase of body weight by about 34 per cent against the controls; the thymus of these animals is enlarged by 36 per cent, P^{32} uptake is 44 per cent higher than in the controls.

The data obtained on the spleen are statistically not significant what proves the functional differences between the two organs.

Table
Body, thymus and spleen weight, thymus and spleen index, and radio-phosphorus uptake in these organs, in control (C) and treated (STH) animals

	Body weight g		Weight mg				Index				No. of counts/min. per 100 mg fresh tissue			
	C	STH	Thymus		Spleen		Thymus		Spleen		Thymus		Spleen	
			C	STH	C	STH	C	STH	C	STH	C	STH		
Average of 10 animals \pm S.E.	174	233	138	188	628	597	0.78	0.80	3.60	2.56	1304	1883	1013	1100
	± 1.70	± 2.79	± 1.61	± 1.58	± 31.96	± 28.94					± 16.45	± 23.60	± 30.98	± 59.87
% Difference against controls		+34		+36		-5						+44		+9
P		<0.01		<0.01		>5.00						<0.01		>2.5

REFERENCES

1. BOMSKOV C., HÖLSCHER B., KAULLA K., *Klin. Wochenschr.* 1942, **46**, 1009.
2. COMȘA J., *Physiologie et Physiopathologie du Thymus*. 1959, Ed. Doin, Paris.
3. JUSEFINA E. Z., *Probl. Endocrinol. Gormonol.* 1961, **5**, 110.
4. PORA E. A., TOMA V., OROS I., ABRAHAM A., *Revue de Biologie*, 1962, **1**, 129.
5. PORA E. A., ABRAHAM A., TOMA V., ȘILDAN N., *Com. Acad. RPR.* 1963, **12**, **11**, 997.
6. PORA E. A., TOMA V., MUREȘAN I., BABAN L., *Revue Roum. Biol. sér. Zool.* 1964.
7. PORA E. A., ABRAHAM A., TOMA V., *St. Cerc. Biol. ser. Zool.* 1964, **16**, **1**, 3.
8. SHIBATA K., *Gunma J. Med.*, 1953, **2**, **1**, 93.

Received June 11, 1964

"Babeș-Bolyai" University
Department of Animal Physiology
Cluj

INFLUENCE DE LA SURRÉNALECTOMIE SUR LES ACIDES NUCLÉIQUES, L'ACTIVITÉ TRANSAMINASIQUE ET LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE ET TÉGUMENTAIRE

PAR

MARIA GHIRCOIAȘIU, E. A. PORA, ECATERINA ROVENȚA
et ILDIKO HINTZ

On a suivi l'effet de la surrénalectomie sur les acides nucléiques et sur l'activité transaminasique (GPT) et celle du glycogène hépatique et tégumentaire chez les rats. Les acides nucléiques augmentent dans le foie et dans le tégument tandis que le rapport ARN/ADN diminue dans les deux organes avec l'augmentation de l'ADN. L'activité GPT diminue dans les deux organes et par conséquent la possibilité d'interconversion des réactions métaboliques diminue également, ce qui prouve que la glyconéogenèse des protéines a été entravée et que le glycogène hépatique a diminué d'une manière significative. Dans la peau s'accumule une quantité plus grande de glycogène. Les modifications du foie et du tégument sont parallèles, ce qui confirme le rapport fonctionnel qui existe entre ces deux organes.

Chez les rats ayant subi la surrénalectomie, la glycémie sanguine et le glycogène hépatique ne peuvent se maintenir à un niveau normal. La glyconéogenèse des protéines est retardée. La proportion d'élimination des amino-acides des tissus est réduite d'une manière significative en l'absence des stéroïdes corticaux. Ces déficiences peuvent être dues, en partie, à un état hémodynamique précaire, car chez l'animal qui a subi la surrénalectomie, même quand il est maintenu au chlorure de sodium, la circulation du sang et de la lymphe à travers les viscères ne se fait pas normalement [7], [11].

En administrant des glycocorticoïdes en grande quantité, il se produit une perte sensible de substance corporelle. Le tissu lymphoïde accuse les effets les plus marqués ainsi que la peau, les muscles, et beaucoup d'autres organes internes [15], [23].

Le foie présente habituellement des modifications pondérales assez insignifiantes, car les amino-acides qui proviennent des tissus périphériques sont entraînés dans le foie et catabolisés.

La perte des protéines tissulaires chez les animaux qui ont subi la surrénalectomie est accompagnée d'ostéoporose, la peau devient fragile et la guérison des plaies est lente.

Étant donné l'influence des hormones corticoïdes sur le métabolisme protéique et glucidique et le rapport fonctionnel qui existe entre le foie et le tégument, nous avons essayé de surprendre quelques aspects des modifications biochimiques qui surviennent dans ces organes chez les rats privés des surrénales.

Dans ce but, nous avons pris comme indices de comparaison les acides nucléiques, l'activité transaminasique et le glycogène du foie et du tégument.

L'augmentation des acides nucléiques dans un tissu donné indique une synthèse protéique intense ou un processus de prolifération des cellules [1], [3], [5], [6], [8].

C'est un fait connu que l'activité transaminasique a comme conséquence la constitution de substance corporelle, elle indique le niveau de l'échange, du renouvellement des protéines, soit la synthèse et la dégradation des amino-acides impliqués dans ce processus. Par le mécanisme de transamination, l'organisme a la possibilité de modifier la concentration des différents amino-acides et des acides cétoniques, suivant les besoins spécifiques de chaque tissu [11], [14], [20].

Le glycogène peut nous indiquer la réserve énergétique pour les réactions de synthèse et de dégradation d'un tissu donné.

Les modifications produites dans le foie à la suite de la surrénalectomie sont connues, mais il reste de nombreux problèmes incomplètement élucidés, concernant la manière dont ces modifications se reflètent sur le tégument.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les expériences ont été effectuées sur des rats jeunes, mâles, d'un poids moyen de 120 à 150 grammes, surrénalectomisés en un seul temps. Ils ont reçu quotidiennement, en dehors de la nourriture normale : pain, lait, céréales, une solution de chlorure de sodium à 1%. Au bout de cinq jours, ils ont été décapités et on a prélevé des fragments de foie de la région marginale du lobe et des fragments de peau. Ceux-ci ont été épilés, poil par poil, et nettoyés de la couche adipeuse sous-jacente. Les déterminations des acides nucléiques et de l'activité de la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) ont été faites à l'aide de tissus homogénéisés dans du sérum de Ringer.

Les acides nucléiques ont été dosés selon la méthode spectrophotométrique de Schneider [22] sur 200 mg de tissu (2 épreuves parallèles). Les acides nucléiques ont été extraits par l'acide trichloracétique 5% durant 15 minutes, à une température de 90° Celsius. La densité optique de la solution claire obtenue a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre de type VSU-1 Wasserstoff, lampes H²-0,3 à cuves de quartz de 0,498 cm VEB, longueur d'ondes 270 à 290 m. Les épreuves ont été comparées à la solution d'ARN et d'ADN pur « Chinoin ». Les résultats ont été exprimés en mg/100 g de tissu frais.

La glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) a été déterminée par la méthode de Reithmann-Frankel [4] pour 35 mg de foie homogénéisé avec 15 ml de sérum de Ringer et pour 100 mg de peau homogénéisée avec 10 ml de sérum. Une quantité de 0,1 ml a été introduite à 37°C et laissée 30 minutes dans le substratum amené au pH 7,4 avec tampon phosphate. Les épreuves ont été mesurées par photométrie en visible à une longueur d'ondes de 435 à 480 m μ . Les extinctions ont été rapportées à une courbe-étalon obtenue dans les mêmes conditions, avec du pyruvate de sodium. L'activité transaminasique est exprimée en gamma acide pyruvique libéré par mg de tissu frais pendant 30 minutes à la température de 37°C.

Le glycogène du foie et du tégument a été dosé par la méthode photo-colorimétrique, de Montgomery [18]; les résultats exprimés en mg/100 g tissu frais.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Nos résultats exprimés en rapports statistiques sont présentés dans le tableau 1. On a constaté après la surrénalectomie une augmentation des acides nucléiques intégraux qui, pour le foie, n'est pas significative mais s'élève pour la peau à plus de 26%, ce qui est très significatif.

Les données de la littérature concernant l'effet de la surrénalectomie sur le métabolisme protéique sont assez contradictoires. Certains auteurs ont constaté une action anabolisante parallèle à une action catabolisante.

Dans des recherches parallèles, par lesquelles nous avons suivi l'incorporation de la méthionine S³⁵ dans les protéines hépatiques et tégumentaires, nous avons constaté une diminution de la méthionine dans le foie et une augmentation dans le tégument. Dans les recherches présentes, nous avons trouvé une légère augmentation des acides nucléiques dans le foie, ce qui indiquerait un effet anabolisant qui ne correspond pas aux résultats obtenus à l'aide de la méthionine S³⁵. Ceci peut être dû au fait que nous avons rapporté les résultats obtenus au tissu frais. Or, on sait que la surrénalectomie entraîne une hémococoncentration et par conséquent l'hydrémie hépatique se modifie par rapport aux témoins, ce qui pourrait entraîner des modifications dans les résultats.

En calculant le rapport ARN/ADN, nous constatons sa diminution de 26% pour le foie et de 20% pour la peau. L'ADN se trouve dans les noyaux et l'ARN dans le cytoplasme (d. Palade et Porter) [17]. La diminution de ce rapport après la surrénalectomie, est due, probablement, à la diminution de l'ARN. Reinberg [21] soutient qu'il y a une relation entre l'ARN et le potassium, car il trouve, après des expériences effectuées par l'administration d'hydrocortisone, une diminution parallèle de l'ARN et du potassium, en même temps qu'une faible augmentation de l'ADN.

Les modifications parallèles de la quantité d'ADN et d'ARN dans le foie et la peau montrent une liaison fonctionnelle entre ces deux organes.

L'activité de la glutamate-pyruvate-transaminase a diminué dans les deux tissus étudiés, mais elle n'est significative que dans le foie. Elle pourrait être due aux modifications de perméabilité qui apparaissent à la suite de la surrénalectomie, grâce auxquelles les transaminases peuvent passer facilement dans le circuit sanguin où elles subissent une augmentation [9].

Tableau 1

Valeurs moyennes des acides nucléiques intégraux (AN), de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en mg/100 g, de l'activité transaminasique (GPT) et du glycogène dans mg/100 g de tissu de foie et de tégument des rats qui ont subi la surrénalectomie, par comparaison avec celles des témoins

	FOIE				PEAU			
	No ind.	AN intégr. mg/100 g			No ind.	AN intégr. mg/100 g		
		Tém.	N°	Exp.		Tém.	N°	Exp.
AN mg/100 g test t P Dif. ± %	10	923	8	1 009 1,72 <0,01 +9,64	10	288	8	363 5,30 <0,001 +26,0
ADN mg/100 g								
ADN mg/100 g test t P Dif. ± %	10	186	8	269 4,57 <0,001 +40,31	10	97	8	141 5,54 <0,001 +45,25
GPT								
γ ac. pyr/mg test t P Dif. ± %	9	583	8	361 6,80 <0,001 -38,10	8	56	7	45 1,70 <0,01 -17,80
Glyc.								
Glyc. mg/100 g test t P Dif. ± %	10	1 659	8	1 186 5,02 <0,001 -22,50	10	111	8	153 5,66 <0,001 +37,85

Le co-facteur des transaminases est le pyridoxa 1-5-phosphate qui se forme dans l'organisme de la pyridoxine (vitamine B₆) qui a une action prépondérante sur la peau. La carence de la vitamine B₆ est prouvée le plus souvent par des troubles caractéristiques qui apparaissent sur la peau. A la suite de la surrénalectomie, la synthèse de la vitamine B₆ peut être déficiente ou son absorption par voie intestinale peut être réduite et ainsi l'activité de la transaminase diminue.

Le glycogène diminue dans le foie d'une manière significative. Cette diminution n'est pas due tant à une consommation excessive du glycogène, car les animaux présentent une adynamie, mais au fait que la glycogénèse des protéines est entravée [13]. Les hormones stéroïdes exercent une action sur les enzymes du cycle tricarboxylique de Krebs ; or, si l'activité enzymatique est troublée, la synthèse du glycogène hépatique ne peut plus se faire.

A cause de la faible activité transaminasique, les protéines ne se renouvellent pas, la preuve en est que les acides nucléiques intégraux du foie

n'ont pas augmenté d'une manière significative. Il est prouvé que les transaminases assurent une rapide interconversion des céto-acides — alpha-cétoglutarique, oxalyle-acétique et pyruvique — nécessaires à l'oxydation par la voie du cycle tricarboxylique des métabolites, et ainsi elles participent à la chaîne de la respiration cellulaire. Elles assurent la voie ordinaire de la dégradation oxydative des glucides, des lipides et des protéines [12].

La baisse de l'activité GPT dans le foie des rats qui ont subi l'ablation de la surrénale indique une diminution des possibilités d'interconversion des relations métaboliques, par conséquent la glycogénèse est entravée. Puchol [19] obtient, sur les rats, 8 jours après la surrénalectomie, une baisse de la transaminase hépatique qui entraîne une diminution de 50 à 80% de la glycogénèse des protéines et parallèlement une baisse des amino-acides.

Nous ne possédons pas de données suffisantes pour pouvoir interpréter complètement les modifications apparues dans le tégument. L'activité des transaminases baisse légèrement. Conformément aux données de Troitzki [25], la peau joue un rôle très important dans le dépôt des produits azotés du métabolisme, restés encore incomplètement dégradés. La peau est le tissu le plus riche en azote.

Après la surrénalectomie, l'ADN croît beaucoup dans la peau, ce qui indique une multiplication des cellules. Un fait digne d'être signalé est également l'augmentation importante du glycogène tégumentaire parallèle à la baisse du glycogène hépatique.

Dans la peau se produit un métabolisme glucidique très important [16] ce qui prouve qu'il y a là d'importantes quantités de diastases glycolytiques [2]. La quantité de glucides de la peau augmente par l'administration d'un régime riche en glucides tandis qu'un régime pauvre en glucides la fait diminuer. La glycodermie subit des modifications parallèles à la glycémie [24].

La synthèse et la dégradation du glycogène dans la peau est un processus dynamique et plus rapide que dans le foie [10]. Le glycogène peut s'accumuler dans la peau et constituer une réserve d'énergie pour différents processus métaboliques de la peau [10]. Le déséquilibre du métabolisme glucidique dans le diabète se reflète très rapidement sur la peau, des démangeaisons, des dermatites, des furonculoses apparaissent et une guérison plus difficile des plaies. Dans l'insuffisance cortico-surrénale également, on constate une guérison ralentie des plaies, ce qui peut être mis en relation avec l'augmentation du glycogène cutané, car on sait que dans toutes les affections tégumentaires qui entraînent une prolifération des cellules, cette prolifération est précédée de l'augmentation du glycogène [2], [13].

L'accumulation du glycogène dans la peau peut être attribuée à une mobilisation déficiente de celui-ci, due aux troubles des systèmes enzymatiques et aux modifications de perméabilité consécutives à la surrénalectomie.

CONCLUSIONS

1. La surrenalectomie produit chez les rats une augmentation insignifiante des acides nucléiques dans le foie et une nette augmentation de ceux-ci dans le tégument. Le rapport ARN/ADN a diminué dans les deux organes étudiés par nous, surtout à cause de l'augmentation de l'ADN.
2. L'activité de la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) a diminué dans les deux organes explorés et par conséquent les possibilités de l'interconversion des réactions métaboliques ont diminué également, ce qui prouve que la glyconéogenèse des protéines a été entravée et que par suite, le glycogène hépatique a beaucoup diminué.
3. Parallèlement à la diminution du glycogène hépatique, on a constaté l'accumulation d'une quantité plus grande de glycogène dans la peau.
4. Les données présentées nous autorisent à considérer que, sous l'influence de la surrenalectomie, les modifications du foie sont parallèles à celles de la peau, ce qui confirme l'étroite liaison fonctionnelle qui existe entre ces deux organes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALOV I. A., JIRNOVA A. A., DAN SSSR, 1957, 114, 192.
2. BĂLUȘ N., Dermat., venerol. 1960, 3, 249.
3. БУХОЛОВА А. И., Усп. совр. биол., 1960, I, 4, 101.
4. EAUVERT R., *Technique moderne de laboratoire*, III^e éd., 1961-62, p. 171.
5. DRAGONCEA C., CILIEVICI O., ZELEANU, Morfol. norm. patol., 1963, 4, 309.
6. GHIRCOIAȘIU M., PORA A. E., *Studia Univ. Babeș-Bolyai*, 1963, 1, 117.
7. GOODMAN L., GILMAN A., *Bazele farmacologice ale teraputicij*, II^e éd., Ed. Medicală, Bucarest, 1960.
8. GREISEMER R. D., J. biophys. biochem. Cytol., 1956, 2, 523.
9. KNAPP A., MAUNE R., FISCHER K., FLEISCHMANN K., ROTHMANN M., Derm. Wschr., 1963, 147, 25.
10. KENJI ADACHI M. D., Journ. invest. Derm., 1961, 37, 5, 382.
11. JEAN PATRICIA, Nature, 1961, 191, 4795, 1302.
12. LOWY R., DEROCHE R., TRÉMOLIÈRE J., C. R. Soc. Biol., 1957, 161, 4, 682.
13. MONTAGNA W., *The structure and function of skin*, Acad. Press. N. Y. a. Lond., Ed. II, 1962.
14. LIN E. C., KNOX W. E., J. biol. Chem., 1958, 237, 5, 1186.
15. MANDEL L., RABER A., MANDEL P., C.R. Soc. Biol., 1956, 150, 2, 424.
16. METRELES PINTO M. J., FALCAO L., CRUZ F., MORATO M. J., Ann. Derm. Syph., 1963, 90, 5, 497.
17. MONTES L. F., CURTIS A. C., BLOCK W. D., Dermatologica, 1961, 123, 129.
18. MONTGOMERY, Arch. Biochem. Biophys., 1957, 67, 378.
19. PUCHOL J. R., CARBALIDO A., Med. exp., 1959, 1, 305.
20. МОТОС FL., CONSTANTINESCU S., St. cerc. biochim., 1962, 1, 91.
21. REINBERG A., EDWIN SIDI M. D., SLOKOVSKI J., J. invest. Derm., 1961, 36, 6, 417.
22. SCHNEIDER W. C., J. biol. Chem., 1945, 161, 293.
23. SILBER R. H., PORTER C. C., Endocrinology, 1953, 52, 518.
24. SORU E., *Biochimie medicală*, II^e vol., Ed. Medicală, Bucarest, 1963.
25. Троицкий Ж. А., *Физиология и гигиена кожи сельскохозяйственных животных*, Moscou, 1948.

Reçu le 19 juin 1964

Chaire de Physiologie Animale
Université « Babeș Bolyai »
Cluj

ON THE ADENYL-NUCLEOTIDES OF THE RAT MUSCLE
IN THE COURSE OF ONTOGENESIS

BY

C. WITTENBERGER and MARTA GÁBOS

Determinations of the adenylnucleotides of the gastrocnemius were carried out by an ion exchanger method, along the postnatal ontogenesis of the rat. The total amount of these substances reaches its maximum (18.7 μ moles/g muscle) in animals nearly 1 month old and then decreases. The amount of ATP has a first maximum at the same age, a minimum (5.0 μ moles/g) at about 5 months and a second rise in older age (the oldest animals which were studied were less than two years old); the maximal amount of ATP is about 9 μ moles/g. The quantity of ADP has an approximately opposite variation, oscillating between 1.8 and 7.4 μ moles/g. The amount of AMP (including also other nucleotides and free bases) has an increase in the first weeks of life and then decreases. Considerations are made on the ontogenetical correlations of some of these variations.

The existing data on the functional ontogenesis of the mammals' striated muscle have permitted the elaboration of a conception — especially in Orbeli's school — on the maturation of the contractile function. In broad lines, the ontogenetic development goes from a tonic, slow muscular type, with a great degree of functional autonomy, to a tetanic, rapid one, which is well integrated by the nervous control in the functional whole of the organism [6]. However, there are rather few data about the ontogenesis of the muscular metabolism. Concerning the high-energy substances, there are some evidences of ontogenetical variations, but our knowledge on the development of the high-energy system of the muscular tissue is still insufficient.

It is known, that in the course of foetal life the quantity of the muscular ATP and CP grows progressively. This growth continues also in the postnatal life, reaching a maximum in the adult animal; in older ages, the amount of these substances diminishes [3], [4], [10]. Researches made on the rat seem to indicate that the maximum is reached by the age of one year [4], [10]. The experiences were, however, carried out by comparing

adult rats (1 year old) with very young ones (some days or one month of age); thus, long ontogenetic periods, including such important moments as the appearing of walking, the transition from the lactic to the mixed alimentation, the sexual maturation, etc., remained unexplored. On the other hand, in the majority of researches, determinations were made with methods which did not permit the separation of ATP and ADP and consequently the evaluation of the percentage of high-energy substance proper.

In the present study, we try to bring some more precise data, by separate determination of the ATP and ADP and by reducing the intervals between the age groups.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on white rat's gastrocnemial muscle. The animals' age varied from one day to nearly two years. Having no possibility to know exactly the age of all the animals, we have expressed our results as function of their weight. For smaller individuals, we took the whole muscle (in the animals below 10 days, we needed to take 2-4 individuals to obtain the necessary 25-50 mg of muscle); in the greater ones, with the gastrocnemius differentiated in a white and a red part, we took the white portion only.

After decapitation of the animals, the legs were cut immediately, for avoiding the strong contractions of the musculature; a muscle piece was excised, rapidly weighed on a torsion balance and introduced in ice-refrigerated trichloroacetic acid solution (1 ml, 6%). All this lasted not more than 4-8 minutes. A few experiments carried out with immediate freezing

Table 1
Limits corresponding to the weight-groups

No. of the group	Weight in grams		Approximate age
	minimal	maximal	
I	6	7.8	1-2 days
II	8	10.8	3-5 days
III	11	14.8	6-10 days
IV	15	20	2 weeks
V	20.5	26.5	
VI	27	37	3 weeks
VII	38	50	
VIII	51	67	1 month
IX	68	93	
X	94	125	2 months
XI	126	170	4-6 months
XII	171	230	
XIII	231	310	18-22 months

of the leg after amputation (at -75°C) gave the same results (the isolation of the muscle was, however, much more difficult).

After one hour extraction in cold, dilution with distilled water in proportion of 500 ml to 1 g tissue, alcalinization at $\text{pH} = 9.5$ and filtration, the nucleotides were determined by the method of Cohn and Carter [2], on a Dowex-1 column (granulation 30-100 mesh, diameter

1 cm, height 6-8 cm) and with a three-steps elution. Thus, the first eluate contained, besides the AMP, also the adenosine, the free adenine and the IMP [1], [2].

We made 87 experiments. The animals were distributed in 13 weight-groups, established on a logarithmic basis (Table 1) and which comprised 3-10 experiences each group. The ontogenetic variations were considered only when the differences between the means of the groups were statistically significant ($P < 0.05$).

RESULTS

We found the following quantities of the determined fractions:

ATP... 5.0-8.9 μ moles/g (2.5-4.5 $^{\circ}/_{\infty}$)

ADP... 1.8-7.4 μ moles/g (0.8-3.1 $^{\circ}/_{\infty}$)

AMP... 2.4-6.0 μ moles/g (0.8-2.1 $^{\circ}/_{\infty}$)

(including also IMP, adenosine and adenine). These figures are mean values of the weight groups.

The total amount of these substances was between 13.0 and 18.7 μ moles/g.

In the course of ontogenesis, there are variations of the total quantity of nucleotides. After some irregular and statistically insignificant oscillations in the 6-50 g rats, the quantity diminishes. Between the VIIth and the XIIIth weight-group (35-50 g, respectively over 230 g animal), the difference is highly significant ($P < 0.01$) (Fig. 1).

The quantities of the three determined fractions show also ontogenetic variations. The ATP increases up to the VIIth group and thereafter diminishes till the XIth group (125-170 g rats). In the more aged animals there appears a new rise, the ATP value nearing the VIIth group maximum values (Fig. 2).

The quantity of the ADP diminishes with age, reaching a minimum in the IXth group (67-93 g). Thereafter, there is a rise and, in the last group, a new decline (Fig. 3).

The third fraction (AMP, IMP, adenosine, adenine) increases with the age up to the Vth group (20-27 g) and diminishes thereafter till the old age (in the limits explored by us) (Fig. 4).

By expressing the results as percentages of the total quantity of adenine

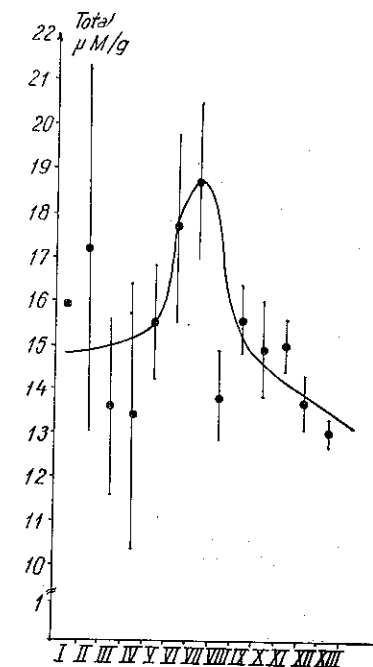


Fig. 1. — Ontogenetic variation of the total amount of adenyl nucleotides in the gastrocnemius of white rat. Abscises: groups of weight; ordinates: μ moles of nucleotide on gram of tissue (wet weight). Vertical lines: standard error of the means.

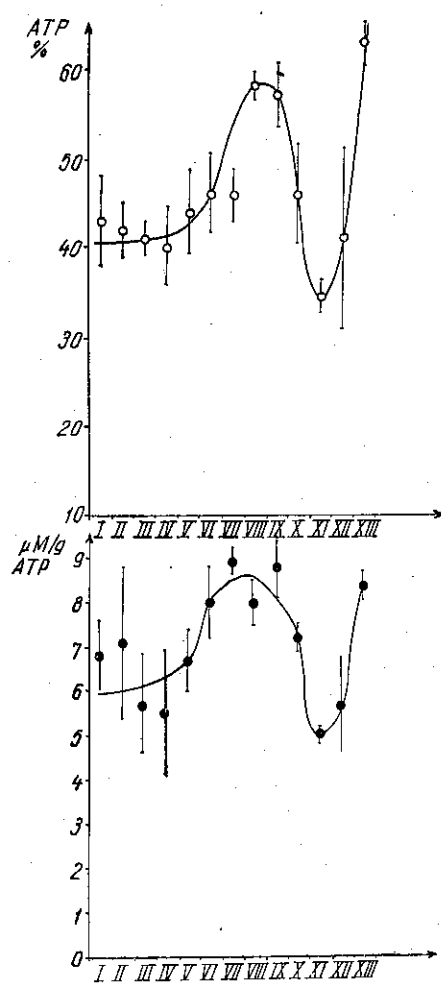


Fig. 2. — Ontogenetic variation of ATP amount in the white rat's gastrocnemius. Lower curve: μ moles of ATP on gram of tissue; upper curve: percentages of ATP related to the total quantity of adenine; abscisses: groups of weight. Vertical lines: standard error of the means.

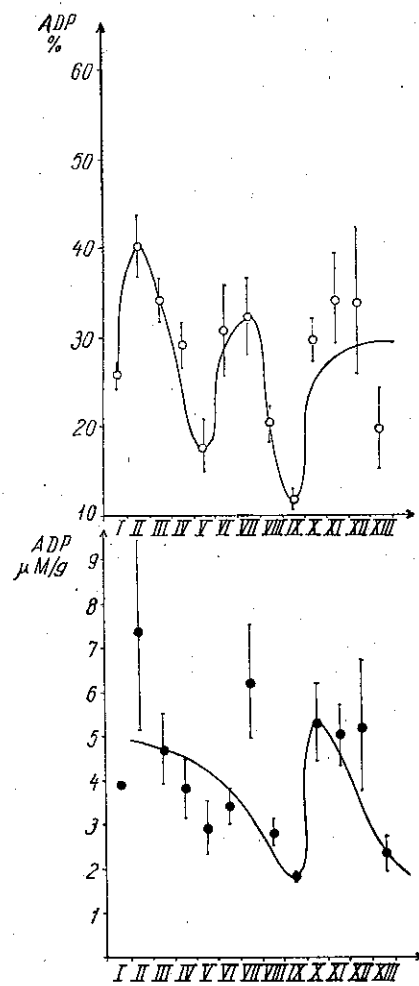


Fig. 3. — Ontogenetic variation of ADP amount. (See explanation of fig. 2).

(+ inosine), we obtain similar curves. The ATP percentage curve has its first maximum in the VIIIth group (50–67 g), its minimum in the XIth group (125–170 g) and its second maximum in the XIIIth one (over 230 g) (Fig. 2). For the ADP, the curve has a number of maxima and minima (Fig. 3). The AMP percentage curve almost coincide with that constructed with the absolute values (Fig. 4).

DISCUSSIONS

Our results show ontogenetic variations of the total adenyl-nucleotide content of the muscle and also of the ratios between the single nucleotides. Some of these modifications can be brought into relation with crucial moments of the development of the rat. So, the total nucleotide quantity and that of the monophosphate and free base fraction diminish from the age of 2–3 weeks on; this is the age of transition to a mixed alimentation. The ATP reaches its minimum in the 125–170 g rats (nearly 5–6 months old), corresponding approximately to the period of the sexual maturation.

It is known that the tetanic muscles have more ATP than the tonic ones [7]. We don't know any data on the age by which the rat's gastrocnemius reaches its functional maturity from the point of view of the degree of tonicity. The electrical polarisation of this muscle reaches its maximal value about the period of sexual maturation [9]. In our experiments, we found the maximum of ATP-curve much before the sexual maturity. On the other hand, it is probable that there is no strong parallelism between the variation of the quantity of ATP and that of the degree of tonicity: we found a minimum of the ATP-curve in young adults, in which we cannot suppose a return to an increased tonicity. The second maximum was found, however, at an age by which the rat's gastrocnemius behaves as one of the most tetanic muscles from the point of view of the phosphorus exchange [11]. As concerns the old animals, we did not observe a decrease of the amount of ATP, as stated in the cited literature. On the contrary, in the

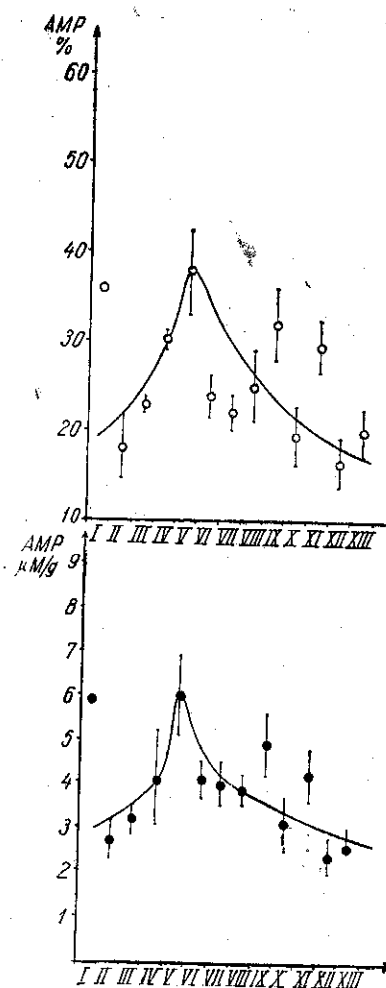


Fig. 4. — Ontogenetic variation of AMP amount (including IMP and free bases) (See explanation of fig. 2).

rats over 200 g, we found an obvious increase of the amount of ATP and ATP/ADP ratio. Our oldest animals were, however, under two years of age, while the conclusions of the cited authors were drawn from experiments on older animals.

Some data in the literature relate the fact that increases of the amount of ATP take place after a certain degree of development of the motor function had been overpassed. So, the high-energy substances appear in great quantity in the muscles after the spontaneous movements of the embryo had appeared [8], and after a great increase of the quantity of actomyosin [5]. Our results show an evident increase of the amount of muscular ATP starting with the IVth weight-group, that is in rats over 15–20 g. That means that the quantity of ATP increases after the appearance of normal movements of walking (in 10–15 g rats), a result that is in good agreement with the above cited literature data.

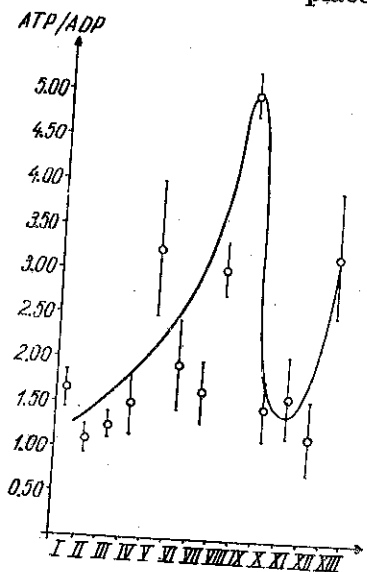


Fig. 5. — Ontogenetic variation of the ATP/ADP ratio. Abscisses: groups of weight; ordinates: the ratio between the values expressed as μ moles/g.

The variation of the ADP is approximately the opposite of that of the ATP. This shows that the observed variations are especially displacements of the equilibrium $\text{ADP} + \text{P} \rightleftharpoons \text{ATP}$. The same conclusion can be drawn from the variation of the ATP/ADP ratio (Fig. 5): the maximal value of this ratio is nearly 5 times greater as compared to the minimal value, while in the case of the ADP the maximal level of the curve is only 3.5 times higher than the minimal one, and for ATP it does not reach the double of the minimum.

We cannot give any interpretation of the variation of the monophosphate and free base fraction. However, we note that, in older age, all the fractions are decreased, excepting the ATP. This fact can be understood as a diminution of the supply of the substances on the account of which the high-energy material can be constructed.

CONCLUSIONS

1. The white rat's gastrocnemius contains 2.5–4.5 ‰ ATP, 1–3 ‰ ADP and 1–2 ‰ AMP, IMP, adenosine and adenine.
2. In the course of the postnatal ontogenesis, the amount of ATP has a maximum in approximately one month aged rats (50 g), a minimum in those of about 5–6 months of age (150 g), and a new increase in the

older ones. The quantity of ADP varies nearly viceversa. The amount of the fraction comprising the monophosphate nucleotides and the free bases increases along the first weeks of life and then decreases.

REFERENCES

1. Bíró E., in Kovács A., *A kísérleti orvostudomány vizsgálati módszerei*, IV, 109–196. Akad. Kiadó, Budapest, 1958.
2. COHN E. W., CARTER E. C., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 9, 4273.
3. ЭПШТЕЙН В. Е., in *Механизмы старения*. Госмедиздат. Укр. ССР, Киев, 1963, 101–104.
4. ЭПШТЕЙН В. Е., Матер. 6-й научн. конфер. по вопр. возраст. морфол., физиол. и биохим., 512–513, Издат. Акад. педаг. наук РСФСР, Москва, 1963.
5. HERRMANN H., COX M. W., *Amer. J. Physiol.*, 1951, **165**, 711–715.
6. ХУДОРОЖЕВА Т. А., *Изв. Акад. наук СССР, Сер. биол.*, 1949, **5**, 617–636.
7. ЯКОВЛЕВ Н. Н., *Ж. общей биол.*, 1958, **19**, 6, 417–427.
8. KOSCHOTJANZ CH., RYBINOWSKAJA A., *Pflüger's Archiv für die ges. Physiol.*, 1935, **235**, 416–421.
9. МАРТЫНЕНКО О. К., in *Механизмы старения*, Госмедиздат Укр. ССР, Киев, 1963, 290–293.
10. НИКИТИН Н. В., ИВАНЕНКО В. Т., *Труды Инст. Биол. и Биол. ф-та. Харьков Унив.*, 1962, **33–34**, 141–146.
11. WITTENBERGER C., STOICOVICI F., *Studii și cerc. biol. (Cluj)*, 1962, **13**, 1, 143–149.

Received October 27, 1964

The Research Centre for Biology
of the Academy of the R.P.R.,
Animal Physiology Department
and
"Babeş-Bolyai" University,
Faculty of Natural Sciences and
Geography
Department of Animal Physiology
Cluj