

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef:

EUGEN PORA, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Rédacteur en chef adjoint:

R. CODREANU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Membres:

MIHAI A. IONESCU, MIHAI BĂCESCU, OLGA NECRASOV, GRIGORE ELIESCU, membres correspondants de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; 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 adressées 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.

Le manuscrits, les livres et les revues proposés en échange, ainsi que toute correspondance seront envoyés à la rédaction: 296, *Splaiul Independenței*, Bucarest, Roumanie.

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE

—SÉRIE DE ZOOLOGIE—

TOME 11

1966

N° 4



SOMMAIRE

| | Page |
|---|------|
| HALINA BALIŃSKA, Food preference in rabbits with hypothalamic lesions | 243 |
| J. DOMONKOS, L. HEINER und MAGDA STIPULA, Zusammenhang zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und Atrophie im tonischen und tetanischen Muskel | 249 |
| KATARINA ISAKOVIĆ and B. D. JANKOVIĆ, Prolongation of homograft survival in chickens following <i>in ovo</i> transplantation of allogeneic thymus | 255 |
| G. KOLOSVÁRY, Clepsydration und Thamnasterisation in Pelson-Delta-Korallen. Ein palaeophysiologisch-phylogenetisches Studium | 261 |
| П. А. КОРЖУЕВ, Эволюция функции дыхания в филогенезе позвоночных животных | 267 |
| Б. И. КОТЛЯР, Некоторые данные электроэнцефалографического исследования условно-рефлекторной деятельности | 275 |
| T. KOVÁCS and B. SZABÓ, Effect of cholinesterase inhibitors on the cation-transport in frog muscle | 281 |
| A. KÖVÉR, M. SZABOLCS, L. KOVÁCS and M. RÁCZ, Studies on the sarcoplasmic reticulum of fish (<i>Amiurus nebulosus</i>) muscle | 287 |
| Г. А. МАЛЮКИНА, ИОН ЧАУШЕСКУ, Исследование роли хеморецепции в сложных формах поведения у рыб | 293 |
| I. MANTA et D. BEDELEANU, Sur les mécanismes de l'homéostasie glycémique dans l'athéromatose expérimentale | 301 |
| CONSTANȚA MATEI-VLĂDESCU, Seasonal variations of hyperglycemic reactivity to adrenalin in anura | 309 |

FOOD PREFERENCE IN RABBITS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS *

BY

HALINA BALIŃSKA

It is commonly accepted that lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus produce a considerable increase in food intake associated with an elevation of body weight. This is characteristic of the dynamic phase of hypothalamic hyperphagia. After the animals become obese, the food intake decreases, and the weight level remains fairly constant. This high plateau in weight level is characteristic of the static phase of hypothalamic hyperphagia.

On the other hand, it has been shown that lesions in the lateral hypothalamus interfere with food and water intake and lead to starvation and death. It has been shown by a few authors in their experiments on aphagic rats, that a lesion of the lateral hypothalamus results in an aversion to standard food and water but it need not necessarily result in the starvation (Teitelbaum 1955, Teitelbaum and Campbell 1958, Graff and Stellar 1962). It has furthermore been shown that a food preference is manifested by aphagic rats which eagerly eat a liquid and tasty food. Moreover, it has been found that rats with lesions of the lateral hypothalamus display hyperphagia when fed on a liquid and tasty food. However, they continue to refuse water and standard food. After a long period of eating tasty food, the animals with lateral hypothalamic lesions return to their previous food but they eat only small amounts of it and lose weight.

Our investigations aim at studying the effect of lesions of the medial or lateral hypothalamus in rabbits on feeding behavior. All the animals used were fed in the experimental situation in which food was presented in response to the instrumental reflex activity. In addition, the technique of the presentation of two kinds of food was used to reflect the food preference of the operated rabbits.

Experiments were performed on adult rabbits. Two type II, according to Konorski and Miller (1933), conditioned reflexes reinforced by two kinds of food were established in these animals. During experiments, the animals ate *ad libitum*, that is as long as they performed the conditioned

* Work presented at the First Session of Animal Physiology (Cluj, 25—28 May 1965).

reflexes, thus controlling the quantity and quality of the food presented. Lesions were placed stereotaxically and verified histologically.

Between the second and fifth day after the medial hypothalamic lesions a hyperphagia occurred. The hyperphagic rabbits showed great voracity in both the experimental situation and their living cages. A considerable preference for oats and potatoes was consistently observed after lesions of the medial hypothalamus, which was in a contradistinction

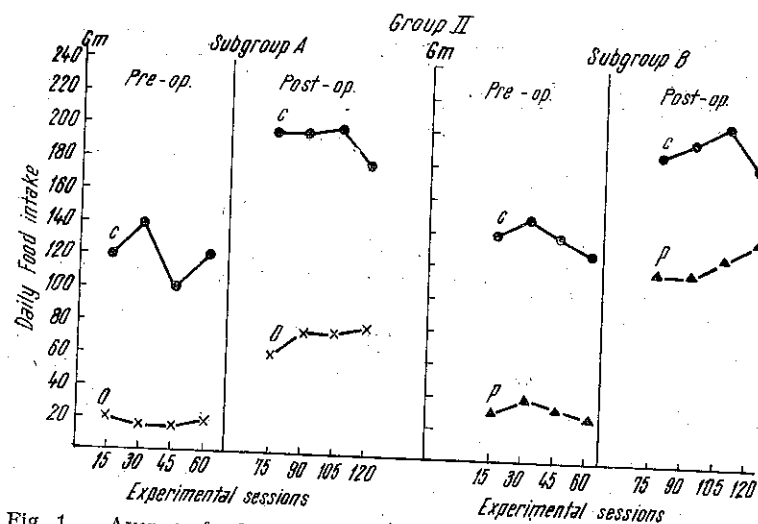


Fig. 1. — Average food intake in Group II animals before and after ventromedial hypothalamic lesion in a situation in which two kinds of food (carrots and oats in Subgroup A, or carrots and potatoes in Subgroup B) were offered at the same time. C, carrots; O, oats; P, potatoes. Each point corresponds to average size of daily food intake obtained from 15 experimental sessions.

to the preoperative period when the animals displayed a strong preference for carrots.

Teitelbaum (1955) and other authors found that rats in the static phase of hyperphagia show a preference to certain kinds of food and that taste characteristics are the major factors determining the food preference. However, our experiments indicate that the food preference also occurs in the dynamic phase of hyperphagia. An increased drive for the food with a lower water content (oats and potatoes) was found in all our rabbits with medial hypothalamic lesions which were in the dynamic phase of hyperphagia. It is likely that the preference for the food with a lower water content may be related to the damage to the anatomical connection between the area paraventricularis and the area preoptica where one of the centers is located controlling the water balance (Nauta 1961, Anderson and McCann 1956, Andersson and Wyrwicka 1957).

Following lesions of the medial hypothalamus, an increase in the conditioned reflex activity occurred. It was particularly clear with regard to the conditioned reflex activity associated with the presentation of the preferred food, that is oats and potatoes (Balińska 1961, 1963a).

The findings that increase in the food intake is associated with an increase in conditioned reflex performance in animals with medial hypothalamic lesions may be explained in terms of an excess in the activity of the functional connections between the "feeding center" and "conditioned reflex center", which was postulated by Wyrwicka (1952). It is possible that the increased conditioned reflex activity following lesions of the medial hypothalamus is a release phenomenon resulting from the abolition of the

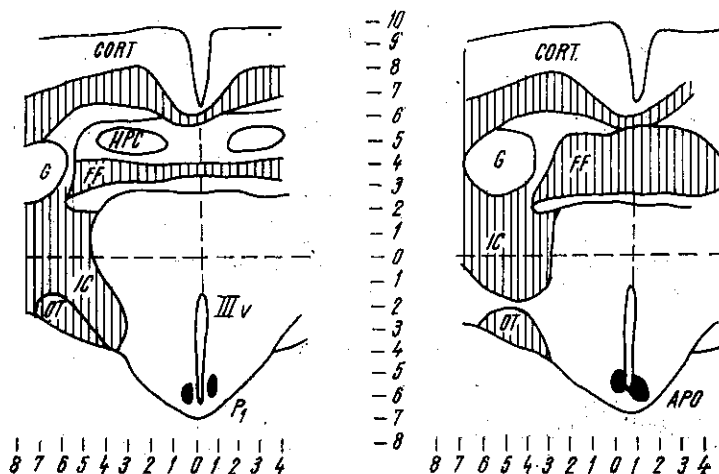


Fig. 2. — Examples of reconstructions of ventromedial hypothalamic lesions described in the text.

CORT — cerebral cortex, FF — the fimbria of the fornix, G — the mammillothalamic tract, HPC — the hippocampus, IC — the internal capsule, OT — the optic tract, IIIv — the third ventricle.

inhibiting influence exerted by the "satiety center", located in the medial hypothalamus.

All the lateral hypothalamic animals refused to eat and drink post-operatively. In their living cages, the lateral hypothalamic animals crouched or sat immobile for hours, ignoring the ordinary food. To keep the animals alive and to prevent an excessive dehydration, the aphagic rabbits were given isotonic saline solution with glucose which was injected subcutaneously every day. After the recovery of motility a slight increase in food drive manifested by approaching the food bowl, sniffing it and even attempts at eating were observed. When after a few days of aphagia, the rabbits with lateral hypothalamic lesions started eating, the injections of saline solution were discontinued. In all cases, there was an identical order of the recovered food intake. First, the rabbits accepted carrots and potatoes, and then oats. Within two months following surgery all animals with lesions of the lateral hypothalamus became hyperphagic (Balińska 1963b).

In view of the existence of the functional relationship between the hypothalamic lateral and medial feeding centers it may be speculated that a destruction of one of them causes the supremacy of the other. When the laterally located "feeding center" is damaged, the medially located "satiety center" takes therefore the upper hand. This results in aphagia and

adipsia. However, due to hydration procedure, conditions are brought about more favorable to setting in operation mechanisms increasing the food intake.

Under our conditions, testing was resumed when lateral hypothalamic rabbits started eating in their living cages. An abolition of conditioned reflex performance was consistently observed after lesions of the lateral hypothalamus. Despite a full motor efficiency after recovery from aphagia,

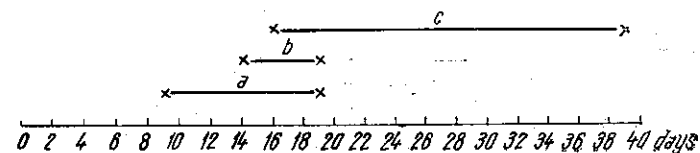


Fig. 3. — Recovery of food conditioned reflex type II activity in individual rabbits after lateral hypothalamic lesion. Horizontal lines indicate time extent of recovery of conditioning: a — basic food oriented reactions in the experimental situation; b — recovery of the first conditioned reflex; c — recovery of the second conditioned reflex.

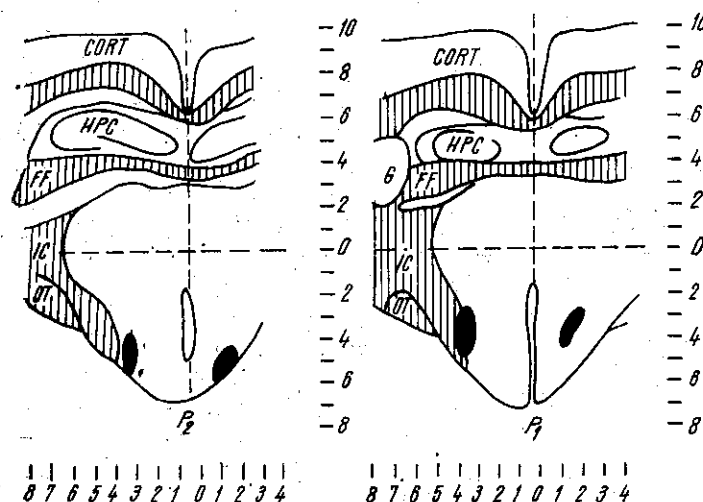


Fig. 4. — Examples of reconstructions of lateral hypothalamic lesions described in the text.

CORT = cerebral cortex; FF = the fimbria of the fornix; G = the mammillo-tegmental tract; HPC = the hippocampus; IC = internal capsule; OT = the optic tract.

the rabbits did not perform any of the previously acquired conditioned reflexes. However, they displayed a marked food-oriented activity in terms of making efforts to reach for the food directly. The absence of the conditioned reflexes persisted for several days. With time, a gradual recovery of conditioned reflexes was observed. The first attempts were very clumsy and concerned only the conditioned reflexes associated with the presentation of carrots. After a few days, the feeding reactivity was

increasing also in relation to the other type of food. This was followed by a recovery of the second conditioned reflex.

The initial postoperative impairment of conditioned reflex in rabbits with lesions of the lateral hypothalamus is obviously associated with an abolition or reduction of the food drive. The absence of the conditioned reflex, despite signs of increasing food drive in the later postoperative period, can be related to the motivating and feeding activity of the lateral hypothalamus (Morgane 1961).

To sum up, the results of the present experiments show that, in addition to an increased food intake and preference to oats and potatoes over carrots, an increase in the preoperatively trained instrumental conditioned reflex activity occurred in rabbits with medial hypothalamic lesions who were in the dynamic phase of hyperphagia. On the other hand, the rabbits with lateral hypothalamic lesions showed a temporary aphagia. However, with time the laterally lesioned animals recovered their preoperative level of eating. Immediately after the lateral hypothalamic lesions, conditioned reflex activity was lost. Despite a clear-cut food-directed activity, the lateral hypothalamic animals were unable to perform the preoperatively acquired instrumental food response. However, late after surgery the conditioned reflex activity fully recovered. Furthermore, following the recovery of the conditioned reflex activity the laterally lesioned animals preferred to eat carrots over oats and potatoes.

REFERENCES

1. ANDERSSON B., MCGANN S. M., Acta Physiol. Scand., **35**, 312, 1956.
2. ANDERSSON B., WYRZYCKA W., Acta Physiol. Scand., **41**, 194, 1957.
3. BALIŃSKA H., Acta Physiol. Polon., **12**, 495, 1961.
4. BALIŃSKA H., Acta Biol. Exper. (Warsaw), **23**, 33, 1963a.
5. BALIŃSKA H., Acta Biol. Exper. (Warsaw), **23**, 115, 1963b.
6. GRAFF H., STELLAR E., J. comp. physiol. Psychol., **55**, 418, 1962.
7. KONORSKI J., MILLER S., *Les principes fondamentaux de la théorie physiologique des mouvements acquis. Les réflexes conditionnels moteurs*, Warszawa-Lwow, Książnica Atlas T.N.S.W., 1933. (In Polish with French summary).
8. MORGANE P. J., Feder. Proc., **20**, 1, 1961.
9. NAUTA W. J. H., J. Anat. Physiol., **95**, 515, 1961.
10. TEITELBAUM P., J. comp. physiol. Psychol., **48**, 3, 1955.
11. TEITELBAUM P., CAMPBELL B. A., J. comp. physiol. Psychol., **51**, 135, 1958.
12. WIRZYCKA W., Acta Physiol. Polon., **3**, 161, 1952.

Laboratory of Animal Physiology, University of Lodz,
Lodz, Poland

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN
KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL UND ATROPHIE
IM TONISCHEN UND TETANISCHEN MUSKEL *

VON

J. DOMONKOS, L. HEINER und MAGDA STIPULA

Es wurden die Zusammenhänge zwischen den in tonischen und tetanischen Muskeln auf die Denervation zustandekommenden Veränderungen des Stoffwechsels und der Atrophie studiert. Im tonischen Muskel ist eine Atrophie früher nachweisbar als im tetanischen. Der Atrophierungsprozeß geht während der untersuchten 2-3-wöchigen Periode den Stoffwechselveränderungen nicht in jeder Hinsicht parallel. Die Aktivität des glykolytischen Systems ist auf den Einfluß der Denervation schon vor dem Zustandekommen der histologisch nachweisbaren Atrophie verändert, während die Veränderungen des oxydativen Stoffwechsels erst während der histologisch nachweisbaren Atrophie zu beobachten sind. Wegen der im glykolytischen und oxydativen Stoffwechsel der beiden Muskeltypen nach der Denervation beobachteten entgegengesetzten Veränderungen können diese beiden Vorgänge nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Atrophie gebracht werden.

Morphologen haben schon vor hundert Jahren beobachtet, daß in der Skelettmuskulatur weiße und rote Muskeln vorkommen. Die Trennung dieser beiden Muskeltypen ist bei den phylogenetisch tieferstehenden Lebewesen viel ausgeprägter als bei den höheren. Besonders bei Vögeln und Kaninchen sind die farblich abweichenden Muskelgruppen deutlich zu unterscheiden. Beim Menschen und Affen kommen die beiden Muskelarten bzw. -fasern gemischt vor. Die Fasern der roten Muskeln sind kürzer, enthalten mehr Sarkoplasma und weniger Myofibrillen, sind längsgefasert und weniger quergestreift. Die Fasern der weißen Muskeln sind durchscheinend, gekreuzt und weniger sarkoplasmahaltig.

Physiologischen Beobachtungen zufolge ist die Kontraktion der roten Muskeln eine langsamere, diese Muskeln sind weniger ermüdbar und bei Stimulation mit niedrigen Frequenzen tritt schneller Tetanisierung ein als bei den weißen Muskeln. An Hand physiologischer Untersuchungen hat man auch eine Parallele zwischen Farbe und Bewegungstyp der Mus-

* Diese Arbeit wurde auf der ersten Tagung für Tierphysiologie vorgetragen (Cluj, 25.-28. Mai 1965).

kulatur zu ziehen versucht und die roten Muskeln mit den prolongierten, sog. tonischen, Antigravitationsfunktionen, und die weißen, bzw. hellen Muskeln mit den kurzfristigen, intensiven, sog. tetanischen, lokomotorischen Funktionen in Beziehung gebracht.

Wir beschäftigen uns seit mehreren Jahren mit dem Kohlenhydratstoffwechsel der beiden Muskeltypen [1]—[3] und haben feststellen können, daß die tetanischen Muskeln über einen größeren glykolytischen, und die tonischen über einen größeren oxydativen Stoffwechsel verfügen. Unter aeroben Bedingungen wird im tetanischen Muskel mehr Glykogen verbraucht als im tonischen. Im tetanischen Muskel ist eine Laktat- und Pyruvatbildung zu beobachten, im tonischen dagegen nicht. Die O_2 -Aufnahme, sowie die Aktivität des Citronensäurecyclus des tonischen Muskels beträgt rund das Zwei- bis Dreifache des tetanischen.

Wir haben weiter untersucht, durch welche Faktoren die Stoffwechseldifferenzen in den über verschiedene biologische Aufgaben bzw. Funktionen verfügenden Muskeln hervorgerufen, bzw. aufrechterhalten werden. In Denervations- und Immobilisationsversuchen stellten wir fest [4], [5], daß mit dem Erliegen der Funktion auch die Differenzen im Kohlenhydratstoffwechsel zwischen den beiden Muskelarten verschwinden. Auf Grund unserer Befunde nehmen wir an, daß für das Zustandekommen und die Aufrechterhaltung der Stoffwechselbesonderheiten die den beiden abweichenden biologischen Aufgaben entsprechenden, speziellen Funktionen und das Nervensystem gemeinsam verantwortlich zu machen sind.

In diesen Versuchen zeigte sich, daß nach der Denervation die Muskelatrophie im tonischen und tetanischen Muskel nicht gleichen Grades ist. Im tonischen Muskel ist schon nach ungefähr einer Woche, im tetanischen aber erst zwei Wochen nach der Denervation mit bloßem Auge eine Atrophie festzustellen.

Die gegenwärtigen Untersuchungen bezwecken die Klärung der Frage, inwiefern die im Anschluß an die Denervation auftretenden Stoffwechselveränderungen mit dem Entstehen der Atrophie in den beiden Muskeltypen in Zusammenhang zu bringen sind.

Die Denervation erfolgte mittels Durchtrennung des N. ischiadicus der einen Seite bei erwachsenen, bei normaler Diät gehaltenen Kaninchen. Als Kontrolle diente die hintere Extremität der intakten Seite. Als tonischer Muskel wurde der M. soleus, und als tetanischer der M. semimembranosus benutzt. Die Untersuchungen wurden an insgesamt 20 Tieren derart vorgenommen, daß im Anschluß an die Denervation zweitäglich bis zum 20. Tage je zwei Tiere aufgearbeitet wurden.

Die histologische Untersuchung erfolgte nach Formalinfixierung, Alkoholdehydratation und Paraffineinbettung an Hämatoxylin-Eosin-van Gieson-gefärbten Schnitten bzw. mittels PAS-Reaktion.

Die Glykogenbestimmungen wurden an den sofort nach der Tötung der Tiere entnommenen Muskeln nach der Methode von Seifter und Mitarb. [6] durchgeführt. Die Muskelzellphasenbestimmung beruht nach den Ergebnissen von Lilienthal und Mitarb. [7] auf der Bestimmung der nicht kollagenen Proteine. Nach Vorbehandlung der homogenisierten Muskeln mit 0,05 n NaOH wurde das eluierte Eiweiß nach Hiller [8] bestimmt.

Nach unseren Befunden verfügen beim Kaninchen der rein tonische M. soleus und der rein tetanische M. semimembranosus über ein unterschiedliches, und für die einzelnen Muskeln typisches Gewebsbild.

Im Laufe der Versuche sahen wir, daß nach der Nervendurchtrennung die Atrophie des tonischen und des tetanischen Muskels nicht gleichen Grades war. Diese Beobachtung deckt sich mit den diesbezüglichen Befunden von Dreyfus und Schapira [9].

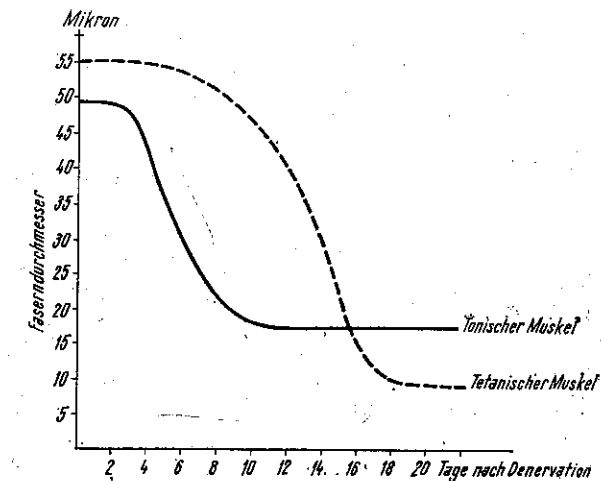


Abb. 1

Die ersten postdenervatorischen Veränderungen traten im tonischen Muskel 6 Tage nach der Operation auf. Stellenweise erschienen zentrale Kernreihen, und die sublemmalen Kerne waren etwas vermehrt. Es erschienen auch dünnere Fasern von etwa 25—30 μ Durchmesser. Zur gleichen Zeit waren im tetanischen Muskel — abgesehen von einigen zentral gelegenen Kernen — keine Veränderungen festzustellen. Auch 10—12 Tage nach der Denervation ist die Atrophie im tonischen Muskel immer noch ausgesprochener als im tetanischen. Am 14. postoperativen Tage erreicht die Atrophie im tetanischen Muskel ungefähr den Grad, wie wir ihn im denervierten tonischen Muskel am 6.—8. Tage sehen, während im tonischen Muskel bereits eine sehr ausgeprägte Atrophie besteht. 16—20 Tage nach der Operation ist der Unterschied zwischen den beiden Muskeltypen schon nicht mehr zu erkennen.

Das Verhältnis der Atrophie der beiden Muskeln ist in Abbildung 1 dargestellt, wo die Stärke der Muskelfasern und die Verminderung des Durchmessers in Mikron angegeben ist. Diese Abbildung führt den Unterschied im Prozeß der Atrophie in beiden Muskeln deutlich vor Augen.

Die auf den Einfluß der Denervation im Kohlenhydratstoffwechsel der beiden Muskeln eintretenden charakteristischen und bestverfolgbaren Veränderungen machen sich im Glykogengehalt bemerkbar. In der ersten Woche nach der Denervation weist der Glykogengehalt des tonischen Muskels eine Verringerung, und der im tetanischen einen Anstieg auf, während nach der ersten Woche im tonischen Muskel eine Zunahme, und im tetanischen

nischen eine Verringerung zu verzeichnen ist (Abbildung 2). Signifikante Veränderungen in der Sauerstoffaufnahme der beiden Muskeltypen sind erst in der zweiten Woche nach der Nervendurchtrennung zu beobachten,

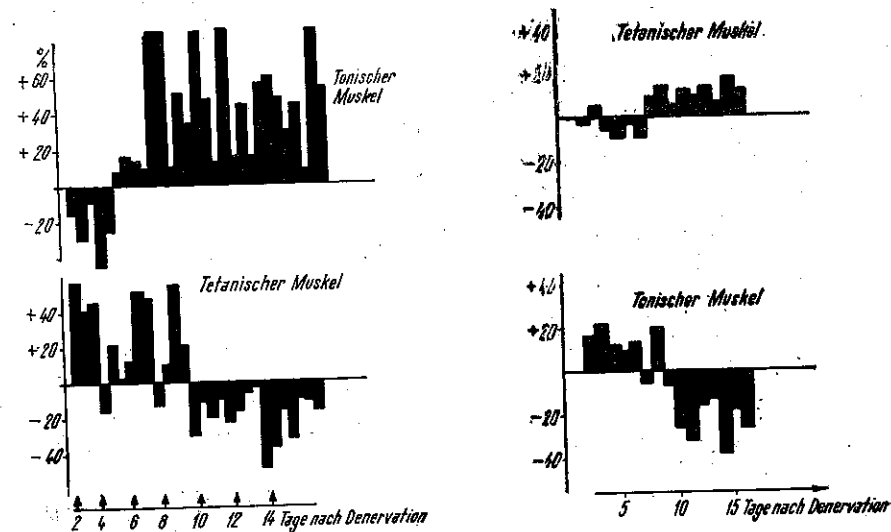


Abb. 2

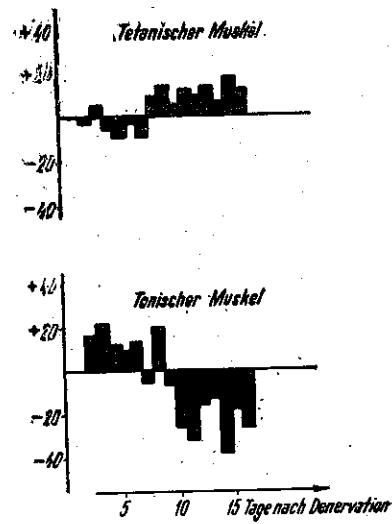


Abb. 3

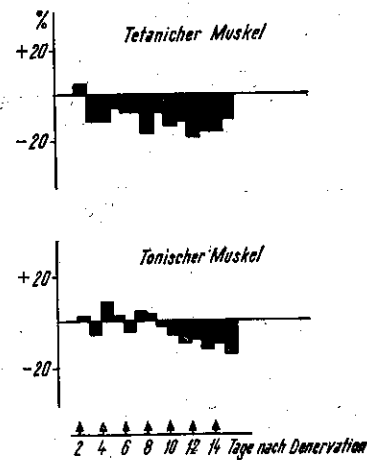


Abb. 4

wo im tonischen Muskel der O_2 -Verbrauch sinkt um im tetanischen mäßig zu steigen (Abbildung 3).

Die Untersuchung des Gehaltes der beiden Muskeln an nicht kollagenem Eiweiß ergab in beiden Fällen nach der Denervation eine mäßige Verminderung, doch waren wesentliche Unterschiede nicht festzustellen (Abbildung 4).

Es wurden auch die Veränderungen im Trockensubstanzgehalt der Muskeln verfolgt, wobei infolge der Denervation in der untersuchten Zeitspanne im tonischen Muskel, insbesondere aber im tetanischen im Verhältnis zur intakten Seite eine geringgradige Vermehrung festzustellen war.

Die Ergebnisse der obigen experimentellen Untersuchungen lassen schließen, daß die auf den Einfluß der Denervation in den beiden Muskeltypen bezüglich des Stoffwechsels und anderer Faktoren beobachteten Veränderungen nicht ohne weiteres mit dem Prozeß der Atrophierung in Zusammenhang gebracht werden können. Während der untersuchten 2—3-wöchigen Phase nach der Denervation kommen augenfällige Veränderungen im Glykogengehalt und in der O_2 -Aufnahme zustande. Diese Veränderungen sind für die einzelnen Muskeln charakteristisch und entgegengesetzter Natur und während der relativ kurzen Untersuchungsperiode auch zeitlich verschieden. Im Zelleiweiß- und Trockensubstanzgehalt der beiden Muskeltypen waren derartige entgegengesetzte Veränderungen nicht zu beobachten.

Die ersten entschiedenen Zeichen der histologisch nachweisbaren Atrophie treten im tonischen Muskel 6, und im tetanischen 8—9 Tage nach der Denervation in Erscheinung. Im glykolytischen Stoffwechsel der beiden Muskeltypen gehen die entgegengesetzten Veränderungen der histologisch nachweisbaren Atrophie voraus, während die in der O_2 -Aufnahme beobachteten Veränderungen bereits in die Phase der schon gut nachweisbaren Atrophie fallen.

Die Denervation hat in beiden Muskelarten eine Verminderung im Gehalt an nicht kollagenem Eiweiß und einen Anstieg des Gehaltes an Trockensubstanz zur Folge. Die erörterten Befunde lassen somit einen gewissen Zusammenhang zwischen Atrophie und Zelleiweißgehalt feststellen, wogegen zwischen den denervationsbedingten, entgegengesetzten Stoffwechselveränderungen und den Veränderungen der Muskelzellphase kein Zusammenhang besteht.

LITERATUR

1. DOMONKOS J., Arch. Biochem. Biophys., 1961, **95**, 138.
2. DOMONKOS J., LATZKOVITS L., Arch. Biochem. Biophys., 1961, **95**, 144.
3. DOMONKOS J., LATZKOVITS L., Arch. Biochem. Biophys., 1961, **95**, 147.
4. DOMONKOS J., HEINER L., Arch. Physiol. Acad. Sci. Hung. (in Druck).
5. HEINER L., DOMONKOS J., Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. (in Druck).
6. SEIFTER S., SAYTON S., NOVIG B., MUNTWYLER E., Arch. Biochem., 1950, **25**, 191.
7. LILIENTHAL J. L., ZIERLER K. L., FOLK B. P., BUKA R., RIELEY M. J., J. Biol. Chem., 1950, **182**, 501.
8. HILLER A., GRIEF L., BECKMAN G., J. Biol. Chem., 1948, **176**, 1421.
9. DREYFUS J. C., SCHAPIRA G., Sem. Hôp. Paris, 1948, **24**, 1999.

Neurologisch-Psychiatrische Klinik der Universität
Szeged und Budapest, Ungarn

PROLONGATION OF HOMOGRAFT SURVIVAL
IN CHICKENS FOLLOWING *IN OVO* TRANSPLANTATION
OF ALLOGENEIC THYMUS *

BY

KATARINA ISAKOVIĆ and B. D. JANKOVIĆ

Pieces of adult chicken thymus were implanted on the chorioallantoic membrane of embryos at 12 days of incubation. Donors and hosts were from outbred utility Rhode Island Red stock. Grafted hosts were tested for homograft immunity 8 weeks after hatching. For this purpose the same adult chicken which was used previously as thymus donor served as donor of skin. It was found that the *in ovo* transplantation of allogeneic thymus induced partial suppression of homograft immunity.

Specific immunological tolerance is the inability of an individual to respond immunologically to a certain antigen or antigenic determinant. A state of tolerance can be induced by administration of a soluble antigen, protein or polysaccharide [1], [2], [3], or by viable cells [4], [5], in animals during embryonic life, the perinatal period or in adults [3], [6], [7]. There is ample evidence of the role which the antigen plays in inducing and maintaining unresponsiveness. However, the process which leads to a state of tolerance is unknown. Gowans [8] claimed that tolerance is a property of the recirculating pool of small lymphocytes. However, whether the reaction between the antigen and lymphocytes occurs in the peripheral lymphoid organs or in the source organs is not known.

It is well established that the thymus is the main lymphopoietic organ in mammals, which colonize the peripheral lymphoid tissues with lymphocytes [9]. Recent studies have shown depletion of small lymphocytes in the spleen, lymph nodes and peripheral blood in thymectomized animals [10], [11]. The lack of small lymphocytes in thymectomized mammals may represent a cellular basis for reduced immunological capacity [11], [12], [13]. However, in birds there are two lymphopoietic organs, the thymus and the bursa of Fabricius. It is well established that the thymus is

* Work presented at the First Session of Animal Physiology (Cluj, 25-28 May 1965).

of prime importance in the development of the delayed type of hypersensitivity [14], [15], whereas the bursa of Fabricius is essential for antibody production capacity [16-18].

MATERIALS AND METHODS

12-day-old Rhode Island Red embryos were grafted with the allogeneic thymus tissues. The thymus was removed aseptically from the 8-week-old donor and placed on the ecto-

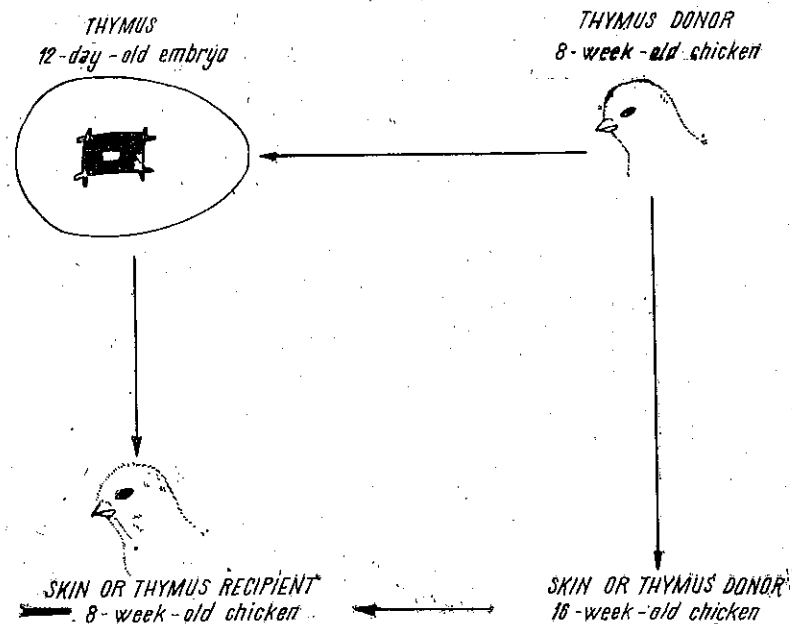


Fig. 1

dermal layer of the chorioallantoic membrane of the host embryos, according to the method of Ballantyne [19]. This layer forms a thin, delicate highly vascularized membrane with a rich capillary network, beneath and within the layer. The grafts are cut into pieces varying in size from 4×6 to 4×7 mm. The grafted embryos and the nongrafted control embryos were sacrificed 3, 6, 9 and 14 days later. The thymus graft, chorioallantoic membrane and spleen were taken for histological examination. They were fixed in Carnoy fixative, embedded in paraffin and the sections were stained with hematoxylin-eosin. Grafted and nongrafted embryos were used at the age of 8 weeks of postembryonic life as the recipients of a skin homograft. The same chick which served previously as thymus donor was used as the donor of the skin (Fig. 1). Skin grafts were 1.5×1.5 cm in size. They were taken from the side of the donor's thorax, after carefully plucking out all feathers and cleaning the skin with alcohol. All adherent fat was snipped away with aid of fine scissors. The graft was kept in place by the suture technique. Six days after transplantation the adhesive dressing was removed and subsequent observations of the transplants were made daily. The intensity of the rejection reaction was graded from 0 to +++.

RESULTS

Spleen weight. — 3 days after transplantation of the thymus there was no difference in spleen weight between thymus-grafted and normal embryos. 8 days after grafting the spleen weight increased in the grafted group compared with the spleen weight of normal embryos of the same age (Table 1).

Table 1

Spleen weight in embryos grafted with allogeneic thymus

| Group | 15-day-old embryo | Spleen weight (mg)* 21-day-old embryo |
|----------------|-------------------|--|
| Control | 11.2 | 13.2 |
| Thymus-grafted | 10.6 | 31.0 |

* Mean presented by 5 embryos.

Histological findings (Table 2). — *Thymus graft:* Between the 3rd and 9th day after grafting the degree of vascularization of the thymus graft was not the same in all embryos. In most instances the thymus graft was well vascularized, and no signs of necrosis were noted. Cell depletion in the graft was observed in 18- to 21-day-old embryos, but there was no reaction of graft rejection in the surrounding chorioallantoic membrane, typical for graft rejection in adults.

Chorioallantoic membrane: Abundant cell infiltrations were noted in the chorioallantoic membrane of embryos grafted with thymus tissue. These infiltrations were located mostly around the blood vessels and consisted of mononuclear cells, small lymphocytes, medium lymphocytes, reticuloocytes and epithelial cells. 6 to 9 days after transplantation, necrotic lesions occurred in the chorioallantoic membrane, surrounded by multinuclear giant cells.

Spleen: In the 15-day-old embryos the spleen sinuses were filled with mononuclear cells, while those cells were rare in the sinuses of the normal embryos. Six days after grafting, necrotic lesions of varying size and surrounded by multinuclear giant cells appeared in the spleen of

Table 2

Histological findings in spleen and chorioallantoic membrane of 15- to 21-day-old embryos grafted with thymus

| Group | Spleen | | Chorioallantoic membrane | |
|----------------|-------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | Sinuses | Necrotic focus | Cellular infiltration | Necrotic focus |
| Control | Rare mononuclear cells | 0 | 0 | 0 |
| Thymus-grafted | Filled with mononuclear cells | +++ | +++ | ++ |

grafted embryos. However, no necrotic foci were found in the spleen of normal embryos. There was a marked depletion of cellular elements in the spleen of transplanted 21-day-old embryos.

Skin homograft. — All control chickens rejected the transplanted skin 6 days after grafting. At this time the grafts were in excellent condition in all chickens which were grafted *in ovo* with allogeneic thymus. The data further show that the rejection of skin homograft is prolonged and some of the chickens from the experimental group still bore an intact transplant 30 days after grafting. (Table 3).

Table 3

| Group | Cross rejection at | | | |
|----------------|--------------------|----------|--------------|----------|
| | 6 days | | 30 days | |
| | Not rejected | Rejected | Not rejected | Rejected |
| Control | 0 | 14 | 4 | 9 |
| Thymus-grafted | 13 | 0 | | |

DISCUSSION

Simonsen [20] showed that enlargement of the spleen occurred following intravenous injections of adult chick blood or spleen cells into chick embryos. He concluded that the proliferating donor cells were responsible for the splenic enlargement as well as for the antibody production. Biggs and Payne [21] using sex chromosomes as a cell marker identified the donor cells which proliferate in the host spleen.

Our results have no direct proof of colonization of host organs by donor cells. However, the presence of mononuclear cells in the chorioallantoic membrane and spleen sinuses of grafted embryos, which were never observed in normal embryos, allowed us to assume that the donor thymus cells colonize the host organs and tissues. The spleen enlargement and necrotic lesions observed in our experiment may be regarded as a graft-versus-host reaction, and taken as evidence of immunological competence of thymus cells [22-24].

These data further show that the thymus is capable of inducing a state of tolerance to skin homograft. The prolongation of skin homograft rejection in 8-week-old chickens grafted *in ovo* with allogeneic thymus can be attributed to the colonization and proliferation of thymus cells in the host spleen. The degree of immunological unresponsiveness, as demonstrated in the present experiment, is probably dependent on the number of donor thymus cells present in the host organs.

This work furthermore provides evidence that the thymus in chickens may act as the source organ of cells involved in delayed hypersensitivity reactions [25]. However, one can also discuss the possibility that the thymus may direct, by some other mechanisms, the appearance of these cells in the peripheral lymphoid tissues.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from the Yugoslav Foundation for Scientific Research.

REFERENCES

- DIXON F. J., MAURER P. H., J. Exp. Med., **101**, 245, 1955.
- FELTON L. D., KAUFFMANN G. R., PRESCOTT B., OTTIGEN B., J. Immunol., **74**, 17, 1955.
- HUMPHREY J. H., Immunol., **7**, 449, 1964.
- BILLINGHAM R. E., BRENT L., Phil. Trans. Roy. Soc., London, ser. B., **242**, 439, 1959.
- HAŠEK M., HAŠKOVA V., Transpl. Bull., **5**, 69, 1958.
- SMITH R. T., BRIDGES R. A., J. Exp. Med., **106**, 227, 1958.
- DRESSER D. W., Immunol., **5**, 378, 1962.
- GOWANS J. D., MCGREGOR D. D., COWEN D. M., in the *Immunologically competent cell*, G.E.W. WOLSTENHOLME and J. KNIGHT, Eds., Little, Brown, Boston, 1963, pp. 20-29.
- AUERBACH R., Proc. Nat. Acad. Sci., **47**, 1175, 1961.
- WAKSMAN B. H., ARNASON B. G., JANKOVIĆ B. D., J. Exp. Med., **116**, 187, 1962.
- MILLER J. F. A. P., Lancet, **2**, 748, 1961.
- JANKOVIĆ B. D., WAKSMAN B. H., ARNASON B. G., J. Exp. Med., **116**, 159, 1962.
- MARTINEZ C., KERSLEY J., PAPERMASTER B. W., GOOD R. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **109**, 193, 1962.
- WARNER N. L., SZENBERG A., BURNET F. M., Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., **40**, 373, 1962.
- JANKOVIĆ B. D., IŠVANESKI M., MILOŠEVIĆ D., POPESKOVIĆ Lj., Nature, **196**, 298, 1963.
- GLICK B., CHANG T. S., JAAP R. G., Poultry Sci., **35**, 224, 1956.
- MUELLER A. P., WOLFE H. R., MAYER R. K., J. Immunol., **85**, 172, 1960.
- ISAKOVIĆ K., JANKOVIĆ B. D., POPESKOVIĆ Lj., MILOŠEVIĆ D., Nature, **200**, 273, 1963.
- BALLANTYNE D. L., Transpl. Bull., **6**, 110, 1959.
- SIMONSEN M., Acta Path. Microbiol. Scand., **40**, 480, 1957.
- BIGGS P. M., PAYNE L. N., Nature, **184**, 1594, 1959.
- SOLOMON J. B., J. Embryol. Exp. Morphol., **9**, 355, 1961.
- WARNER N. L., Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., **42**, 401, 1964.
- OWEN J. J. T., MAWDSLEY A. R., HARRISON G. A., Transpl., **2**, 503, 1964.
- JANKOVIĆ B. D., IŠVANESKI M., POPESKOVIĆ Lj., MITROVIĆ K., Int. Arch. Allergy, **26**, 18, 1965.

Microbiological Institute, Faculty of Pharmacy, and Immunological Unit, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Belgrade (Yugoslavia)

CLEPSYDRATION UND THAMNASTERISATION
IN PELSON-DELTA-KORALLEN *
EIN PALAEOPHYSIOLOGISCH-PHYLOGENETISCHES STUDIUM

VON

G. KOLOSVÁRY

Unsere Pelson-Delta-Korallen des Anisicums des Mecsek-Gebirges in Südpannonien bei Fünfkirchen tragen den Charakter einer phylogenetisch progressiv-regressiven Tierart. Diese Korallen sind in Form, Gestalt und Funktion d.h. speziellerweise in Fortpflanzungsphysiologie polymorph. Diese fortpflanzungsphysiologischen Lebenserscheinungen haben wesentlich auf die Phylogenese dieser Korallengruppe eingewirkt. Das ist ein Beweis dafür, daß die physiologischen Erscheinungen als wesentliche Faktoren, endogene Ursachen im allgemein gesteuerten biokybernetischen phylogenetischen Entwicklungsvorgang der Tiere überhaupt mitwirken können. Untersuchungen dauern schon seit 1954 und Verfasser hatte mehr als 1000 Objekte durchstudiert. Mit vieler Mühe und Schwierigkeiten konnten die Meinungen und Folgerungen als Wahrscheinlichkeiten aufgestellt werden.

EINLEITUNG

Die von mir schon beschriebenen [7] Pelson-Delta-Korallen der Misina-Spitze des Mecsek-Gebirges in Südpannonien bei Fünfkirchen sind solche Triaden [10] die einen gemeinsamen (Kollektiven) Plerophyllum Xriesen-Conophyllia Charakter besitzen [6]. Th.G. Iljina [3]—[5] hat bewiesen, daß das Genus Plerophyllum am Ende des Perms nicht ausgestorben war, sondern im Trias noch immer existierte.

Die Entwicklung verschiedener mesozoischer Korallen aus dem kollektiven Polycœlia-Typ, stammt also aus der Zeit des Postpermischen, d.h. Mitteltriassischen. Meine Misina-Korallen gehören also systematisch nach der Klassifikation von Th.G. Iljina mit den Genera Plerophyllum, Pleramplexus und Ufimia zu: Plerophyllidae → Polycœliina → Streptelasmata.

Infolge der großen phylogenetischen Labilität unserer Misina-Korallen ist ein Polymorphismus festzustellen. Ich konnte nämlich fol-

* Diese Arbeit wurde auf der ersten Tagung für Tierphysiologie vorgetragen (Cluj), 25.—28. Mai 1965).

gende Formen beobachten: als *Archaeotypen* (A) solo Polypen; als *Mesotypen* (B) sich gruppierende Polypen und *Neotypen* (C) d.h. kolonisierte Polypen. In allen drei Fällen wurden clepsydrierte, oligoclepsydrierte und nicht-clepsydrierte Polypen konstatiert.

Clepsydrationen als von Seitensektorenreduktionen verursachte Sanduhrformationen kommen auch bei anderen mesozoischen Korallen vor, wie es z.B. über *Margarosmia* und *Keriophyllia* bei G. Kolosváry [6] und J. Alloiteau [1] zu lesen ist. Die Clepsydration kann auf zweierlei Weisen entstehen u.zw.: eine frühere und eine spätere Periode der *Ontogenese*.

FORTPFLANZUNGSPHYSIOLOGISCHES

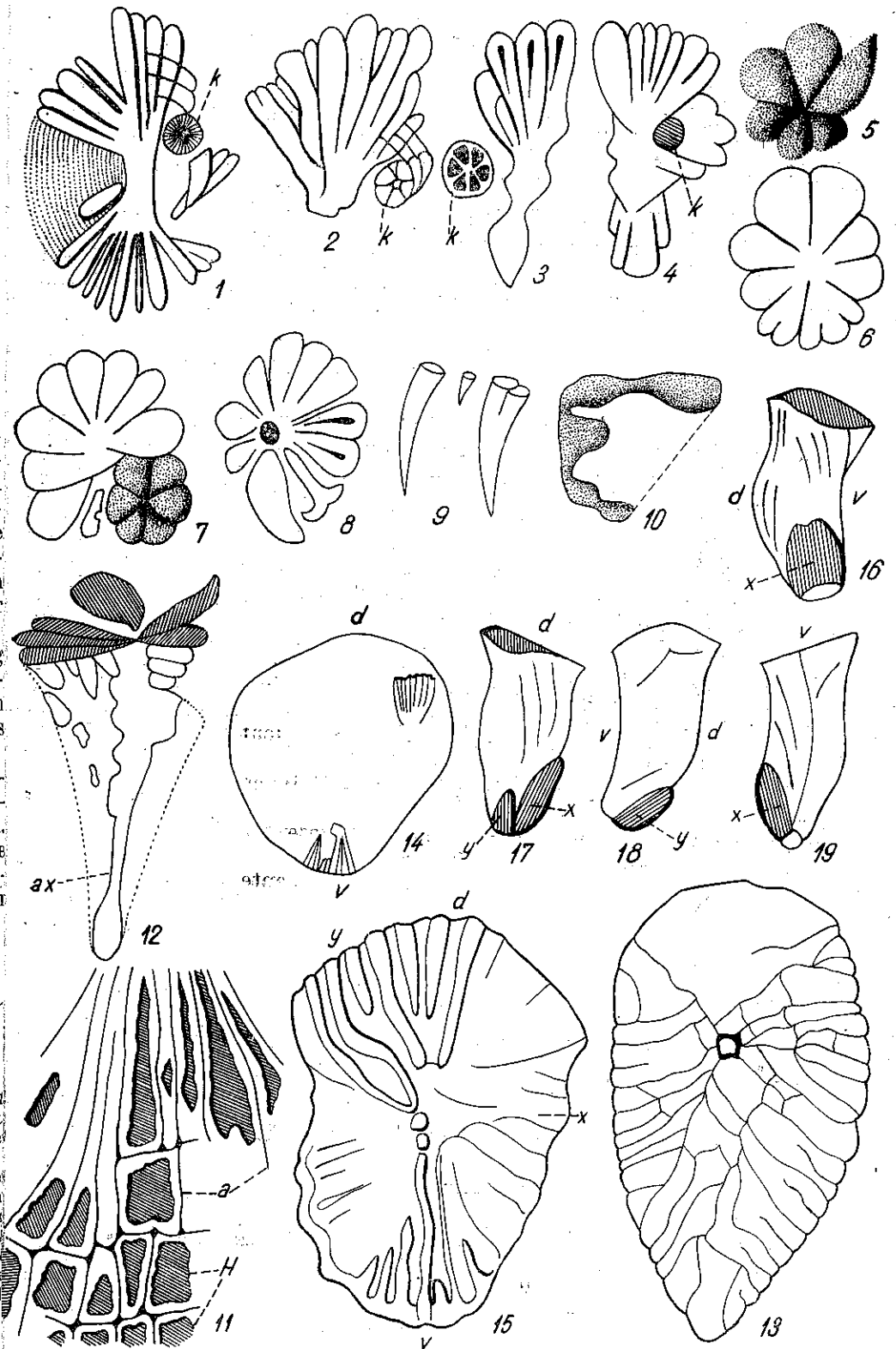
Ich beobachtete mehrmals identische knospenähnliche 2 mm große Bildungen bei clepsydrierten Polypen, wo die kleine intracalycinale Knospe von 2–3 Nachbarsklerosepten des Muttertieres aktiverweise hervorgerufen erscheint. Von diesen Knospen — (welche schon 6 Protosepten besitzen) — werden vielleicht *Thamnaster*formen mit Wandschwund verursacht. Diese *Thamnasterausbildungen* sind manchmal nur 2–3 cm dünne Krustenkolonien. Unsere Photos zeigen eine Ähnlichkeit zwischen Pelson-Delta-Korallen und meso- sowie neozoischen *Thamnasteriden* d.h. zwischen epakmischen und akmischen Desindividualisationen der *Madrepোরarien*-Natur.

Ich muß noch erwähnen, daß eine geschlechtliche Fortpflanzung auch mitwirken mußte. In meinen Dünnschliffen sind mehrere kleine Pseudomorphosen von Polypchen zu beobachten, die in einer Größe von 1 mm auch schon 6 Protosepten zeigen. Diese sind vielleicht als Endstation eines Zygote → Larve → Jungpolyp-Prozesses aufzufassen.

Ich fand gelegentlich mehrere junge Polypen gruppenweise zerstreut auf 2 × 1,5 cm in ca. 40 Individuen, ins Gestein eingebettet. Basis-Durchmesser 1–0,5 mm, schon mit 6 Protosepten und 6 Metasepten. Kelchdiameter 2–3 mm. Der eine dieser Polypen bildete schon eine kleine intracalycinale Knospe, welche ebenfalls 6 Protosepten besaß (das „Muttertier“ war mit 6 Proto- und 6 Metasepten versehen). Die Länge der

TAFEL I:

1–4, Knospen (k) in clepsydrierten Polypen; 5–9, Jungpolypen auf 7 und 9 Jung-Knospen; 10, clepsydrierter solo Polyp; 11, Höhlungen interseptal und interendothekal stark vergrößert; a, Sclerosepten; H, Höhlungen; 12, Längsschnitt durch einen clepsydrierten solo Polypen; Gestreift: Oberfläche der Clepsydra; punktiert: Umriß des Polypen im Gestein; ax: Axialteil des Polypen; 13, Kelchabdruck im Gestein; 14, nicht clepsydrierter solo Polyp-Kelch, fast vollkommen verkalkt (Septen nur in Spuren); d, dorsale und v, ventrale Sektoren; 15, Basis desselben Polypen mit reduzierten Seitensektoren; d, dorsale, ventrale, x, laterale und y, dorsale Sektoren; 16–19, isolierter Polyp von vier Seiten gesehen. d, v, x und y wie oben (Original

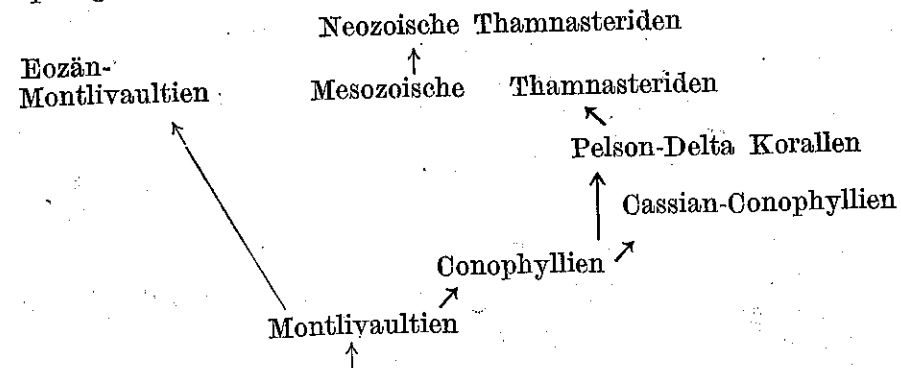


Polypen beträgt 2,5 cm. Diese jungen Polypen stehen nicht dicht beisammen und ihre Septenzahl ist im allgemeinen bei 14—15—16 zu zählen.

Eine wahrscheinliche Hypothese ist, daß auch die alten Plerophyllen keine Medusengenerationen hatten — wie es bei den rezenten Madreporarien ebenfalls der Fall ist. Die Plerophyllen Polypen mußten periodisch weibliche und männliche Geschlechtsprodukte ins Seewasser hineinlassen. Aus dem Zygoten entwickelte sich dann die Larve und aus den Larven wurden Jungpolypen. Die Frage ist nun: welche Faktoren führen zu einer weiteren Thamnasterisation und welche Faktoren konservieren den solo Polyp in diesem Stadium?

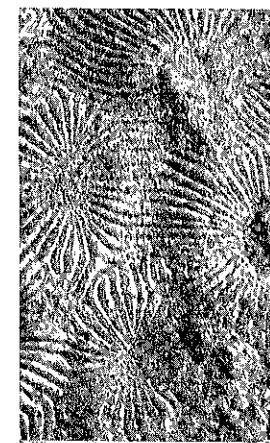
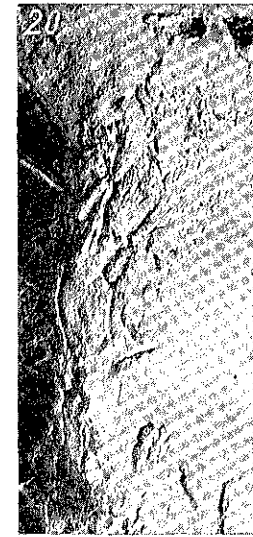
PHYLOGENETISCHES

Die Phylogenese ist im allgemeinen vereinfacht nach I. Apáthy [2] und J. J. Smalganzen [11] ein Entwicklungsvorgang der nie wieder in sich selbst zurückkehrt d.h. eine gesteuerte d.h. biokybernetische progressive Lebenserscheinung. Die System-Lehren widerspiegeln diese Entwicklungsgänge und sind also natürliche System-Lehren. Die Systeme selbst in der Natur sind natürliche „systemic unities“ [9] und die verschiedenen gearteten Systeme werden von unserem Gehirn in verschiedenen System-Lehren besser oder minder gut widerspiegelt. Ich meine, daß unsere Pelson-Delta-Korallen folgende Stelle in der Phylogenese der Triaden einnehmen können [über Stammbaum-Hypothese kann ich vorausschicken, daß die Thamnasteriden von den Conophylliden herkommen u.zw. durch reiche Knospungen und auf Grund einer Desindividualisationstendenz. Die Conophylliden nehmen ihren Ursprung von den Montlivaultien]:



TAFEL II:

20—22, Clepsydrationsfigurationen in Recoaro-Kalkstein; 23, Längsschnitt durch eine Polypengruppe — vielleicht eine Kolonie — stark verkalkt und mit sekundären Höhlungen; 24—26, Meso- und Neozoische Thamnasteriden verschiedener Art und Gruppe. (Photo: I. Miháitz, L. Havranek, A. Pencziné und G. Kolosváry).



Die Montlivaultien stammen aus Polyceliinae, welche auch den Ast der permischen und triassischen Plerophyllen ergeben hatten.

Von den allgemeinen phylogenetischen Induktionsprozessen sind 50% endogener und 50% exogener (auch kosmobiologischer) Art. Von dieser Distinktion der äußeren und inneren Faktoren und Induktionen unabhängig sind die Kategorien: Form, Konstitution und Funktion, sowie Konservativismus, Elastizität und Progression-Regression-Einheit immer festzustellen und der phylogenetische Vorgang kennen zu lernen:

| | A. Konservativismus | B. Elastizität | C1. Progression | C2. Regression |
|--------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| Form | nicht clepsydrierte | oligoclepsydrierte | clepsydrierte | |
| Konstitution | | | Riesenwuchs Kelch 22 mm | |
| Funktion | | Gruppenweise Anordnungen | Kolonisationen = Thamnasterisationen | |
| | | | | Wandschwund und Desindividualisationen |

ÜBER FOSSILISATION

Es ist zu erwähnen, daß die Korallenreste, die mir in ca. 1000 Objekten zwecks Untersuchung zur Verfügung standen vielmehr nur Pseudomorphosen sind. In Recoaro-Kalkstein wurden folgende Komponenten festgestellt: graue, harte, *Brachiopoden*-Kalke zwischen gelben granulösen kalkigen Einbettungen, die Korallen in gelber oder blutroter Farbe enthalten.

Solo Polypen allein oder isoliert sind seltener zu finden. Ich habe einen clepsydrierten ins Gestein eingebettet gefunden und Herr E. Nagy hat ein anderes isoliertes nicht-clepsydriertes Exemplar in Pelson-Delta-Schichten des Bertalan-Berges im Mecsek-Gebirge im Steinbruch von Piricsizma aufgesammelt und mir freundlicherweise überlassen. Die Beschreibung dieses Polypen ist wie folgt: Länge 22 mm; Mitte des Polypen ein bißchen verdickt; im allgemeinen zylindrisch gestaltet; unterer Teil lateral reduziert; Basis 7 × 5 mm, Kelch 10 × 10 mm, Rand ein bißchen ausragend; die Oberfläche mit *Jakowlew-Linien*-ähnlichen Streifen; schwache Längsrippung; auch feine Granulation scheint vorhanden zu sein; Dorsal- und Ventralsektoren gewölbt; Dorsalsektor konvex, Ventralsektor konkav; Seitensektoren bei der Basis reduziert (jüngere Clepsydrations-tendenz); Seitensektoren im Kelche vollständig entwickelt, die Kolumelle ist klein, Kolumellarring stark entwickelt. Dorsalsektor hat 8, Ventralsektor hat 4 Sklerosepten. Die übrigen Septen sind schwach entwickelt. Die Septen sind granulös und mit dichtem Endothek versehen.

Endlich muß ich etwas über die alte Ernährungsphysiologie erwähnen. Ich fand nämlich in einem Gesteinsstück einen Überrest von einem clepsydrierten Polypen, welcher in seinem Coelenteron ein kleines pentagonales Ärmchenglied von *Encrinus* (oder *Dadocrinus*?) besaß. Dieses Crinoideengliedchen lag tief im Kelchzentrum auf der Achse des Protosotomiums, als ehemaliges Nahrungsmittel vom ehemaligen Polypen geschluckt. Der Durchmesser dieses Gliedchens beträgt 5 mm, und es ist nicht zu verwechseln.

LITERATUR

1. ALLOITEAU J., *Monogr. fossil. Madréporaires*. Ann. Géol. Madagascar, 1958, 25.
2. APÁTHY I., *Állattani Előadások. Kolozsvár*. 1892, Verl. Verf.
3. ILJINA TH. G., *Nekotorije predstaviteli semejtva Pterophyllidae iz pograničnykh sloev permii i triasa dzhulbfj*. Paleont. Journal, 1962, 4.
4. ILJINA TH. G., *Novije dannije o proiskhozhdenij sestilushchobykh korallow*. Doklady Akad. Nauk., 1963, 148, 1.
5. ILJINA TH. G., *Posdnepermskije i triasovye chetyrekhstuchevije korally zakov kasbaj*. Paleont. Inst. Akad. Nauk., 1963.
6. KOLOSVÁRY G., *Über phylogenetische Regression im Korallenorganismus*. Acta Biol. Szeged, 1956.
7. KOLOSVÁRY G., *Quelques Madréporaires fossiles intéressantes, nouveaux en Hongrie*. Magy. Áll. Földt. Int. Évi Jelentése, 1957/1958.
8. KOLOSVÁRY G., *Trias-Madrepোরারিен aus der Zeit vor dem ungarischen Ladinikum*. Acta Biol. Szeged, 1958, 4, 3/5.
9. KOLOSVÁRY G., *Integration, adaptation and progression-regression as systemic unity*. XVI. Int. Congr. Zool., 1963, Proc. 1. Bd., Contrib. pp. Washington.
10. SCHINDEWOLF O., *Polycælia und Pterophyllen*. Abh. d. Reichsanst. f. Bodenforsch. N. F. 1942, 204.
11. SMALGANZEN J. J., *Az evolutio szabályozó mechanizmusa*. Zool. Journal, 1958, 9.

от
Syst. Zool. Inst. Univ. Szeged — Ungarn

ЭВОЛЮЦИЯ ФУНКЦИИ ДЫХАНИЯ В ФИЛОГЕНЕЗЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ *

П. А. КОРЖУЕВ

Проблема эволюции функций стоит в центре внимания исследователей на протяжении многих десятилетий, однако, до сих пор еще нет четких закономерностей развития основных жизненно важных функций, таких как дыхание, питание, размножение.

Среди современных животных позвоночные являются наиболее хорошо изученной группой животных, однако, и здесь нет таких обобщений, которые позволили бы вскрыть основные линии эволюции жизненно важных функций организма.

И сегодня остается в силе положение, согласно которому основные закономерности эволюции современных животных разработаны морфологами. Впрочем, правильнее будет сказать, что морфологи хорошо разработали проблему хронологии появления животных на нашей планете, тогда как вскрытие глубоких закономерностей эволюции формы организмов в зависимости от условий существования может быть осуществлено лишь при тщательном изучении эволюции основных жизненно важных функций. Проблема же эволюции функций еще ждет своего решения.

Одним из основных затруднений в разработке проблемы эволюции функций является, по-видимому, то обстоятельство, что среди физиологов и биохимиков до сих пор нет единого мнения в определении функции. В самом деле, что такое функция? Одни считают функцию атрибутом клетки или ткани, другие — органа, третьи — организма. По-видимому, наиболее правильным будет определение функции, как атрибута организма, а предметом изучения в филогенетическом плане в первую очередь должны быть такие жизненно важные функции, как дыхание, питание, воспроизведение себе подобных. В плане филогенетических исследований именно функции организма, как целого, могут иметь существенное значение для понимания конкретных путей эволюции организмов.

* Работа была представлена на I сессии по физиологии животных (Клуж, 25-28 мая 1965 г.).

С этой точки зрения эволюция функции дыхания, как одной из основных, лежащих в основе всех жизненных явлений, может быть понята как эволюция целого комплекса сложнейших структурных образований, обеспечивающих доставку кислорода клеткам и тканям организма, равно как и удаление углекислоты из организма. К этой категории структур относятся не только органы аэрации и сосудистой системы, не только кровь, содержащая в своем составе дыхательный пигмент гемоглобин, но и органы эритропоэза в виде костного мозга, печени, селезенки, почек, кишечной стенки.

Совершенно очевидно, что успешное обеспечение организма кислородом будет осуществляться лишь при нормальном функционировании всех этих структур, которые в филогенезе позвоночных животных претерпевают весьма существенные изменения. Наиболее резкие изменения структурных образований, участвующих в обеспечении организма кислородом, имели место при переходе позвоночных животных от водного образа жизни к наземному, когда произошла не только смена органов аэрации, но и появление нового очага синтеза гемоглобина в виде костного мозга.

Освоение суши первыми выходцами среди позвоночных животных привело к тому, что благодаря смене органов аэрации имело место весьма нежелательное для благополучия организма явление, как смешение артериальной и венозной крови в желудочке сердца, что могло привести к катастрофическим последствиям. Предотвращение этих последствий было осуществлено благодаря таким изменениям, как удаление покровов тела. Именно вследствие этого первые представители среди амфибий должны были „сбросить” чешуйчатый покров с поверхности тела, столь необходимый им на суше, и превратить поверхность тела в дополнительный орган аэрации. Известно, что кожное дыхание у амфибий составляет около 50% общего дыхания. Однако, вследствие этих изменений амфибии привязали себя к водоемам, их прибрежной зоне и только рептилиям удалось решить задачу разделения артериальной и венозной крови, обеспечив тем самым возможность появления чешуйчатого покрова, благодаря чему они стали исключительно наземными животными.

Дальнейший ход эволюции позвоночных животных был связан с появлением теплокровности или гомойотермности. Птицы и млекопитающие выработали способность поддерживать постоянную высокую температуру тела, а следовательно высокую интенсивность жизненных процессов, с резким усилением потребности в кислороде. Высокая потребность в кислороде обеспечивалась не только значительной стимуляцией деятельности органов аэрации и гемодинамики, но и интенсификацией очагов синтеза гемоглобина в виде костного мозга. Скелет птиц и млекопитающих стал основным очагом синтеза гемоглобина у этих высших представителей позвоночных животных.

В результате этих изменений со стороны деятельности структур, обеспечивающих организм кислородом, в организме птиц и млекопитающих резко возросло количество крови и гемоглобина (таблица 1). Птицы и млекопитающие стали обладателями наибольшего количества крови и гемоглобина, по сравнению с остальными представителями позвоночных животных. Увеличение количества гемоглобина в крови жи-

вотных, приспособленных к наземному образу жизни, было обусловлено мощным развитием очагов синтеза гемоглобина в виде костного мозга. Количество гемоглобина, выраженное в граммах, приходящееся на килограмм веса тела животного, у птиц и млекопитающих в среднем в 5—6 раз больше, чем у рыб, как первично-водных животных.

Таблица 1

Средний вес скелета, крови и гемоглобина у позвоночных животных (Коржуев, 1964)

| Группа животных | Число исследованных видов | Скелет % | Кровь % | Гемоглобин г-кг |
|-----------------|---------------------------|----------|---------|-----------------|
| Рыбы | 8 | 8.4 | 2.9 | 1.8 |
| Амфибии | 4 | 11.1 | 5.6 | 3.6 |
| Рептилии | 6 | 14.0 | 5.8 | 3.8 |
| Птицы | 6 | 14.3 | 9.7 | 10.2 |
| Млекопитающие | 18 | 14.2 | 7.3 | 12.1 |

Мощность очагов синтеза гемоглобина (костный мозг) у млекопитающих достигла величин, превышающих вес очагов синтеза гемоглобина у рыб в десятки и сотни раз. В то время, как вес костного мозга у такого представителя млекопитающих, как северный олень, в среднем составляет около 5,5% веса тела у взрослых животных и около 13,0% веса тела у новорожденных, у рыб вес селезенки и почек, как очагов синтеза гемоглобина, составляет всего лишь сотые или десятые доли процента от веса тела рыбы.

Анализ данных по весовой характеристике скелета, как очага синтеза гемоглобина у наземных позвоночных животных показывает, что в филогенезе позвоночных животных имело место постоянное увеличение относительного веса скелета, начиная с первых выходцев на сушу — хвостатых амфибий, у которых впервые появился костный мозг, новый очаг синтеза гемоглобина.

Может быть здесь уместно будет отметить, что среди морфологов распространено мнение, согласно которому в филогенезе позвоночных животных имеет место тенденция к облегчению веса скелета. Во всяком случае достоянием школьных учебников является положение, что для облегчения полета птиц одним из приспособлений была потеря зубов в пневматизация костей. Более того, считается, что одной из причин, тормозивших биологический прогресс некоторых групп позвоночных животных был скелет, являвшийся „тяжелым бременем для организма” (Ромер, 1937). По этому поводу можно только заметить, что одной из причин увеличения относительного веса скелета было увеличение массы костного мозга, которая у некоторых представителей млекопитающих составляет около 6—7% веса тела, а по отношению к весу самого скелета достигает 40—45% веса скелета.

То обстоятельство, что костный мозг, как очаг синтеза гемоглобина достиг таких больших величин, превышая по весу любой из внутренних органов, можно рассматривать как доказательство огромного биологического значения этого структурного образования в организме наземных позвоночных животных. Биологическое значение костного мозга подчеркивает и то обстоятельство, что это самая эмбриональная

ткань организма, сохраняющая этот эмбриональный характер в течение всей жизни организма, поддерживает тем самым его благополучие.

Основным фактором, вызвавшим к жизни костный мозг, мы считаем силы гравитации. Доказательство справедливости этого положения мы усматриваем в том, что впервые костный мозг появился у первых выходцев на сушу — хвостатых амфибий. Дальнейшая эволюция наземных позвоночных животных была связана с выработкой приспособлений, направленных на преодоление сил гравитации. Одним из наиболее существенных механизмов, обуславливающих возможность преодоления сил гравитации, с нашей точки зрения, является костный мозг, ибо чем более активно и подвижно животное, тем больше относительный вес скелета, а тем самым и костного мозга. Высокий относительный вес костного мозга в организме высших позвоночных животных является тем неизменным условием, благодаря которому в организме вырабатывается большое количество гемоглобина, доставляющего достаточное количество кислорода, потребность в котором резко возросла в связи с необходимостью преодоления в наземных условиях сильно возросших сил гравитации по сравнению с водными условиями, где организм находится почти во взвешенном состоянии.

Однако, костный мозг не является единственным очагом синтеза гемоглобина. У наземных позвоночных животных, особенно у высших представителей — птиц и млекопитающих, получил мощное развитие второй очаг синтеза гемоглобина в виде гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры. У отдельных представителей беспозвоночных, рыб, рептилий, некоторые мышечные комплексы также содержат мышечный гемоглобин, однако у птиц и млекопитающих все поперечно-полосатые и некоторые гладкие мышцы содержат мышечный гемоглобин и лишь в виде исключения у мало подвижных животных некоторые мышечные комплексы не содержат гемоглобин или содержат его в очень малой концентрации.

Может быть наиболее мощного развития этот очаг синтеза мышечного гемоглобина достиг у водных млекопитающих, включающих внешнее дыхание на длительный срок. В частности у дельфинов концентрация мышечного гемоглобина в отдельных мышечных комплексах достигает 3600 мг-%, а у тюленя 7000 мг-%. Если учесть общий вес мускулатуры у этих представителей водных млекопитающих, составляющий около 40% веса тела и общее количество мышечного гемоглобина, содержащегося в этих мышцах, то оказывается, что на долю мышечного гемоглобина приходится около половины общего количества гемоглобинов, синтезируемых в обоих очагах синтеза гемоглобина. В этом отношении водные млекопитающие представляют исключение по сравнению с остальными представителями млекопитающих, ибо у остальных наземных млекопитающих на долю мышечного гемоглобина приходится не более 20—25% общего количества гемоглобина.

Таким образом, высшие представители позвоночных животных обладают довольно большим количеством гемоглобина в организме, превосходя в этом отношении рыб более чем в 5—6 раз (таблица 1). Если учесть особенности гемодинамики, когда оксигенация гемоглобина в органах аэрации в течение одной минуты осуществляется несколько раз (3 раза у человека и лошади, 12 раз у мыши), то и в этом случае

внешнее дыхание может выключаться не более, чем на 1—2 минуты. Это означает, что несмотря на усиление деятельности очагов синтеза гемоглобина, органов аэрации и гемодинамики, организм высших позвоночных животных и человека обладает весьма малыми резервами кислорода. Некоторое исключение в этом плане представляют лишь водные млекопитающие и птицы, у которых выключение внешнего дыхания измеряется минутами или десятками минут.

По нашим наблюдениям, дельфин-белобочка на берегу может переносить выключение внешнего дыхания не более двух минут, а дельфин-афалина не более четырех минут. По истечении этого срока начинается весьма бурная реакция, сопровождаемая рвотой и общим возбуждением, что свидетельствует о явно неблагоприятном отношении этих животных к более длительному выключению внешнего дыхания. Возможно в воде эти животные способны выключать внешнее дыхание на несколько более длительный срок, но в целом речь может идти лишь о нескольких минутах (Коржуев и Булатова, 1952). Литературные данные о сроках выключения внешнего дыхания на большие сроки порядка часа и более, особенно в отношении кашалота и других крупных китообразных, с моей точки зрения, несколько преувеличены (Коржуев, 1964).

Так или иначе, но в целом все млекопитающие и птицы обладают весьма небольшими резервами кислорода, которые не позволяют им выключать внешнее дыхание на сроки, превышающие 1—2 минуты.

Примечательным является то обстоятельство, что на всех этапах эволюции животного мира благополучие организма обеспечивалось созданием резервов важнейших компонентов, таких как жиры, углеводы, соли и другие, необходимых для поддержания нормального уровня обмена веществ. Некоторые из этих резервных веществ накапливаются в больших количествах. В частности, жиры у некоторых видов животных составляют около 30,0% веса тела, как это имеет место у представителей группы зимнеящих животных, например, у сурков, накануне залегания в спячку, которая длится от 6 до 9 месяцев, особенно это касается сурков тундры и памирского сурка, или морских млекопитающих, у которых подкожный слой жира выполняет и терморегуляторную функцию.

Парадоксальность положения состоит в том, что кислород — этот важнейший элемент, абсолютно необходимый для нормальной жизнедеятельности, без которого организм может обходиться одну—две минуты, — не имеет резервов в организме.

Природа, по непонятным причинам, уклонялась от создания значительных резервов кислорода на протяжении почти всей истории развития позвоночных животных. По-видимому, имелись весьма фундаментальные причины, которые на всех этапах филогенеза позвоночных животных мешали созданию значительных резервов кислорода в организме животных, за исключением небольшой группы водных млекопитающих.

Физиологи и биохимики до сих пор не дали объяснения этому явлению и ограничивались лишь простой констатацией этого факта. Уместно напомнить мнение одного из крупнейших физиологов. Дж. Баркрофта (1937), который по этому поводу писал: „Из веществ, необходимых для сохранения жизни и деятельности, пожалуй, наиболее важным

является кислород. Удивительно, что организм имеет так мало запасов столь необходимого элемента. Больше того, по мере перехода к более высоко организованным формам жизни все увеличивается зависимость организма от непосредственного снабжения кислородом: анаэробы могут жить без кислорода всегда, лягушки — дни, человек — минуты".

Спорным является также утверждение Будденброка (1939) о том, что „интенсивность дыхания тем выше, чем более высокое положение занимает животное в филогенезе”, ибо интенсивность дыхания клеток тела пойкилотермных и гомойотермных животных при сравнимых условиях оказалась одинаковой (Коржуев, 1949). Это обстоятельство свидетельствует о том, что все многообразие структурных образований, обеспечивающих организм кислородом, достигает единственной цели — сохранить уровень окислительных процессов в клетках и тканях тела на прежнем уровне, характерном для предков этих животных. Единственной оговоркой здесь может быть лишь та, что при появлении гомойотермии этот уровень повышается, с тем, однако, чтобы в ряду гомойотермных уже сохраняться без изменений.

По нашему мнению в настоящее время имеется возможность дать объяснение этой особенности животных организмов. Эта возможность появилась в связи с обоснованием положения о том, что для организма имеет жизненно важное значение не только химический состав воздуха, но и его физическое состояние. Впервые это было сделано проф. А. Л. Чижевским в середине 20-х годов нашего века.

Одной из важнейших особенностей этого физического состояния воздуха является определенная насыщенность его электрическими зарядами, вследствие чего молекулы кислорода переходят в ионизированное состояние. Было показано (Чижевский, 1960), что если в воздухе нет ионизированного кислорода, то все подопытные животные довольно быстро погибают. Эти исследования А. Л. Чижевского, проливают свет на причины, обусловившие отсутствие в организме животных значительных резервов кислорода.

Дело в том, что ионизированный кислород существует очень непродолжительное время, порядка нескольких минут, после чего заряд теряется и кислород превращается в неактивную форму. Именно по этой причине, как нам кажется, организм животного лишен возможности иметь сколько-нибудь существенные запасы ионизированного кислорода отрицательной полярности. Молекулы же кислорода, не имеющие отрицательного электрического заряда, как показали опыты А. Л. Чижевского, не в состоянии поддерживать нормальную жизнедеятельность организма животных.

Отрицательно заряженный ион кислорода, обладая девятью электронами, напоминает фтор. Кроме того, при ионизации кислорода изменяется спин его ядра. По-видимому, эти тончайшие физические явления, происходящие на электронном и ядерном уровне, играют решающую роль в эволюции животного мира, в результате чего даже у высших представителей позвоночных животных нет значительных резервов кислорода.

Сама по себе проблема получения кислорода и его резервирования не могла представить в процессе эволюции животных значительных трудностей, однако накопление мало активного кислорода, видимо,

не решало проблемы создания резервов кислорода, вследствие чего основные адаптивные изменения пошли по линии резкой интенсификации деятельности органов аэрации и гемодинамики, что нашло свое наиболее совершенное выражение у высших представителей позвоночных животных — птиц и млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

- БАРКРОФТ Дж., *Основные черты архитектуры физиологических функций*. Биомедгиз., М., 1937, стр. 317.
- КОРЖУЕВ П. А., *Концентрация гемоглобина и интенсивность потребления кислорода у эритроцитов позвоночных животных*. Биохимия, 1949. 14, стр. 338—340.
- КОРЖУЕВ П. А., БУЛАТОВА Н. Н., *Дыхательная функция крови дельфинов*. Труды Института морфологии животных им. Северцова АН СССР, 1952, 6, стр. 151—164.
- КОРЖУЕВ П. А., *Гемоглобин. Сравнительная биохимия и физиология*. Изд-во „Наука”, Москва, 1964, стр. 287.
- РОМЕР А. Ш., *Палеонтология позвоночных животных*. Гос. Научно-техн. изд-во, М., 1939, стр. 414.
- ЧИЖЕВСКИЙ А. Л., *Аэроионизация в народном хозяйстве*. Госпланиздат, Москва, 1960, стр. 758.
- БУДДЕНБРОК W., *Grundriß der vergleichenden Physiologie*. Bd. 2, Berlin, 1939, S. 569

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ
ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ*

Б. И. КОТЛЯР

Синхронизированная активность и ее связь с условно-рефлекторной деятельностью явилась предметом детального и систематического изучения в лаборатории М. Н. Ливанова (М. Н. Ливанов, Т. А. Королькова, Г. М. Френкель, 1954; И. Н. Книст, 1955; М. Н. Ливанов, 1962 и др.). Этими исследованиями показано, что выработка условного оборонительного рефлекса у кроликов сопровождается появлением в электроэнцефалограммах различных областей синхронизированной ритмики с частотой 4—7 кол/сек. Отчетливо выступая в корковых анализаторных зонах, соответствующих сочетаемым раздражениям, в ранний период замыкательного процесса, еще до появления периферических ответов, изосинхронные колебания при укреплении рефлекса ослабевают или даже полностью исчезают. В процессе угашения рефлекса синхронизированная активность вновь появляется. На основании этих экспериментов М. Н. Ливанов пришел к выводу, что синхронизированные колебания являются отражением процессов, связанных с иррадиацией как раздражительного, так и тормозного процессов.

При повторении этих опытов нами были получены сходные результаты — между синхронизированной активностью, регистрируемой от затылочной коры, ретикулярной формации среднего мозга и ретикулярного ядра таламуса, фиксированного в станке кролика, и двигательными ответами также не отмечалось четкой корреляции.

В дальнейшем с помощью методики регистрации биотоков у свободно передвигающихся кроликов (Котляр, 1963) было отмечено появление в электрической активности ряда структур головного мозга синхронизированных колебаний большой частоты (8—10 в сек.), точно соответствовавших условному пищевому поведению (Л. Г. Воронин и Б. И. Котляр, 1962). После образования условного рефлекса каждому пищедобывательному движению предшествовала вспышка таких колебаний. Если в ответ на сигнал синхронизированная активность отсутствовала, условный ответ не проявлялся. Синхронизированная актив-

* Работа была представлена на I сессии по физиологии животных (Клуж, 25—28 мая 1965 г.).

ность с частотой 8—10 кол/сек обнаруживала постоянную связь с условным рефлексом на всех стадиях его проявления и не исчезала при большем числе сочетания (до 800).

Аналогичные ЭЭГ-изменения отмечались при выработке условного избегательного рефлекса (Л. Г. Воронин и Б. И. Котляр, 1963).

Характерно, что в отдельных случаях синхронизированная активность регистрировалась в тех точках двигательной области коры, где до образования условного рефлекса отмечалась лишь быстрая низкоамплитудная активность. Это наблюдение послужило поводом для изучения локализации различных форм электроэнцефалографического компонента ориентировочного рефлекса в коре больших полушарий. Выяснилось, что ЭЭГ-реакция пробуждения проявляется в виде 3 основных форм (Г. Апостол и Б. И. Котляр, 1964). Причем их локализация значительно изменялась в ходе хронического угашения ориентировочного рефлекса. Например, в теменно-лобной области коры десинхронизированная активность сменялась синхронизированными колебаниями, а в затылочно-височной области синхронизированная ритмика становилась менее выраженной, что, по-видимому, было следствием изменения уровня возбуждения в исследуемых областях.

Тщательное сопоставление поведения животного с сопутствующей ему электрической активностью позволило отметить во время бодрствования три основных типа ЭЭГ-активности, каждому из которых соответствовал „свой“ вид поведения (Л. В. Калюжный и Б. И. Котляр, 1965). Тип I ЭЭГ-активности — нерегулярные колебания с частотой 4—5 г, отмечался у животного в бодрствующем, но поведенчески бездеятельном состоянии. Тип II — синхронизированная ритмика с частотой 6—8 кол/сек обычно сопровождал двигательные реакции животного в виде поворота головы, а также реакции внимания, насторожения. Тип III — синхронизированная ритмика с частотой 8—11 кол/сек регистрирующейся при разнообразных целенаправленных действиях животных. Например, при ориентировочно-исследовательской деятельности, при поиске пищи и в оборонительной ситуации. Таким образом, каждому типу электрической активности соответствовал определенный набор поведенческих реакций. Выделенные формы ЭЭГ-активности отличались друг от друга, главным образом, по их частотной характеристике. На основании этих наблюдений было высказано предположение, что частота синхронизированной активности отражает уровень возбуждения в структурах центральной нервной системы. С целью экспериментальной проверки были получены эффекты введения фармакологически препаратов, снижающих и повышающих уровень возбуждения в головном мозге. Повышение уровня возбуждения достигалось введением фенамина, относящегося к классу адренергических веществ. Под его влиянием усиливалась двигательная активность животного и происходило учащение синхронизированной ритмики до 9—11 кол/сек. В отличие от эффекта фенамина, введение депрессанта-аминазина приводило к последовательному урежению частоты ритмической активности от типа III к типу I, т.е. от 8—11 до 4—5 кол/сек. Эти опыты явились подтверждением нашего предположения о наличии прямой зависимости между частотой синхронизированной активности, уровнем возбуждения и поведенческими реакциями животного.

Постоянное появление синхронизированной активности с частотой 8—11 кол/сек при условной реакции требовало выяснения условий, от которых зависит ее появление. В наших прежних работах (Л. Г. Воронин и Б. И. Котляр, 1962, 1963) было показано, что появление указанного ЭЭГ индикатора не связано в отдельности с модальностью условного сигнала, видом подкрепления и характером выполняемого движения. Можно было полагать, что синхронизированная ритмика отражает только двигательную активность животного, так как она всегда предшествовала движению при условной и ориентировочно-исследовательской деятельности. Поэтому были проведены исследования электрической активности при оборонительном избегательном рефлексе, т.е. в ситуации, когда за условным сигналом обязательно следовало подаваемое на металлическую решетку дна камеры электроболевое подкрепление, избежать которого животное не могло. В этом случае синхронизированная активность также всегда регистрировалась на условный сигнал, хотя двигательная реакция отсутствовала. Динамика образования такой условной связи находила свое отражение в ЭЭГ столь же отчетливо, как при инструментальных условных рефлексах.

Естественно, что этой серией опытов не мог быть решен вопрос о роли двигательного компонента в генезе синхронизированного ритма с частотой 8—11 кол/сек, поскольку не исключалось напряжение мускулатуры, и появление ЭЭГ-изменений могло быть следствием усиленного афферентного притока преприцептивной импульсации от соматической мускулатуры. Поэтому была проведена серия опытов на обезвреженных тубокурарином животных, у которых предварительно был выработан условный избегательный оборонительный рефлекс. Оказалось, что и в таких условиях сигнальный раздражитель также регулярно вызывает учащение синхронизированной ритмики (на 1,5—2 кол/сек), как у свободно передвигающихся животных, хотя ее частота не превышает 8—9 кол/сек. Следовательно, отмечаемое при действии условного сигнала учащение синхронизированной активности не является следствием лишь двигательной реакции кролика.

Систематическое исследование изменений электрической активности в коре и структурах лимбической системы в процессе образования и укрепления разнородных рефлексов выявило концентрацию синхронизированной активности в различных ядрах гипоталамуса (опыты совместно с Л. В. Калюжным, 1965). При последовательной выработке у кроликов пищевого и оборонительного условного рефлексов отмечена следующая динамика изменений электрической активности гипоталамических ядер. В стадии генерализации условный сигнал пищедобывательного рефлекса вызывал появление синхронизированной активности в электрограммах латерального и вентромедиального ядер гипоталамуса; по мере укрепления связи синхронизированная активность концентрировалась, главным образом, в латеральном гипоталамусе и исчезала, либо ослабевала в вентромедиальном ядре. При выработке оборонительного избегательного рефлекса синхронизированная активность снова появлялась в обоих ядрах. Укрепление оборонительного рефлекса сопровождалось наибольшей выраженностью такой ритмики в вентромедиальном ядре. В последующем эти эксперименты были расширены и уточнены при изучении ЭЭГ-изменений,

сопутствующих 2-членному цепному пищедобывательному рефлексу (Л. Г. Воронин, Л. В. Калужный и И. Н. Захарова, 1965). Было показано, что условный сигнал вызывает в коре и латеральном гипоталамусе изосинхронные колебания с частотой 9—10 кол/сек.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вышеизложенные результаты наших экспериментов, свидетельствующие о наличии четко выраженной корреляции поведенческих реакций и электрической активности, позволили высказать мнение, что уровень возбуждения в структурах центральной нервной системы находит свое отражение в частоте регистрируемой синхронизированной ритмики. Дополнительным доказательством этой точки зрения могут служить наши опыты по исследованию характера биоэлектрической активности в процессе „привыкания” к повторяющемуся стимулу. В начале незнакомый сигнал вызывал появление вспышки синхронизированной активности с частотой 9—11 кол/сек. По мере ознакомления животного с раздражителем последовательно регистрируется ЭЭГ-активация в виде синхронизированной ритмики с частотой 7—8 и 5—6 кол/сек. При полном привыкании раздражитель теряет способность как-либо менять исходную биоэлектрическую активность. Аналогичные изменения отмечены нами при угашении условного рефлекса. Уже при первых десяти предъявлениях неподкрепляемого сигнала, в тех случаях, когда условная реакция отсутствует, частота синхронизированной активности урежается. Раздражитель вызывает лишь реакцию типа „внимание”, сопровождающуюся синхронизированной активностью 5—7 кол/сек, т.е. интенсивность реакции активации постепенно снижается. В качестве иллюстрации развиваемого положения могут служить наши опыты, проведенные совместно с Г. Апостолом и Ф. Йеро по изучению ЭЭГ картины при дифференцировании звуковых сигналов. Чем больше дифференцируемый сигнал отличался от условного, тем меньше была частота синхронизированной активности. Введение адренолитика-аминазина и холинолитика-скополамина также приводило к последовательному снижению частоты синхронизированной активности, вызываемой условным стимулом. Наоборот, введение фенамина, стимулятора адренергической системы, приводило к постепенному учащению регистрируемой ритмики. Блокирование нервно-мышечной передачи, связанное с уменьшением притока проприоцептивной импульсации, незамедлительно вызывало снижение частоты синхронизированной активности. Вышеперечисленные результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод, что уровень возбуждения и частота синхронизированной активности находятся в прямой зависимости. Большому уровню возбуждения в образованиях головного мозга соответствует синхронизированная активность большей частоты и наоборот. Полученные результаты находят свое подтверждение в опытах Sailer G. Stumpf Ch. (1957). При раздражении ретикулярной формации среднего мозга кролика током нарастающей интенсивности соответственно увеличивалась частота синхронизированной ритмики в гиппокампе. Характерно, что частота регистрируемой ими синхронизированной активности, как и в наших экспериментах, не превышала

11 кол/сек. Дальнейшее усиление электрораздражения приводило к ее нарушению и замене быстрой низкоамплитудной ритмикой.

В связи с тем, что ЭЭГ-сдвиги, сопутствующие состояниям (пищевая, оборонительная и ориентировочно-исследовательская доминанта), протекающим при достаточно высоком уровне возбуждения, отмечаются в виде кратковременной вспышки и при условном рефлексе позволяют рассматривать условную связь в процессе ее реализации как пример доминантного состояния в центральной нервной системе, точно ограниченного во времени интервалов условный раздражитель-подкрепление. Наличие надежных ЭЭГ-индикаторов, сопровождающих условно-рефлекторную деятельность, отмечено и в ряде других работ. Сходные результаты были получены на кроликах Sadowski B. и Longo V. (1962) при выработке пищедобывательного условного рефлекса. Авторы отметили появление стойкого ЭЭГ-коррелята поведения в виде синхронизированной активности 9—10 кол/сек в гиппокампе. Недавно Pickenhain a. Klingberg (1965) получили данные, полностью совпадающие с нашими. У крыс на каждое применение условного сигнала избегательного оборонительного рефлекса регистрировалась короткая вспышка синхронизированных колебаний с частотой до 9—11 кол/сек. Еще раньше Adey (1951) обнаружил у кошек, обученных находить пищу в Т-образном лабиринте, перед каждым начальным поисковым движением появление синхронизированной активности большей частоты. Таким образом, надежные ЭЭГ-корреляты условно-рефлекторной деятельности показаны на разных объектах. Однако интерпретация этих ЭЭГ-сдвигов весьма затруднительна. Нет необходимости доказывать, что изменения в электрической активности, сопутствующие условному рефлексу, не отражают интимной стороны замыкательного процесса. Тем не менее весьма важно определить их информационное значение. Очень часто делается попытка рассмотреть эти изменения в качестве индикатора процесса условного возбуждения. Трудность такого толкования заключается прежде всего в том, что аналогичные ЭЭГ-сдвиги отмечаются и при ориентировочном рефлексе. На основании того, что синхронизированная активность после привыкания к незнакомому раздражителю исчезает, появляясь вновь в случае придания ему сигнального значения, Pickenhain a. Klingberg (1965) видят существенную разницу между синхронизированной активностью при ориентировочном и условном рефлексе. Однако вряд ли вызывает сомнение тот факт, что как при ориентировочной, так и при условно-рефлекторной деятельности включается единый механизм ЭЭГ активации. Здесь следует также отметить, что факт концентрации синхронизированной активности в безусловно-рефлекторных центрах при укреплении рефлекса не позволяет еще использовать ЭЭГ-индикатор в виде синхронизированного ритма в качестве „меченого” ритма условного возбуждения.

Полученные факты позволяют полагать, что ЭЭГ-индикатор в виде синхронизированной активности может быть использован при изучении локализации ряда безусловно-рефлекторных функций и фармакодинамики центральнодействующих препаратов. В связи с этим следует остановиться на полученных данных о концентрации синхронизированной активности в ядрах гипоталамуса при разнородных условных рефлексах. Если связь латерального гипоталамуса с

пищевым безусловным центром еще раньше была доказана многочисленными исследованиями, то утверждать на основании ЭЭГ изменений, что вентромедиальный гипоталамус является „оборонительным” центром оснований, пока не достаточно. Ананд в серии исследований показал, что латеральный гипоталамус и вентромедиальное ядро гипоталамуса находятся в реципрокных отношениях. Особенно наглядно это демонстрируется в одной из последних работ (Anand, China, Sharma, Dua, Singh Baldev, 1964), где четко показана связь вентро-медиального ядра с центром „насыщения”. По-видимому, реципрокность этих структур является причиной того, что при ряде доминантных состояний, включая и оборонительную ситуацию, торможение пищевого центра сопровождается активацией вентро-медиального ядра. Таким образом, для решения вопроса о функциональном значении вентро-медиального ядра необходимы дополнительные исследования.

В заключение следует указать на необходимость использования методов математического анализа с целью большей эффективности электроэнцефалографических исследований механизмов поведения.

ЛИТЕРАТУРА

- АПОСТОЛ Г. и КОТЛЯР Б. И., I годичная научно-отчетная конф. биолого-почв. ф-та МГУ 9—12 марта 1964, рефераты докладов, Изд. МГУ, 1964, стр. 37, 38.
 АПОСТОЛ Г. и КОТЛЯР Б. И., *Revue Roumaine de Biologie, Série de zoologie*, 1965, 10, 4, 261.
 ВОРОНИН Л. Г. и КОТЛЯР Б. И., *Ж. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова*, 1962, 12, 3, 547.
 ВОРОНИН Л. Г. и КОТЛЯР Б. И., *Ж. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова*, 1963, 13, 5, 917.
 ВОРОНИН Л. Г., КАЛЮЖНЫЙ Л. В. и ЗАХАРОВА И. Н., *Ж. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова*, 1965, 15, 2.
 КАЛЮЖНЫЙ Л. В. и КОТЛЯР Б. И., *Научные докл. высш. школы*, 1965, 4.
 КНИПСТ И. Н., *Тр. Ин-та высш. нервн. деят.; сер. физиол.*, 1955, 1, 294.
 КОТЛЯР Б. И., *Физиол. журн. СССР*, 1963, 49, 9, 1115.
 ЛИВАНОВ М. Н., В сб. *Электроэнцефалографическое исследование высш. нервн. деят.* Москва, 1962, 174.
 ЛИВАНОВ М. Н., КОРОЛЬОВА Т. А. и ФРЕНКЕЛЬ Г. М., *Ж. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова*, 1951, 1, 4, 521.
 ADEY W. R., *Federat. Proc.*, 1961, 20, 2.
 ANAND B., CHINA G., SHARMA K., DUA S., BALDEV SINGH, *Amer. J. Physiol.*, 1964, 207, 8.
 PICKENHAIN a. F. KLINGBERG, *Elektroenceph. clin. Neurophysiol.*, 1965, 18.
 SADOWSKI B. and LONGO V. G., *Elektroenceph. clin. Neurophysiol.*, 1962, 14, 4, 465.
 SALLER S., STUMPF Ch., *Neues Schmiedebergs Arch. exper. Path. u. Pharm.*, 1957, 231, 1, 63.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Кафедра физиологии высшей нервной деятельности

EFFECT OF CHOLINESTERASE INHIBITORS
ON THE CATION-TRANSPORT IN FROG MUSCLE *

BY

T. KOVÁCS and B. SZABÓ

M. sartorius muscles of frog extrude Na^+ against a concentration gradient in Ringer's solution containing half of the original Na concentration. This Na^+ extrusion can be inhibited by physostigmine or DFP (10^{-3} concentration). In the same molar concentration prostigmine is ineffective. Intracellular Na^+ content of the muscle increases significantly in consequence of incubation in Ringer's solution containing low K. Na^+ influx is inhibited by the examined cholinesterase inhibitors (physostigmine, prostigmine, DFP) in the same way. Na^+ influx of untreated muscles was found to be $4.5 \text{ pmol/cm}^2 \cdot \text{sec}$ and the influx was decreased by 10^{-3} M of physostigmine to the value $1.7 \text{ pmol/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Li^+ entrance is inhibited by physostigmine but only slightly and the influx is lowered from the value of $2.2 \text{ pmol/cm}^2 \cdot \text{sec}$ to $1.6 \text{ pmol/cm}^2 \cdot \text{sec}$. The possibility is discussed that the cholinesterase inhibitors may work by inactivation of the carrier mechanism or in another way.

In spite of the generally accepted conception that the "energy-rich" phosphate bonds supply the energy necessary for the "sodium pump", cholinesterase inhibitors have been found to affect the active sodium ion transport and their inhibiting effect was demonstrated on frog skin [1], in red blood cells [2], on the giant axon of squid [3], on isolated gill of crab *Eriocheir sinensis* [4]. The important role of an intracellular cholinesterase in the mechanism of active sodium extrusion has been shown on frog muscle by Van der Kloot [5]. On the basis of Van der Kloot's results, this cholinesterase fraction may not be identical with cholinesterase localized at the myoneural-junctions, but it is not extracellular.

In our laboratory Dr. Varga *et al.* have demonstrated that myosin has a cholinesterase activity and this fraction amounts to half of the total cholinesterase activity of muscle [6—8]. Dr. Kóvér and myself have previously shown by histochemical methods that a pronounced cholinesterase activity can be seen uniformly distributed in the muscle-fibres and was attributed to myosin [9].

* Work presented at the First Session of Animal Physiology (Cluj, 25—28 May 1965).

The purpose of the present experiments is to decide whether myosin-cholinesterase has any role in the mechanism of ion transport, and on the other hand, to investigate the effect of cholinesterase inhibitors upon the passive transport of sodium and lithium ions.

Experiments were carried out on frogs. In an experiment 4—8 pairs of isolated sartorius muscles were used. The examination of Na-extrusion was performed in the following way: after dissection the muscles were allowed to equilibrate in a normal Ringer for 2 hours, then they were

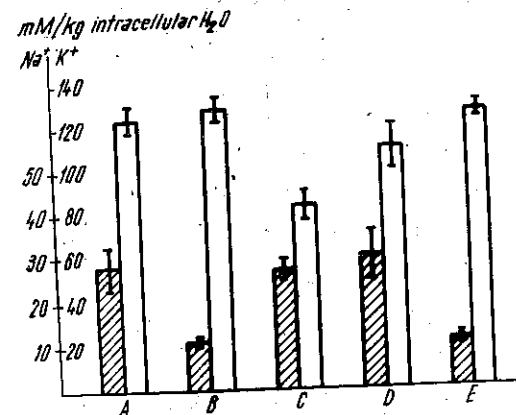


Fig. 1. — The average Na⁺ and K⁺ content of sartorius muscles of frog. A, soaked in a normal Ringer's solution (115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2.1 mM NaH₂PO₄, 0.25 mM Na₂HPO₄) for 3 hours; B, in normal Ringer for 2 hours and in a half sodium Ringer (55 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.25 mM Na₂HPO₄, 2.1 mM NaH₂PO₄ and 175 mM saccharose) for 1 hour; C, procedure was the same as in B, but in both, solutions contained physostigmine in 10⁻³ M concentration; D, as B + 10⁻³ M DFP; E, as in B + 10⁻² M prostigmine. Hatched columns: Na⁺, empty columns: K⁺. There were 20—30 muscles in a group.

normal Ringer for 3 hours. This statistically significant effect was observed only in the case of physostigmine and DFP used in 10⁻³ M concentration. No inhibition was caused by prostigmine in 10⁻² M concentration. In comparing the effect of physostigmine with that of prostigmine, the assumption was made that the Na-extrusion was hindered only by cholinesterase inhibitors to which the membrane is permeable. Physostigmine was effective because its tertiary N group allows the molecule to enter into the muscle cell in contrast to the prostigmine which contains a quaternary N group and consequently is impermeable.

In the present experiments a much higher concentration of physostigmine and DFP was found to be necessary to inhibit the Na-extrusion than that which caused total inhibition of cholinesterase. A correlation between the concentration of physostigmine which inhibited the sodium extrusion and those which inhibited the intracellular cholinesterase activity have

been found by Van der Kloot [5]. The cholinesterase activity was measured in intact muscle using ethylchloroacetate as substrate, which readily penetrated into the intracellular phase. For that very reason ethylchloroacetate was used as a substrate also in our experiments to estimate the cholinesterase activity of myosin prepared from frog sartorius muscle. In contrast with Van der Kloot's observation, ethylchloroacetate was not hydrolyzed by the frog myosin in our experiments. Our finding confirms the result of Szöör *et al.* [10], who have demonstrated that rabbit myosin does not split

exposed to a half Na-Ringer for 60 minutes. Muscles, upon which the effect of cholinesterase inhibitors was studied, were immersed in solutions which contained the inhibitor in a suitable molar concentration. At the end of the experiments the muscles were ashed and Na and K content were determined flame-photometrically. The results of the experiments are shown in figure 1. When the muscles were immersed in normal Ringer for 3 hours, their Na⁺ content was 27.9 mM and K⁺ content, 124 mM/kg intracellular water. The next column shows that the intracellular Na concentration decreased to 11.4 mM if the muscles were soaked in a normal Ringer for 2 hours and in a solution containing 60 mM NaCl for 60 minutes. In the presence of physostigmine or DFP, Na-content did not change and the muscles behaved as if they were soaked in a

been found by Van der Kloot [5]. The cholinesterase activity was measured in intact muscle using ethylchloroacetate as substrate, which readily penetrated into the intracellular phase. For that very reason ethylchloroacetate was used as a substrate also in our experiments to estimate the cholinesterase activity of myosin prepared from frog sartorius muscle. In contrast with Van der Kloot's observation, ethylchloroacetate was not hydrolyzed by the frog myosin in our experiments. Our finding confirms the result of Szöör *et al.* [10], who have demonstrated that rabbit myosin does not split

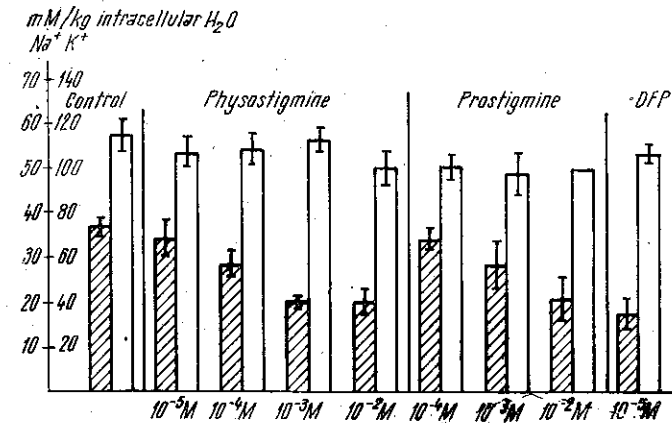


Fig. 2. — The average cation concentration per kg intracellular water. The extracellular space was taken 150 ml/kg. The muscles were soaked in low K⁺ Ringer (120 mM NaCl, 0.25 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, phosphate buffer) for 3 hours. Cholinesterase inhibitors were used in molar concentration as indicated at the foot of columns. The standard error is indicated by the line drawn through each bar. Hatched columns: Na⁺, empty columns: K⁺.

ethylchloroacetate and in this respect it differs from other muscle cholinesterase. It would not be correct to draw definitive conclusions from these tentative experiments, but it remains questionable whether myosin-cholinesterase plays any role in Na-extrusion.

Desmedt [11] reported that muscles immersed in Ringer's solution containing low K⁺ gain sodium and lose potassium. It may be supposed that activity of the Na-extruding mechanism is decreased by the changed external medium, i.e. decrease of K⁺ concentration.

Based on the above mentioned experimental results, it was surmised that Na⁺ content of muscles could be increased by using a permeable cholinesterase inhibitor in addition to the low K⁺ Ringer, because the inhibition of "sodium pump" can also be increased in the presence of these two factors. The data in figure 2 are, however, inconsistent with this assumption. The Na⁺ content of untreated muscles soaked in low K⁺ Ringer's solution for 3 hours was 37.1 mM, whereas the Na⁺ concentration of muscle treated with 10⁻⁵ M physostigmine was lower (34.6 mM) and it decreased as the molar concentration of inhibitor increased. The effect was significant in the case of 10⁻³ M concentration and an optimum was found at this concentration: i.e. when physostigmine was applied in a molar concentra-

tion ten times as high, it was no more effective. It can be seen, that Na-uptake was inhibited also by prostigmine in spite of the fact that Na-extrusion was not affected by it. Similarly, a marked inhibition was found in the case of DFP at a concentration of 10^{-5} M. Na-influx and active Na-extrusion seem to take place through separate mechanisms, and permeation of inhibitors across the membrane does not appear to be necessary for the inhibition of Na-uptake, since prostigmine containing the quaternary N group is also effective.

Na-entrance is plotted versus time in figure 3. In these experiments Na⁺ concentration rose on the average to 67.4 mM/kg wet weight during 6 hours. Physostigmine at 10^{-3} M concentration decreased the Na-uptake and the treated muscle contained only 43.7 mM Na/kg wet weight. From these experiments the Na-influx was determined, and an average value for Na-influx of 4.5 pmol/cm².sec was obtained. This is in complete agreement with the data of Keynes and Swan [12 a] and those of Hodgkin and Horowicz [13] of 4.2 pmol/cm². sec and 3.5 pmol/cm². sec respectively. Physostigmine in 10^{-3} M decreased the average influx to a value of 1.7 pmol/cm².sec.

The sodium influx takes place in two different channels or pore systems according to Keynes and Swan [12 b]. Li⁺ was found to replace Na⁺ without any essential alteration in the elicited spike potential, and as the value of Li⁺ flux was only half of the Na⁺ influx, Li⁺ entrance was supposed by Keynes and Swan to take place in a spike channel or in a pore system which is unable to differentiate between Na⁺ and Li⁺.

In the present experiments physostigmine was observed to inhibit about 50 per cent of Na-influx, so a detailed investigation of it was carried out. The results are shown in figure 4. As may be seen, the muscles gained an average of 9.9 mM Li⁺ when they were soaked in Li-Ringer for 3 hours. From the 14.4 mM Na⁺ in freshly dissected muscles, 4.8 mM remained after 3 hours in the Li-Ringer's solution: 9.6 mM Na⁺ have thus been changed, which equals the Li-uptake.

This proves that one Na⁺ is changed for one Li⁺. But this "one for one" exchange still remains after treatment with physostigmine because Na⁺ decrease is 7.6 mM and Li⁺-uptake is similarly 7.5 mM/kg. The Li-influx calculated from the average of untreated muscles amounts to 2.2 pmol/cm². sec. This value agrees with the values reported by Keynes and Swan [12 b] but shows that the Li⁺-influx amounts really to half of the Na⁺-influx. The Li⁺-influx under the influence of physostigmine decreased to the value of 1.6 pmol/cm².sec, a 27 per cent inhibition. Our experiments show that both Na⁺-influx and Li⁺-influx in the presence of physostigmine fall to 1.6–1.7 pmol/cm².sec. so that not all of the influx is inhibited.

The data of our experiments show that the inhibition of sodium uptake rose with the increase of concentration up to 10^{-3} M. At this concentration, sodium uptake was inhibited 62 per cent by physostigmine whereas Li⁺-uptake was inhibited only 27 per cent.

Keynes and Swan [12 b] suppose that one half of Na⁺-influx can be attributed to the "exchange diffusion", and the other half to the so-called passive sodium influx. It was suggested that the "spike channel"

where the passive entrance takes place is permeable both to Na⁺ and Li⁺ but the "exchange diffusion" is Na⁺ selective.

As it was mentioned above, both Li-influx and Na-influx decreased from a normal value of 2.2 pmol/cm².sec and 4.5 pmol/cm².sec respectively

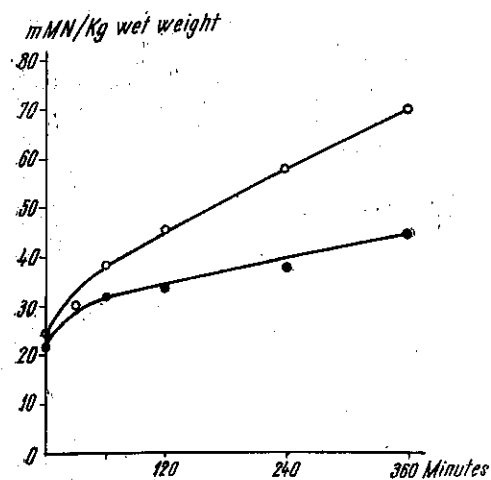
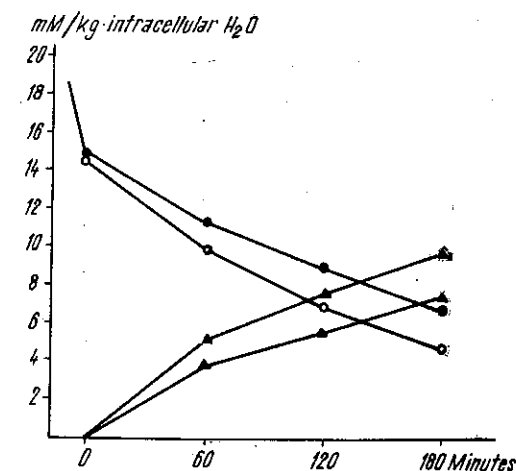


Fig. 3. — The effect of physostigmine on Na⁺ uptake by isolated frog sartorius at 20°C. The muscles were exposed to a low K⁺ soaking-in fluid. O: untreated; ●: 1 mM physostigmine during the period of equilibration and soaking in.

Fig. 4. — Effect of physostigmine on Li⁺-gain and Na⁺-loss. Muscles were equilibrated in a normal Ringer's solution for 30 minutes and then in a Li-Ringer (110 mM LiCl, the other components were the same as in normal Ringer). At the end of this procedure the extracellular space was washed in choline-Ringer for 20 minutes. The 0 min. at the abscissa means the time when muscles were transferred in Li-Ringer. Empty circles: Na, empty triangles: Li, filled circles and triangles: Na and Li concentration respectively in muscles treated with 10^{-3} M physostigmine.



to 1.7 pmol/cm².sec in the presence of physostigmine. From this fact it can be concluded that transport was inhibited across the spike-channel only to a certain extent, while through "exchange diffusion", markedly. Perhaps the cholinesterase inhibitor attached to the "carrier molecule" forms an inactive complex which is unfitted for Na⁺ transport. The membrane permeable inhibitors are able to inactivate the "carrier molecule" at the inner surfaces so that the Na⁺ extrusion is inhibited.

REFERENCES

1. KIRSCHNER L. B., *Nature*, **172**, 248, 1953.
2. HOLLAND W. C., GRIEG M. E., *Arch. Biochem.*, **26**, 151, 1950.
3. ROTHENBERG M. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 96, 1950.
4. KOCH H. J., *Recent developments in Cell Physiology*, Ed. by Kitching J. A., Butterworths Sci. Publ., London, 1954.
5. VAN DER KLOOT, W., *J. Gen. Physiology*, **41**, 879, 1958.
6. VARGA E., SZIGETI, J., KISS E., *Acta Physiol. Hung.*, **5**, 383, 1954.
7. VARGA E., KÖNIG T., KISS E., KOVÁCS T., HEGEDÜS L., *Acta Physiol. Hung.*, **7**, 171, 1955.
8. VARGA E., KÖVÉR A., KOVÁCS T., HETÉNYI E., *Acta Physiol. Hung.*, **11** 235, 1957.
9. KOVÁCS T., KÖVÉR A., BALOGH G., *J. Cell. comp. Physiol.*, **57**, 63, 1961.
10. SZÓR A., KÖVÉR A., KOVÁCS T., *Acta Physiol. Hung.*, **24**, 165, 1963.
11. DESMEDT J. E., *J. Physiol.*, **121**, 191, 1953.
- 12.a. KEYNES R. D., SWAN R. C., *J. Physiol.*, **147**, 591, 1959.
- 12.b. KEYNES R. D., SWAN R. C., *J. Physiol.*, **147**, 626, 1959.
13. HODGKIN A. L., HOROWICZ P., *J. Physiol.*, **145**, 405, 1959.

*Department of Physiology, University Medical School,
Debrecen, Hungary*

STUDIES ON THE SARCOPLASMIC RETICULUM OF FISH (*AMIURUS NEBULOSUS*) MUSCLE *

BY

A. KÖVÉR, M. SZABOLCS, L. KOVÁCS and M. RÁCZ

1. Beside ATP-ase activity, the sarcoplasmic reticular fractions show also very significant cholinesterase activities.
 2. The Ca-uptake of fish SRF is much lower than that of rabbit SRF.
 3. During aging, the enzymatic activities increase and the Ca-uptake decreases. These changes reveal symmetric characters.
- An alternation appears in response of SRF ATP-ase to Ca^{++} ; fresh preparations are activated, aged preparations are inhibited by it.

The localization of sarcoplasmic reticulum around the myofibrils and its close relation to the sarcolemma of muscle fiber suggest a definite rôle during some phase of the contraction-relaxation cycle. The relatively large size of the longitudinal tubules may allow a very rapid exchange of some substance between the sarcoplasmic reticulum and the intermyofibrillar space.

The morphology of SR is described in detail by different authors [1-3] but as yet we do not know very much about the function of such a complex cytoplasmic membrane system.

Such fractions can be produced by the differential centrifugation of striated muscle homogenate, which under suitable circumstances reveal a very significant Ca-uptake or Ca-binding [4-6]. This is accompanied by an increased ATP-splitting, and promoted by oxalate, phosphate and other anions to a great extent [7], [8]. It is generally accepted that Ca ions are required for the contraction of skeletal muscle [9 - 11]. Thus, it actually seems to be a correct assumption, that sarcoplasmic reticulum plays an important rôle in the mechanism of contraction-relaxation.

The present paper is concerned with an investigation of the Ca-uptake of fractions obtained from fish muscle, as well as with the investigation of a few other properties.

* Work presented at the First Session of Animal Physiology (Cluj, 25 - 28 May 1965).

METHODS

The minced muscle was homogenized three times for half a minute in a Waring blender, with 4 vls of extracting solution containing 0.1 M KCl, 5 mM potassium oxalate and 10 mM phosphate buffer, pH 7. The homogenate obtained in this way was centrifuged at $1,000 \times g$ for 20 minutes. The supernatant, Fr. I was first centrifuged at $8,000 \times g$ for 20 minutes. Its residue, that is Fr. II, contained mitochondria and larger fragments of sarcoplasmic reticulum. It was necessary to centrifuge the supernatants for a further hour at $25,000 \times g$ to separate the smaller fragments of sarcoplasmic reticulum from the dissolved proteins. After centrifugation, the pellet was resuspended in a solution containing 0.05 M KCl, 5 mM potassium oxalate and $MgCl_2$, 10 mM phosphate buffer, pH 7, using a Potter homogenizer. This, Fr. IV, is called sarcoplasmic reticulum fraction (SRF) in the following. The final supernatant which contained chiefly dissolved proteins is Fr. III.

The preparative procedure was carried out below $4^\circ C$. Generally, only fresh preparations were used in the experiments.

Protein determinations were performed by micro-Kjeldahl and biuret methods respectively, inorganic P determinations were made according to Taussky and Shorr [12], acetylcholine determinations were carried out according to Hestrin [13].

For the investigation of Ca-uptake, cellulose powder columns of 0.8×6 cm as well as Ca^{45} preparations of 99 $\mu C/0.12$ mM Ca specific activity were employed. The different quantities of the cell-fractions were applied to the very top of the columns (Fig. 1). After their application, 5 ml of incubation mixture consisting of 0.05 M KCl, 2 mM oxalate, $MgCl_2$, ATP, 10 mM TRIS-maleate buffer pH 7, were superfused. This was followed by 5.2 ml of the aforementioned incubation mixture with an additional $0.12 \mu M Ca^{45}/ml$, then again by the original incubation solution. Before applying the Ca^{45} incubation solution, the dripping of the original incubation solution was adjusted to 8 sec/drop. The dripping solution was collected in 1.3 ml samples, in calibrated tubes. The Ca content of each sample was calculated on the basis of its radioactivity and was expressed in $\mu M Ca/1.3$ ml. The Ca-contents,

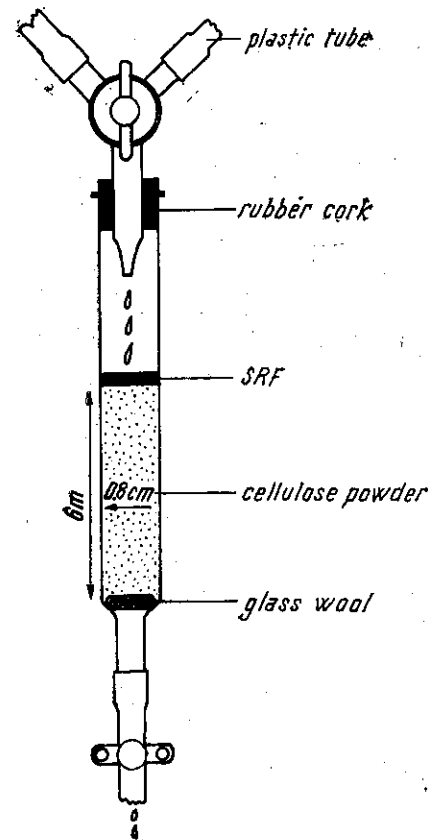


Fig. 1. — Schematic representation of cellulose-column employed for Ca-uptake.

represented in the order of the samples, gave us, in general, a bell-shaped curve.

In control experiments, cell-fractions denatured by heat or 0.1 % deoxycholate were applied onto the column. Under such conditions Ca-uptake or Ca-adsorption to cellulose powder was not observable. To express the Ca-uptake in $\mu M Ca/mg$ protein, we first added the Ca content of samples gathered in control experiments and in experiments performed with undenatured proteins, separately. Then from their difference as well as from the protein quantity of cell-fractions applied to the test-column, the measure of Ca-uptake was estimated.

In the case of Fr. II and SRF, proteins could be observed only at the upper part of the cellulose column in a layer, approximately 5–10 mm thick throughout the experiment. The dissolved proteins diffused rapidly when Fr. I and Fr. III were employed, and at the end of the experiment the presence of proteins was demonstrated in the upper part of the cellulose column only in the case of Fr. I. Taking into account the protein distribution as well as the radioactivity of the layers, it was observed that in the case of the different fractions only those proteins had Ca-binding capacity which were detected in the upper part of the cellulose columns.

RESULTS

Figure 2 shows the distribution of protein content, ATP-ase and cholinesterase activities, as well as the Ca-uptake among the various cell fractions. In the first group of columns the protein content in g per 100 g muscle, in the second cholinesterase activity, in the third ATP-ase activity, and in the last the Ca-uptake of one mg fraction are indicated. Fr. I and Fr. III show the largest protein content, because they contain chiefly dissolved proteins. As a rule one can observe that the fractions which show a relatively high ATP-ase activity, have also a significant cholinesterase activity. We may suppose that there is some connection between the two activities. The Ca-uptake was investigated both in the presence and absence of oxalate. The highest Ca-uptake was shown in Fr. IV or SRF, which sedimented at $25,000 \times g$. In the absence of oxalate the Ca-uptake was about 70–75 % less than in its presence.

Furthermore we studied the effect of aging on the properties of SRF (Fig. 3). The sudden decrease of Ca-uptake in fish SRF refers to the lability of its structure. Figure 3 shows, that the decrease of Ca-uptake is accompanied by the increase of both ATP-ase and cholinesterase activity. It is worthy of mention that the degree of cholinesterase and ATP-ase activity increase is proportional to the Ca-uptake decrease. Recently, Martonosi's results [14] called attention to the participation of phospholipids in ATP-ase activity and Ca^{++} transport of SRF. However, on the basis of his data, the decrease of Ca-uptake observed during aging is not due to the decrease of phospholipid content. Perhaps the rearrangement of the protein-structure of SRF takes place in this case. Obviously this is reflected by the increase of enzymatic activities.

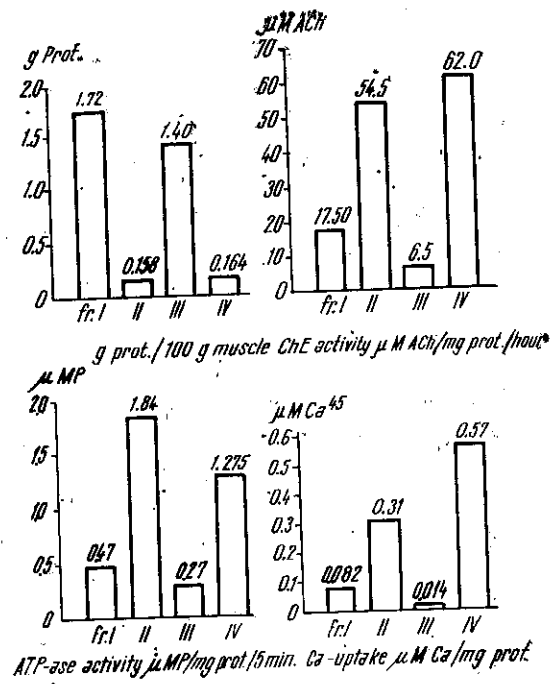


Fig. 2. — Distribution of protein content, cholinesterase and ATP-ase activities as well as Ca-uptake in various cell-fractions.

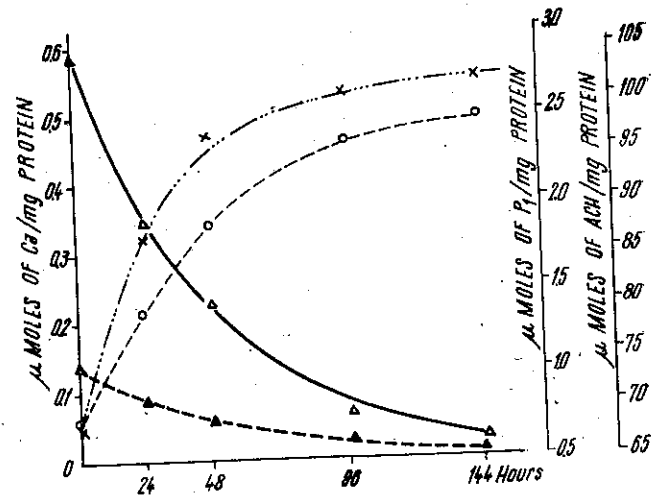


Fig. 3. — Changes in properties of SRF during aging. Ordinates indicate the Ca-uptake in μM of Ca per mg protein; μM of P_i and ACh hydrolyzed at pH 7 by one mg protein. Ca-uptake was measured in the presence of 2 mM potassium oxalate $\Delta - \Delta$, and in its absence $\blacktriangle - \blacktriangle$. ChE activity $X - \dots - X$, ATP-ase activity $0 - \dots - 0$.

During aging not only the aforementioned properties of SRF change but there is an alteration also in the activation of its ATP-ase activity by Ca ions.

In figure 4 it can be observed that 0.12 mM Ca⁺⁺ increased ATP-ase activity both in the presence and in the absence of oxalate when fresh preparations were used. During aging this activation was reduced and some days later even an inhibition was noticeable. There are contradictory reports concerning the effect and role of Ca⁺⁺. For example Hasselbach

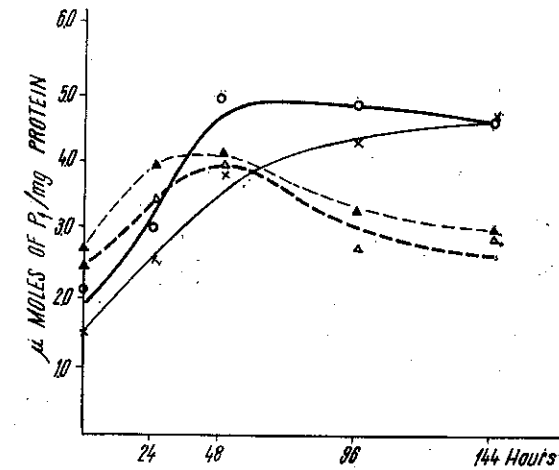


Fig. 4. — The effect of Ca⁺⁺ on ATP-ase activity both in the absence and in the presence of 2 mM oxalate during aging. μM of P_i hydrolyzed during 10 minutes at pH 7 by one mg protein are indicated: in the absence of Ca⁺⁺ and oxalate $0 - \dots - 0$, in the presence of 0.12 mM Ca⁺⁺ and in absence of oxalate $\Delta - \dots - \Delta$, in the presence of 2 mM oxalate and in the absence of Ca⁺⁺ $X - \dots - X$, in the presence of 0.12 mM Ca⁺⁺ and 2 mM oxalate $\blacktriangle - \dots - \blacktriangle$.

and Makinose [15] found that Ca⁺⁺ activated the microsome-ATP-ase Kielley and Meyerhof, as well as Muscatello *et al.* showed that Ca⁺⁺ inhibited it [16], [17]. Recently, Martonosi has convincingly demonstrated that the ATP-ase activity of reticular fragments is regulated by the Ca-concentration of medium [18]. For optimal activation the Ca-concentration is 5–50 μM . The activity declines at both lower and higher Ca-concentration. There are two possible explanations of our results. On the one hand, the Ca-concentration of medium declined below the optimal level because of the Ca-binding capacity of reticular fragments when fresh preparations were used in the experiments performed without Ca⁺⁺, consequently, the addition of Ca⁺⁺ to the incubation solution increased the ATP-ase activity. During aging, the Ca-uptake of preparation rapidly decreased and it resulted in the rise of Ca concentration of medium, perhaps to the inhibitory level and therefore an inhibition of ATP-ase activity was observed. On the other hand, it is concluded that there are two

distinct ATP-ases in the microsomal fraction; the one accounts for Ca-uptake, the other plays a role in the production of the soluble relaxing factor and they change in different ways during aging. It is our object to solve this problem in our present research-work.

REFERENCES

1. ANDERSSON-CEDERGREN E., J. Ultrastruct. Res., Suppl., 1, 1, 1959.
2. REVEL J. P., J. Cell Biol., 12, 571, 1962.
3. FRANZINI-ARMSTRONG C., J. Cell Biol., 19, 637, 1963.
4. EBASHI S., LIPMANN F., J. Cell Biol., 14, 389, 1962.
5. PARKER C. J. JR., GERGELY J., J. Biol. Chem., 236, 411, 1961.
6. HASSELBACH W., MAKINOSE W., Biochem. Z., 333, 518, 1961.
7. LORAND L., MOLNÁR J., in K. RODAHL and S. HORVATH (Editors) *Muscle as a tissue*, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, p. 97, 1962.
8. MARTONOSI A., FERETOS R., J. Biol. Chem., 239, 648, 1964.
9. WEBER A., HERZ R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 364, 1962.
10. WEBER A., WINICUR S., J. Biol. Chem., 236, 3198, 1961.
11. EBASHI S., J. Biochem. (Tokyo), 50, 236, 1961.
12. TAUSSKY H. H., SHORR E., J. Biol. Chem., 202, 675, 1953.
13. HESTRIN S., J. Biol. Chem., 180, 249, 1949.
14. MARTONOSI A., Fed. Proc., 23, 913, 1964.
15. HASSELBACH W., MAKINOSE M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 132, 1962.
16. KIELLEY W. W., MEYERHOF O., J. Biol. Chem., 183, 391, 1950.
17. MUSCATELLO U., ANDERSSON-CEDERGREN E., AZZONE G. F., J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 201, 1961.
18. MARTONOSI A., FERETOS R., J. Biol. Chem., 239, 659, 1964.

Department of Physiology and Central Research Laboratory
University Medical School, Debrecen, Hungary

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ХЕМОРЕЦЕПЦИИ В СЛОЖНЫХ ФОРМАХ ПОВЕДЕНИЯ У РЫБ *

Г. А. МАЛЮКИНА, ИОН ЧАУШЕСКУ

The role of chemical analyzers was investigated in the relation of fish in large groups in the species *Phoxinus phoxinus*, *Cyprinus carpio* and *Carasius carasius*. The results have shown that with the aid of chemical receptors these fish can perceive the presence of other individuals from the same species as well as the presence of individuals from systematically related species. The presence of predatory fish always determined a violent reaction. The same reaction is seen in the presence of skin extracts from animals of the same species. Less keenly perceived was the extract from the skin of animals systematically related and not at all the extract of fish from systematically remote families.

Для понимания физиологических механизмов, обуславливающих сложное поведение рыб в стае, важное значение имеет изучение деятельности органов чувств в процессах формирования и сохранения стаи. Тот факт, что у большинства рыб зрение играет ведущую роль при отыскании пищи, в оборонительных реакциях, ориентировке, и что стаи многих рыб распадаются в темноте и вновь образуются на свету, дает основание многим авторам считать зрение сенсорной основой стайного поведения рыб [4], [7], [9], [11].

Вместе с тем известно, что у рыб органы химического чувства (обоняние и вкус) достигают высокого развития и больших функциональных возможностей и этим органам принадлежит значительная роль в жизни многих рыб.

Задача настоящей работы заключалась в экспериментальном изучении у некоторых пресноводных видов рыб роли химических анализаторов в осуществлении сложных взаимоотношений в стае.

Стайность оказывает значительное влияние и на целый ряд физиологических функций. Так, в стае рыбы менее чувствительны к неблагоприятным условиям, более спокойно реагируют на внешние раздражители.

* Работа была представлена на I сессии по физиологии животных (Клуж, 25—28 мая 1965 г.).

Токсические вещества оказывают меньшее действие на рыбу в стае, чем на одиночную рыбу [11], [12], [13].

Стая заметно влияет и на интенсивность газообмена и двигательную активность рыб [4], [6], [11], [15], [16].

На ряде морских и пресноводных рыб было показано, что у рыб, находящихся в группе, потребление кислорода и двигательная активность ниже, чем у изолированной особи, т.е. имеет место „групповой эффект“.

Учитывая, что рыбам, находящимся в группе, свойствен „стаинный“, или „групповой эффект“, мы использовали этот объективный показатель в качестве критерия стаинности.

Опыты проводились на гольянах (*Phoxinus phoxinus* L.), карпах (*Cyprinus carpio*), карасях (*Carassius carassius* L.) с ноября 1963 г. по январь 1965 г.

Определение скорости потребления кислорода велось методом замкнутых сосудов. В качестве респираторов использовались камеры из органического стекла, разделенные непрозрачной перегородкой на два неравных отделения: меньшее, куда помещалась одна рыба, и большее, где находилась группа из 6—9 особей. На время опыта камера герметически закрывалась. Пробы воды брались до и после часовой экспозиции и по разности вычислялась интенсивность потребления кислорода (в мг, за один час в расчете на 1 грамм живого веса).

Для поддержания постоянства температуры вода для всех опытов бралась из отстойника (колебания температуры воды в опытах в течение дня составляли 0,3—1°C, в продолжении серии опытов не превышали 2°C). Количество кислорода во время опыта не падало ниже 7,3 мг/л.

Рыбы, взвешенные, подобранные, по возможности, по одинаковому весу и размеру, помещались в аквариум за 5—10 дней до начала опыта. Учитывались также и другие условия, влияющие на газообмен животных. Так, опыты проводились всегда в одно и то же время суток. Рыбы получали корм в одно и то же время после опыта.

Анализ содержания кислорода в воде проводился с помощью метода неподвижного платинового электрода.

В связи с тем, что показателем стаинности был избран „групповой эффект“, первая серия опытов (150) была проведена с целью выявить наличие и исследовать характер и особенности этого эффекта у гольянов, карпов, карасей и окуней.

Параллельные изменения интенсивности потребления кислорода, проведенные в трех группах каждого вида, показали, что интенсивность газообмена в группе всегда меньше, чем у изолированной особи, т.е. всем подопытным рыбам свойствен „групповой эффект“. Наибольшей величины он достигал у гольянов 40,5%; у карасей и карпов он составлял 40,2% и 38,2%.

Величина „группового эффекта“ может варьировать в значительных пределах в разных опытах, хотя заметных различий в условиях опытов или в поведении рыб не наблюдалось.

Анализ полученных данных показал, что несмотря на некоторые изменения интенсивности газообмена, наблюдавшиеся в разные сезоны года, „групповой эффект“ существенно не менялся. Длительное

пребывание особи в респираторе не вело к изменению „группового эффекта“ во времени.

Установив наличие четкого „группового эффекта“ у всех подопытных рыб, мы перешли к выяснению основного вопроса о роли органов химического чувства в стаинных отношениях рыб.

Способность рыб реагировать на химическое воздействие стаи своего вида была описана еще Шлейфом (1939), а позднее это же явление наблюдалось в лаборатории физиологии животных Московского государственного университета М. Штефаном (1958), Малюкиной Г.А. и М. Штефанеску. Поскольку полученные данные не были однозначными и касались только двух видов рыб, нами были предприняты опыты на рыбах разных экологических групп с целью изучить характер и особенности реакции на химическое воздействие стаи.

В опытах (111) использовались гольяны, карпы, караси и окуни (по 3 группы каждого вида). В качестве раздражителя применялась вода, в которой некоторое время находилась группа рыб того же вида, так называемая „стаинная вода“. Аэрированная „стаинная“ вода в определенном количестве подливалась в меньшее отделение респираторной камеры и после часовой экспозиции измерялось потребление кислорода. Опыты чередовались с контрольными измерениями в чистой воде.

Было показано, что все подопытные рыбы — гольяны, карпы и караси четко реагировали на „запах“ рыб своего вида. Так, если в чистой воде гольяны потребляли в среднем 0,448 мг/г час, то в „стаинной“ воде потребление кислорода у них возрастало до 0,820 мг/г час, у карпов от 0,248 мг/г час до 0,294 мг/г час и у карасей от 0,235 мг/г час до 0,287 мг/г час. „Групповой эффект“ при этом у гольянов увеличился до 72,9% (от 49,6% в контроле), у карпов до 46,3% (от 35,9%) и у карасей до 50,3% (от 39,2%) (рис. 1).

Подопытные рыбы различались по силе реакций на эти воздействия. Наименее интенсивной реакция была у карпов и карасей („групповой эффект“ возрастал на 10,4% — у карпов и на 11,2% у карасей). У гольянов эти изменения составляли 22,9%, что, по-видимому, согласуется с различиями в развитии и функциональном значении хеморецепции в жизнедеятельности этих рыб.

Таким образом, опыты этой серии показали, что все подопытные рыбы воспринимали химическое воздействие стаи своего вида и четко на него реагировали.

Убедившись в способности подопытных рыб воспринимать с помощью хеморецепции „запах“ стаи своего вида, нам предстояло выяснить насколько специфично это воздействие.

В качестве раздражителей в этих опытах (108) использовалась вода, в которой находились рыбы из родственного с подопытными рыбами семейства.

Так, гольянам подливалась вода от карпов и карасей (сем. *Cyprinidae*), карпам — вода от карасей, карасям — от карпов.

Опыты показали, что на „запах“ рыб, близких по систематическому положению, подопытные рыбы реагировали четким изменением газообмена. У гольянов среднее потребление кислорода в 0,430 мг/г час возрастало на „запах“ карпов до 0,520 мг/г час, а на „запах“ карасей — до 0,500 мг/г час. При этом групповой эффект увеличивался

соответственно на 8,1% и 7,1%. Интенсивность газообмена карпов от 0,230 мг/г час в чистой воде увеличивалась в стайной воде карасей до 0,278 мг/г час („групповой эффект” при этом возрастал на 11,2%), а у карасей в воде карпов — от 0,234 мг/г час до 0,282 мг/г час („групповой эффект” увеличивался на 9,6%) (рис. 2).

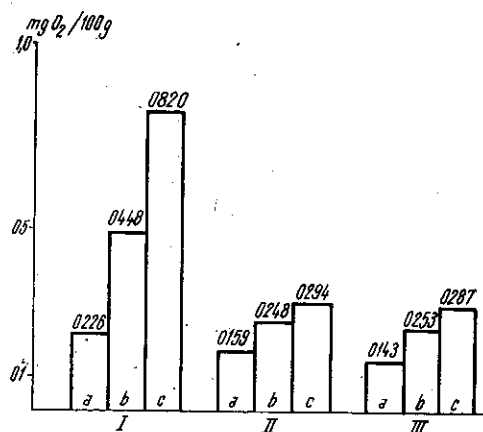
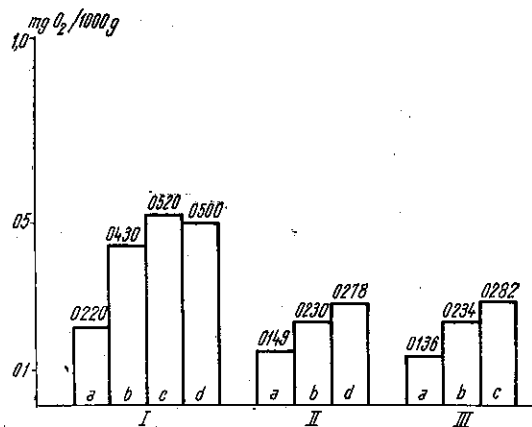


Рис. 1. — Интенсивность потребления кислорода в миллиграммах в час, в расчете на 1 г живого веса. а — рыбы в группе; б — изолированная особь в контроле; с — изолированная особь в „стайной” воде своего вида. I — гольяны (*Phoxinus phoxinus*); II — карпы (*Cyprinus carpio*); III — караси (*Carrasius carassius*) (I, II, III на всех последующих рисунках обозначения те же).

Рис. 2. — Интенсивность потребления кислорода в миллиграммах в час, в расчете на 1 г живого веса.

а — рыба в группе; б — изолированная особь в контроле; с — изолированная особь в „стайной” воде карпов; д — изолированная особь в „стайной” воде карасей.



Таким образом, опыты показали, что химическое воздействие стай рыб своего вида не является специфическим раздражителем. Рыбы способны с помощью органов химического чувства воспринимать рыб других видов, близких подопытным по систематическому положению.

Однако рыбы значительно отличались по силе реакции. Опыты на гольянах показали, что „запахи” других видов того же семейства — карасей и карпов — оказывают менее сильное воздействие, чем „запах” собственного вида. Это объясняется, по-видимому, тем, что раздражители имеют для гольянов неодинаковое биологическое значение.

У карасей в „стайной воде” карпов и у карпов в „стайной воде” карасей таких различий не обнаружено. Можно полагать, что отсутствие

существенных различий при перекрестных воздействиях объясняется систематической близостью обоих видов.

Вместе с тем „запах” мирных рыб, далеких по систематическому положению от подопытных, не оказывал сколько-нибудь заметного влияния на величину „группового эффекта” гольянов, карпов и карасей. Так, в „стайной” воде балтийской ряпушки — *Coregonus albula* (L.) (сем. *Salmonidae*) интенсивность потребления кислорода гольянами составляла 0,460 мг/г час (0,447 — в мг/г час в контроле); у карпов она равнялась 0,246 мг/г час (0,248 мг/г час в контроле), а у карасей — 0,234 мг/г час (в контроле 0,235 мг/г час). „Групповой эффект” при этих воздействиях не менялся (рис. 3).

Таким образом, опыты показали, что гольяны, карпы и караси не реагируют на химическое воздействие систематически далеких видов мирных рыб.

В литературе имеются данные, говорящие о способности рыб обнаруживать опасность, и, в частности, хищника на большом расстоянии (Мантейфель Б. П., Радаков Д. В. (1958) и др.).

Полагая, что помимо зрения в восприятии рыбами сигнала опасности определенную роль может играть химическая рецепция, мы предприняли опыты по изучению этого вопроса на тех группах рыб, которые использовались в предыдущих экспериментах. В качестве раздражителей употреблялась вода, в которой в течение некоторого времени находились хищные рыбы — щука (*Esox lucius* L.) и ротан (*Percottus Glehni* L.).

Было обнаружено, что на эти раздражители все подопытные рыбы реагировали весьма интенсивно. У гольянов „запах” ротана вызывал увеличение интенсивности потребления кислорода до 0,727 мг/г час (по сравнению с 0,463 мг/г час — в контроле), а прибывание в „щучьей” воде повышало интенсивность газообмена до 0,913 мг/г час (по сравнению с 0,463 мг/г час в норме). При этом „групповой эффект” увеличился соответственно на 20,1% и 26,2%.

У карпов на „запах” щуки потребление кислорода возрастало до 0,309 мг/г час (в контроле 0,230 мг/г час); „групповой эффект” увеличился на 16,5%. У карасей при этих воздействиях „групповой эффект” возрастал на 14,6% (рис. 4).

Сильное повышение потребления кислорода и, следовательно, значительное увеличение „группового эффекта” у всех подопытных рыб свидетельствует о том, что с помощью хеморецепции рыбы способны обнаружить хищника.

В этих опытах, так же как и в опытах со „стайной водой”, у рыб наблюдалась одинаковая реакция — интенсивное повышение скорости газообмена и, следовательно, увеличение „группового эффекта”. Однако биологический смысл этих реакций различен. Если в опытах со „стайной водой” „запах” группы своего вида вызывает беспокойство и „поиск” стай у изолированной особи, за счет чего повышается потребление ею кислорода, то при воздействии „запаха” хищника увеличение интенсивности газообмена происходит в виду того, что этот раздражитель является для рыб сигналом опасности.

Известно, что вещества, экстрагированные из кожи рыб, вызывают у *Cyprinidae* оборонительную реакцию. В связи с этим предста-

вляло интерес сравнительное исследование участия хеморецепции в восприятии сигнала опасности рыбами, различающимися по своей экологии.

Нами были предприняты опыты, целью которых было исследовать влияние на особь экстрактов кожи рыб разных видов.

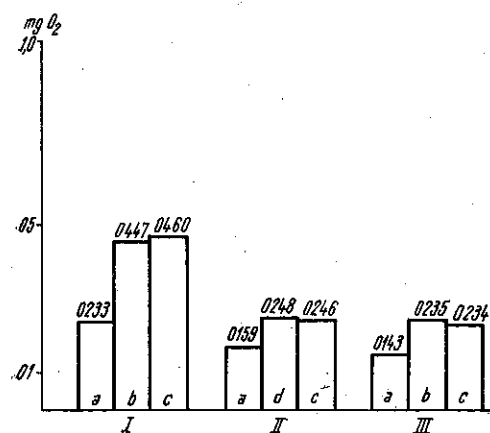
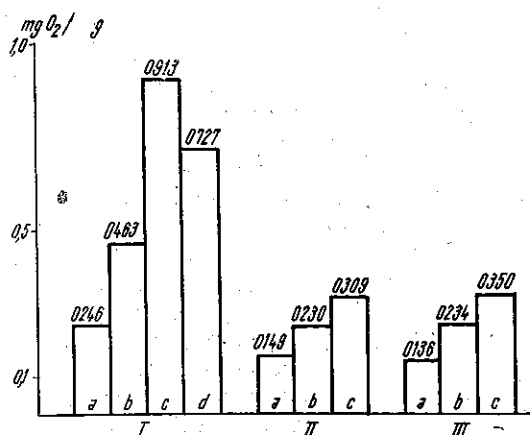


Рис. 3. — Интенсивность потребления кислорода в миллиграммах в час в расчете на 1 г живого веса. a — рыба в группе; b — изолированная особь в контроле; c — изолированная особь в воде ряпушки.

Рис. 4. — Интенсивность потребления кислорода в миллиграммах в час, в расчете на 1 г живого веса. a — рыба в группе; b — изолированная особь в контроле; c — изолированная особь в воде с „запахом“ щуки; d — изолированная особь в воде с „запахом“ ротана.



Опыты (513) проводились на тех же четырех видах рыб, которые использовались нами ранее. В качестве раздражителя применялись экстракты кожи гольянов, карпов, карасей, ряпушки, щуки, ротана, сома и окуней. В меньшее отделение респираторной камеры добавлялось по 50 мл экстракта кожи рыб, который был получен при экстрагировании 1 г кожи рыб в 1 л водопроводной воды.

Опыты показали, что наиболее сильное воздействие оказывают вещества, экстрагированные из кожи рыб своего вида. „Групповой эффект“ при этом у гольянов возрастал на 30,3%, у карпов на 18,1%, а у карасей на 14,2% за счет резкого увеличения интенсивности газообмена изолированной особи.

Экстракт кожи рыб других видов, но того же семейства, что и подопытные рыбы, оказывал меньшее действие. „Групповой эффект“ у гольянов при воздействии экстрактом кожи карпов повышался на 19,3%, а экстрактом кожи карасей на 19,7%. У карпов экстракт кожи карасей вызвал увеличение „группового эффекта“ на 11,4% и у карасей экстракт кожи карпов — на 10%.

Экстракт кожи ряпушки, принадлежащей к семейству *Salmonidae* оказался неэффективным, величина „группового эффекта“ в этих опытах оставалась неизменной.

Экстракты кожи хищников вызвали сильную реакцию у всех подопытных рыб. Вещества, экстрагированные из кожи хищных рыб, оказывали на подопытных рыб такое же действие, как и вода, в которой содержались хищные рыбы.

Результаты опытов с „запахом“ хищников и опытов с экстрактами кожи рыб показали, что химическая рецепция играет значительную роль в восприятии опасности подопытными рыбами.

Полученные данные позволяют думать, что различия в степени реакции рыбы на химические воздействия разного качества зависят от экологической адекватности раздражителя и от систематических отношений рыб. Различия же в интенсивности реакции между рыбами разных видов указывают на то, что роль хеморецепции в стайных отношениях этих рыб различна.

ЛИТЕРАТУРА

1. АЛЕКСЕЕВА К. Л., Тр. Севастоп. биол. станции, 1959, 12.
2. АНДРИЯШЕВ А. П., Докл. АН СССР, 1944, 44, 7.
3. АНДРИЯШЕВ А. П., Журн. общ. биол., 1944, 5, 1.
4. КОШТОЯНИЦ Х. С., МАЛЮКИНА Г. А. и АЛЕКСАНДРИУК С. П., Физиол. журн. СССР, 46, 9.
5. КРЫЖАНОВСКИЙ С. Г., ДИСЛЕР Н. Н. и СМЕРНОВА Н. Г., Тр. ин-та морфол. животн. им. Северцова, 1953, 10.
6. МАЛЮКИНА Г. А., АЛЕКСАНДРИУК С. П., ШТЕФАНЕСКУ М., Вопр. ихтиологии, 1962, 2, 3, 2.
7. МАНТЕЙФЕЛЬ Б. П., Тр. Совет. по вопр. поведения и разведки рыб. Изд-во АН СССР, 1955.
8. МАНТЕЙФЕЛЬ Б. П. и РАДАКОВ Д. В., Усп. сов. биол. 1960, 50, 3, 6.
9. ЧУГУНОВА Н. И., Тр. Совет. по вопр. поведения и разведки рыб. Изд-во АН СССР, 1955.
10. ШТЕФАН М., Зоол. журн., 1958, 36, 2.
11. BOWE E., 1931, Monogr., v. 1 — 1932. Biol. Bull. v. 63.
12. BREDER C., Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 1959, 117.
13. BREDER C. and HALPERN F., Physiol. Zool., 1946, 19.
14. BREDER C. and RASQUIN P., Zoologica, 1943, 28.
15. SCHUETT F., Ecology, 1933, 14, 2.
16. SCHLAIFER A., 1938. Physiol. Zool., 11, 4, 1939.

SUR LES MÉCANISMES
DE L'HOMÉOSTASIE GLYCÉMIQUE
DANS L'ATHÉROMATOSE EXPÉRIMENTALE *

PAR

I. MANTA et D. BEDELEANU

Les recherches sur les lapins avec athéromatose expérimentale montrent des dérèglements de l'homéostasie glycémique à des niveaux différents:

- A, La régulation endocrinienne: insulïnémie de base et dynamique, réponse à l'adrénaline (plateau de type prédiabétique);
- B, les enzymes liés au métabolisme glucidique: phosphorylase, hexokinase, aldolase, G-6-P-ase, G-6-P-DH, Gluconate-6-P-DH, SDH;
- C, les facteurs de limitation de la glycolyse et de la consommation d'oxygène en présence des différents substratums avec ou sans DNP, NAD, amytal, etc., qui plaident pour les dérèglements des processus énergo-enzymatiques dans l'athéromatose expérimentale.

Les conceptions actuelles plaident pour le fait que les perturbations qui surviennent dans l'athéromatose intéressent un cadre métabolique complexe, les modifications comprenant certains maillons dans le temps, à des niveaux différents.

Les observations cliniques ont montré l'association fréquente de l'athéromatose avec le diabète [1]. Dans les recherches effectuées nous avons aussi enregistré des modifications similaires, mais aussi d'autres modifications spécifiques, différentielles, entre les malades avec diabète (D), athéromatose (A) et les maladies associées (A + D) en rapport avec les témoins (T), en ce qui concerne le cuivre [2] et certains enzymes impliqués dans le métabolisme glucidique, par exemple la phosphorylase, l'aldolase, la sorbite-déshydrogénase, etc. [3].

Les recherches entreprises sur des lapins en état d'athéromatose expérimentale provoquée par un régime hyperlipidique cholestérolé d'après Anitchikov, dans une variante mise au point par nous [2], ont

* Travail présenté à la Première Session de Physiologie animale (Cluj, 25-28 mai 1965).

comme objet l'étude des mécanismes de l'homéostasie glycémique à des niveaux différents :

- A, la régulation endocrinienne ;
- B, la régulation enzymatique et les modifications des différents enzymes ;
- C, les mécanismes de contrôle au niveau des particules sous-cellulaires, spécialement des mitochondries.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats de nos recherches sont envisagés dans les graphiques comparatifs annexés (figures 1-4).

A. Régulation endocrinienne-humorale

En ce qui concerne le métabolisme des glucides, la glycémie des lapins à l'athéromatose expérimentale présente, en rapport avec les témoins, une large dispersion sans variations significatives, mais montrent une labilité des mécanismes de la régulation glycémique.

Pour élucider les causes des niveaux déréglés, nous avons utilisé le test de l'hyperglycémie provoquée, dont l'aspect rappelle celui d'un diabète léger [2], manifestant un dérèglement global du système neuro-endocrinien régulateur.

Afin d'approfondir ce phénomène, nous avons suivi le taux de l'insuline basale, qui est augmenté chez les animaux athéromateux, tandis que la réponse à la sollicitation par glucose (insulinémie dynamique) montre que les animaux témoins libèrent au cours de ce chargement une quantité plus grande d'insuline que les animaux athéromateux. Il est probable que, pour assurer les processus biochimiques, sur le fond de dérèglements complexes, une quantité plus grande d'insuline doit être sécrétée, pour pouvoir assurer un niveau suffisamment élevé (seuil tissulaire), auquel les tissus puissent utiliser le glucose circulant [4].

En ce qui concerne le rôle anti-insulaire, nous avons cherché la réponse des animaux athéromateux à l'adrénaline et nous avons constaté l'augmentation (de 20%) de l'hyperglycémie chez les animaux athéromateux en rapport avec les témoins.

Le réponse des animaux à l'alloxane, en vue de provoquer le diabète alloxanique, ne montre pas de différences significatives entre les animaux athéromateux et les témoins.

B. La régulation enzymatique et les modifications des différents enzymes

Considérant qu'à la base de ces perturbations métaboliques se trouvent des lésions enzymatiques, relativement peu décrites dans la littérature [5], nous avons dirigé notre attention sur certains enzymes que nous considérons intéressés dans l'athéromatose, en rapport avec le métabolisme glucidique, par le prisme de l'incidence clinique de l'athérosclérose avec le diabète et dans le cadre de la respiration cellulaire : les enzymes d'oxydo-réduction.

a. Les *aldolases* (d'après la méthode d'Herbert [6]) apparaissent accrues dans le plasma et les hématies des lapins athéromateux ainsi que

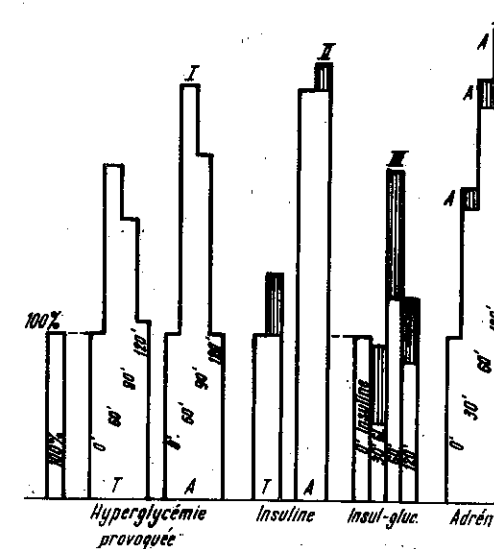


Fig. 1. — La régulation endocrinienne de la glycémie. Hyperglycémie provoquée (I), insulinémie (II), réponse à l'insuline-glucose (III) et à l'adrénaline (IV) chez les lapins athéromateux (A) par rapport aux lapins témoins (T).

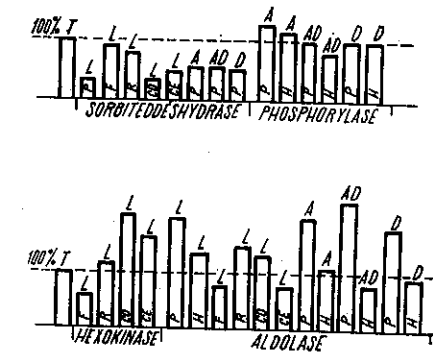
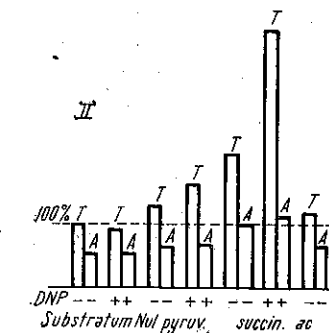
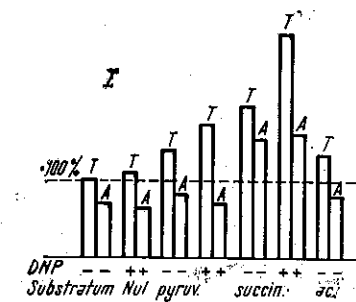


Fig. 2. — Les modifications de quelques enzymes chez les lapins athéromateux (L) et les malades avec athéromatose (A), diabète (D) et maladie associée (A + D) par rapport aux témoins (T). P, plasma; H, hématies; F, foie; R, reins; CO, cœur; CE, cerveau.



← Fig. 3. — La consommation d'oxygène des coupes (I) et des homogénats (II) de foie des lapins athéromateux (A) et des témoins (T).

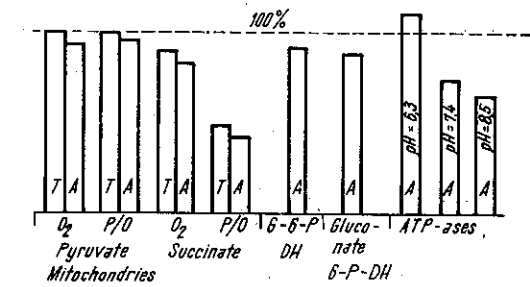


Fig. 4. — Quelques aspects du métabolisme énergobiochimique dans le cerveau des lapins athéromateux (A) par rapport aux témoins (T).

dans le cœur et les reins, organes qui, dans ce cas, peuvent être soupçonnés comme étant source de l'excès des aldolases sanguines. L'abaissement observé dans le foie peut être mis en rapport avec le fait que dans les maladies hépatiques, les taux demeurent normaux dans les formes chroniques exemptes de nécroses du parenchyme hépatique, ainsi qu'avec le dérèglement du métabolisme des glucides et avec l'altération fonctionnelle du foie, que nous avons constatée par le test de l'épuration plasmatique du BSP [7] et par observations anatomo-pathologiques. En clinique, les taux maximums se trouvent dans le groupe A + D, suivi par le groupe A et ensuite par le groupe D par rapport aux T, ces derniers présentant des taux sensiblement plus bas. Intéressant est le fait que dans les hématies, les taux sont inversés (maximum aux T et minimums aux A + D), ce qui soulève le problème nouveau d'une inversion enzymatique entre le plasma et les hématies [3].

b. Les *hexokinases*, activées par l'insuline [8] agissant sur le glucose-6-phosphate (G-6-P) en même temps que la G-6-P-ase, qui produit la libération du glucose dans la circulation, sont directement impliquées pour maintenir l'homœostasie glycémique. Nos recherches [9] effectuées d'après la méthode de Zaharine [10] pour l'hexokinase et de Swanson [11] pour la G-6-P-ase montrent une diminution au niveau du foie, tant des hexokinases que de la G-6-P-ase. Les modifications sont similaires à celles du diabète en ce qui concerne les hexokinases, mais différentes en ce qui concerne la G-6-P-ase, ce qui peut expliquer la labilité du métabolisme glucidique, ainsi que le fait que les dérèglements de ce dernier ne peuvent pas être mis en évidence par la simple détermination de la glycémie, mais seulement dans des conditions spéciales. Les hexokinases et la G-6-P-ase sont accrues dans les reins, pouvant expliquer l'absence de la glycosurie chez les animaux athéromateux.

c. Les *phosphorylases* (déterminées d'après Cori [12] et Asatiani [13] n'intéressent pas seulement le métabolisme glucidique, mais elles s'étendent aussi aux voies de transformation des lipides et des acides aminés en glucides et inversement, se trouvant en rapport étroit avec les composés macroergiques phosphorylés. Nos recherches [3] montrent que les phosphorylases étudiées sous l'aspect de la synthèse du glycogène, comportent les taux maximums chez les A, tant dans le plasma (l'accroissement le plus marqué) que dans les hématies. La diminution légère par rapport à la normale apparaît dans les hématies des malades A + D. Ainsi, l'enzyme apparaît modifié spécifiquement dans l'athéromatose, en rapport avec les autres groupes étudiés.

d. La *sorbyte-déshydrogénase* est considérée par Gerlach [14] comme l'indicateur des perturbations hépatiques, mais on sait que le myocarde et la musculature du squelette peuvent également servir comme source de l'enzyme sérique. Par la méthode modifiée par nous [15] on constate un abaissement de cet enzyme chez les animaux athéromateux par rapport aux témoins, dans le plasma et les organes étudiés (cœur, cerveau; moins dans le foie et les reins) ainsi que chez tous les groupes des malades (A, D et A + D [3]), ce qui révèle l'existence d'une lésion biochimique généralisée qui prouve qu'à ce niveau les troubles du métabolisme glucidique présentent l'aspect d'un fond enzymatique commun, modifié d'une façon analogue.

e. Nos recherches ont révélé des modifications survenues après 45 jours d'alimentation par le régime athérogène, en ce qui concerne l'acide pyruvique [15]. Ces modifications nous ont portés à l'étude de la thiamine et de ses divers esters phosphoriques chez les animaux athéromateux. D'après la méthode de Rindi [16] dans le foie on constate la diminution de la T et du TTP, et dans le sang celle du TDP, ce qui indique des altérations biochimiques au niveau de l'activation de la vitamine B₁, nécessaire pour la participation de celle-ci dans les processus enzymatiques.

Nous avons également étudié certains enzymes qui montrent des variations significatives comme le coenzyme acétylant, la triptophane-oxydase, l'histaminase, l'enzyme méthionine-activatrice, etc. [5].

f. Les modifications significatives du cuivre ont attiré notre attention sur la cytochrome-oxydase, enzyme situé dans la phase finale de la chaîne respiratoire et qui, selon l'opinion actuelle, contient du cuivre dans sa structure moléculaire. Les déterminations effectuées d'après Figareva et Tchetverniov [17] montrent l'abaissement au niveau du foie, similaire d'ailleurs aux modifications de la majorité des enzymes étudiés [9]. En revanche, nous avons constaté un accroissement surprenant (de 700-800 %) dans le cerveau des animaux athéromateux, ce qui parle en faveur de la participation directe du système nerveux central dans les dérèglements athéromateux, apportant de la sorte des arguments d'ordre biochimique aux théories nervistes touchant l'apparition et l'aggravation de l'athérosclérose.

C. Les mécanismes du contrôle au niveau des particules sous-cellulaires, spécialement des mitochondries.

Les données de la littérature [18] signalent ces derniers temps des modifications de la respiration cellulaire dans l'aorte athéromateuse. Aussi avons-nous dirigé notre attention en premier lieu sur le foie, qui présente des modifications anatomo-pathologiques, des dérèglements enzymatiques et fonctionnels [5], [7], [19], [20].

Outre la détermination classique de la respiration cellulaire par la méthode de Warburg, en milieu d'air, suivie séparément sur des homogénats et des sections de foie, nous avons étudié l'influence de l'addition des différents substrats sur la respiration cellulaire. Ayant étudié l'action des acétates, pyruvates et de quelques intermédiaires du cycle citrique, Krebs [21] constate que ceux-ci augmentent la consommation d'oxygène, probablement en raison de l'affinité plus grande pour les codéshydrases ou les flavine-enzymes des premières étapes de la chaîne des oxydations biologiques.

Nous avons abordé l'étude par l'utilisation du pyruvate et du succinate qui, dans les recherches de Krebs, s'avèrent être les activateurs les plus puissants de la respiration cellulaire. En vue d'approfondir les causes et les mécanismes intimes qui pourraient être à la base des lésions athéromateuses, nous avons utilisé le dinitrophénol (DNP) afin de découpler les processus de respiration cellulaire de ceux de glycolyse. A cet égard, Slater [22] soutient que le DNP n'a pas d'effet sur la phosphorylation

liée au substratum, mais qu'il stimule la respiration des cellules intactes, en même temps que l'inhibition des différentes fonctions qui sollicitent l'énergie cellulaire.

De nos recherches [9] dans ce domaine se dégagent les quelques faits suivants :

a. La respiration du tissu hépatique des animaux A sans addition de substratum spécial, tant sur des coupes que sur des homogénats, est de 30-40 % plus faible que chez les témoins.

b. Lorsqu'on ajoute du pyruvate sans DNP on constate l'augmentation de 40% de la consommation d'oxygène chez les témoins, tandis que chez les animaux A on ne remarque pas ce processus. Il nous semble intéressant que, à la différence des données de la littérature et du comportement des animaux témoins, qui révèlent un accroissement important à l'addition du DNP et du pyruvate (de 70 % environ dans nos expériences), chez les animaux athéromateux l'accroissement est très petit dans les homogénats, et dans les coupes nous constatons même un abaissement.

c. En présence de succinate ajouté aux coupes des animaux témoins, la respiration s'accroît de 99%, et avec du succinate et du DNP elle s'accroît de 181%, tandis que dans les coupes provenant d'animaux A l'accroissement avec succinate est de 107% et avec du succinate + DNP de 134%. Sur les homogénats, le succinate accroît chez les animaux témoins la respiration de 122%, et le succinate + DNP de 327%, tandis que chez les animaux A l'accroissement est, dans le premier cas, de 62 % et dans le second cas, de 88 %, ce qui montre que la respiration sur les coupes et les homogénats en présence de DNP est moindre chez les animaux A et sensiblement diminuée par rapport aux témoins dans le cas du succinate + DNP.

On peut conclure de nos expériences que dans l'athéromatose, il existe probablement des facteurs enzymatiques capables de modifier la respiration cellulaire. La stimulation des oxydations cellulaires par le succinate, constatée tant chez les témoins que chez les animaux athéromateux, peut être considérée comme une déviation de la voie utilisée par les enzymes pyridiniques [23], ce qui permettrait de conclure que l'étape flavinique ne constitue pas un facteur de limitation de l'oxydation.

d. En continuant nos recherches sur les lésions enzymatiques dans l'athéromatose nous avons étudié le métabolisme énergétique du tissu cérébral chez les lapins à athéromatose expérimentale [7].

Nos résultats montrent que dans le cerveau des animaux A on constate une dissociation de l'activité de l'hexokinase (augmentée) et de l'aldolase (diminuée), tandis que la glucose-6-P-déshydrogénase et la 6-P-gluconate-déshydrogénase (déterminées d'après [25]) demeurent inchangées, fait qui parle en faveur d'une déviation du métabolisme du glucose par voie pentoso-phosphorique.

La diminution de l'activité des ATP-ases à pH 7,4 et 8,5 et la non-modification de celles à pH 6,3 (d'après Kielley [26]) constatée dans les mitochondries du tissu cérébral chez les animaux A indique une perturbation des facteurs de contrôle (ATP-ases) de la chaîne oxydo-ré-

ductrice cellulaire. Ces résultats confirment les observations sur le « block » partiel du succinate et du pyruvate.

Ces constatations sont encadrées dans une conception large sur les lésions biochimiques-énergétiques dans l'athéromatose et mettent en évidence la grande capacité de compensation du cerveau par une mobilité métabolique prononcée qui assure le maintien dans les limites normales des processus d'énergogénèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. MOGA A., HĂRĂGUȘ St., *Atheroscleroza*, Ed. Acad. R.P.R., Bucarest, 1963.
2. MANTA I., BEDELEANU D., MUREȘAN L., GORUN V., *St. cerc. biochim.* 1961, 4, 1, 31-43.
3. MANTA I., BEDELEANU D., MUREȘAN L., BÎRZU O., PITEA P., MISSITS P., *Fiziologie norm. patol.*, 1964, 10, 1, 69-74.
4. MANTA I., BEDELEANU D., LAZĂR Tr., GORUN V., IONESCU D., *Fiziol., norm.patol.*, 1962, 3, 4, 321-327.
5. MANTA I., BEDELEANU D., *Revista Medicală (Tg. Mureș)*, 1862, 3, 2, 210-218.
6. HERBERT D., GORDON H., SUBRAHMANYAN I., GREEN D. E., *Biochem. J.*, 1940, 34, 1108-1123.
7. MANTA I., BEDELEANU D., GORUN V., *Fiziol. norm. patol.*, 1962, 3, 6, 509-512.
8. VOLFIN P., EBONE D., CLAUSER H., *Vth. Int. Congress of Biochemistry, Moscou, Abstracts*, Pergamon, 1961, 252.
9. MANTA I., BEDELEANU D., BÎRZU O., *St. cerc. biochim.*, 1964, 7, 1, 9-17; *Rev. Roum. Biochim.*, 1964, 1, 1, 11-17.
10. ЗАХАРИН И. И., *Биохимия (СССР)*, 1951, 16, 6, 562-66.
11. SWANSON A. MARJORIE, *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colovick, N. O. Kaplan, vol. II, p. 541; Academic Press, New-York, 1955.
12. CORI C. F., CORI G. T., GREEN A. A., *J. Biol. Chem.*, 1943, 151, 1, 39.
13. АСАТИАНИ В. С., *Биохимический анализ. I*, Грузмедгиз, Тбилиси, 1953, p. 378.
14. GERLACH U., *Klin. Wschr.*, 1959, 37, 2, 93.
15. MANTA I., BEDELEANU D., *Rev. Chim.* 1962, 7, 317-325.
16. RINDI G., GIUSEPPE A. L., *Biochem. J.*, 1961, 78, 3, 602.
17. ПИГАРЕВА З. Д., ЧЕТВЕРИКОВ Д. А., *Биохимия (СССР)* 1950, 15, 6, 517.
18. KOSKO V. A., KULNEV B. A., CHOYANSKAJA M. G., *Métabolisme de la paroi vasculaire*, Thèses du IV^e Congrès Int. d'Angéiologie, Prague, 1961, p. 108.
19. MANTA I., BEDELEANU D., LAZĂR Tr., MUREȘAN L., *St. cerc. biochim.* 1961, 4, 1, 45-48.
20. HĂRĂGUȘ St., UZA G., ROSENBERG A., BEDELEANU D., OPINCARU A., *St. cerc. Med. (Cluj)*, 1960, 11, 1, 35-51.
21. KREBS H., *Ciba Foundation Symp. on the Regulator of Cell Metabolism*, ed. G.E.W. Wolstenholme, Cecilia M. O'Connor J. A. Churchill, London, 1959, p. 1-11.
22. SLATER C., *Vth. Int. Congress of Biochemistry, Moscou, 1961, Symp. V*, preprint 129.
23. READFERN E. R., *Vth. Int. Congress of Biochemistry, Moscou, 1961, Symp. V*, preprint 133.
24. MANTA I., BEDELEANU D., GORUN V., MUREȘAN L., BÎRZU O., BODEA I., *Clujul Medical*, 1964, 34, 2-3, 132-141.
25. KORNBERG A., HORECKER B. L., *Methods in Enzymology*, ed. S. P. Colovick, N. O. Kaplan, Acad. Press., New-York, 1955, p. 323.
26. KIELLEY W. W., *Vth. Int. Congress of Biochemistry, Moscou, 1961, Symp. V*, preprint 157.

Chaire de Chimie Biologique
de l'Institut Médico-Pharmaceutique
de Cluj, 6, rue Pasteur Roumanie.

SEASONAL VARIATIONS OF HYPERGLYCEMIC
REACTIVITY TO ADRENALIN IN ANURA *

BY

CONSTANȚA MATEI-VLĂDESCU

Modifications of hyperglycemic reactivity to adrenalin under the influence of dose, season and temperature were studied in two species of anura, *Rana ridibunda* and *Bombina variegata*, establishing at the same time the action threshold of hormone.

It was found that the intensity of adrenalin hyperglycemia was directly proportional to the injected dose of hormones; in autumn and winter, with similar adrenalin, doses more intense and lengthier hyperglycemias were obtained than in the other seasons.

The action threshold of the hormone corresponds to the dose of 10 μ g adrenalin/kg body weight, in winter.

In continuation of the study undertaken by us on the regulation of carbohydrate metabolism in amphibia, after the investigation of normal glycemia (17), of tolerance to glucose [6], and of the action of insulin [7], we have proceeded to the study of the effect of adrenalin.

The hyperglycemiant action of adrenalin in amphibia was emphasized by different research workers [12], [16], [18], but the agents which may influence hyperglycemic reactivity to adrenalin of these animals have so far not been studied. Therefore in research works carried out on two species of anura, *Rana ridibunda* and *Bombina variegata*, we have observed the modifications of hyperglycemic response to adrenalin according to dose, season and temperature, and tried to establish the action threshold of hormone.

In the present paper we give the results of these investigations.

MATERIAL AND METHOD

For our experiments we have used 134 adult specimens, males and females of *Rana ridibunda*, captured in the neighbourhood of Bucharest and of the Nucet Piscicultural Station,

* Work presented at the First Session of Animal Physiology (Cluj), 25-28 May 1965).

and 59 specimens, of both sexes, of *Bombina variegata*, at the Sinaia Zoological Station. The average weight was 70 g in *Rana ridibunda* and 7 g in *Bombina variegata*.

After capture, the animals were kept without food in earthen aquariums. 24 hours before experiments they were brought to the laboratory and kept in small aquariums, at whose bottom a continuous water current was passing. Experiments were made at temperatures varying, according to season, between 16 and 28 °C.

For experimenting, animals were divided into lots of 3–5 specimens each. Every animal was injected with adrenalin, and then, at various time intervals blood was taken for analyses. In *Rana ridibunda* blood was taken by cardiac puncture, while in *Bombina variegata* by bleeding. Glycemia was dosed by the Hagedorn-Jensen method.

$10/100$ Biofarm adrenalin was used. Dilutions were made with physiological saline solution (6.5% NaCl). Experimental doses were injected into the dorsal lymphatic sacs. Experiments were carried out in all seasons.

RESULTS OBTAINED

Variation of hyperglycemic reactivity to adrenalin according to dose

In experiments carried out on *Rana ridibunda* in the months of July–August, at a temperature varying between 25 and 28 °C, the action of 4 different adrenalin doses: 50, 100, 500 and 1000 micrograms/kg was observed. After the adrenalin administration, blood samples were taken at 1, 4 and 24 hours, glycemia being determined. The results are shown in the graph of figure 1.

It is found that the intensity of adrenalinic hyperglycemia is directly proportional to the injected dose of adrenalin. Glycemia increases in the first 4 hours after injection, and returns to normal after 24 hours.

A direct proportionality between adrenalin dose and hyperglycemic response was likewise found in *Bombina variegata* (Fig. 2). The return to normal of glycemia in this species was, however, more rapid, even after 4 hours. Experiments were carried out in July, at 23 °C.

In both species, the effect of adrenalin on melanophores lasted about 2 hours.

Seasonal variation of hyperglycemic reactivity to adrenalin

To detect seasonal variations of hyperglycemic reactivity to adrenalin in *Rana ridibunda*, we likewise repeated the experiments towards the end of autumn (November) at temperatures of 16–18 °C, when the animals had a lower metabolism.

We found the same dependence between dose and induced hyperglycemia intensity (Fig. 3). For the same doses of adrenalin, the value of adrenalinic hyperglycemia was however higher than in summer ($0.02 < p < 0.05$), while the time necessary for re-establishing the initial glycaemic level was longer; 48 hours (Fig. 4).

During reproduction season (May, at 20 °C), response to adrenalin was feeble even in animals treated with doses of 2000 micrograms/kg. At such

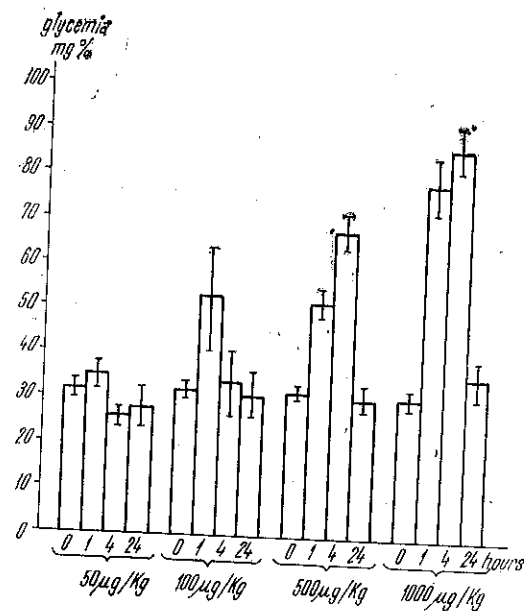


Fig. 1. — Action of adrenalin on glycemia in *Rana ridibunda* (July–August, 25–28 °C; the vertical lines represent the standard error of the average).

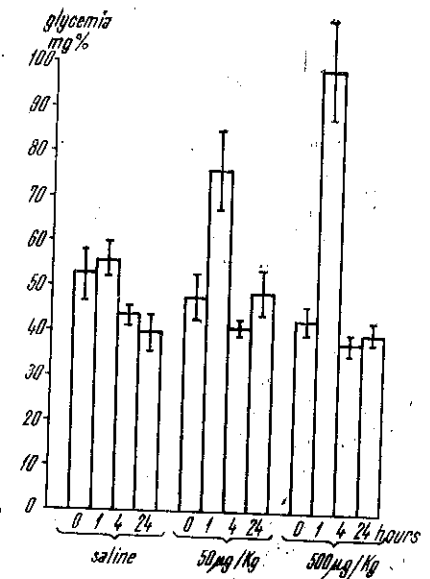


Fig. 2. — Action of adrenalin in *Bombina variegata*.

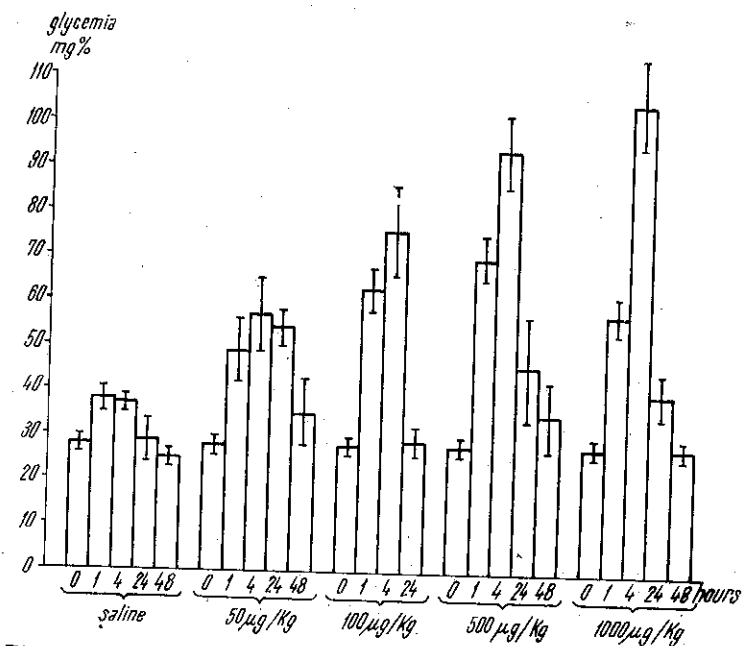


Fig. 3. — Action of adrenalin on glycemia in *Rana ridibunda* (November, 16–18 °C).

doses glycemia increased after 4 hours from 28 ± 2.05 mg. % to only 52 ± 4.94 mg. %.

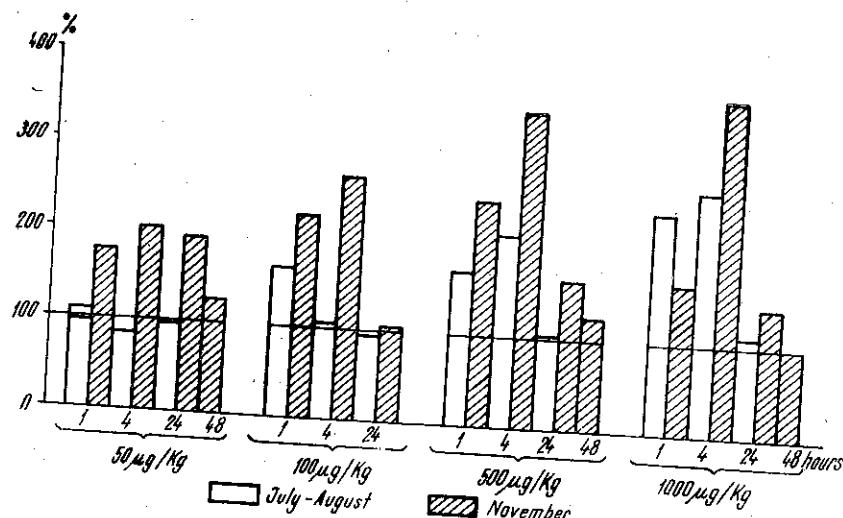


Fig. 4. — Seasonal variation in hyperglycemic reactivity to adrenalin, in *Rana ridibunda* (percentual values as against average normal glycemia considered as 100).

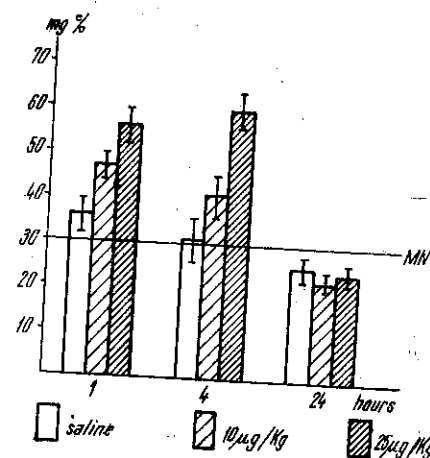


Fig. 5. — Sensitivity to adrenalin in *Rana ridibunda* (MN = average of normal glycemia).

The limit of sensitivity to adrenalin

In December, in the laboratory, at a temperature of $+24^{\circ}\text{C}$ we tested the action of some small adrenalin doses, 10 and 25 micrograms/kg (Fig. 5) on several specimens of *Rana ridibunda*. From the comparison of the action of these doses with that of physiological saline solution administered alone, results the existence of a hyperglycemic effect even for the dose of 10 micrograms/kg, in the first hour after adminis-

tration ($0.02 < p < 0.05$). The 25 micrograms/kg dose was plainly hyperglycemic ($p < 0.01$).

DISCUSSION OF RESULTS

In our investigations on *Triturus vulgaris* [8], we have likewise found a direct dependence between the adrenalin dose and the induced hyperglycemia intensity. This dependence was also observed in other species belonging to the other classes of lower vertebrates [9], [11], [13] and [14]. Mazeaud [10], [11] has shown that the directly proportional relationship between dose and induced hyperglycemia is only found up to a certain limit. This limit seems to be determined by the glycogen reserves which the animal has at the moment of the experiment, as in amphibians, and in the rest of vertebrates, adrenalinic hyperglycemia appears due to hepatic glycogenolysis [2] and [4].

The cause of seasonal differences observed by us in *Rana ridibunda* regarding hyperglycemic reactivity to adrenalin, might be explained by the fact that, in amphibians, the concentration of tissue glycogen varies throughout the year, in that it reaches a maximum level in autumn and drops to a minimum in spring [5], [15]. As far as the duration of hyperglycemic effect is concerned, we consider that this depends particularly on the difference of temperature. The phenomenon was studied by Mazeaud in the carp, by Khalil and Ianni (quot. 10) in *Uromastix aegyptia* and by Coulson and Hernandez in alligator [3].

As a matter of fact, temperature influences other effects of adrenalin as well [1].

Sensitivity to adrenalin in anura has not been studied. From our experiments on *Rana ridibunda* it results that during winter, very small doses of adrenalin (10 micrograms/kg) induce an evident hyperglycemic effect. In summer, however, sensitivity to adrenalin is smaller. This action threshold of hormone is similar to the one determined by us in *Triturus vulgaris* [8], and in certain species of reptiles [9], but is higher than that found by Motelică [13] and Mazeaud [10] for carp (1 microgram/kg).

CONCLUSIONS

1). Hyperglycemia induced by adrenalin in *Rana ridibunda* is proportional to the hormone dose used. For a similar dose of adrenalin, it is greater and of longer duration in autumn and winter than in the other seasons.

We consider that these differences are due to seasonal variations of glycogen reserve and to metabolism intensity (under the influence of temperature).

2). The action threshold of hormone is of about 10 micrograms/kg (during winter season).

REFERENCES

1. AVARGUES M., C.R. Soc. Biol., 1961, **155**, 4, 732.
2. BUCHWALD K. W., CORI C. F., J. Biol. Chem., 1931, **92**, 355.
3. COULSON R. A., HERNANDEZ T., *15th International Congress of Zoology*, London.
4. CRAIG A. B. J., Amer. J. Physiol., 1958, **193**, 2, 425.
5. GOLDFEDEROVA A., C.R. Soc. Biol., 1926, **95**, 27, 80.
6. MATEI-VLĂDESCU C., Rev. Biol., 1963, **8**, 4, 447.
7. — Rev. roum. Biol., Série de Zoologie, 1964, **9**, 5, 343.
8. — Rev. roum. Biol., Série de Zoologie, 1965, **10**, 3.
9. MATEI-VLĂDESCU C., MOTELICĂ I., Rev. roum. Biol., Série de Zoologie, 1964, **9**, 6, 407.
10. MAZEAUD F., C.R. Soc. Biol., 1964, **158**, 1, 36.
11. — C.R. Soc. Biol., 1964, **158**, 6, 1230.
12. MILLER R. M., *Comparative Physiology of Carbohydrate Metabolism in Heterothermic Animals*, Washington, 1961, 125-147.
13. MOTELICĂ I., Doctor's Thesis, Cluj, 1965.
14. ПЛИСЕЦКАЯ М. Е., ЛЕЙВЗОН Г. Л., СТАБРОВСКИЙ М. Е., Физiol. Ж., 1961, **1**, 117.
15. SMITH C. L., J. Exp. Biol., 1950, **26**, 412.
16. — J. Endocrinol., 1954, **10**, 184.
17. VLĂDESCU C., Rev. Biol., 1961, **6**, 2, 169.
18. WRIGHT P. A., Endocrinology, 1959, **64**, 4, 551.

LA REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE - SÉRIE DE ZOOLOGIE - paraît 6 fois par an. 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 :

ALBANIE, Ndermarja Shtetnore e Botimeve - Tirana ■ R. D. ALLEMANDE, Deutscher Buch-Exp. und -Import, G-mbH Leninstrasse 16-701 Leipzig ■ R. F. ALLEMANE, Kubon & Sagner, POB '68 - Munich 34; W. E. Saarbach, POB 1510-6, Cologne ■ AUTRICHE, Globus Buchvertrieb, Selzgries 16 - Vienne XX ■ BELGIQUE, Du Monde Entier, 5, Place St-Jean - Bruxelles ■ R. P. de BULGARIE, Raznoiznos, 1, rue Tzar Assan - Sofia ■ R. P. de CHINE, Waiwan Shudian, POB 88 - Pékin ■ R. P. D. COREENNE, Chulphanmul - Pyong-Yang ■ CUBA, Cubartimpex, Calle Ermita 48 San Pedro - La Havane ■ ESPAGNE, Libreria Herder, Calle de Balmas 26 - Barcelonne ■ ETATS UNIS D'AMÉRIQUE, Fam Boock Service 69 Fifth Avenue Suite 8 F - New York 10003, N.Y.; Continental Publications, 111, South Mernanee Ave., St. Louis Missouri 63105 ■ FINLANDE, Akatemenen Kirjakauppa, POB 128 - Helsinki ■ FRANCE, Messageries de la Presse Parisienne, 111, Rue Réaumur - Paris 2 ■ GRANDE BRETAGNE, Collet's Holdings Ltd., Denington Industrial Estate, Wellingborough, Northants ■ HONGRIE, Kultura, POB 149 - Budapest 62 ■ ISRAËL, Haifepac Ltd., 11 Arlesoroff Street - Haifa; Lepac, 15 Rembom Street - Tel-Aviv ■ ITALIE, So. Co. Lib. Ri Export-Import, Piazza Margana 33 - Rome ■ JAPON, Nauka Ltd., 2 Kanda Zimbocho, 2 Chome Kiyoda-ku - Tokyo ■ R. P. Mongole, Mongolgosknigotorg, Ulan Bator ■ NORVÈGE, Norsk Bogimport, POB 3267 - Oslo ■ PAYS-BAS, Meulenhoff, Beulingstraat 2 - Amsterdam ■ POLOGNE, Ruch, ul. Wilcza 46 - Varsovie ■ PORTUGAL, Libreria Buchholz, Avda. Liberdade - Lisbonne ■ SUÈDE, D. C. Fritze, Fredgatan 2 - Stockholm 16 ■ SUISSE, Pinkus & Cie, Froschaugasse 7 - Zurich ■ TCHÉCOSLOVAQUIE, Artia, Ve Smeckach 30 - Prague I ■ U.R.S.S., Mejdunarodnaia Kniga, Moscou - G-200 ■ R. D. VIETNAM, So Kunt Nhap, Khap Sach Bao, Hai Ba Trung 32 - Hanoi ■ R. S. F. YOUGOSLAVIE, Jugoslovenska Knjiga, Terazije 27 - Belgrade; Forum, Vojvode Misica - Novisad; Prosveta, Terazije 16/1 - Belgrade.

En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste, chez votre facteur ou directement par les services de presse des entreprises et institutions.

Une livraison prompte vous sera assurée.

NOUS VOUS PRIONS DE RENOUVELER VOTRE ABONNEMENT POUR L'ANNÉE 1967