

REVUE ROUMAINE DE
BIOLOGIE

— SÉRIE DE ZOOLOGIE —

TOME 15

1970

N° 3

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
PETRU BĂNĂRESCU, Contributions to the knowledge of the genus <i>Megalobrama</i> (Pisces, Cyprinidae)	133
M. I. VARO, Die Bildung der Blutzellen bei <i>Cyprinus carpio</i> L.	141
C. PRUNESCU, Les cellules neurosécrétrices des ganglions ventraux des Chilopodes anamorphes	147
A. SĂFTOIU, La neurosécrétion cérébrale aux stades avancés des espèces de <i>Caenis</i> (Fam. <i>Caenidae</i> , <i>O. ephemeroptera</i>)	153
ANCA PETRESCU-RAIANU, Investigations on the differentiation in zones of the adrenal gland in <i>Phalacrocorax carbo</i> L.	159
E. A. PORA, A. D. ABRAHAM, Z. URAY, MARIANA MANIU and M. FĂRCĂȘANU, Effects of some radioprotective substances on the NADH-cytochrome C reductase activity of isolated liver mitochondria	165
URAY Z., MADAR I., E. A. PORA and T. HOLAN, Contributions to the study of the mechanism of AET action on the carbohydrate metabolism in white rats	169
E. VĂSILESCU, Sleep and wakefulness in the tortoise (<i>Emys orbicularis</i>)	177
M. ȘERBAN et DITA COTARIU, La biochimie comparée des isoenzymes. VI. Isoenzymes des déshydrogénases maliques des muscles squelettiques des Vertébrés	181
L. M. BURUIANĂ, The enzymogram, a genetic index	189
LILIANA GEORGIAN, Corrélations entre le caryotype et le zymogramme de la déshydrogénase lactique dans la tumeur Guérin T ₈	203

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.

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

La «REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE — Série de ZOOLOGIE» paraît 6 fois par an.

Le prix d'un abonnement annuel est de £ 2.10.0; \$ 6, —; FF 29, —; DM 24, —.

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.

CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE GENUS
MEGALOBrama (PISCES, CYPRINIDAE)

BY

PETRU BĂNĂRESCU

Sinibrama Wu, 1939 is considered a subgenus of *Megalobrama*; it contains two species: *M. macrops* with four subspecies and *M. changi*, which bears some similarity with *Hemiculter* and especially with *Ancherythroculter*. *M. melrosei* Nichols & Pope is a synonym of *M. macrops affinis* (Vaillant). *Megalobrama* Dybowski 1872 s. str. includes two species; *M. hoffmanni* is a synonym of *M. terminalis*; *M. amblycephala* Yih is the species usually recorded as *M. bramula* (Valenciennes) whose nominal status is doubtful, the original description being inadequate and based on a painting. A probable hybrid between *M. macrops affinis* and *M. terminalis* is described.

The genus *Megalobrama*, as understood by J. T. Nichols [5], L. S. Berg [1], G. V. Nikolski [6], includes deep-bodied bream-like East Asian carps similar to *Parabramis* but with the abdominal keel restricted to the postventral region. Hs. W. Wu [7] splits this genus, ascribing the species with slightly shorter anal fin and bipartite air-bladder to a distinct genus, *Sinibrama*; this view was adopted also by H.w. Chang [2] and Hs. W. Wu & others [8].

The delimitation of the genera within the Cultrinae is difficult and rather arbitrary, while the species are in general well-differentiated; by splitting the genera too much, one runs the risk of having too many genera, most of them monotypic or containing quite few and closely related species. I consider therefore that *Sinibrama* deserves only subgeneric rank.

Megalobrama as here understood differs from *Erythroculter* and *Ancherythroculter* in its deeper body (yet the extreme values may overlap), terminal mouth with equally long jaws (as against superior mouth with prominent lower jaw), stronger and more hooked pharyngeal teeth with better developed grinding surface.

A review of the Chinese species of *Megalobrama* and *Sinibrama* was recently published by Yih and Wu (in Wu & oth., [8]); the North

Vietnam forms were not taken into consideration. The study of the available specimens led me to a conclusion somewhat different from his.

Specimens examined: some 220, belonging to the following collections: Academy of Natural Sciences of Philadelphia (A.N.S.P.), American Museum of Natural History, New York (A.M.N.H.), British Museum of Natural History, London (B.M.N.H.), Institutul de Biologie "Tr. Săvulescu", București (I.B.T.S.), Museum National d'Histoire Naturelle, Paris (M.N.H.N.), Field Museum of Natural History, Chicago (F.M.N.H.), Naturhistorisches Museum, Wien (N.M.W.), United States National Museum, Washington (U.S.N.M.), Stanford University, Zoological collections (S.U.), Zoologisches Museum der Humboldt Universität, Berlin (Z.M.B.), Zoologisches Staatsinstitut und Museum, Hamburg (H.Z.S.).

SYSTEMATIC ACCOUNT

Subgenus *Sinibrama* Wu, 1939

Yih and Wu recognize four Chinese species of *Sinibrama*: *wui* with two subspecies — *wui* "typus" (right name: *wui wui*) from the Upper Yangtze and *wui polylepis* from Hsinking drainage in Kweichow—, then *macrops* from Taiwan, Fukien and Chekiang, *melrosei* from Hainan and *changii* from the Upper Yangtze. A sixth nominal form, usually considered as distinct species, is "*Chanodichthys*" *affinis* from North Vietnam. The ranges of all these forms, except *changii* which occurs sympatrically with *wui* are representative and their distinguishing characters are slight and only statistical: the values of scales number, anal rays and body proportions overlap; I therefore consider them subspecies of a single species, *Megalobrama* (*Sinibrama*) *macrops* (Günther, 1968).

1) *M. (Sinibrama) macrops* (Günther, 1868)

Figs 1-4

Specimens examined:

- From Taiwan (Formosa):
- Syntypes of *Chanodichthys macrops*: B.M.N.H., 1865, 5.2. 15-19, leg. Swinhoe, 5 spec., 87.5-182.0 mm st. length; the longest specimen (No. 1865, 5. 2. 15) is declared lectotype;
 - F.M.N.H. 59109, Tamusui R., Taiwan, 2 spec., 163 and 145 mm;
 - I.B.T.S. 1338, Keelung, N. Taiwan, 1 spec., 127 o. mm.
- From Fukien (Minkiang drainage):
- H.Z.S. 11173, no local., 2 spec., 98.0 and 101.2 mm;
 - A.M.N.H. 10234, near Yenping, Sept. 1920, 3 spec., 142-158 mm;
 - A.M.N.H. 10377, same locality, 1926: 32 spec., 49.5-125.0 mm;
 - A.M.N.H. 11058, Chung Hsien, 12 spec., 89.0-155.5 mm.

From Chekiang:

S.U. 32475, Tsien Tang R., 2 spec., 108-122 mm.

From North Vietnam:

— Holotype of *Chanodichthys affinis*, M.N.H.N. 9247, 102.0 mm;

— I.B.T.S. 622, Boi R., 1 spec., 86.0 mm;

From Hainan Island:

— Holotype of *Megalobrama melrosei*, A.M.N.H. 8378 Nodoo, 66.0 mm;

— A.M.N.H. 10965, Nodoo, 84 spec. (10 measured: 86.0-110 mm);

— A.M.N.H. 10980, no locality, 2 spec., 87.0-93.1 mm;

— A.M.N.H. 10978, no locality, 3 spec., 49.1-56.2 mm;

— N.M.W. 9759, Kangkong R., 1 spec., 75.1 mm.

The comparative study of the available specimens showed but little differences between them. The number of branched anal rays is practically the same:

20-22, rarely 19 or 23 in Hainan specimens ($M = 21.13 \pm 0.17$ in 30 specimens from Nodoo);

21-23 in the specimens from Taiwan ($M = 21.8 \pm 0.29$);

21 in the available North Vietnam and Chekiang specimens;

20-23, rarely 19 or 24 in the specimens from Fukien ($M = 21.13 \pm 0.21$ in the specimens from Yenping, 21.59 ± 0.30 in those from Chung Hsien).

Gill rakers: 10-12 in Taiwan, 11-13 (rarely 14) in Fukien, 10-12, rarely 13 in Hainan specimens.

The number of scales in lateral line is more variable:

55-61 in Taiwan specimens ($M = 59.0 \pm 0.53$);

56-61 in Fukien specimens ($M = 58.07 \pm 0.22$ in Yenping, 58.65 ± 0.33 in Chung-Hsien ones);

48-55 in 40 specimens from Nodoo, Hainan ($M = 53.40 \pm 0.16$);

49-54 in other specimens from Hainan;

49 on both sides in the two specimens from North Vietnam;

59-60 in the two specimens from Tsien Tang R., Chekiang.

The body proportions are shown in Table 1. One remarks that most values are practically the same in all populations examined; the head and the eye are slightly larger, the snout on the contrary slightly shorter in the specimens from Hainan and Vietnam than in those from Taiwan and Fukien; but the stronger differences concern the caudal peduncle (longer in Hainan and Vietnam populations) and the pelvic-anal distance (longer in Taiwan and Fukien populations).

The general conclusion is that the specimens from Taiwan, Fukien and Chekiang, on the one hand, those from North Vietnam and Hainan, on the other, agree both in scales number and in body proportions; the nominal subspecies, *M. macrops macrops*, described from Taiwan Island occurs also in the mainland adjacent provinces Fukien and Chekiang, while *M. melrosei*, described from Hainan Island, is a synonym of *M. macrops affinis* from North Vietnam.

According to the available data in the literature, the upper Yangtze subspecies, *M. macrops wui*, has 21-24 branched anal rays, a deeper body than *macrops macrops* and *m. affinis* (depth 32.3-33.8%) and 53-56 scales (like *m. affinis*). The Hsikiang subspecies, *M. macrops*

Table 1

	<i>Megalobrama macrops affinis</i>				<i>Megalobrama macrops macrops</i>			
	Hainan Island		North Vietnam		Taiwan Isl.		Chekiang	
	Nodoa	no local.	Kang-kong R.	Type sp.	Boi R.	Yenping	Tsien-Tang R.	
Stand. length, mm	86.0-111.0	49.0-98.0	75.1	102.0	86.0	87.2-182.0	99.0-158.0	108.0-122.0
body depth	29.0-32.5 (30.92)	23.0-30.2	28.1	32.4	29.6	30.6-33.8	28.7-33.3 (30.16)	28.8-30.2
caudal ped.	16.0-18.6 (17.37)	16.7-19.6	16.6	17.6	17.5	14.6-17.1	13.6-17.0 (15.14)	15.6-15.8
least depth	9.7-10.9 (10.24)	8.5-9.3	8.3	10.0	10.2	9.4-10.1	9.8-10.8 (10.30)	10.7-10.9
predorsal	48.0-51.2 (49.44)	46.5-50.5	51.6	51.0	49.6	46.5-51.5	48.2-51.8 (50.06)	50.2-50.8
preanal	61.0-64.0 (62.47)	60.5-64.5	61.1	61.0	61.6	61.5-66.0	59.8-66.5 (63.24)	63.5-64.7
P-V dist.	20.2-24.2 (22.10)	18.0-21.0	20.7	21.1	21.8	22.8-25.9	20.8-25.2 (22.56)	22.3-23.6
V-A dist.	16.3-19.4 (17.71)	15.2-17.8	16.6	17.6	16.3	21.4-23.6	17.3-21.8 (19.24)	20.2-20.4
pectoral	18.8-22.4 (20.23)	18.9-21.3	21.3	20.6	20.9	19.3-20.6	19.8-21.8 (20.55)	19.6-20.8
pelvic	14.7-16.6 (15.48)	14.3-19.3	16.6	16.6	15.5	14.5-16.0	15.1-17.1 (16.32)	16.0-16.9
D-spine height	17.7-24.4 (19.22)	16.4-19.6	17.7	18.1	-	18.7-21.4	20.2-22.4 (21.21)	19.6-20.4
D-height	19.4-26.2 (24.55)	20.0-24.0	21.3	21.1	-	20.0-22.5	20.9-23.8 (22.68)	22.0-22.2
head length	24.3-27.4 (26.21)	25.8-28.4	25.9	25.3	25.6	22.4-25.0	23.8-26.2 (24.73)	24.4-24.6
snout	5.8-7.1 (6.43)	6.0-7.2	6.8	6.1	6.1	5.6-7.2	6.3-8.3 (6.89)	6.5-6.8
eye diam.	8.2-10.4 (9.02)	8.6-10.6	9.7	10.3	9.3	7.2-8.6	7.9-9.7 (8.88)	8.2
snout	22.8-27.2 (24.53)	21.8-26.2	26.6	23.6	24.2	24.8-28.6	25.6-30.8 (27.07)	26.7-27.4
eye diam.	32.6-39.0 (34.47)	33.4-37.4	35.8	40.1	36.3	30.9-36.4	33.6-38.2 (36.0)	33.3-33.5

in % of standard length

in % of head

Body proportions in *Megalobrama macrops*

polylepis, has 22-24 anal rays (like *wui*), a deep body (depth 29.4-34.0%) but 56-59 scales, like the nominal subspecies.

2) *Megalobrama (Sinibrama) changi* (Chang, 1944).

Fig. 5

Specimens examined: F.M.N.H. 51130, Min R. at Kiating, Szechwan; 11 spec., 98.5-125.0 mm standard length.

D III 7; A 2/(16) 17-19; L. lat. $51 \frac{9}{4}$ 56; Sp. br. (11) 12-14; D.

phar. 5.4.2-2.4.4., 4.4.2-2.4.5 or 4.4.2-2.4.4.

In % of standard length: body depth 24.5-29.2% (M = 26.7); caudal peduncle length 17.1-21.9% (19-15); least depth 9.3-11.6% (10.92); predorsal distance 47.7-55.7% (50.14); preanal 61.8-66.2% (64.02); preventral 43.6-48.6% (46.58); distance from pectoral to pelvic origin 22.3-24.8% (24.15); from pelvic to anal origin 16.7-22.4% (20.05); length of pectoral 17.0-20.4% (19.05); base of anal 17.3-21.7% (19.8); head length 23.2-24.6% (23.86); snout length 5.0-7.0% (6.25); eye diameter 6.7-7.9% (7.30); in % of head: snout 24.6-28.6% (26.28); eye diameter 27.6-34.0% (30.66); eye 75.0-97.0% (87.4) of interorbital width.

Lateral line slightly more decurved than in *M. macrops*.

Back brownish (in preserved specimens), body sides silvery. Minute blackish spots, grouped in a longitudinal stripe, on lateral line scales.

In its general habitus, rather low body, eyes smaller than the interorbital width, this species differs sharply from *M. macrops* and bears some similarity with *Hemiculter*, especially with the Upper Yangtze *H. liui*, in which the abdominal keel is postventral and the lateral line slightly decurved. Yet in all available *Hemiculter* species the postorbital bones are broad, while in *changi* they are narrow, as in the other *Megalobrama* species. *M. changi* is close also to the species of the Upper Yangtze genus *Ancherythroculter* Yih & Wu; yet in number of anal rays, gill rakers and in the shape of scales it remains closer to *Megalobrama*.

Subgenus *Megalobrama* Dybowski, 1872

This subgenus too contains two species.

3) *Megalobrama (s. str.) terminalis* (Richardson, 1845).

Fig. 6

Specimens examined:

M.N.H.N. 34141, Yangtze, 1 spec., 125.2 mm;

M.N.H.N. 34131, Yangtze, 1 spec., 150.0 mm;

M.N.H.N. 34137, Szechwan, holotype of *Parosteobrama pellegrini*, 1 spec., 148.0 mm;

B.M.N.H. 1851, 12.27 191, "China", 1 spec., 78.0 mm;

Lake Kaing-tze-Kiang, Hupeh, 2 spec., 112.0–113.0 mm;
 Nucet, Romania (introduced from the Yangtze at Wu-chang), 5
 spec., 83.0–120.0 mm;
 U.S.N.M. 130086, "China", 3 spec., 172.0–242.0 mm;
 U.S.N.M. 91733, Suifu, 1 spec., 204.0 mm;
 U.S.N.M. 130680, Canton, 1 spec., 114.0 mm;
 U.S.N.M. 86060, "China", 1 spec., 130.0 mm;
 U.S.N.M. 94871, Canton, 1 spec., 138.0 mm;
 U.S.N.M. 117780, Foochow, 1 spec., 116.5 mm;
 U.S.N.M. 87186, China, 1 spec., 209.0 mm;
 U.S.N.M. 86987, Foochow, 4 spec., 76.0–122.0 mm;
 S.U. 25708, Canton, 2 spec., 99.0–112.0 mm, determ. *M. hoffmanni*;
 A.M.N.H. 12934, Kwantung, 1 spec., 197.0 mm, determ. *M. ma-*
crostoma. (a manuscript name);
 A.M.N.H. 15612, Kwantung, 2 spec., 95.0–181.0 mm.
 D III 7; A 3/25–29; L. lat. 52–59; Sp. br. 15–20.

Body rhomboidal; depth 34.5–45.5% of standard length; caudal
 peduncle 12.7–15.9%; least depth 9.5–11.8%; least depth 62.0–
 97.0% of caudal peduncle length. Snout compressed and covered by
 a well developed horny sheath.

By comparing the Kwantung specimens, including the two ones
 (S.U. 25708) determined by Herre himself as *M. hoffmanni*, with *M. ter-*
minalis from the Yangtze and the Amur drainage, I did not find any
 differences. L. S. Berg [1] and J. T. Nichols [5] have already suggested
 that *hoffmanni* may be a synonym of *terminalis*. Yih & Wu (in Hs. W.
 Wu & others, [8]) accept *hoffmanni* as distinct species, yet most values
 (number of scales, rays, body proportions) they indicate for *hoffmanni*
 are included within the variation range of the same values in *terminalis*.

4) *Megalobrama* (s. str.) *amblycephala* Yih, 1955.

Fig. 7

Specimens examined:

B.M.N.H. 1936. 10.19. 21. Hankow, 1 spec., 116.0 mm;
 B.M.N.H. 1891. 1. 31. 29. Shanghai, 1 spec., 212.0 mm;
 H.Z.S. 1816, Shanghai, 1 spec., 278.0 mm;
 M.N.H.N. 3963, Wu-chang, Hupeh, 1 spec., 185.0 mm;
 M.N.H.N. 07293, North Vietnam, 1 spec., 239.0 mm;
 M.N.H.N. 2706, Ningpo, Chekiang, 1 spec., 316.0 mm;
 M.N.H.N. 5046, Yangtze, 1 spec., 172.3 mm;
 M.N.H.N. 91622, Shanghai, 1 spec., 350.0 mm;
 A.M.N.H. 10972, Ningkwo, Anhwei, 1 spec., 149.0 mm;
 A.M.N.H. 12190, Tungting Lake, Hunan, 2 spec., 148.0–155.2 mm;
 D III 7; A 2/ 23–30; L. lat. 50–58; Sp. br. 12–19.

This species closely resembles *M. terminalis* but has a less rhomboidal
 and deeper body (depth 39.4–48.0% of st. length) and caudal peduncle
 (least depth 10.8–13.4% of st. length and 83–104% of caudal peduncle
 length) and the snout is less compressed and covered by a quite slight
 horny sheath.

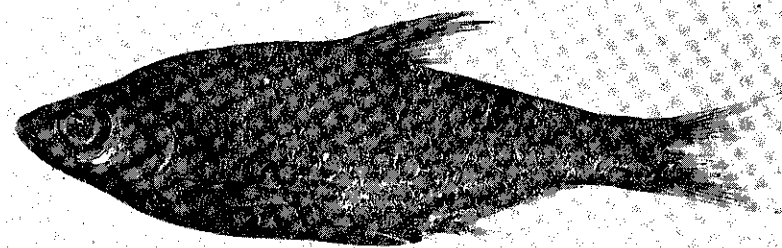


Fig. 1. — *Megalobrama macrops macrops* (Günther). Tsien-Tang R., Chekiang.
 S.U. 32475

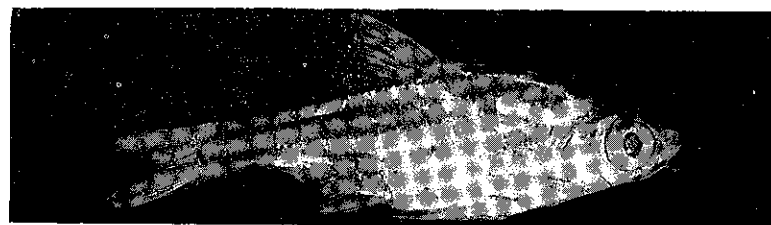


Fig. 2. — *Megalobrama macrops affinis* (Vaillant). Holotype, North Vietnam.
 M.N.H.N. 9247.

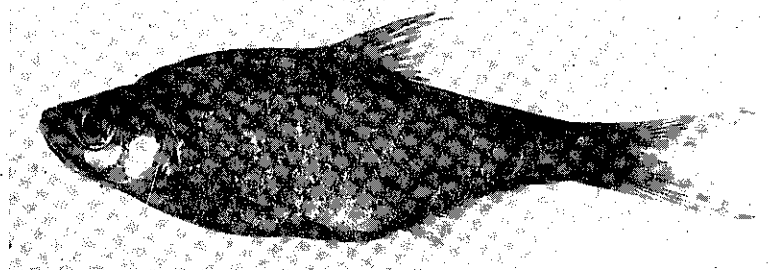


Fig. 3. — *Megalobrama macrops affinis* (Vaillant). Nodoo, Hainan. A.M.N.H.
 10965.

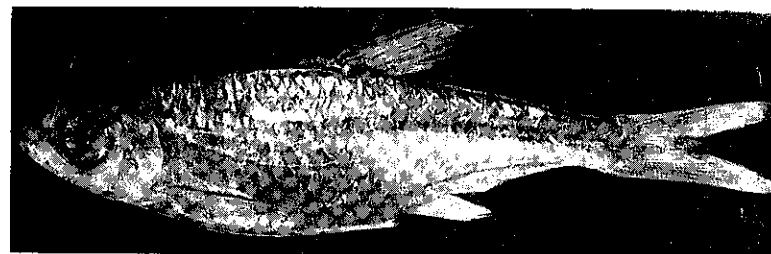


Fig. 4. — *Megalobrama macrops affinis* (Vaillant). Kangkong R., Hainan.
 N.M.W. 9759.

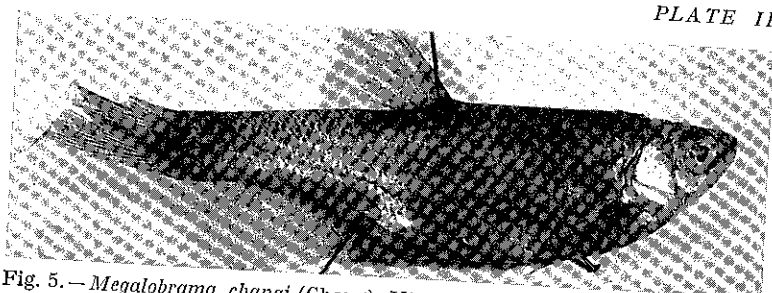


Fig. 5. — *Megalobrama changi* (Chang). Klating, Szechwan. F.M.N.H. 51130.

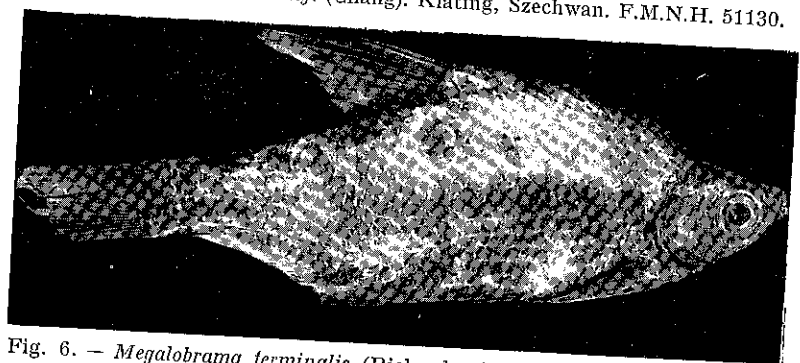


Fig. 6. — *Megalobrama terminalis* (Richardson). Holotype of *Parosteobrama pellegrini* Szechwan. M.N.H.N. 34137.

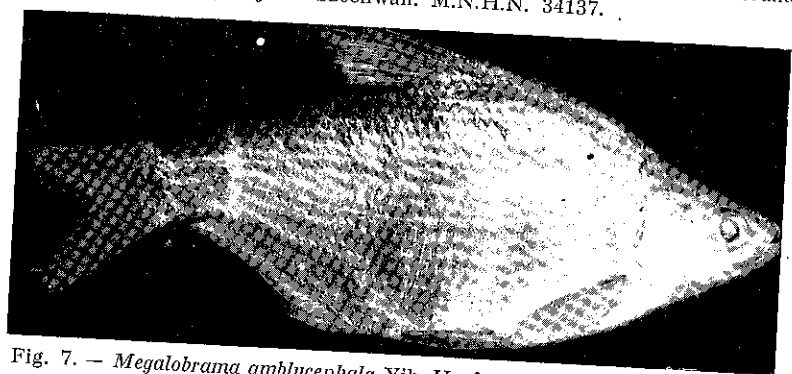


Fig. 7. — *Megalobrama amblycephala* Yih. Hankow. B.M.N.H. 1936. 10.19.21.

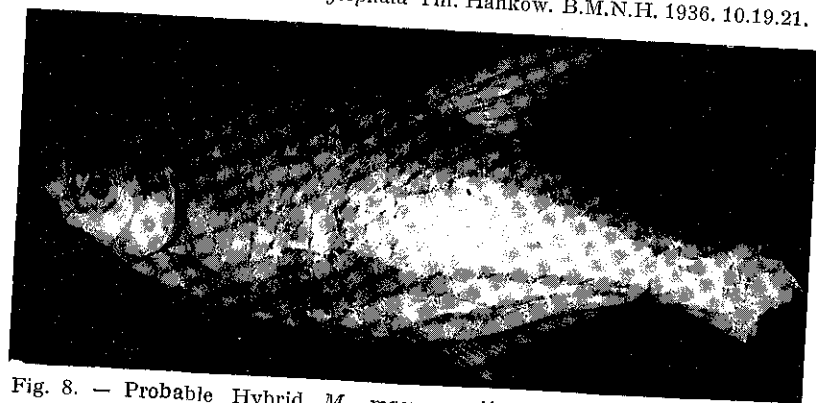


Fig. 8. — Probable Hybrid *M. macrops affinis* × *M. terminalis*. North Vietnam. M.N.H.N. 35347.

The nominal status of this species is rather difficult. *M. amblycephala* as described by Yih in 1955 and figured in Wu & others [8] is surely the species recorded by Günther [4]. Nichols [5] and other authors as *M. bramula* (Valenciennes). But the description of *Leuciscus bramula* by Valenciennes (in Cuvier & Valenciennes, [3]), is based on a Chinese painting and is so vague that it can apply to every species of *Parabramis* or *Megalobrama* as well.

Hybrid *M. macrops affinis* × *M. terminalis* (?)

One North Vietnam specimen, M.N.H.N. 35347, 140.0 mm standard length (Fig. 8) seems to be a hybrid between *M. macrops affinis* and *M. terminalis*; it has 28 branched anal rays (as *terminalis*), 52 scales, shape of mouth as in *macrops*, no horny sheath, eye larger than the snout (as in *macrops*) but smaller than the interorbital width (as in *terminalis*); the air-bladder was strongly damaged.

Aknowledgements

Following curators lent me specimens: M-me le Prof. M. L. Bauchot, Paris; Dr. J. Böhlke, Philadelphia; Prof. Dr. K. Deckert, Berlin; Dr. P. H. Greenwood, London; Dr. P. Kähnsbauer, Viena; Dr. E. Lachner, Washington; Dr. W. Ladiges, Hamburg; Dr. D. E. R - sen, New York; Dr. L. P. Woods, Chicago. A visit in several museums from the U.S.A. and United Kingdon was financed by the Smithsonian Institution's T.F.H. Fund, at the kind proposal of Dr. E. Lachner.

REFERENCES

1. БЕРГ Л.С., *Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран*, vol. 2, Moscow—Leningrad, 1949.
2. CHANG H. W., *Sinensia*, 1944, 15, 27—60.
3. CUVIER G., VALENCIENNES A., *Histoire Naturelle des Poissons*, vol. 17, Paris, 1844.
4. GÜNTHER A., *Catalogue of the Fishes in the British Museum*, vol. 7, London, 1868.
5. NICHOLS J. T., *The Fresh-Water Fishes of China*, 1943, New York.
6. НИКОЛЬСКИЙ Г. В., *Рыбы бассейна Амура*, Moscow, 1956.
7. WU Hs. W., *Sinensia*, 1939, 10, 92—142.
8. WU Hs. W. & others, *The Cyprinid Fishes of China*, Shanghai, The Technical Printing House (in Chinese) (*Subfam. Abramidinae* by P. L. YIH and C. K. WU, vol. 1, 1964).

Received November 17, 1969

The "Traian Săvulescu" Institute of Biology
Department of Systematic and Evolutionary Zoology

DIE BILDUNG DER BLUTZELLEN BEI *CYPRINUS CARPIO* L.

VON
M. I. VARO

The haematogenesis of the anterior kidney in the carp *Cyprinus carpio* L. has been analysed by histochemical and electronmicroscopical methods. It has been shown that the original bloodforming cell is the lymphoid haemoblast which athrocytizes at trypan blue and it forms all the lines of the cells of blood: plasmocytes, germinocytes, eosiniphils, basophils, a special type of leukocytes with clear vacuoles, erythrocytes, lymphocytes and thrombocytes. Each of them has been characterized from the histochemical and submicroscopic point of view, and the eosinophil granulocyte has been insisted upon.

Die bisher über die Blutbildung bei Knochenfischen unternommenen Forschungen [4], [6]—[8], [10], [17] haben nur den rein zytologischen Aspekt der Blutbildung vor Augen geführt. Keine histochemischen Daten sind angeführt worden und nur in einem einzigen Studium [17] wird die submikroskopische Struktur behandelt.

In vorliegender Arbeit, in der die Methoden der Zytologie, der Hämatologie, der Histochemie und Elektronenmikroskopie konvergent angewendet wurden, beabsichtige ich, die Blutzellen zu charakterisieren und einige noch ungelöste Probleme betreffs deren Identifizierung zu klären: die Homologie der Blutzellen mit den Blutzellen der höheren Wirbeltiere, ob es azurophile und basophile Granula in den Granulozyten gibt, welches die zytochemische Zusammenstellung der eosinophilen Granula und welches die submikroskopische Struktur der Blutzellen ist.

MATERIAL UND METHODE

Klatschpräparate der Vorderniere werden mit Osmium- oder Formoldampf, mit Maximovs oder Hellys Fixierlösungen, mit Methanol oder essigsauerm Alkohol fixiert. Bei diesen oder bei frischen Präparaten wird die klassische Methode angewendet, um die Lipide, die

Kohlenhydrate, die Enzyme und die Endgruppen der Proteine nachzuweisen. Diese einzelnen Methoden haben wir dem ausgezeichneten Buch von Bover-Forteza entnommen, wo sie für Hämatologie angepaßt sind: P J S nach Hotchkiss für Mukopolysaccharide und Glykogen, Alcianblau nach Mowry für saure Mukopolysaccharide, Sudan Schwarz B nach Shelman und Storey für Lipide, Feulgen für DNS, Methylgrün-Pyronin nach Kurnick für RNS und für die basischen Proteine Eosin 0,1 %, pH 8,2, Biebrich Scarlet 0,01 %, pH 8,5, Fast green 0,1 % pH 8,2, Solochromcyanin pH 3. Zink wurde durch die Methoden mit Zirkon und Dithison sichtbar gemacht, Tryptophan durch die Methode mit Nitrit-Aldehyd, während die Methode mit β -Glyzerophosphat-Ca und Naphthol-ASS Phosphat-Fast-Garnet GBC die alkalischen Phosphatasen hervorgehoben haben; mit Glyzerophosphat Pb und Naphthol AS-Mx Phosphat - Fast violett wurden die sauren Phosphatasen kenntlich gemacht; das Naphthol Chlorazetat AS-LC-Azetat Fast blue B weist die Esterase nach, das Erscheinen des Hämoglobins wird nach der Methode Bover verfolgt, während die zum Krebszyklus gehörenden Dehydrogenasen nach Lillie nachgewiesen werden.

Für die Elektronenmikroskopie wird mit Osmiumsäure 1% in verschiedenen Puffern von 0,16 M (Veronalazetat, Kakodilat oder Kollidin) fixiert und in Vestopal W eingebettet. Die Blocks werden mit einem Glasmesser durchschnitten, mit einem Ultratom LKB nach einer Doppelfärbung mit Uranylazetat und Bleizitrat; die Schnitte werden an einem Hitachi Elektronenmikroskop untersucht und fotografiert.

ERGEBNISSE

Die Stammzelle der Blutzellen ist nach einigen Autoren der Hämoplast, der aus undifferenzierten Bindegewebszellen hervorgegangen ist, genauer aus einer Retikulumzelle. Der lymphoide Hämoplast ist auch bei Amphibien und Sauropsiden beschrieben worden. Er ist von großer Gestalt (13μ), mit einem fein granulierten Kern (9μ) und das basophile Zytoplasma kann leicht von den übrigen Blutzellen unterschieden werden. Was die Retikulumzellen anbelangt, so können sie leicht mit Hilfe von Einspritzungen mit Tripanblau oder Chinatusche hervorgehoben werden. Sie athrozitieren sei es im Endothel einiger Nierenkanäle, sei es im Blutgewebe der Retikulumzellen.

Im hämatopoetischen Gewebe der Niere gibt es sowohl Histiocyten der Art „resting wandering cells“ als auch Makrophagen der Art „amiboid wandering cells“ von Maximov. Tatsächlich bilden die länglichen Histiocyten die Zellen des Nierenretikulums, aber auch das Endothel der Nierengefäße, was sich feststellen läßt, wenn Trypanblau athrozitiert. In diesem Retikulum-Endothelsystem wird der lymphoide Hämoplast nachweisbar, der die Stammzelle aller Blutzellen ist. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen aber einige Homologien zu höheren Wirbeltieren. So gibt es z. B. in den Keimzentren der Säugetiere Immunoblasten, Germinoblasten und Germinocyten. Bei den Immunoblasten sind die Polysomen im ganzen Zytoplasma verteilt, wo sie Anhängen oder gewundene Ketten bilden. Die Mitochondrien sind zusammengeschlossen und der Golgi-Apparat ist entwickelt. Ein Charakteristikum der Immunoblasten und Germinoblasten besteht darin, daß der Nukleolus an der Keimmembran haftet, wahrscheinlich wegen seiner Funktion, die verschiedenen RNS anzusammeln, mit denen sich das Zytoplasma bereichert. Ein anderes Charakteristikum dieser Linie ist die Seltenheit des

endoplasmatischen Retikulums, das in Form von sehr raren Bläschen im Zytoplasma in Erscheinung tritt. Das Vorkommen eines Ergastoplasmas in den Retikulumzellen führt zu der Bildung der plasmozytischen Linie: Plasmoblast, Proplasmazyt und Plasmazyt. Beim Karpfen tritt diese ergastoplasmische Linie als eine Blase auf. Der Nukleolus haftet am Anfang der Differenzierung an der Kernmembran. Die länglichen Mitochondrien und der Golgi-Apparat wird von einer großen Anzahl von Mikroblasen begleitet. Das Vorhandensein solcher Elemente kann nur elektronenmikroskopisch deutlich nachgewiesen werden.

Besonders erwähnt sei beim Karpfen der azurophile Leukozyt, der von Heider so genannt wurde. Die Bezeichnungen, die im Laufe der Jahre aufgekommen sind, zeugen von Mangel an zytologischen Kriterien, die für ihre Bestimmung und die Aufstellung der Homologie mit wohlbekannten Elementen der Hämatologie hätten herangezogen werden können. Wie man solche Zellen auch immer bezeichnen mag, können sie nicht von klaren, glänzenden Vakuolen zytochemisch charakterisiert werden. Die jungen Elemente sind groß, mit basophilem Zytoplasma und exzentrischem Kern, wie eine bikonvexe Linse. Um den Zentrosom tritt im Stadium des Myeloblastes eine Anhäufung von klaren Vakuolen auf, die bei den Progranulozyten zählenmäßig anwachsen, so daß vom Myelozyt bis zum Entwicklungsende das Zytoplasma zahlenlose Vakuolen aufweist. Vom stabkernigen azurophilen Leukozyt an bis zum reifen Granulozyt (azurophilen Leukozyt) verliert das Zytoplasma sehr viel von seinen Bestandteilen.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß infolge der Giemsa-Färbung einige Karpfenrassen — var. *rea. cyprinorum* — Granula mit reichem azurophilem Gehalt aufweisen, die sich intensiv dunkelviolett färben. Bei den Abarten aus der Zuchtfischerei „Nucet“ weisen nur einige Exemplare dunkelviolette Granula in ihren Vakuolen auf. Solche Zellen haben einige infrastrukturelle Merkmale, die sich von den echten Azurophilen ableiten lassen, wenigstens im Falle des Karpfens, wie vor allem die rasche Entwicklung, die sie durchmachen.

Die jungen Zellen sind sehr reich an endoplasmatischem Retikulum, der in dem Maß abnimmt, in dem die Zellen an das Ende der Entwicklung gelangen; dafür herrscht das Hialoplasma mengenmäßig vor.

In diesem intratissularen Raum — denn diese Zellen befinden sich nur in geringen Mengen im zirkulierenden Blut — behalten die Mitochondrien ihre Funktionsmerkmale bei. Der Reichtum an Christae weist bei diesen Mitochondrien auf die intensive Aktivität der oxydativen Phosphorylierung.

Der Mangel an enzymologischen Reaktionen sowie an spezifischen Proteinen in den Vakuolen weist diesen Zellen einen besonderen Platz zu, um so mehr, als sie nicht zum zirkulierenden Blut gehören. Dieser Zellentyp ist mit keiner anderen Blutzelle der höheren Wirbeltiere homologierbar. Die Unbeständigkeit des Vakuolengehalts, der Mangel einiger chemischen Komponenten in diesem Strukturgefüge, die histochemisch nachweisbar wären, führt dazu, diese Zellen als Zellen mit klaren Vakuolen zu bezeichnen.

Die Eozinophilen weisen dagegen alle Eigenschaften auf, die bei höheren Wirbeltieren aufweisen. Histochemisch betrachtet, weisen sie dadurch, daß sie sich mit Eosin Y bei pH 8,1 mit Biebrich-Scarlet

Fast green, Fast green Eosin ebenfalls bei pH 8,1 ziegelrot färben, auf einen Gehalt an basischen Proteinen vom Typ der Histonen hin. Genauer gesagt, enthalten sie ein argininreiches Gemisch von kationischen Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt, der oberhalb von 11,0 liegt. Sie färben sich, wie bereits erwähnt, bei hohem pH mit sauren Farbstoffen. Auch Tyrosin und Tryptophan wurde darin nachgewiesen. Die Reaktionen der Mukopolysaccharide fallen positiv aus. So ist die Reaktion PJS in den eosinophilen Granula intensiv positiv, wobei in einigen Zellen auch eine gewisse Menge von Sulfhydrylgruppen vorhanden sind, die mit Alcianblau nach der Hydrolyse mit Perameisensäure, reagieren.

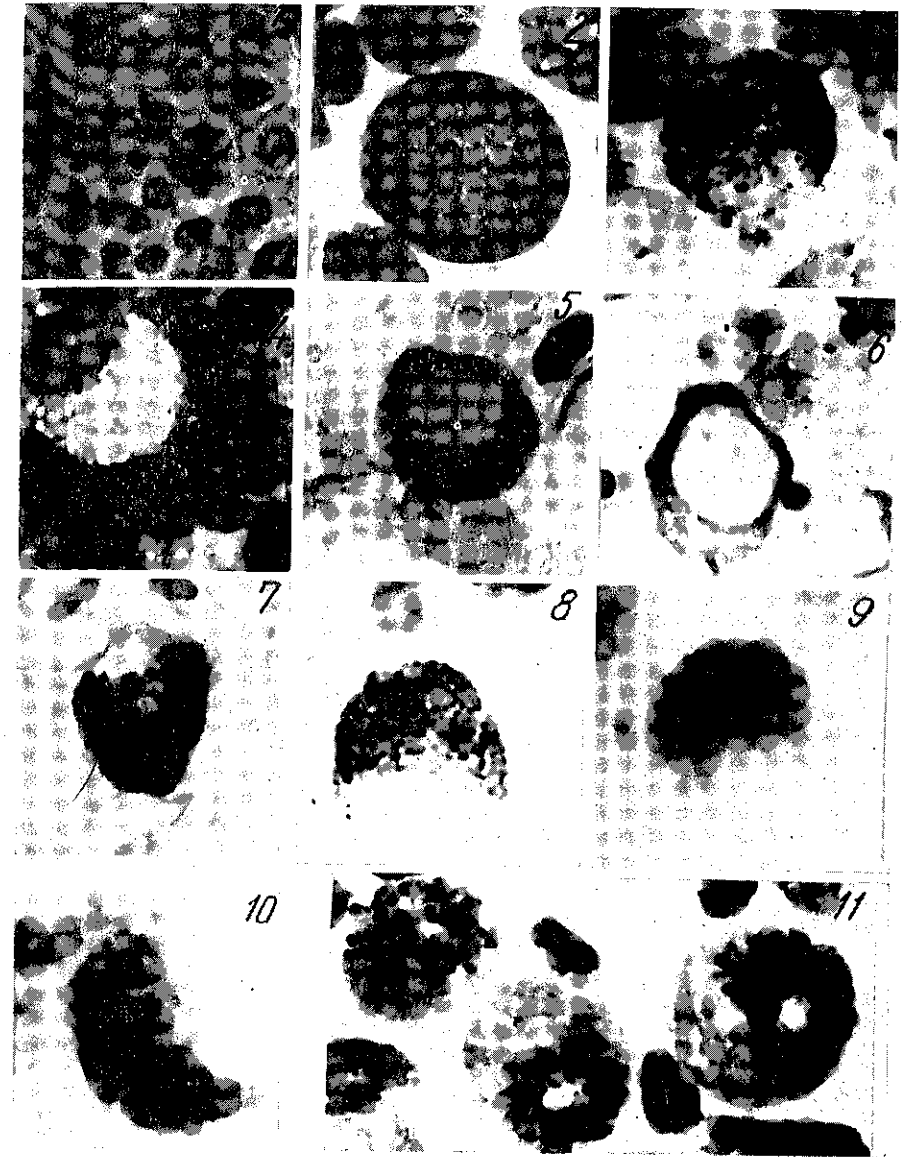
In den Zellen kommen folgende Enzyme vor: alkalische Phosphatase durch die Kupplungsreaktion des Naphthols AS-MS Phosphat mit Fast redviolet LB; saure aktive Phosphatase von Mn^{++} durch das Gömori-Verfahren; unspezifische Esterase durch die Methode mit Naphthol AS-LC Azetat — Fast garnet GBC oder Fast blue B; Peroxydase nach der Methode Sato und Kainovsky.

Von den Dehydrogenasen sind die Milchsäure-, Zitronensäure-, Apfelsäure-, Succinat-, Alfaglycerinphosphatdehydrogenase nachgewiesen. Dazu kommt noch, daß die eosinophilen Granula die Zinkreaktion sowohl mit Dithison als auch mit Zincon (2-Carboxy-2-hydroxy-5-sulfoformazol) eingehen. Das Zytoplasma weist wenige Bläschen und ergastoplasmische Tubuli auf, die Mitochondrien sind reich an Christae und der Golgi-Apparat erzeugt eine große Anzahl von dichten Mikrobälchen, die sich in eosinophile Granula verwandeln. Diese haben einen dichten Gehalt und ein charakteristisches Kristalloid.

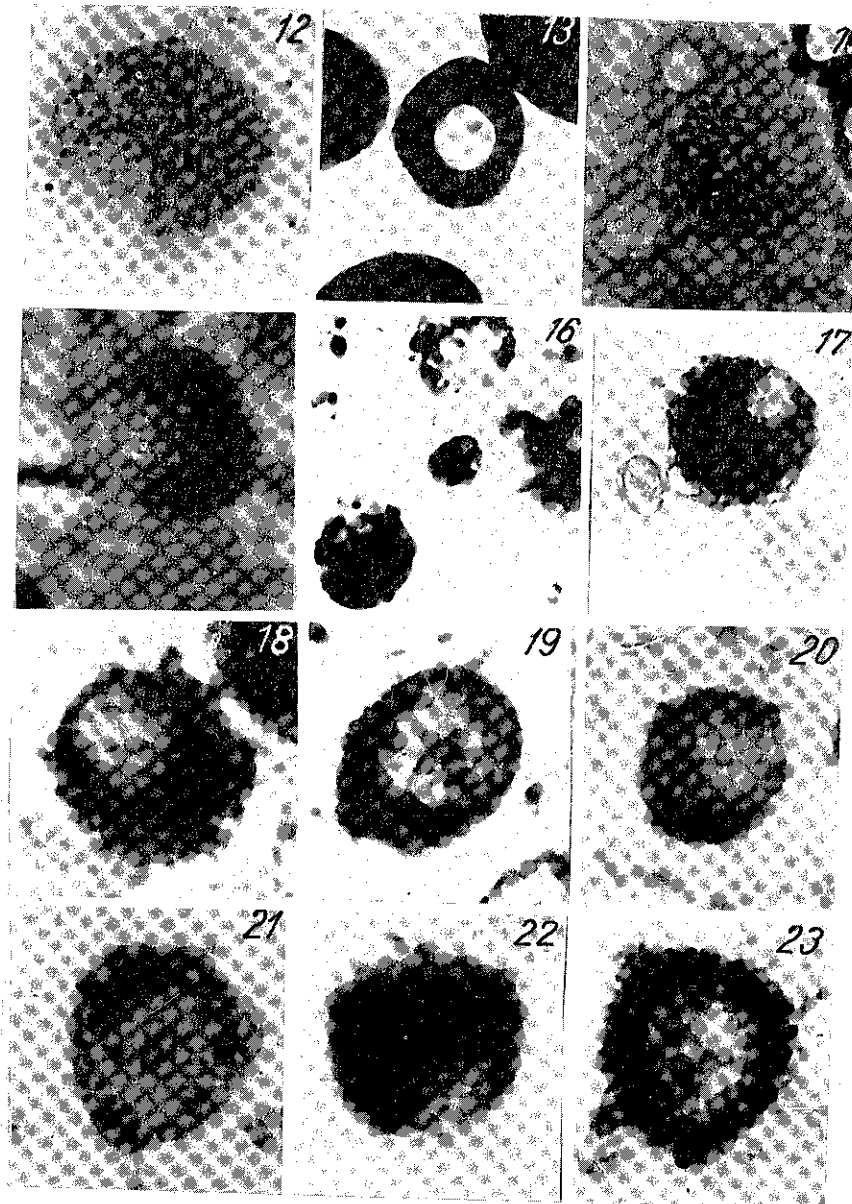
Die Basophilen sind schwer zu sehen, weil sie die ihnen eigene Metachromasie nicht aufweisen. Hingegen werden sie elektronenmikroskopisch bestätigt. Die großen Granula mit unregelmäßigem Umriss und dichtem Gehalt, mit stellenweise intensiver Opazität füllen das Zytoplasma ganz aus. In einigen Fällen kann beobachtet werden, wie diese Zellen die Lymphozyten einverleiben, eine Erscheinung, die ihrer Funktion eigen ist.

Durch die große Anzahl an Polysomen weisen die Lymphozyten ein basophiles Zytoplasma auf und enthalten wenige Mitochondrien. Der Kern ist dagegen reich an Chromatin und besitzt einen kennzeichnenden granulierten kugeligen Nukleolus.

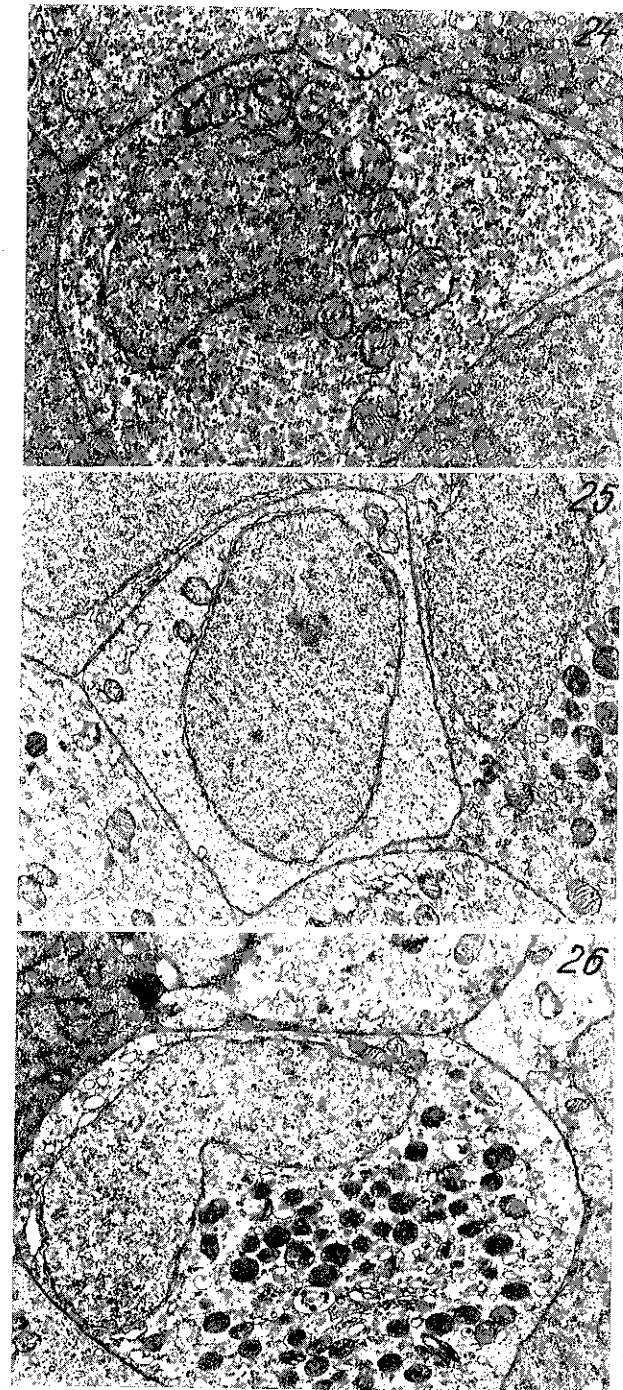
Die Erythrozyten gehen selbstverständlich die Blanco-Bover-Reaktion für Hämoglobin ein, wodurch sich die Erythrozytenlinie (Proerythroblast, Normoblast, Erythrozyt) aufstellen läßt, indem das Hämoglobin erst in Form von schwarzen Flecken in Erscheinung tritt, die immer größer werden, bis sie schließlich die ganze Zelle ausfüllen. Der Proerythroblast zeichnet sich durch ein klares Hyaloplasma mit langen Ketten von Polysomen aus, die sich gerade oder gewunden gestalten, durch wenige Mitochondrien im V. Stadium von Hackenbrock und durch einen typischen Golgi-Apparat. Der erweiterte perinukleäre Raum und die Poren der Kernmembran bestätigen, daß in diesem Stadium eine eigene Syntheseaktivität stattfindet. Der Normoblast weist im Querschnitt ein eckiges Aussehen auf, die Polysomen sind viel seltener, da das Hyaloplasma jetzt von Hämoglobin angefüllt ist. Der Golgi-Apparat und die Mitochondrien schrumpfen ein und mit der Zeit büßt auch die Kernmembran die Poren ein.



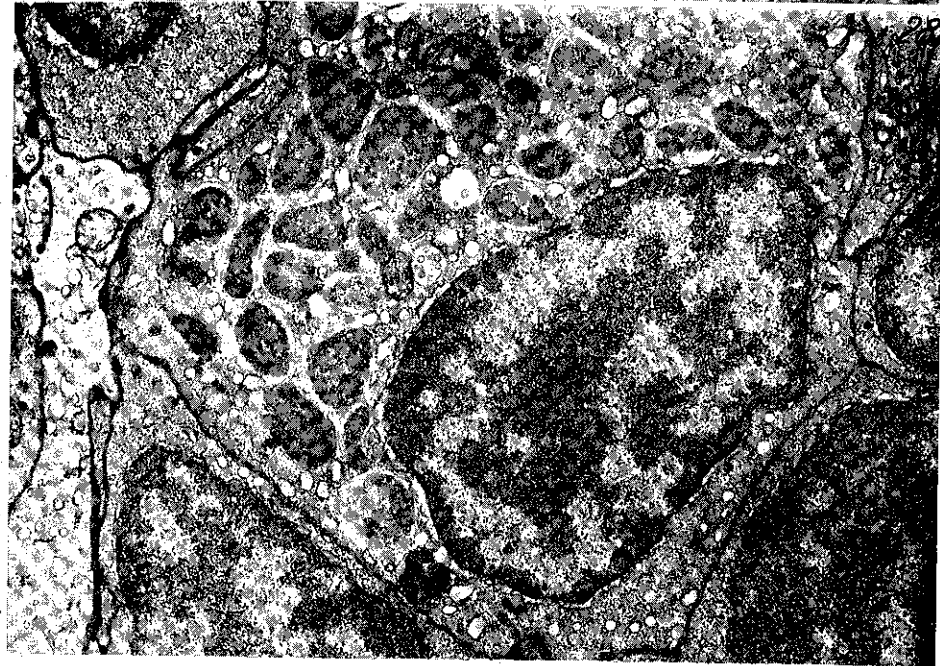
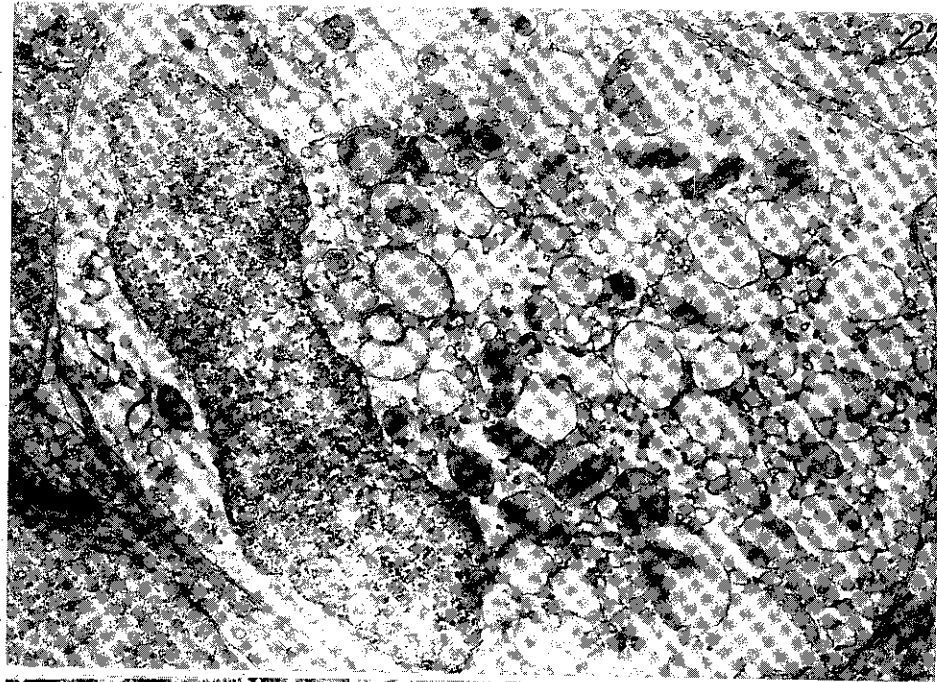
1, Reticulumzellen. Einspritzung des Tieres mit Trypanblau; 2, Lymphoider Hämoblast. Methylgrün-Pyronin; 3, Eosinophil. Giemsa; 4, Zelle mit klaren Vakuolen. Giemsa; 5, Lymphozyt. Methylgrün-Pyronin; 6, Promiellozyt. Methylgrün-Pyronin; 7, Eosinophil. Mukopolysaccharide PJS; 8, Eosinophil. Basische Proteine. Eosin. pH 8,2; 9, Eosinophil. Basische Proteine. Biebrich-Scarlat. pH 8,5; 10, Eosinophil. Basische Proteine. Fast green. pH 8,1; 11, Zelle mit klaren Vakuolen gefüllt mit Mukopolysacchariden. Giemsa.



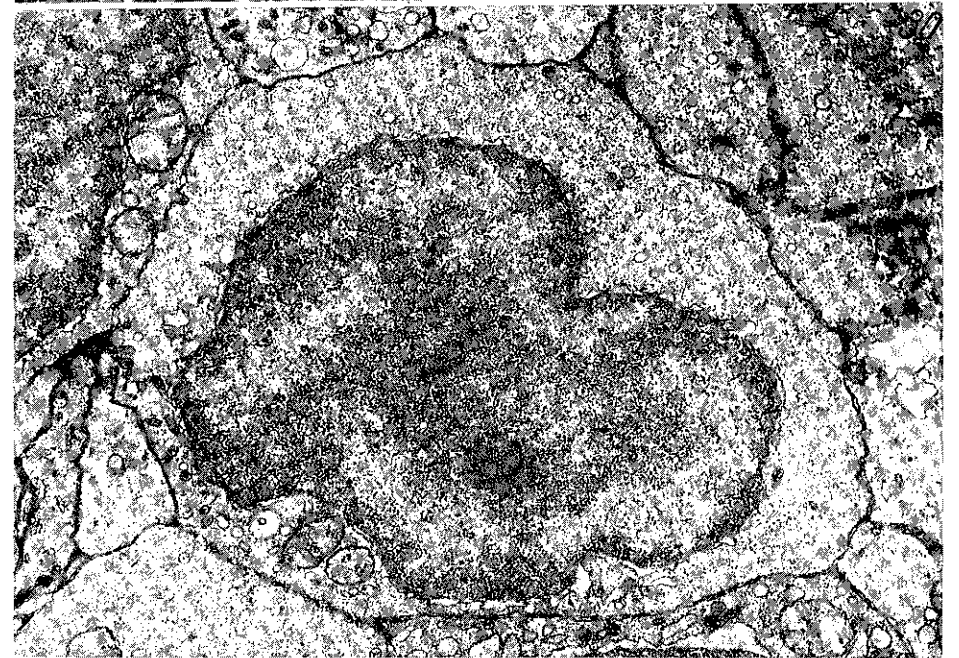
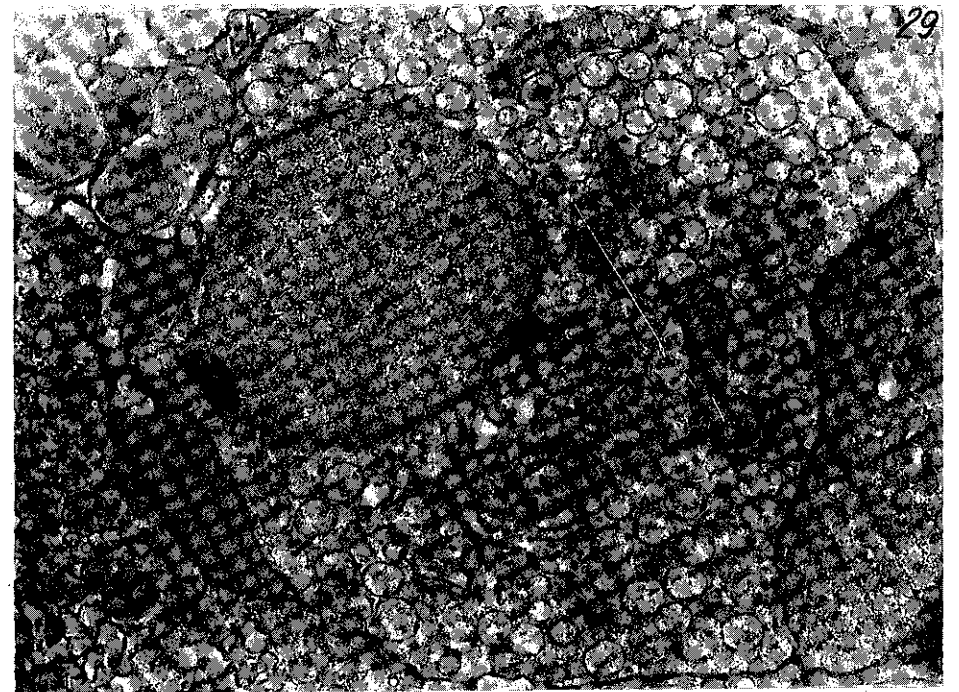
12-23, Eosinophile; 12, Zn nach der Zinconmethode; 13, Normoblast. Hämoglobinreaktion nach Bover; 14, Peroxydase. Karnovsky-Reaktion; 15, Tryptophan. Aldehyd-Nitritmethode; 16, Saure Phosphatase. Naphthol AS-MX Phosphat Fast violett; 17, Alkalische Phosphatase. Naphthol AS-MX Phosphat-Fast Garnet GBC; 18, Unspezifische Esterase. Naphthol AS-LC Azetat-Fastblau B; 19, Äpfelsäure-Dehydrogenase; 20, Glyzerophosphat-Dehydrogenase; 21, Laktat-Dehydrogenase; 22, Sukzinat-Dehydrogenase; 23, Isozitrat-Dehydrogenase.



24, Immunoblast; 25, Normoblast; 26, Eosinophil.



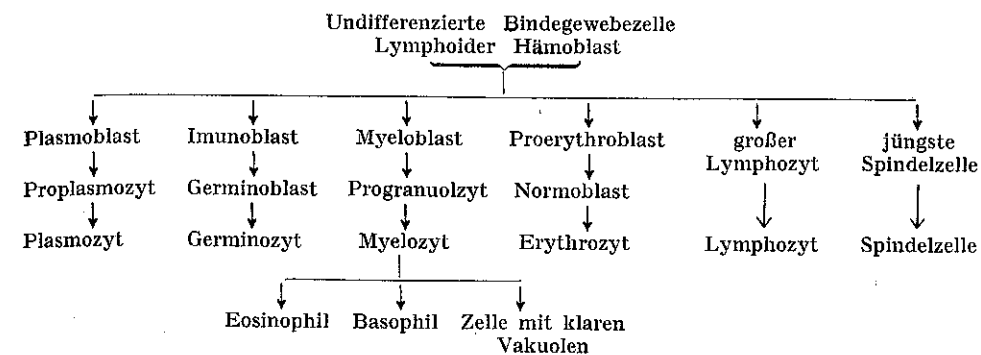
27, Leukozyt mit klaren Vakuolen; 28, Basophil.



29, Proplasmoblast; 30, Lymphozyt.

Die Spindelzellen weisen einen sehr chromatischen Kern mit gut entwickeltem Nukleolus auf, eine Zentrosphäre mit einigen Golgisaculi: einige Mitochondrien und Ribosomen, die das Zytoplasma anfüllen.

Laut dieser Beschreibung könnte man für die Abstammung der Zellen im Laufe der Blutbildung beim Karpfen folgendes Bild aufstellen:



LITERATUR

1. BAINTON D. F. FARQUHAR M. G., J. Cell. Biol., 1968, **39**, 2, 286—298, 299—317.
2. BOVER FORTEZA G., *Atlas of Blood Cytology*, Toray, Barcelona, 1964.
3. BRZEZINSKI VON D. K., Acta histochem., 1965, **20**, 343—365.
4. CATTON W. Y., Blood, 1951, **6**, 39—60.
5. COTTIER H., ODARCHNKO N., SCHINDLER R., CONGDON C. C., *Germinal Centers in Immune Responses*, Springer-Verlag, New York, 1967.
6. DOMBROWSKI H., Biol. Zbl., 1953, **72**, 182—195.
7. DRZEWINA A., Arch. Anat. micr., 1911, **13**, 319—376.
8. DUTHIE E. S., J. Anat., 1939, **73**, 396—412.
9. GABE M., *Techniques histologiques*, Masson, Paris, 1968.
10. HAIDER G., Anat. Anz., 1967, **179**, 5/6, 355—384, 384—409; 1968, **180**, 1/2, 110—130, **181**, 3/4, 203—226.
11. JAKOWSKA S., Rev. Hémat., 1956, **11**, 519—539.
12. JORDAN H. E., SPEIDEL C. C., J. Morph., 1924, **38**, 529—548.
13. LAUR C. M., Sang, 1949, 452—460.
14. LOEWENTHAL N., Arch. Anat. Hist. Embryol., 1927, **7**, 315—322.
15. SPILLMANN J., Bull. Museum nat. d'Hist. Nat., 1966, **38**, 132—142.
16. TOPF W., Zool. Anz., 1953, **150**, 91—404; 1959, **163**, 190—193.
17. WEINREB E. L., Anat. Rev., 1963, **147**, 219—238.

Eingegangen am 14. Oktober 1969

Biologische Fakultät der Universität
Bukarest

LES CELLULES NEUROSECRETICES DES GANGLIONS VENTRAUX DES CHILOPODES ANAMORPHES

PAR

C. PRUNESCU

In *Scutigera*, the ventral nervous ganglia have two types of neurosecretory cells: A and B; in *Lithobius* we find three types: A, B, and C. The cells of the types A and B in *Scutigera* and of the type B in *Lithobius* are described for the first time.

Nous avons abordé l'étude des cellules neurosécrétrices des ganglions ventraux des Chilopodes, car, selon nous, elles pourraient jouer un rôle important aussi bien dans l'induction que dans la différenciation des caractères sexuels secondaires.

Dans ce travail nous ne nous occupons que des ganglions métamériques des segments pédifères chez un seul représentant des ordres *Scutigera* et *Lithobius*.

Si l'on n'a pas entrepris d'études spéciales pour *Scutigera* afin de déceler la neurosécrétion des ganglions ventraux, il n'en est pas de même pour *Lithobius*, où, grâce à Gabe [1, 2], Palm [4] et surtout à Scheffel [5] nous connaissons un bon nombre d'éléments qui caractérisent morphologiquement ce phénomène.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Plusieurs individus mâles et femelles des espèces *Scutigera coleoptrata* L. et *Lithobius forficatus* L. ont été fixés au liquide de Bouin, clarifié à l'alcool butylique et inclus dans la paraffine. Les coupes sériées, horizontales et transversales, de 6 à 8 μ d'épaisseur, ont été colorées, après oxydation permanganique, à la fuchsine-paraldéhyde, chromotrope 2R, orange G, vert lumière (Hübl), à l'hématoxyline chromique-phloxine (Gomori) ou à la pseudo-isocyanine (Sterba).

REV. ROUM. BIOL.-ZOOLOGIE, TOME 15, N° 3, p. 147-151, BUCAREST, 1970

2 - c. 5224

DESCRIPTION DES RÉSULTATS

I. Ord. SCUTIGEROMORPHA — SCUTIGERA COLEOPTRATA

Le développement excessif des ganglions ventraux des segments pédifères, mis en corrélation avec la grande vitesse de déplacement et avec les réflexes très vifs des *Scutigera*, ont conduit à l'union des ganglions par la disparition des connectifs. Ceci rend assez malaisée la précision des limites des deux ganglions.

Chez *Scutigera*, chaque ganglion ventral d'un segment pédifère contient deux types de cellules neurosécrétrices :

Type A « Les cellules neurosécrétrices antérieures » sont disposées en deux groupes symétriques, chacun comprenant 6 à 10 cellules, situées aux extrémités antéro-ventrale du ganglion, à petit diamètre de 9–10 μ et à grand 15–23 μ . La majorité des axons sont dirigés en sens antéro-dorsal et émergent des ganglions par un nerf qui se bifurque en une branche, ventrale, et une autre dorsale. Les axons d'autres cellules neurosécrétrices antérieures se dirigent vers le micropyle ou en direction postérieure.

Les cellules neurosécrétrices antérieures se caractérisent par une activité sécrétrice intense à peu près continue.

Le matériel basophile apparaît constitué par des granules de taille moyenne, seulement pendant les phases d'activité neurosécrétrice. Durant les phases actives, la quantité de sécrétion augmente, les granules fusionnent et le périkarion semble verni par le colorant compact qui se trouve dans le cytoplasme. Souvent on peut observer aux ganglions susmentionnés, au point de sortie des nerfs dorsaux, une grosse goutte de sécrétion. Il est probable que la sécrétion soit restée dans les axons, mais les limites de ces derniers ne peuvent être observées par les moyens optiques, de sorte que la goutte de sécrétion basophile est le résultat du rapprochement d'un nombre d'axons pleins de neurosécrétion.

Type B « Les cellules neurosécrétrices postérieures » sont placées à l'extrémité postérieure des ganglions ventraux dans la zone latéro-dorsale, immédiatement sous le perineurium.

Chaque ganglion possède une seule paire de cellules de cette catégorie. Les axons de ces cellules sont dirigés symétriquement vers la partie médio-dorsale du ganglion.

Le grand diamètre des cellules du type B varie entre 25 à 40 μ et le petit diamètre mesure environ 45 μ , mais au noyau il ne dépasse pas 10 μ .

Indifféremment de la phase fonctionnelle, la neurosécrétion, dans la cellule comme dans l'axon, est formée de fins granules, basophiles, plus ou moins nombreux.

II. Ord. LITHOBIOMORPHA — LITHOBIUS FORFICATUS

A la suite des recherches de Scheffel (5) on sait que dans les ganglions ventraux de *L. forficatus* il y a deux types de cellules neurosécrétrices, antérieures et postérieures.

Le matériel que nous avons étudié confirme l'existence de ces deux types de cellules et indique aussi la présence d'une troisième catégorie, semblable aux cellules neurosécrétrices postérieures de *Scutigera coleoptrata*.

Le type A « Cellules neurosécrétrices antérieures » décrites pour la première fois par Scheffel, dans la zone ventrale, médio-antérieure des ganglions, sont petites, ayant un diamètre d'environ 8 μ . Disposées en deux groupes symétriques, formés chacun approximativement de 2–3 neurones, elles ont une faible activité sécrétrice, constituée par de rares granules de sécrétion basophile. Ces cellules sont difficilement visibles, aussi arrive-t-il parfois de ne pouvoir les observer durant la phase d'activité plus réduite. Ainsi donc, la certitude de leur existence dans tous les ganglions doit être déduite surtout de la présence de cellules homologues, chez d'autres groupes de Chilopodes (*Scolopendromorpha*).

*Le type B** « Cellules neurosécrétrices paires » observées pour la première fois par nous, sont situées à un niveau légèrement antérieur par rapport à celui des cellules neurosécrétrices postérieures (type C) décrites par Scheffel. Les granules de sécrétion sont fins et ne fusionnent pas entre eux. Les axons se dirigent symétriquement vers la zone médiane du ganglion.

Le diamètre de ces cellules est d'environ 20 μ , et de ce point de vue, elles ne diffèrent pas trop des cellules neurosécrétrices postérieures près desquelles elles se trouvent.

De même que chez *Scutigera*, les cellules de type B sont représentées dans chaque ganglion par une seule paire.

Type C « Les cellules neurosécrétrices postérieures » (cellules « des hinteren Typs » de Scheffel) sont grandes, à diamètre de 15 à 20 μ ; deux groupes formés de 5 à 6 cellules disposés symétriquement aux extrémités latéro-caudales des ganglions. La sécrétion de ces cellules, intensément basophile est d'un grand débit.

DISCUSSIONS

On constate, des données encore inédites dont nous disposons, que l'on trouve aussi chez d'autres groupes de Chilopodes les cellules neurosécrétrices de type B et qu'elles sont toujours situées vers l'extrémité postérieure des ganglions ventraux des segments pédifères.

Les cellules de type A, semblent être homologues chez *Scutigera* et *Lithobius*, malgré leurs dimensions et le rythme différent de sécrétion. Il est à supposer que chez *Lithobius*, en raison de nécessités spéciales, la quantité de substance active provenant de ces cellules, est plus réduite que chez d'autres Chilopodes.

Les cellules neurosécrétrices postérieures (type C), qui existent chez *Lithobius* et chez d'autres Chilopodes, paraissent faire défaut chez *Scutigera*.

A l'état actuel de nos connaissances sur la neurosécrétion des ganglions ventraux des Chilopodes, cette absence est inexplicable. Toutefois

*) R. Joly (3) présente dans l'image 21 une cellule neurosécrétrice de la chaîne nerveuse ventrale de *L. forficatus*. Il paraît qu'il s'agit d'une cellule de type B.

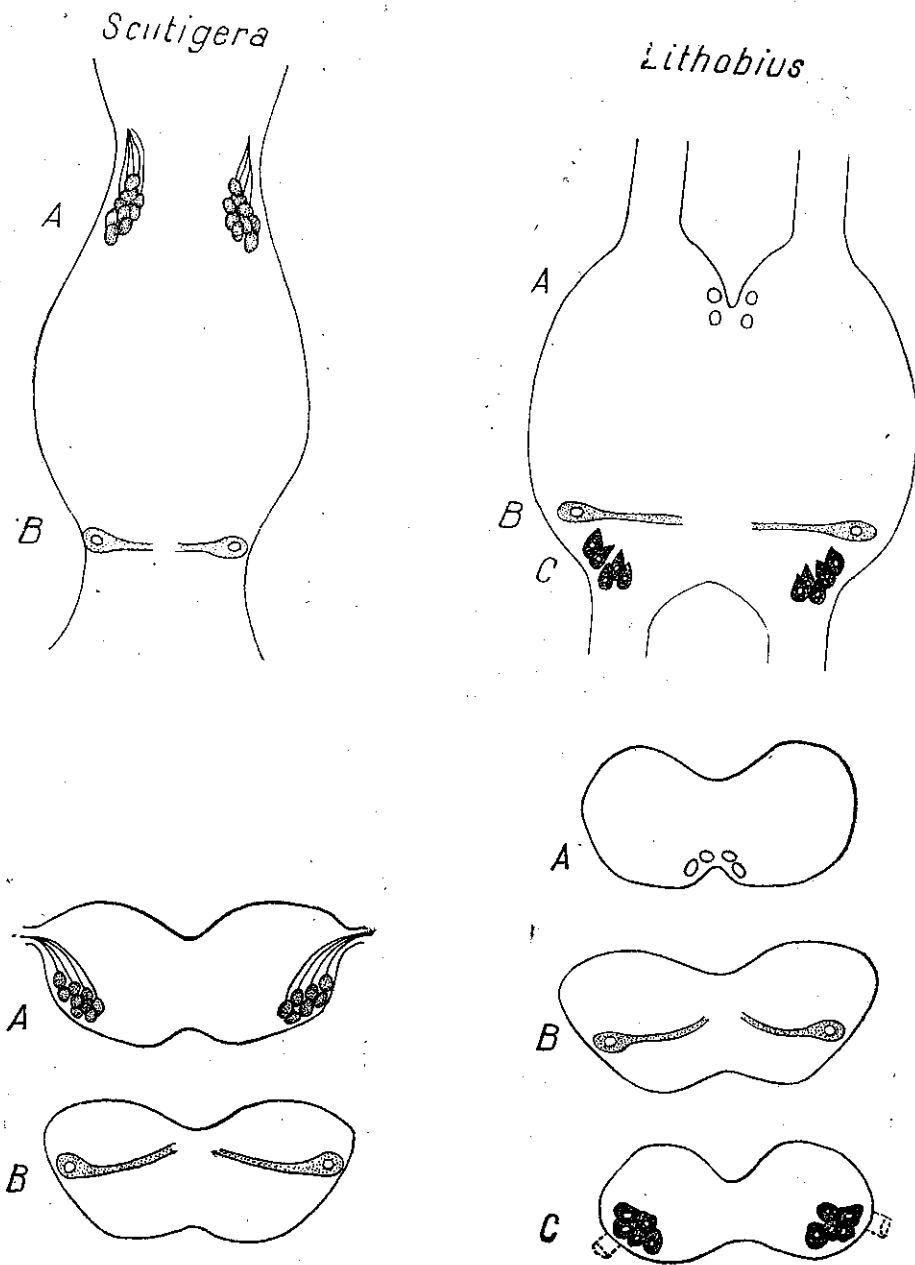


Fig. 1. — Les cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse ventrale (schéma).

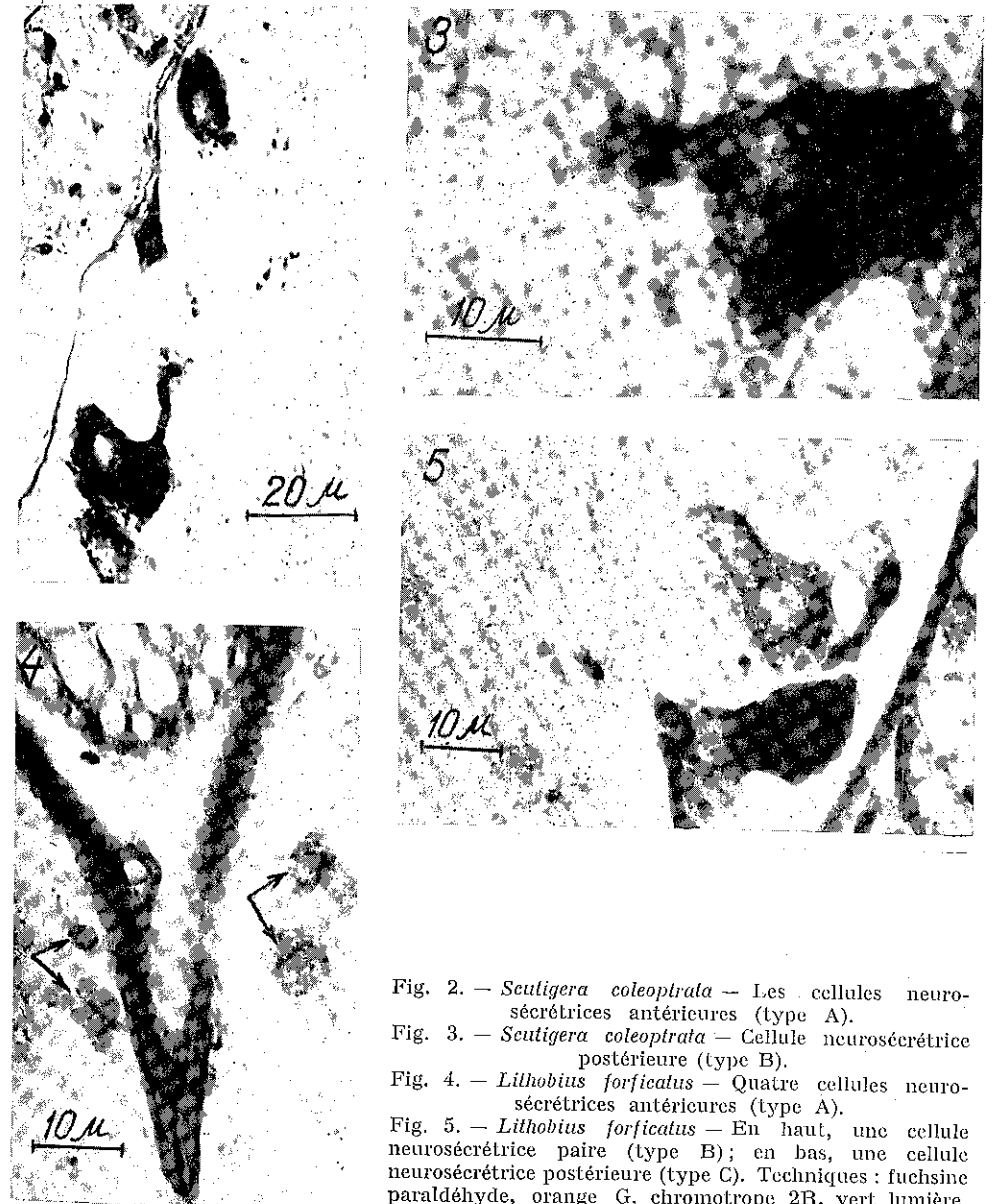


Fig. 2. — *Scutigera coleoptrata* — Les cellules neurosécrétrices antérieures (type A).
 Fig. 3. — *Scutigera coleoptrata* — Cellule neurosécrétrice postérieure (type B).
 Fig. 4. — *Lithobius forficatus* — Quatre cellules neurosécrétrices antérieures (type A).
 Fig. 5. — *Lithobius forficatus* — En haut, une cellule neurosécrétrice paire (type B); en bas, une cellule neurosécrétrice postérieure (type C). Techniques : fuchsine paraldehyde, orange G, chromotrope 2R, vert lumière.

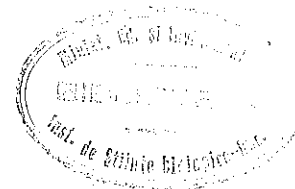
on pourrait envisager l'hypothèse, assez plausible d'ailleurs, selon laquelle le groupe antérieur de cellules neurosécrétrices de *Scutigera* se serait formé par la migration concomittante, dans cette zone, des cellules antérieures (de type A) et des cellules postérieures (de type C) du ganglion précédent. Etant donné la disparition des connectifs et la fusion des ganglions, on pourrait admettre cette hypothèse, au moins tant que l'on ne saura pas avec précision la composition spécifique et le rôle de la substance active produite par chaque type de cellule neurosécrétrice.

BIBLIOGRAPHIE

1. GABE M., *Contribution à l'histologie de la neurosécrétion in Bertil Hanström, Zool. Papers in honour of his 65 birthday*, 1956, 163-183.
2. — *Neurosecretion*, Pergamon Press, London-New York, 1966.
3. JOLY R., *Contribution à l'étude du cycle de mue et de son déterminisme chez les Myriapodes Chilopodes*. Thèse, Lille, 1966.
4. PALM N. B., *Ark. Zool.* 1956, 9, 115-129.
5. SCHEFFEL H., *Zool. Jb. Anat.* 1961, 79, 529-556.

Reçu le 23 octobre 1969

*Institut de Biologie « Traian Săvulescu »
Laboratoire de Morphologie animale*



LA NEUROSECRETION CÉRÉBRALE AUX STADES
AVANCÉS DES ESPÈCES DE *CAENIS*
(Fam. *CAENIDAE*, O. *EPHEMEROPTERA*)

PAR

A. SĂFTOIU

The advanced instars of the *Caenidae* show neurosecretory phenomena, increasing gradually. They reach a maximum in the imago. The reproduction stages develop synchronic with this terminal cycle.

En 1953, Arvy et Gabe ont décrit des phases des cycles neurocrines chez de diverses espèces d'Ephéméroptères, à l'exception des *Caenidae*. [1, 2, 3, 4].

En partant de la conclusion que cet ordre d'Insectes présente, comme caractéristiques endocrinienne, l'atténuation et la disparition chez les adultes des phénomènes neurosecrétors, nous avons entrepris, dans un ouvrage antérieur l'étude des *Baëtidae*, formes à vie imaginale la plus longue. En constatant que chez les formes imaginales l'activité des neurones de la *pars intercerebralis* est intense et nuancée dans le temps, nous avons considéré qu'il est nécessaire de confirmer et de compléter ces données chez les formes totalement opposées, ayant une vie aérienne très courte, comme les *Caenidae*.

Ce groupe présente quelques particularités morpho-physiologiques : la phase sousimaginale a une durée de quelques minutes et la phase imaginale de quelques heures ; la ponte est explosive, étant accompagnée de déchirements et évaginations létales des organes. [6].

A cet égard, une étude parallèle des processus neurosecrétors et des moments de la reproduction promet d'être significative.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Les captures ont été faites aux alentours du lac Băneasa de Bucarest, au mois de juillet et au bord du Danube, à Brăila, au mois de mai.

Nous avons utilisé des exemplaires des deux sexes des espèces *Caenis robusta* et *Caenis horraria*, capturés dans la nature pour éviter les influences traumatisantes du laboratoire. Le dernier stade aquatique, de nymphe avancée, a été établi morphologiquement d'après la coloration générale de la cuticule, le degré de pliage des ailes dans les gaines alaires, le développement ovarien et l'évolution du tégument. Les nymphes ont été capturées quelques heures avant la mue sousimaginale. Pour le stade de sousimago, des exemplaires éclos dans la nature ont été capturés aussitôt après leur envolé à la surface de l'eau. La durée de la vie sousimaginale étant de 10' au maximum, les fixations ont été faites dans ce laps de temps.

Pour le stade imaginal nous avons utilisé : 1) des exemplaires tout récemment obtenus des sousimagos capturés dans la nature et maintenus dans de bonnes conditions jusqu'à la mue ; 2) des exemplaires ♀ descendant vers la surface de l'eau après le vol nuptial ; et 3) des femelles déposant la ponte.

Les fixations ont été faites dans Zenker, Helly et Halmi, les sections de 5-7 μ colorées à la fuchsine-paraldéhyde (Gabe), hématoxyline-chromique-phloxine (Gomori) et azan (Haldenhein).

RÉSULTATS OBTENUS

Des aspects de la neurosécrétion de type A, au sens de Nayar (1952), ou A, B, d'après Bern (1962), sont évidents dans la *pars intercerebralis*, des *nervi corporis cardiaci I* et *corpora cardiaca*, chez tous les stades étudiés.

1. Nymphe avancée

Chez les nymphes de deux sexes, on peut observer dans les neurones de la *pars* le commencement d'une activité concrétisée dans l'élaboration des granules qui, dans cette première phase, présentent une fuchsinophilie accentuée. Ils sont groupés en flots, séparés par des zones de cytoplasme, encore libres de granules. Les cellules les plus chargées ont des agglomération du produit élaboré aussi dans le cône axonal.

Dans toutes les cellules, le noyau est nettement visible, n'étant pas encore estompé par une accumulation massive. Le diamètre moyen du noyau est de 3,5 à 4,5 μ et celui des cellules de 7 à 9 μ .

Ce commencement de la sécrétion est accompagné de déversements axoniques initiaux qu'on peut observer seulement dans quelques péricaryones situés dans les régions internes, médio-sagittales des deux flots neurosécréteurs, suggérant une activité qui commence et s'accroît graduellement en irradiant, à partir de la zone interne les régions latérales, externes et dorsales de la *pars intercerebralis*.

Dans ce stade, le nombre des neurones en activité est plus petit (8-10) qu'aux stades suivants (16-20). (Fig. 1 A, B).

Les trajets des *nervi corporis cardiaci I* sont jalonnés de granules sur toute leur étendue en montrant que le réservoir cardiaque est en train de se remplir (Pl. I, fig. 2, Pl. II, fig. 8).

Chez la nymphe ♀, la proportion des granules élaborés et déversés est sensiblement moindre que chez la nymphe ♂. (Pl. I, fig. 1, Pl. II, fig. 7).

2. Sousimago

L'activité commencée chez la nymphe, se continue en s'accroissant avec l'accroissement du nombre des cellules actives, dont le cytoplasme est chargée de plus en plus de granules de petite dimension. (Pl. I, fig. 3, Pl. II, fig. 9) en même temps, que s'intensifie le transport intraaxonique, le long de *n.c.c.l* (Pl. I, fig. 4, Pl. II, fig. 10).

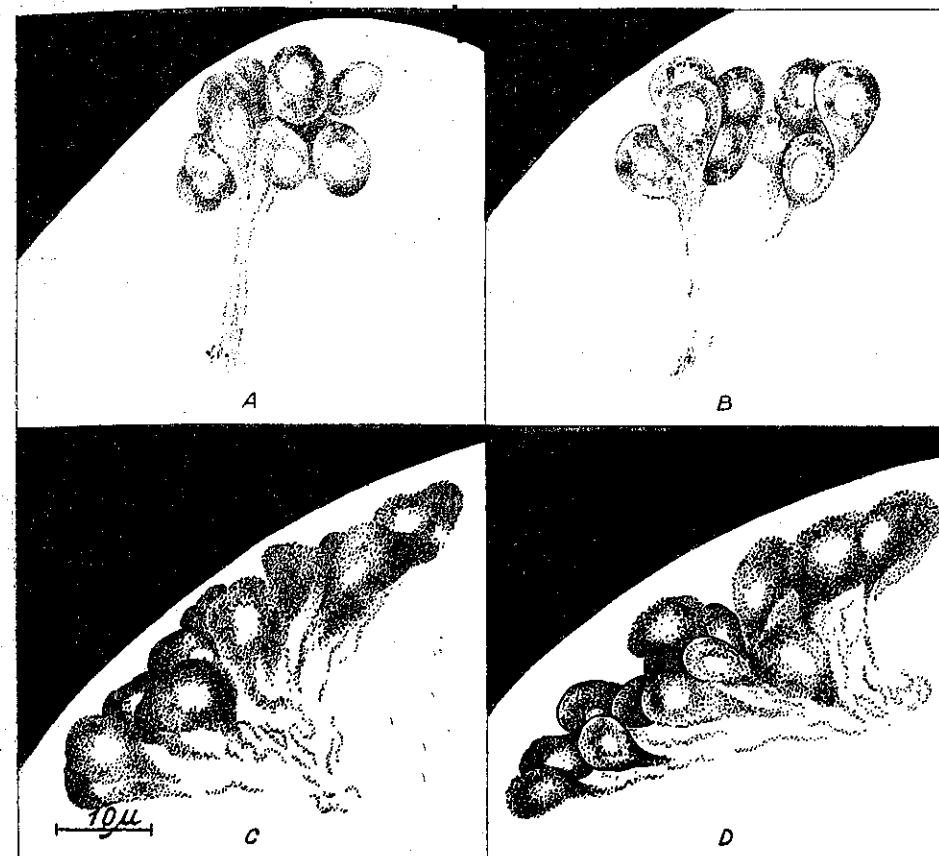


Fig. 1. Reconstitution sagittale des deux zones médianes symétriques de la *pars intercerebralis*. A, B nymphe avancée ♀ ; C, D imago ♂♀ pendant la ponte. Dessin à la chambre claire. $\times 600$.

Chez le sousimago mâle, cette activité est plus intense par rapport à celle de la femelle. Les granules finissent par s'unir, en formant des traînées continues dans la région caudale des deux nerfs cardiaques ; dans le réservoir cardiaque ils s'unissent en formant de véritables corps de Herring (Pl. I, fig. 4, Pl. II, fig. 10).

3. Imago

Nous avons considéré l'imago ♀ au cours de la ponte, comme un moment significatif parce que la vie imaginale chez les espèces du genre

Caenis est très brève (1—2 heures) en finissant pratiquement avec la ponte. Dans ce stade on arrive à un maximum de l'activité neurosécrétoire cérébrale.

Les cellules de la *pars* sont très chargées, aux granules denses, intensivement colorés (Pl. I, fig. 5).

Le nombre des neurones actifs se sont doublés et leur disposition est modifiée. Les zones dorsales des deux flots médians fonctionnent intensivement, les pericaryones étant groupés en batteries actives présentant une unistratification à la surface. On peut y voir une couche active et non pas un groupe compact, à disposition verticale, comme chez la nymphe (Fig. 1). Le diamètre moyen du noyau est de 3,5—4 μ et celui des cellules de 9—10,5 μ . Les axons sont pleins et tout le trajet du *n.c.c.l.* est jalonné par une grande quantité de produit (Pl. I, fig. 6). La déposition des œufs dans l'eau a lieu en même temps. Chez l'imago mâle, les processus sont moins accentués (Pl. I, fig. 11—12).

On peut conclure qu'aux espèces étudiées, le cycle neurosécréteur commence à devenir évident chez la nymphe avancée, et qu'il s'accroît graduellement au cours du bref stade sousimagineal, pour culminer chez l'imago.

Ici l'intensité du processus est maximale en comparaison du faible niveau rencontré chez les larves et les jeunes nymphes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Chez la nymphe au dernier stade, les processus de gamétogenèse sont terminés. En tenant compte que c'est à peine maintenant que commence l'élaboration la plus massive dans les cellules neurosécrétrices, il est certain que cette production vise particulièrement le passage à la vie aérienne, donc les phénomènes de reproduction (accouplement, ponte). Le processus tout entier apparaît orienté vers le stade d'imago.

PLANCHE I (*Caenis* ♀)

A gauche, cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis* à diverses phases et divers stades; à droite: le complexe *nervi corporis cardiaci* I-corpora cardiaca au stade respectif. Coloration à la fuchsine-paraldéhyde (Gabe).

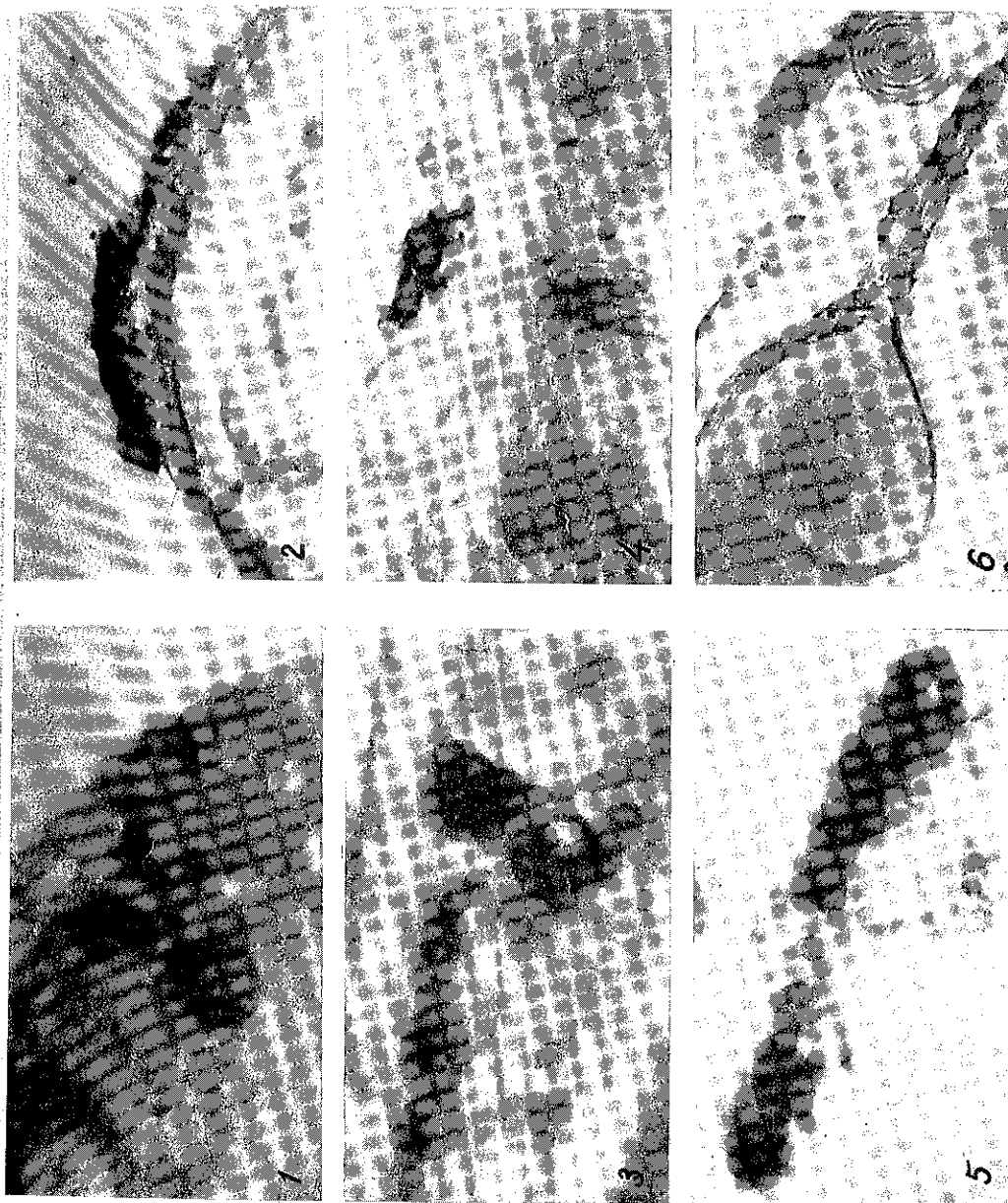
1. *C.n.s. pars intercerebralis* au commencement de l'élaboration. Section sagittale chez la nymphe avancée de *Caenis robusta* $\times 720$.

2. Faible accumulation dans les *corpora cardiaca*. $\times 720$.

3. 4. *C.n.s.* en activité grandissante. On observe d'énergiques déversements axoniques.

Le jalonnement des trajets de *n.c. c.l.* est net et la partie apicale des *corpora cardiaca* contient d'importantes accumulations. Section transversale, chez le sousimago de *Caenis robusta*. $\times 720$ et $\times 320$.

5, 6. Imago ♀ pendant la ponte. Batterie de neurones en pleine activité et transport massif par le *n.c.c.l.* Dans les *corpora cardiaca* les granules confluent dans des accumulations plutôt caudales. Sections sagittales de *Caenis robusta*. $\times 720$ et $\times 320$.



N.A.V.

Si

♀

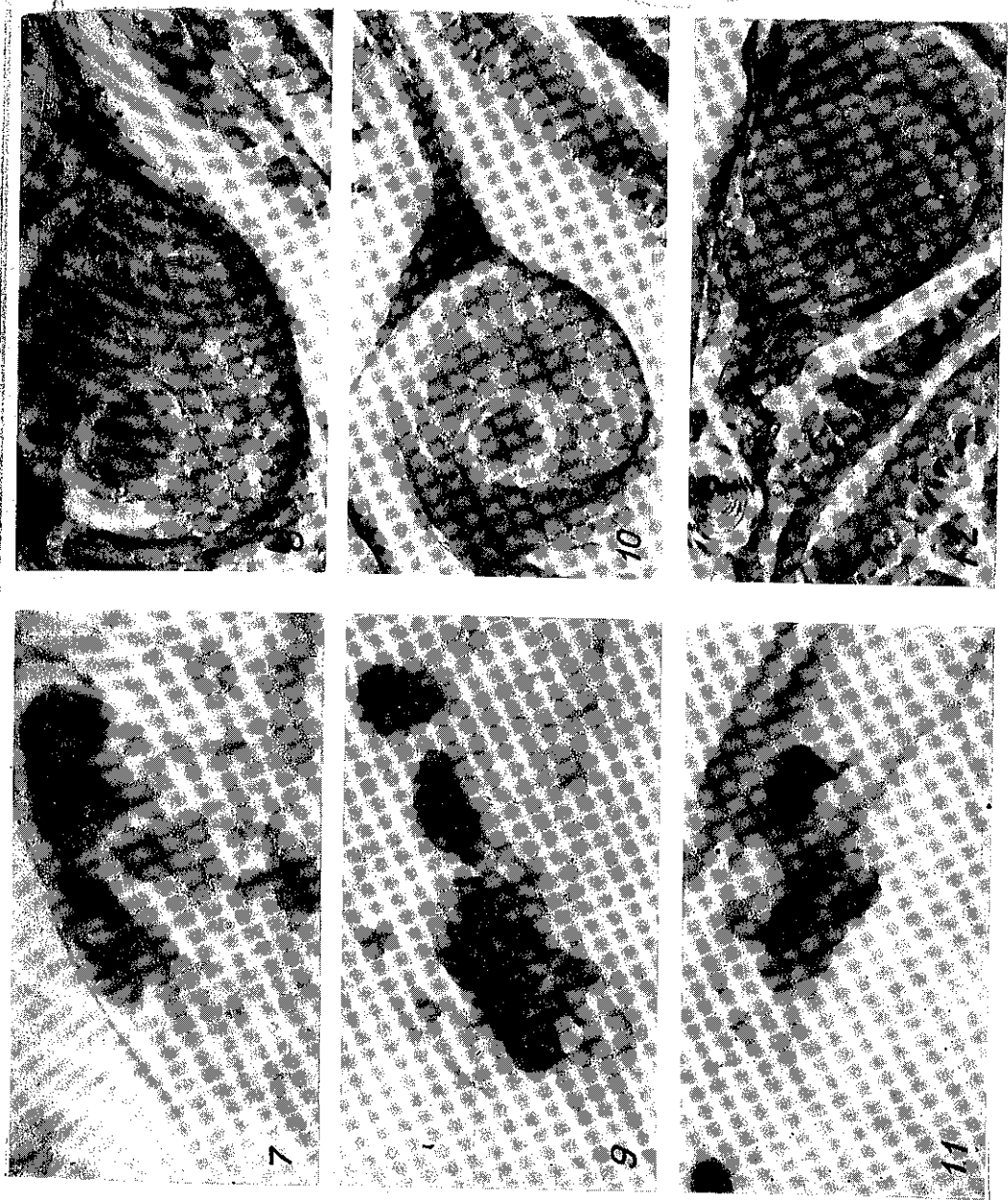
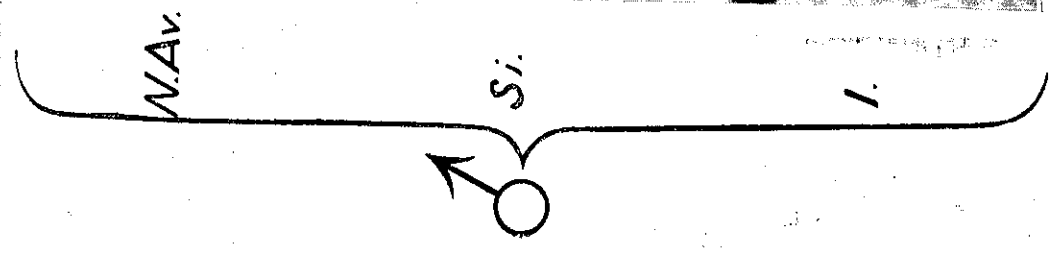


PLANCHE II (*Caenis* ♂)

7, 8. Chez la nymphe avancée de *Caenis robusta*, l'activité s'est accrue autant dans les cellules neurosécrétrices, que dans le complexe *n.c.c.1-c.e.* × 720 et × 320.
 9, 10. La plus intense activité chez le sousimago de *Caenis robusta*. Dans les *corpora cardiaca* les accumulations sont importantes.
 11, 12. Activité diminuée chez l'imago de *Caenis horraria*. × 720 et × 400.



Ch. Degrange a établi que chez *Caenis moesta* et *Caenis macrura* les jeunes femelles, immédiatement après la dernière mue, placées expérimentalement en contact avec l'eau, éliminent les œufs par le déchirement de l'abandon et le prolapsus de l'appareil digestif. Pour d'autres Ephémérides, le même auteur a établi qu'il est impossible de déclencher le réflexe de la ponte au début même de la vie imaginale.

Ces constatations peuvent être corrélées d'une manière significative aux résultats de cet ouvrage. Ainsi, donc, chez les espèces du genre *Caenis*, la réalisation facile d'une ponte peut être attribuée, entre d'autres causes, à l'existence d'un important substrat hormonal résultant de l'élaboration et du déversement intense, protocérébrale, chez la nymphe avancée et chez le sous-imago. Par contre, la ponte tardive des espèces de *Baëtidae* et l'impossibilité de la forcer expérimentalement, reflète l'existence, dans ce cas, d'une période neurosécrétrice inactive au commencement de la vie imaginale et que c'est à peine vers la fin qu'un nouveau cycle neurocrinien a lieu probablement en liaison avec la ponte.

En conclusion, les divers stimuli qui déclenchent expérimentalement la ponte sont suivis ou non, d'une réponse, en fonction de l'étape du cycle neurosécréteur, qui apparaît comme déterminant. Pour les femelles des espèces étudiées de *Caenis*, l'étape de la plus abondante sécrétion marque le début de la vie imaginale, la ponte n'étant pas possible avant ce moment, en raison de l'absence d'un substrat hormonal favorable.

S'il y a chez les *Baëtidae* ovipaires deux périodes d'apogée d'un cycle terminal (l'une chez le sous-imago et l'autre chez l'imago avancé), chez les *Caenidae*, ces deux moments se sont superposés formant un seul cycle de brève durée (quelques heures).

Dans les autres stades du développement, une telle élaboration éruptive n'existant pas, on peut conclure que l'extrême brièveté de la vie aérienne est accompagnée d'énergiques mécanismes hormonaux.

Exception faite pour certaines suppositions physiologiques qui restent sous la réserve des vérifications expérimentales, les données morphologiques établissent certainement l'image d'une activité neurosécrétrice chez les adultes de ces Ephéméroptères à vie imaginale la plus brève.

L'ordre *Ephemeroptera* apparaît donc étroitement lié aux autres Ptérygotes, démontrant ainsi la similitude à l'égard des mécanismes hormonaux dans les principales étapes du développement [5], [7]. L'idée que cet ordre se singularise sous cet aspect, comme étant dépourvu de phénomènes neurocriniens aux stades adultes, n'a pas été confirmée (Arvy et Gabe). L'agastrie imaginale chez les Ephéméroptères, représente donc une régression secondaire et non pas un caractère de primitivité.

CONCLUSIONS

1. Nymphe avancée : un nouveau cycle terminal débute dans les cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis*. L'intensité des élaborations et des déversements s'accroît au fur et à mesure que la nymphe avance. Chez la ♀, le phénomène est plus tardif que chez le ♂.
2. Sousimago : le cycle continue à s'intensifier. Le nombre des cellules actives et la quantité du produit élaboré et déversé augmentent.

A ce stade, l'activité atteint son maximum chez le ♂, probablement pour réaliser le substrat hormonal de l'accouplement.

3. Imago : chez le ♂, l'activité neurocrine tire sur sa fin, tandis que chez la ♀ (surtout pendant la ponte) elle atteint son maximum.

4. Les *Caenidae*, malgré la brièveté de leur vie imaginale, présentent des phénomènes neurosécréteurs protocérébraux de ce stade.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARVY L., GABE M., Bull. Soc. Zool. France, 1950, 75, 267-285.
2. — Cellule, 1952, 55, 203-222.
3. — Z. Zell., 1953, 38, 591-610.
4. ARVY L., Bull. Soc. Zool. France, 1953, 78, 451-462.
5. CASSIER P., Ann. Biol., 1967, 6, 11-12, 596-670.
6. DEGRANGE CH., *Recherches sur la reproduction des Ephéméroptères*. (Thèse), Paris, 1960.
7. JOLY P., *Endocrinologie des insectes*. Masson, Paris, 1958.

Reçu le 17 novembre 1969

Institut de Biologie «Traian Săvulescu»
Laboratoire de Morphologie animale

INVESTIGATIONS ON THE DIFFERENTIATION IN ZONES OF THE ADRENAL GLAND IN *PHALACROCORAX* *CARBO* L.

BY

ANCA PETRESCU-RAIANU

On the basis of the analysis of morphological features of interrenal cords and cells, the author considers that the adrenal glands in *Phalacrocorax carbo* presents two quite distinct zones: a peripheral zone (analogous to the glomerulosa in mammals) and a central zone. Though in certain sectors of the gland a fasciculated disposition of interrenal cords was observed under the peripheral zone, the morphological features of interrenal cells and cords do not entitle us to assert the existence of a fascicular zone.

Though the differentiation into three zones of the adrenal gland of mammals has been known for a long time, the physiological significance of this division into zones has only been elucidated after the works undertaken by Deane and Greep [6], [11] and Chester Jones [4]. In accordance with the results obtained by these authors, the functional division of the adrenal gland was proposed, a theory generally accepted at present due to the experimental evidence it is supported by.

A similar functional differentiation apparently exists also in other classes of vertebrates, although numerous authors insist upon the structural uniformity of interrenal tissue in reptiles and birds in normal condition.

Researches effected by Sinha and coll. [24] and by Kondics [15], [16] in *Columbia livia domestica*, by Fujita [8] in *Gallus domesticus*, by Péczely [21] in *Actitis hypoleucos* and *Columbia livia domestica* and by Bhattacharyya and Ghosh in *Passer domesticus* [2] show that in adult specimens, in normal conditions, the interrenal cords situated in different regions of the gland present a similar morphological aspect. On the other hand, Müller [20], Miller and Riddle [19], Sinha and Ghosh [23], Arvy [1], Péczely [21] and Sivaram [25], [26] describe in some species of

birds certain differences concerning the morphological aspect and the histochemical pattern of interrenal cords situated at the periphery of the gland, as against those situated in the depth. Moreover, Knouff and Hartman, studying the adrenals in *Pelecanus occidentalis* record a very well defined differentiation of interrenal cords, similar to that of mammals [14]. This disposition of interrenal cords in three quite distinct zones has so far not been described in any other species of birds.

Taking into account the systematic position and the relationship of genera *Pelecanus* and *Phalacrocorax*, we tried to see what is the degree of morphological differentiation of the interrenal cells in *Phalacrocorax carbo*.

MATERIALS AND METHODS

Adrenal glands of *Phalacrocorax carbo* L., collected during the sexual rest period of this species (September) served as study material. The animals were captured on the Sulina channel, at its flowing into the Black Sea. Adrenals were collected from 19 specimens (10 females and 9 males). The material was fixed into a Bouin-Hollande fixing mixture, and sections were stained with hemalaun and eosin. Measurements of the diameters of nuclei, of the diameters of cells and of the thickness of interrenal cords from different regions of the glands were made by means of an ocular micrometer. Data were processed statistically by variation analyses according to Snedecor.

RESULTS

In view of establishing the existence and the degree of morphological differentiation of cells constituting the interrenal cords from the different regions of the gland, the following morphological aspects were analysed: disposition of interrenal cords, thickness of interrenal cords, cell eosinophilia, diameter of interrenal cells, diameter of nuclei, nucleoplasmatic ratio of cells.

Disposition of interrenal cords. In both sexes, the cords of the interrenal tissue present a different disposition according to the region of the gland. So, immediately under the connective capsule, the interrenal cords are disposed in handles or curls with radiate orientation. In the greatest part of the gland, interrenal cords situated under this zone begin to anastomose, being disposed inordinately without a precise orientation (Fig. 1). Nevertheless, in some regions the cords which leave the peripheral, subcapsular zone, descending towards the central part of the gland, present a radiate arrangement, reminding of the fascicular zone characteristic of mammals (Fig. 2). As this radiated disposition does not represent a general aspect, characteristic of the entire gland, but is limited merely to some sectors, we tried to see if there are any other morphological indices from which a physiological differentiation of the cells constituting these cords would result.

Thickness of interrenal cords. The values obtained by measuring the thickness of interrenal cords of the three above described zones (peripheral, fascicular, and central) are very significantly different ($p < 0.001$) (Table 1). In the peripheral zone it is observed in males, as well as in

females, that the interrenal cords are thinner subsequently growing in thickness and arriving to present the highest values in the central zone.

Eosinophilia of interrenal cells. The interrenal cells of the peripheral zone differ plainly from those of the fascicular and central zones. The cells of the peripheral zone present a much more marked eosinophilia. No difference was recorded between the cells of the fascicular and of the central zones.

Table 1

Dimensions of interrenal nuclei, cells and cords and the nucleoplasmatic ratio in the three zones

	Zones	Thickness of cords (μ)	Diameter of nuclei (μ)	Diameter of cells (μ)	N/P
Males	P. Z.	33.9	6.39	15.27	0.113
	F. Z.	41.2	5.49	18.84	0.028
	C. Z.	55.1	5.53	20.14	0.023
Females	P. Z.	29.9	6.60	14.47	0.132
	F. Z.	40.9	5.70	22.47	0.019
	C. Z.	46.7	5.83	24.13	0.016

Diameter of the nuclei of interrenal cells. In males, as well as in females, the measurements of nuclear diameter showed values very significantly different for nuclei of the interrenal cells of the peripheral zone as against the two other zones ($p < 0.001$). Between the values characteristic of the fascicular and central zones, differences were not significant (Table 1).

Diameter of interrenal cells. Comparing the results of the measurements effected, we obtained in both sexes results very significantly different between the peripheral cord cells, on the one hand, and the cord cells of the fascicular and central zones, on the other ($p < 0.001$). As in the case of nuclear diameter measurements, differences between the cell diameter values of the fascicular zone and of the central zone are not significant.

Nucleoplasmatic ratio. In both sexes the nucleoplasmatic ratio of interrenal cells of different zones of the adrenal gland is different. We thus recorded very significant differences between the values characteristic of the peripheral zone, on the one hand, and those characteristic of the fascicular and reticular zones on the other ($p < 0.001$). Between the fascicular and reticular zones differences are however insignificant.

DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

As a result of the numerous experimental data which appeared lately [3-7], [11], [12], [18], the hypothesis which accounts for the division into zones of the adrenal gland of mammals as an expression of the different degree of maturation of the cells forming it, was invalidated

[28], [29]. At present it is generally accepted that the morphological division into zones corresponds to a functional differentiation, each zone secreting a certain type of hormones. Certain indications of division into zones were likewise recorded in other classes of vertebrates, though some authors insist upon the uniformity of the structure of interrenal cords in reptiles and birds. We are of the opinion that the data relating to the different morphological aspects of interrenal cords of the adrenals of lower vertebrates must be interpreted in the light of the theory of functional zonation. There are, nevertheless, some authors who maintain that in birds the zonation is the result of a maturation gradient [14], [25], [26].

In adult specimens of certain species of reptiles [10] and birds [8], [15], [16], [21], [24], no morphological zonation of the interrenal cords was recorded. Other authors observed differentiations during certain limited periods of the annual cycle, both in reptiles [17] and in birds [2], or merely in immature specimens [24]. There are likewise data which also show that the occurrence of a zonation of interrenal cords can be experimentally induced in birds [15], [16].

On the other hand, numerous papers bring important contributions relating to the differentiation of interrenal cords within the adrenals in reptiles and particularly in birds, data which are in agreement with the results obtained by us in the present paper [1], [13], [19—22], [25], [26]. According to these authors' data, it seems that both in birds and in reptiles, the adrenal gland presents two zones: a peripheral zone and a central zone, which differ by the disposition and orientation of interrenal cords, by the size of the cells, the volume of nuclei and chemical structure.

An exception is *Pelecanus occidentalis*, in which Knouff and Hartman [14] describe three zones altogether similar to mammals. From our studies on the interrenal cords in *Phalacrocorax carbo*, a species related to the pelican, it ensues that this has only two well differentiated zones: a peripheral one and a central one. Though in some sectors of the adrenals we observed a radial, fasciculated disposition of the interrenal cords situated immediately under the peripheral zone, we cannot admit that this would form another distinct zone, as the morphological features of its cells do not differ from those of the central zone cells. Knouff and Hartman assert that the fasciculated disposition of interrenal cords is well visible in the pelican, because in the adrenals of this species, the quantity of chromaffin tissue is smaller than in other bird species. In this case the few and small islets of chromaffin tissue would not disturb the orientation of interrenal cords and thus their fasciculated disposition would be more evident [14]. As regards the quantity of chromaffin tissue, *Phalacrocorax carbo* fits into the same category as *Pelecanus occidentalis*. Nevertheless, the fasciculated disposition of interrenal cords was observed only in limited sectors within the gland, and these sectors do not coincide with the regions poorer in chromaffin tissue of the adrenal. From this fact we draw the conclusion that not only the quantity of chromaffin tissue would be responsible for the zonation of adrenals, but that the cell functional specific character is certainly much more important.

As regards the zonation of adrenals in birds, Kondics obtained experimental results according to which the peripheral aldosterone secretory

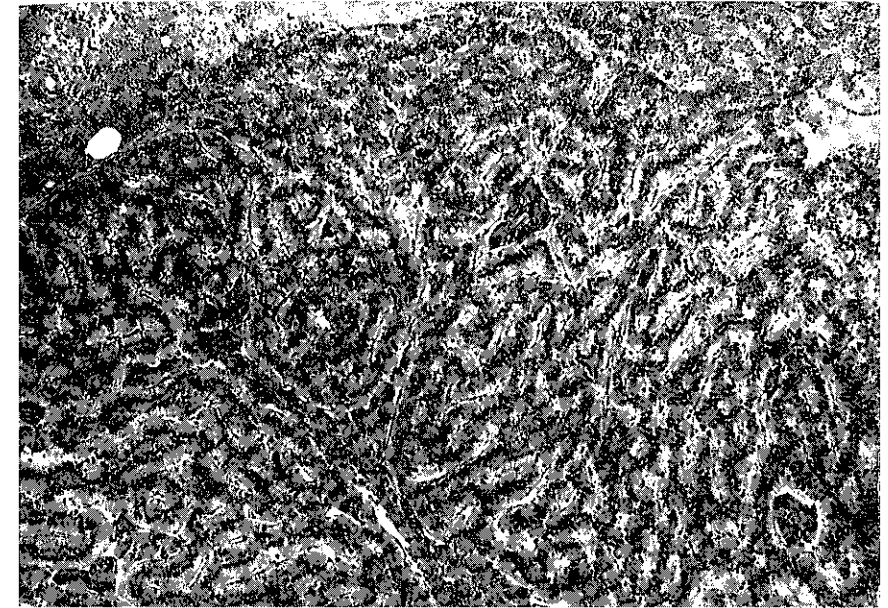


Fig. 1. — Portion of adrenal gland of *Phalacrocorax carbo*, which presents an inordinate orientation of interrenal cords descending from the peripheral zone.

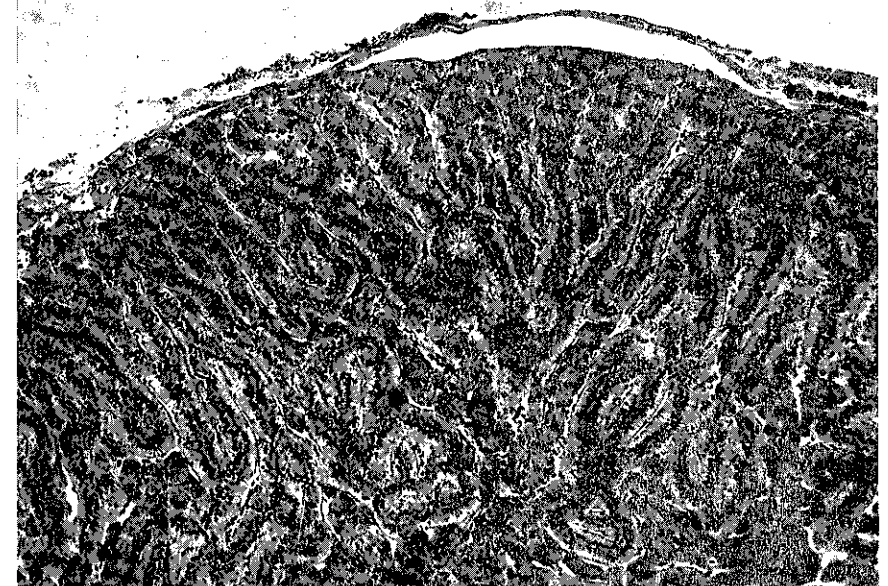


Fig. 2. — Portion of adrenal gland of *Phalacrocorax carbo*. The fasciculated arrangement of interrenal cords descending from the peripheral zone is visible.

zone becomes evident in the case in which the cells making it up are in hypo- or hyperfunction [15], [16]. Péczely, likewise, offers a very reasonable explanation to the zonation of adrenals in birds depending on ecological conditions, more precisely on the consumption of mineral salts. The results obtained by us in *Phalacrocorax carbo* confirm both Kondics' results and Péczely explanation. The specimens from which we collected the adrenals were captured from a sodic habitat. Consuming water rich in sodium salts, the quantity of aldosterone necessary to metabolism is small and consequently the peripheral aldosterone secretory zone is slightly atrophied. Its cells are smaller than those of the central zone, with more acidophilous cytoplasm and smaller nuclei.

It thus results that in *Phalacrocorax carbo* the adrenal gland presents only two quite distinct zones. Our opinion is based in the fact that the fasciculated disposition of interrenal cords is not characteristic of the entire gland or of the greatest part of it, on the lack of differences in tinctorial affinity and the dimensions of cells and nuclei, as well as on the results of histochemical investigations [1], [2], [9], [22], [23], [25], [26].

REFERENCES

1. ARVY LUCIE, C. R. Soc. Biol., 1961, 155, 1, 69-71.
2. BHATTACHARYYA T. K., GHOSH A., Acta Biol. Hung., 1965, 16, 1, 69-77.
3. BRAÑEZ E., ROELS H., Nature, 1961, 192, 4807, 1043-1044.
4. CHESTER-JONES I. Quart. J. Micr. Sci., 1948, 89, 53-73.
5. CHOEN R. B., FAGUNDES L. A., Endocrinology, 1966, 78, 1, 220-224.
6. DEANE H. W., GREEP R., Amer. J. Anat., 1946, 79, 117-137.
7. DOBBIE J. W., MACKAY A. M., SYMINGTON T., *The investigation of hypothalamic-pituitary-adrenal function*, ed. by W.H.T. JAMES and T. LANDON, Cambridge Univ. Press, 1968, p. 103-112.
8. FUJITA H., Zschr. Zellforsch., 1961, 55, 80-88.
9. GABE M., MARTOJA M., Arch. Anat. Micr., 1961, 50, 1, 1-34.
10. —, Arch. Anat. Micr., 1962, 51, 2, 107-128.
11. GREEP R., DEANE H. W., Endocrinology, 1947, 40, 417-425.
12. HUNT T. E., HUNT E. A., Anat. Rec., 1964, 149, 3, 387-396.
13. JUNQUEIRA L. C. U., quoted from GABE M. and MARTOJA M. [10].
14. KNOUFF R. A., HARTMAN F. A., Anat. Record, 1951, 109, 2, 161-187.
15. KONDICS L., Ann. Univ. Scient. Bpestinensis, s. biol., 1963, 6, 101-107.
16. —, Ann. Univ. Scient. Bpestinensis, 1964, 7, 115-120.
17. MARTOJA M., DUGUI R., SAINT GIRONS H., Arch. Anat. Micr., 1961, 50, 2, 233-249.
18. MIKHAIL Y., Indian J. Med. Res., 1961, 49, 2, 290-295.
19. MILLER R. A., RIDDLE O., Amer. J. Anat., 1942, 71, 311.
20. MÜLLER J., Quoted from KNOUFF R. A. and HARTMANN F. A. [14].
21. PÉCZELY P., Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1964, 15, 2, 171-179.
22. PETRESCO-RAIANU A., Rev. Roum. Biol., s. Zool., 1968, 13, 1, 63-70.
23. SINHA D., GHOSH A., Endokrinologie, 1961, 40, 270-280.
24. SINHA D., RAY I., GHOSH A., Nucleus, 1959, 2, 2, 171-178.
25. SIVARAM S., Canad. J. Zool., 1965, 43, 6, 1021-1031.
26. —, Canad. J. Zool., 1966, 44, 2, 342.
27. SNEDECOR W. G., *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*, Iowa, 1957.
28. ТАРАКАНОВ Е. И., Архив анат. гист. и эмбр., 1960, 39, II, 102-115.
29. ZARROW M. X., YOCHIN J. M., MCCARTHY J. L., *Experimental endocrinology*, Acad. Press, New York, London, 1964.

Received November 13, 1969

The "Traian Săvulescu" Institute of Biology
Department of Animal Morphology

EFFECTS OF SOME RADIOPROTECTIVE SUBSTANCES
ON THE NADH-CYTOCHROME C REDUCTASE ACTIVITY
OF ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA

BY

E. A. PORA, A. D. ABRAHAM, Z. URAY, MARIANA MANIU
and M. FĂRCĂȘANU

Some neurotrope substances, sulphamides, biogenous amines, AET can influence the respiratory activity of isolated liver mitochondria by interaction with NADH-cytochrome C reductase. It has been proved that the moderate reduced state of respiratory enzymes may ensure radioprotection, a phenomenon which can explain the radioprotective effect of these substances.

In a previous work we presented the moderate and reversal effect of AET and of some neurotropes upon the activity of succin oxidase and cytochrome oxidase of liver mitochondria [1]. In the present work we shall present data obtained by using 20 substances (neurotropes, sulphamides, biogenous amines), having radioprotective effect, which can influence the respiratory activity by interaction with NADH-cytochrome C reductase enzyme from isolated liver mitochondria. The methods used for the isolation of liver mitochondria and for the determination of NADH-cytochrome C reductase activity (NCCR) were the same as described in our earlier published works [1], [2].

The 136 animals used for these experiments were Wistar male rats, weighing $150 \text{ g} \pm 10$. The substances used here were analytically pure and were purchased from different firms (E. Merck, La Roche-Hoffmann, I. R. Geigy, Richter Gedeon).

RESULTS

AET (S-2-Aminoethyl-isothiourea Br. HBr), as a reference substance, having an excellent radioprotective effect, significantly reduced the NCCR activity of isolated mitochondria, administered in $100-300 \mu\text{g}$ (Fig. 1).

The CNS acting substances with radioprotective effect

Imipramine had an inhibitory effect of 60 per cent, administered in doses of 125 μg ; this effect increased when larger doses were administered.

Dibenzocycloheptatriene derivatives in the doses of 100 μg showed an inhibitory effect depending on their radioprotective effect. Two sub-

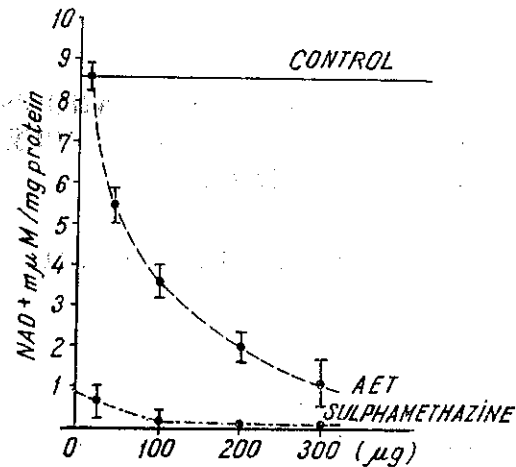


Fig. 1. — Action of AET and Sulphamethazine on the activity of NCCR of isolated liver mitochondria, depending on the administered doses.

stances: Ro-4-1577 and Ro-4-6011 inhibited NCCR activity with 22, respectively, 34 per cent (moderate inhibition). The other substances (no radioprotectors), Ro-4-8093, Ro-4-8711, Ro-4-7960, Ro-4-8624 had either a weak effect (15 per cent, Ro-4-8624) or a very strong one (99 per cent, Ro-4-8711).

Plegomasine, Nozinane, Laroxil and Taractan (Phenothiazine and thioxanthene derivatives), having radioprotective effect between 30–50 per cent, decreased NCCR activity in 100 μg dosis with 60, 100, 52, respectively, 84 per cent. The effect of Plegomasine and Nozinane increased parallelly with the dosis (Fig. 2).

Administration of Sulphamethazine (radioprotective effect = 60 per cent) resulted in a very strong inhibition of NCCR activity, already in the dosis of 20 μg . This sulphamide is a weaker radioprotector than AET, but it is a stronger inhibitor of enzyme activity than AET (Fig. 1).

The action of biogen amines was measured in comparison with the action of tryptophan. Because tryptophan is not a radioprotector and has no effect on the NCCR activity of isolated mitochondria, serotonin had an inhibitory effect equal to 73 per cent at 100 μg doses. Histamine inhibited the above enzyme activity with 83 per cent at the same dosis (Fig. 3).

In the higher doses the effects of these substances were increased.

DISCUSSION

It has been proved that a moderately reduced state of respiratory enzymes may ensure radioprotection, a phenomenon that can be related

to the action of direct or indirect cytochrome oxidase inhibitors to produce hypoxia of all enzymes involved in mitochondrial oxidation pro-

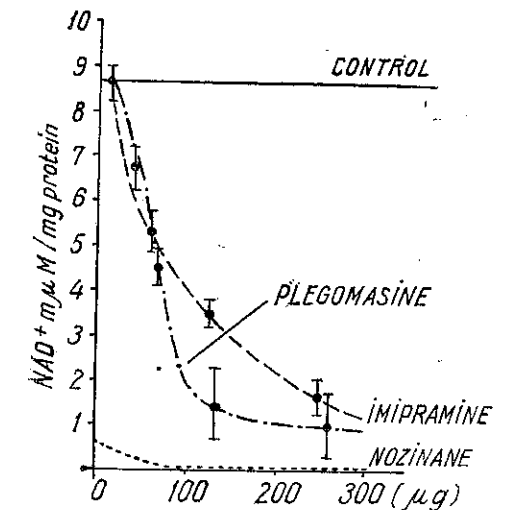


Fig. 2. — Action of neurotropes on the activity of NCCR of isolated liver mitochondria, depending on the administered doses.

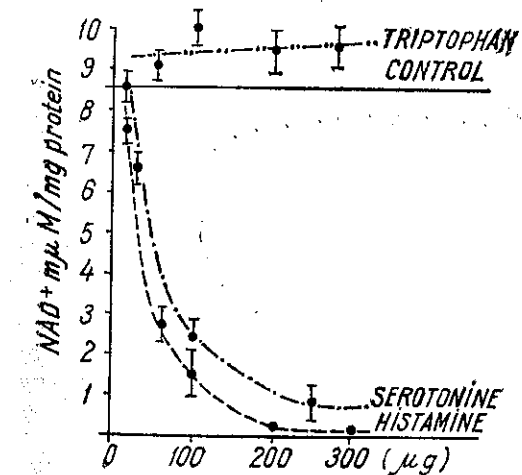
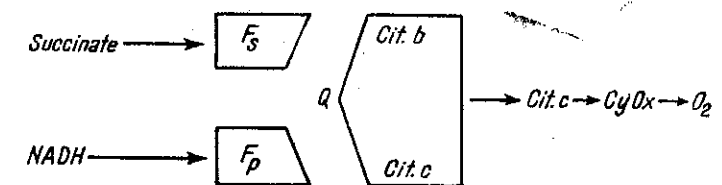


Fig. 3. — Action of Serotonin and Histamine on the activity of NCCR of isolated liver mitochondria, depending on the administered doses.

cesses. The central position of cytochrome oxidase is represented by Lehninger [2] in scheme 1:



Radioprotectors used in these experiments, which have an inhibitory effect on NCCR activity of isolated liver mitochondria, at the same time provoked an accumulation of NADH in the inside of mitochondria. This fact may be in relationship with the radioprotective effects of these inhibitors, in accordance with the well-known Pihl and Sanner's hypothesis [3] which presumed that NADH may act as hydrogen donors in transfer reactions, repairing target radicals induced by irradiation in biological systems.

REFERENCES

1. ABRAHAM A. D., PORA E. A., HODOŞAN F., *Experientia* (Basel), 1969, 25, 8, 820-821.
2. LEHNINGER A., *The Mitochondrion*, Benjamin W. A., New York-Amsterdam, 1965.
3. PIHL A., SANNER T., *Progr. Biochem. Pharm.*, 1965, 1, 85-89.
4. PORA E. A., ABRAHAM A. D., URAY Z., HOLAN T., *Rev. Roum. Biol. Sér. Zool.*, 1969, 14, 3, 203-210, and *2nd Internat. Conference on Med. Physics*, Boston, Mass., USA, 1969.

Received January 19, 1970

*Biological Research Centre, Cluj
Department of Animal Physiology
and
Institute of Cancer, Cluj
Department of Nuclear Medicine*

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE MECHANISM OF AET ACTION ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN WHITE RATS

BY

Z. URAY, I. MADAR, E. A. PORA and T. HOLAN

The effect of AET was studied upon some aspects of carbohydrate metabolism in white rats. In normal rats, AET induced hypoglycaemia, decreased liver glycogen content and glucose-6-phosphate activity. These effects of AET were abolished by previous administration of Redergam. Atropine suppressed only the hypoglycaemic effect of AET. In alloxan-diabetic animals AET provoked hyperglycaemia and a decrease of liver glycogen level, meanwhile in the adrenalectomized rats, AET caused a decrease of the liver glycogen level only.

The theory of the biochemical shock, elaborated by Bacq and co-workers [1], attributes a particular importance to the action of radioprotective substances upon carbohydrate metabolism.

It was demonstrated by the majority of authors, that AET (S-2 aminoethyl-isothiourea Br. HBr) induces significant changes in glycaemia, in lactate and pyruvate concentration of the blood, as well as in the glycogen content of the liver [1-3], [13], [15]. It is presumed, that AET, beside its direct action on the carbohydrate metabolism, may have also any indirect effects, similarly to many radioprotective substances, structurally related with AET [1], [2]. Any of these indirect actions are interpreted by the effects of AET upon some endocrine glands important in carbohydrate metabolism. In this respect the data are contradictory [1], [3].

The object of this study is to clarify the effect of AET (administered in optimal radioprotective dosis) upon some aspects of carbohydrate metabolism in normal white rats, in rats treated with sympathicolytical substances, in alloxan-diabetic rats and in adrenalectomized rats. In this connection the following parameters were studied: glycaemia, blood lactate and pyruvate concentration, hepatic glycogen content, the acti-

vity of glucose-6-phosphatase and hexokinase of the liver, the uptake of ^{32}P by the liver, pancreas and adrenal glands, as well as insulin-like activity of the plasma.

MATERIAL AND METHODS

Albino male rats weighing 130–160 g (mixed strain) were used. They were fed on a standard diet during 10 days, and fasted 18 hours before the experiment.

The animals were distributed in 8 experimental groups:

Group I: control rats, injected intraperitoneally with 0.5 ml isotonic NaCl solution;

Group II: animals injected intraperitoneally with a small unique dose of 30 mg AET/100 g body weight;

Group III: injected intraperitoneally with Redergam plus AET. A dose of Redergam (0.1 mg. per 100 g b.w.) was injected 20 minutes before the injection of AET, and the other dose of Redergam was administered simultaneously with AET (30 mg/100 g b.w.);

Group IV: injected intraperitoneally with 0.05 mg. atropine per 100 g b.w., 20 minutes before the administration of AET;

Group V: control alloxan-diabetic rats. Experimental diabetes was induced through a rapid intravenous injection of 7.5 mg alloxan/100 g b.w. Alloxan was dissolved freshly in isotonic NaCl solution, and administered subcutaneously in 18-hour fasted animals;

Group VI: alloxan-diabetic rats, injected intraperitoneally with 30 mg AET/100 g b.w. 48 hours after alloxanization;

Group VII: control adrenalectomized animals, treated substitutively during 2 days with a daily dose of subcutaneously administered 2.5 mg hydrocortisone per 100 g b.w.;

Group VIII: adrenalectomized rats, treated subcutaneously, with hydrocortisone (similar to group VII), injected intraperitoneally with 30 mg AET per 100 g b.w.

Blood samples for determination of initial glycaemia were collected from the tail veins, and for the determination of circulating blood glucose, blood lactate and blood pyruvate concentration, blood was obtained through decapitation of animals.

Glycaemia was determined photocolometrically, using a glucose oxidase method [8]. For the determination of liver glycogen content the method of Montgomery [9] was utilized and for blood lactate determination the method of Barker and Summerson [4]. Pyruvate concentration of blood was determined using the method of Rindi and Ferrari [12]. Hexokinase activity in the liver was followed according to the method of Kohn and Minski [9], and the liver glucose-6-phosphatase activity was determined after Marjorie and Swanson [7]. ^{32}P uptake by tissues was determined 20 minutes after intraperitoneal injection of AET and $0.5 \mu \text{Ci Na}_2 \text{H}_2 \text{PO}_4$ g b.w., respectively. The specific radioactivity of tissues, obtained by radioactive measurements [14] was calculated using the following formula:

$$\text{coefficient} = \frac{\text{radioactivity of 100 mg tissue}}{\text{radioactivity of 0.1 ml plasma}}$$

Insulin-like activity of plasma was determined with isolated rat adipose tissue, using the method of Martin et al [16].

RESULTS

Data concerning the values of glycaemia and of liver glycogen content are summarized in Table 1.

One can see that in normal animals AET induces significant hypoglycaemia 20 minutes after its administration; the blood glucose level

Table 1

The values of glycaemia and of liver glycogen content after AET administration in various experimental conditions

Group	Glycaemia mg%		Diff. mg. % related to the initial values	P
	Initial	20 min. after AET		
I Control	85±6.1	87±5.9	+ 2	>0.5
II AET	92±5.4	58±4.2	-34	<0.01
III Redergam + AET	90±3.9	92±5.3	+ 2	> 0.5
IV Atropine + AET	88±3.1	91± 4.2	+ 3	> 0.5
V Alloxan diab.	345±31	352±27	+ 7	> 0.5
VI Alloxan diab. + AET	315±23	410±35	+95	<0.02
VII Adrenalectomy	87±3.4	90±2.8	+ 3	> 0.5
VIII Adrenalectomy + AET	84±2.8	89±11	+ 5	> 0.5
GROUP	Liver glycogen content mg%		Diff. compared to the control values mg%	P
I Control	2386±439		-	-
II AET	1269±102		-1117	< 0.02
III Redergam + AET	2191±116		-195	> 0.5
IV Atropine + AET	1135±84		-1251	<0.05
V Alloxan diab.	1015±120		-	-
VI Alloxan diab. + AET	430± 53		- 585	< 0.01
VII Adrenalectomy	3254±117		-	-
VIII Adrenalectomy + AET	2436±233		- 818	< 0.02

decreases with 34 mg%, comparative to the initial values ($p < 0.01$). Simultaneously with the decrease of glycaemia, liver glycogen content decreases with 1117 mg% as compared to the control values ($p < 0.02$).

In conditions of previous administration of Redergam, the blood glucose level does not change in comparison to the initial value of glycaemia ($p > 0.5$), as the hypoglycaemic effect of AET is inhibited. On the contrary, Redergam reduces the glycogenolytic effect of AET, the amount of liver glycogen being decreased only with 195 mg% as compared to the control values ($p > 0.5$). The liver glycogen content of this group increases significantly in comparison with the liver glycogen content of rats, treated only with AET (+922 mg%; $p < 0.05$).

In normal rats, which were injected with atropine, glycaemia is not modified 20 minutes after AET administration. In this case the glycogen-mobilizing effect of AET is not influenced by atropine.

In alloxan-diabetic animals, AET induces a significant increase of glycaemia (+95 mg%; $p < 0.02$), and a marked decrease of liver glycogen content (-585 mg%) as compared to the alloxan-diabetic control animals ($p < 0.01$).

In adrenalectomized and substitutively hydrocortisone-treated rats AET does not show any changes in glycaemia as compared to the initial values and to the values of control adrenalectomized animals, respectively. On the contrary, the liver glycogen content of this group decreases with 818 mg%, related to the liver glycogen content of control adrenalectomized rats ($p < 0.02$).

Table 2 show the values of blood lactate and pyruvate concentrations.

Table 2

Action of AET on blood lactate (AL) and blood pyruvate (AP) concentration

Group	Lactate mg%	P	Pyruvate mg%	P	AL/AP
Control	11.69 ± 0.3	—	1.21 ± 0.17	—	9.7
A E T	28.1 ± 2.8	>0.01	2.29 ± 0.30	>0.01	12.2

From these data it results that 20 minutes after AET injection, blood lactate concentration increases from 11.69 mg% to 28.10 mg% ($p > 0.01$), and pyruvate concentration from 1.21 mg% to 2.29 mg% ($p < 0.01$).

The values of liver hexokinase and glucose-6-phosphatase activity, as well as the insulin-like activity of plasma are summarized in Table 3.

These data show that AET stimulates significantly the activity of liver hexokinase ($p < 0.01$), and inhibits glucoso-6-phosphatase activity ($p < 0.02$). Simultaneously with modification of above parameters, one can observe the increase of plasma insulin-like activity ($p < 0.05$).

The action of AET on the ^{32}P uptake in the adrenal and pancreatic glands and in the liver tissue is shown in table 4.

It is demonstrated that AET increases the ^{32}P uptake in the adrenal and pancreatic glands, as in the liver, meaning a hyperactivity of all these tissues.

Table 3

Effect of AET on liver hexokinase and glucoso-6-phosphatase activity, and on the insulin-like activity of plasma (ILA)

Group	Hexokinase mg. gluc./100 mg protein	Glucoso-6-phosphatase mg P_i /100 mg protein	I.L.A. $\mu\text{U/m}$
Control n = 10	X = 0.064 ES = 0.017	X = 0.768 ES = 0.033	185 ±19
A E T n = 10	X = 0.739 ES = 0.096 p < 0.01	X = 0.421 ES = 0.06 p < 0.02	343 ±42 p < 0.05

Table 4

Distribution of P^{32} in various organs by control and AET treated groups

Groups	cpm 100 mg adrenal gl.	cpm 100 mg pancreas	cpm 100 mgr liver
	cpm 0.1 ml plasma	cpm 0.1 ml plasma	cpm 0.1 ml plasma
Control n = 10	X = 3.72 ES = 0.37	X = 4.15 ES = 1.27	X = 9.73 ES = 1.5
A E T n = 10	X = 4.48 ES = 0.30 p > 0.1	X = 7.80 ES = 1.69 p > 0.1	X = 12.7 ES = 1.71 p = 0.2

DISCUSSION

Our experimental data evince that AET induces a significant decrease of glycaemia and of liver glycogen amount. These data are in agreement with the observations of Zins et al. [15], who obtained similar modifications in glycaemia and in liver-glycogen content after AET administration.

The above modifications in carbohydrate metabolism are associated with the increase of blood lactate and pyruvate concentration, as well as with the stimulation of liver hexokinase activity and inhibition of liver glucose-6-phosphatase activity.

The mechanism by which AET induces modifications in carbohydrate metabolism are likely complex mechanisms. From our results it arises that AET manifests an adrenal-independent direct stimulative effect upon liver hexokinase activity, demonstrated by the data obtained in adrenalectomized rats (group VII and VIII). The direct action of this substance on liver glucose-6-phosphatase activity may be interpreted also by the absence of hyperglycaemia. On the other hand, Pora et al. demonstrated

that by a direct mechanism AET induces a partial inhibition in the activity of tissue respiratory enzymes [10], which leads to the increase of anaerobic glycolysis, accompanied with the increase of blood lactate and pyruvate concentration.

As for the indirect action of AET upon the carbohydrate metabolism, our data showed that the effect of this radioprotective substance may be manifested by a few effects upon some endocrine glands. The fact that by previous administration of Redergam hyperglycaemic and glycogenolytic action of AET is annihilated demonstrates the intervention of adrenaline in this phenomenon, and that the secretion of adrenaline is probably stimulated by AET treatment.

At the same time, our results showed that AET acts upon the secretory activity of endocrine pancreas, increasing the insulin-like activity of the plasma. This result is in concordance with our above experimental data, which demonstrate that the insulin secretion after rapid intravenous hyperglycaemia stimulus may be inhibited by previous administration of atropine [6]. In fact, the present experiments demonstrate that atropine inhibits the hypoglycaemic effect of AET. On the other hand, the data obtained in alloxan-diabetic animals demonstrate that, in absence of circulating insulin, AET manifests a significant hyperglycaemic effect, which is associated with increased glycolysis. In these circumstances, the influence of adrenal glands becomes preponderant.

CONCLUSIONS

1. The hypoglycaemic and glycogenolytic effect of AET is achieved through a complex direct and indirect mechanism.
2. The direct action of AET is manifested in increase of liver hexokinase activity and in diminution of liver glucose-6-phosphatase activity.
3. The indirect action of AET on the carbohydrate metabolism in white rats is achieved by modification in the activity of some endocrine glands: for instance the adrenal glands and the endocrine pancreas.

REFERENCES

1. BAQO Z. M., *Chemical protection against ionizing radiation*, Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill., USA, 1965.
2. BAQO Z. M., FISCHER P., *Intern. Physiol.*, 1953, **61**, 417.
3. BAQO Z. M., LIÉBECQ C., *Drugs and Enzymes, Proc. of the 2nd Int. Pharmacol. Meeting, Aug. 20-23, 1963*, Pergamon Press, 1965.
4. BARKER I. B., SUMMERSON W. H., *Biol. Chem.*, 1941, **133**, 2.
5. KOHN B., MINSKY R. H., *Science*, 1947, **106**, 148.
6. MADAR I., PORA E. A., *Studia Univ. "Babeş-Bolyai"*, Ser. Biol., 1964, **2**, 121.
7. MARJORIE A., SWANSON I., in KAPLAN, *Methods in enzymology*, vol. II, Acad. Press, 1957, p. 541.
8. MCCOMBEI I., JOSTOCK I., *J. Franklin Inst.*, 1958, **265**, 417.
9. MONTGOMERY R., *Arch. Biochem., Biophys.*, 1957, **67**, 378-386.
10. PORA A. E., ABRAHAM A., URAY Z., HOLAN T., *Rev. Roum. Biol. (Sér. Zool.)*, 1969, **14**, 3.
11. PORA A. E., KISS Z., URAY Z., HOLAN T., *A II-a Conferință Națională de Radiologie București, 22-24 octombrie 1968*.

12. RINDI G., FERRARI G., *Experientia*, 1956, **XII**, 10.
13. SOKAL I. E., SARCIONE E. I., GERSZI K. E., *Amer. J. Physiol.*, 1959, **196**, 261.
14. URAY Z., DEREVENCO V., FĂRCĂȘANU M., ABRUDAN R., GHERMAN C., *Primul simpozion de igiena radiațiilor ionizante, Timișoara, 14-16 octombrie 1965*.
15. ZINS G. R., SEIDEL D. M., RAYMOND A. B., *Univ. Chicago, U.S.A., Rad. Labor., Quart. Rep.*, 1958 b., **28**, 150.
16. MARTIN D. B., DAGENAIS J. M., RENOLD A. E., *Lancet*, 1958, **2**, 76.

Received January 19, 1970

*Institute of Cancer, Cluj
Department of Nuclear Medicine
and
Biological Research Centre, Cluj
Department of Animal Physiology
and
Institute of Medicine and Pharmacy, Cluj
Department of Nuclear Medicine*

SLEEP AND WAKEFULNESS IN THE TORTOISE (*EMYS*
ORBICULARIS)

BY

E. VASILESCU

The work was done on tortoises (*Emys orbicularis*) using chronically electrodes for polygraphic recordings (EEG, EMG, EOG and ECG). Sleep and wakefulness as background states and elements of paradoxical sleep were distinguished both behaviourly and electrographically.

Sleep and wakefulness in submammalian vertebrates were little studied. As subject of our investigation, we have chosen the tortoise (*Emys orbicularis* — 33 animals), since reptilians seem to achieve a leap in the phylogenetic evolution of the sleep-wakefulness states [4], [5]. Electroencephalogram (EEG) was recorded monopolarly or bipolarly, by means of chronically surface electrodes from: olfactory bulbs (OB), cerebral hemispheres (CH), optic lobes (OL), middle brain stem (MBS) and lower brain stem (LBS). Electromyogram (EMG) of the nuchal musculature, electrooculogram (EOG) and electrocardiogram (ECG) were also recorded. Every animal was followed several hours, sometimes in repeated sessions. Two fundamental states were revealed by the experiments:

I) WAKEFULNESS (A in Fig. 1). EEG consisted of sometimes irregular tracings, with a dominant rhythm of 10 c/sec (8–11 c/sec) somewhat slower in OL, and an amplitude of 10–15 μ V; EMG was active enough (20–30 μ V), EOG indicated no, or occasional, ocular movements, and ECG revealed a heart rate of about 30 c/min. EEG arousal (activation) reaction (B in Fig. 1) was represented in 70% of the investigated animals by a telencephalic (OB and CH) synchronization, with a slightly increased frequency of 11 c/sec (8–15 c/sec) and a large amplitude of 35 μ V (10–200 μ V). In other instances (30%), there appeared but a slight increase in frequency and amplitude of the tracings. Telencephalic EEG arousal synchronization is not surprising in these animals whose telen-

cephalon is constituted essentially of phylogenetically old structures. Since this type of arousal was demonstrated also in other submammalian vertebrates, with basically the same telencephalic organization and in the old telencephalic structures of the mammals, we consider, along with Bert and Godet [1], that synchronization is the phylogenetically oldest kind of cortical arousal and the usual EEG arousal in many lower forms of the vertebrates. During the arousal reaction, EMG showed a notable increase in amplitude (50 μ V), EOG was active, with bursts of rapid (less than 1 sec) or slow (a few seconds) ocular movements, and ECG

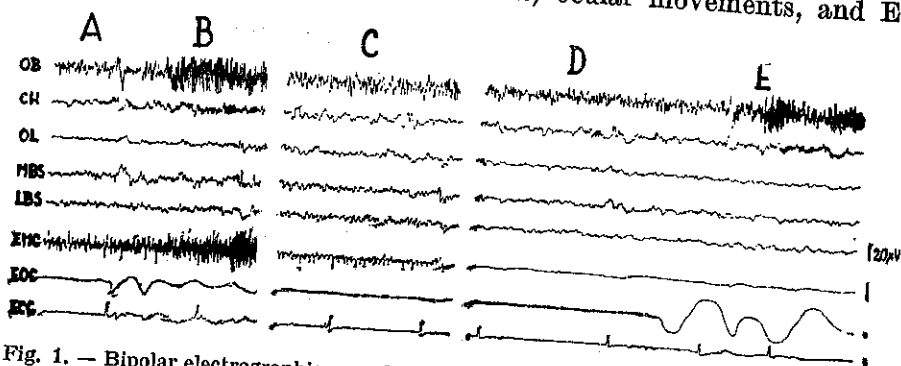


Fig. 1. — Bipolar electrographic records from the tortoise during wakefulness and sleep. A — wakefulness; B — EEG arousal reaction; C, D — successive phases of sleep of increasing depth; E — paradoxical sleep.

remained practically unchanged (33 c/min). In 12% of the investigated animals a reaction of adaptation to darkness, characterized by a synchronous rhythm of 12 c/sec (11–13 c/sec) with 25 μ V (10–70 μ V) amplitude and a duration of 10–20 sec from switching off the light, appeared in the OL leads. It is possible that this electrical activity is an expression of the synchronization of those neuronal units that respond to darkness, identified by Chang and Mkrtycheva [2] in the optic tectum of the frog. II) SLEEP (C in Fig. 1). EEG revealed a slow rhythm of 6 c/sec (3–8 c/sec), being the slower, the deeper the sleep (D in Fig. 1), approximately with the same amplitude as in wakefulness and a tendency to regularization in MBS and LBS in 50% of the animals; animal extremities were relaxed, EMG indicating nuchal hypotony sometimes very marked (1–2 μ V), eyes were closed and ocular movements were abolished, ECG presented bradycardia (20 c/min), and the threshold of excitability to sensitive stimulation (visual and cutaneous) was raised. Paradoxical sleep (PS—E in Fig. 1). In the submammalian vertebrates series, in a rudimentary form in birds [3], [6], and in some species of reptilians [4], [5] the presence of a PS with rapid eye movements and occasional slight bradycardia could be noted, but without EEG "arousal" or nuchal atony. In 15% of our animals, the following elements of PS (a highly relaxed state of wakefulness could not be excluded but seemed to us of little probability) appeared: 1) very marked nuchal hypotony (1–2 μ V), slowly installed during the previous sleep phases and sometimes interrupted by isolated or grouped jerks; 2) rapid (less than 1 sec) or slow (a few sec) ocular movements, either isolated or grouped (bursts);

and 3) telencephalic EEG "arousal" (activation), in the other leads persisting slow rhythms of sleep. Sometimes the EEG "arousal" appeared unaccompanied by ocular phenomena. In only one animal (E in Fig. 1) PS was accompanied by marked tachycardia (increase from 12 to 24 c/min). PS phases lasted up to 15 sec and recame irregularly. From the presented facts it results that the tortoise (*Emys orbicularis*) displays a behavioural and electrographic sleep clearly distinct from the wakefulness state, and probably a behavioural and EEG elements of paradoxical sleep.

I wish to express my gratitude to the staff of the Neuroendocrinological Department of the Institute of Endocrinology of the Romanian Academy, for their kind encouragement and help during the preparation of this work.

REFERENCES

1. BERT J., GODET R., C. R. Soc. Biol. Paris, 1963, 157, 1787.
2. CHANG H. T., MKRITYCHEVA L., Sci. Sinica, 1962, 11, 90.
3. KLEIN M., MICHEL P., JOUVET M., C. R. Soc. Biol. Paris, 1964, 158, 99.
4. TAUBER E. S., ROFFWARG H. P., WEITZMAN E. D., Nature (London), 1966, 212, 1612.
5. TAUBER E. S., ROJAS-RAMIREZ J., HERNÁNDEZ PEÓN R., EEG Clin. Neurophysiol. (Netherl.), 1968, 24, 424.
6. TRADARDI V., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1964, 40, 769.

Received February 13, 1970

Faculty of Biology
Department of Physiology

LA BIOCHIMIE COMPARÉE DES ISOENZYMES.
VI. ISOENZYMES DES DÉSHYDROGÉNASES MALIQUES
DES MUSCLES SQUELETTIQUES DES VERTÉBRÉS *)

PAR

M. ȘERBAN et DITA COTARIU

Muscle cytoplasmic and mitochondrial malate deshydrogenase isoenzymes (MDH) in different vertebrate species were investigated. Thus, isoenzyme patterns were described and their peculiarities depending on the evolutionary degree of species were characterized. The different values of MDH enzyme activity in various investigated species also suggested the existence of some specific properties of protein enzymes studied. Results show that MDH isoenzyme pattern does not display organ-specificity but only species-specificity.

Dans un travail antérieur [11] nous avons décrit une série de caractéristiques des isoenzymes des déshydrogénases maliques (MDH) cytoplasmiques et mitochondriales du cerveau pendant l'évolution phylogénique. Nous avons, par exemple, mis en évidence que les deux formes de MDH — cytoplasmique et mitochondriale — se présentent dans le cerveau des Vertébrés supérieurs comme des entités bien individualisées contrastant avec les cerveaux des Vertébrés inférieurs où la forme mitochondriale n'est pas bien individualisée comme une entité distincte. De même, on a établi que chez les Vertébrés inférieurs le polymorphisme, respectivement le nombre des conformers appartenant à la forme MDH cytoplasmique, est plus grand que chez les Vertébrés supérieurs, cependant que l'activité enzymatique présente les plus grandes valeurs dans le cerveau des Mammifères et les plus petites au pôle opposé, c'est-à-dire chez les Poissons et les Amphibiens. Ces caractéristiques ont été mises en

*) Assistance technique A. Radu

corrélation avec les relations phylogéniques entre différentes espèces ainsi qu'avec les particularités métaboliques du cerveau comme expression de son évolution.

A l'occasion de ces investigations on a remarqué l'existence d'un certain parallélisme entre les modèles isoenzymatiques MDH du cerveau et des muscles striés des mêmes espèces. C'est pourquoi dans le cadre de nos préoccupations de biochimie comparée des isoenzymes [1], [9-10], nous avons considéré utile d'étendre les investigations aux isoenzymes MDH musculaires des Vertébrés. Le but de ce travail est d'établir les relations entre les isoenzymes MDH de deux organes appartenant aux mêmes espèces, et d'autre part, entre isoenzymes musculaires MDH chez différentes espèces occupant des positions taxonomiques différentes. La déshydrogénase malique se présente dans les cellules sous deux formes principales [2, 3, 4] [12], avec localisation intracellulaire et propriétés distinctes [6], [13, 14]. MDH appartient aux isoenzymes « conformationnelles » [5, 6, 7] qui sont généralement distribuées dans des espaces cellulaires différents; en même temps la mobilité conformationnelle ainsi que la localisation différente a certaines implications dans le processus d'adaptation métabolique aux diverses conditions de l'ensemble cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les recherches ont été effectuées sur des muscles striés de douze espèces représentant — dans la limite des possibilités — toutes les classes de Vertébrés, notamment, Poisson, Carpe de culture (*Cyprinus carpio*), Carassin (*Carassius* sp.); Amphibiens: Grenouille (*Rana ridibunda*), Triton (*Triton* sp.); Réptiles: Tortues (*Emys orbicularis*, *Testudo graeca*); Serpent (*Natrix natrix*); Oiseaux: Pigeon (*Columba* sp.), Poule (*Gallus* sp.); Mammifères: Rat, Lapin, Bœuf, Porc.

Préparation des extraits. Les muscles squelettiques (*gastrocnémien*, respectivement *longissimus dorsi*) provenant de 2-4 individus, selon le cas, ont été prélevés immédiatement après la sacrifice des animaux, lavés plusieurs fois dans une solution physiologique froide, tamponnés avec du papier filtre et pesés. Pour obtenir les MDH cytoplasmiques et mitochondriales, respectivement pour pouvoir comparer les extraits, on a employé trois milieux d'extraction: tampon Tris-HCl à pH 7,4, solution isotonique de saccharose à 0,25 M, EDTA à 2.10^{-5} M et eau distillée. Dans tous les cas, le rapport d'extraction a été 3/1 v/p. Les homogénés obtenus au froid ont été maintenus pendant une heure à $+4^{\circ}\text{C}$ pour extraction, après quoi ils ont été centrifugés pendant 20 min. à $5.000 \times g$ ($+4^{\circ}\text{C}$). Les surnageants provenant de la centrifugation à $5.000 \times g$ des extraits obtenus dans l'eau distillée ont été congelés et décongelés trois fois, après quoi l'extrait protéique a été de nouveau centrifugé pendant 40 min. à $22.000 \times g$ ($+2^{\circ}\text{C}$). Les surnageants provenant des extraits obtenus en tampon Tris et en saccharose ont été recentrifugés pendant 40 min. à $22.000 \times g$ ($+2^{\circ}\text{C}$). La fraction mitochondriale de l'extrait en saccharose a été lavée plusieurs fois avec 2 ml saccharose à 0,25 M et recentrifugée chaque fois pendant 20 min. à $22.000 \times g$ ($+2^{\circ}\text{C}$). Après le dernier lavage et recentrifugation la fraction mitochondriale a été suspendue en 1 ml de l'eau distillée, congelée et décongelée trois fois pour broyer les mitochondries.

De cette façon les extraits obtenus dans l'eau distillée contenaient la forme soluble ainsi que la forme mitochondriale de la MDH; les surnageants des extraits obtenus en saccharose contenaient seulement la forme soluble, cependant que leurs résidus repris dans de l'eau distillée contenaient la forme mitochondriale.

L'électrophorèse en gel d'amidon pour la mise en évidence des isoenzymes MDH cytoplasmiques et mitochondriales a été effectuée à deux valeurs de pH: 8,5 et 7,0, dans les conditions décrites antérieurement [11]. Dans les deux cas, la quantité de protéine appliquée a été de 150 g, tandis que les fractions protéiques ont été révélées avec une solution d'« amido black » B, après le sectionnement longitudinal du gel.

La mise en évidence des isoenzymes MDH a été effectuée en incubant le gel à $+37^{\circ}\text{C}$ dans une solution à 0,2 M tampon Tris-HCl, pH 8,4, contenant du malate de sodium à $1,5.10^{-2}$ M comme substrat, du NBT (sels de tétrazolium), du NAD et du phénazine-méthosulfate (accepteurs intermédiaires).

L'inhibition pour la différenciation des types d'isoenzymes MDH a été réalisée avec du p-chloromercuribenzoate (PCMB), ainsi qu'à haute température dans de conditions décrites antérieurement [10].

L'activité enzymatique des extraits a été déterminée spectrophotométriquement à pH 7,4 en poursuivant le décroissement de la densité optique à 340 m μ dans un système de réaction contenant: tampon Tris-HCl à pH 7,4, de l'oxalacétate à $7,6.10^{-2}$ M, du NADH à $1,5.10^{-3}$ M et l'enzyme dont la concentration a été préalablement ajustée à une valeur convenable. Les unités enzymatiques calculées ont été rapportées à 1 mg de protéine, en obtenant ainsi les activités spécifiques respectives.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les isoenzymes MDH des muscles striés présentent dans la série des Vertébrés un polymorphisme similaire à celui signalé antérieurement dans le cerveau des mêmes espèces. Toutefois, en contraste avec les isoenzymes des aldolases musculaires, qui présentent un haut degré d'homologie phylogénique chez les différents Vertébrés, les isoenzymes musculaires manifestent une hétérogénéité différente dépendant de la position taxonomique des espèces étudiées. Quoique les isoenzymes MDH des muscles striés des Vertébrés catalysent le même type de réaction, ils manifestent toutefois une série de particularités distinctives pouvant être mises en corrélation avec le processus d'évolution et qui indiquent certaines manifestations de leur homologie.

Du point de vue de leur hétérogénéité, le spectre électrophorétique des isoenzymes MDH cytoplasmiques et mitochondriales musculaires indique des différences significatives dépendant du degré d'évolution phylogénétique des espèces étudiées. Ainsi qu'il ressort de la figure 1, les muscles des Vertébrés supérieurs (Mammifères et Oiseaux) contiennent deux groupes de fractions isoenzymatiques reflétant leur origine biloculaire. La bande généralement compacte avec la mobilité électrophorétique anodique la plus petite à pH 8,5 représente l'isoenzyme MDH de type mitochondrial; la bande à mobilité électrophorétique la plus grande et qui est plus ou moins hétérogène représente l'isoenzyme (plus les conformers) de type cytoplasmique. Les enzymogrammes présentés dans la figure 1, obtenus avec les extraits dans l'eau distillée, devraient contenir les deux types d'isoenzymes MDH (cytoplasmique et mitochondriale). Toutefois, les Vertébrés inférieurs (Poissons, Amphibiens, Reptiles) ne présentent point d'isoenzymes de type mitochondrial à mobilité électrophorétique correspondant à celle des espèces de Mammifères et d'Oiseaux. Certainement, l'absence du type mitochondrial MDH chez les espèces de Poissons,

Amphibiens et Reptiles étudiées paraît peu probable, ce qui laisse supposer que ce type se trouverait chez les Vertébrés inférieurs, soit dans une concentration non détectable, soit avec une grande instabilité, ou avec une mobilité électrophorétique très rapprochée des isoenzymes du type cytoplasmique. On a démontré que, généralement, la forme MDH soluble présente un caractère plus conservatif que la forme MDH mitochondriale [8]. Cette différence signalée dans le cas de l'électrophorèse à pH 8,5 des extraits dans l'eau distillée, a été également confirmée dans le cas de l'électrophorèse des mêmes extraits à pH 7,0. De la figure 2 il ressort qu'à pH 7 (d'ailleurs, également comme à pH 8,5) l'isoenzyme MDH du type mitochondrial des muscles de Mammifères et d'Oiseaux est nettement individualisé et possède une mobilité électrophorétique cathodique. Les enzymogrammes réalisés par électrophorèse à pH 7 des extraits musculaires des Vertébrés inférieurs (Poissons, Amphibiens, Reptiles) indiquent que le type MDH mitochondrial n'apparaît pas comme une fraction bien individualisée. Toutefois, à pH 7 on constate dans les muscles de Reptiles l'existence d'une fraction peu exprimée dans la région du start et qui possède une mobilité anodique.

Les données obtenues avec des extraits musculaires en solution isotonique de saccharose plaident aussi en faveur des résultats mentionnés. En contraste avec les muscles des Mammifères et des Oiseaux, où l'on met en évidence le type mitochondrial ainsi que le type soluble d'isoenzymes MDH, la fraction mitochondriale des muscles de Poissons, Amphibiens et Reptiles contient quelques fois seulement de faibles traces, au niveau de migration des fractions MDH cytoplasmiques. Toutefois, dans les surnageants respectifs qui, pratiquement contiennent la forme MDH soluble, on met en évidence les bandes caractéristiques des MDH cytoplasmiques, avec une migration électrophorétique plus grande que les bandes correspondant à la fraction isoenzymatique mitochondriale des muscles de Mammifères et d'Oiseaux.

Enfin, en vue d'obtenir certaines informations sur la nature, respectivement sur la localisation des isoenzymes MDH musculaires dans la série des Vertébrés, on a poursuivi leur comportement envers le PCMB qui inhibe de façon préférentielle les isoenzymes de type mitochondrial, isoenzymes qui dans ces conditions n'apparaissent plus sur l'enzymogramme. Dans la figure 3 on présente quelques spectres isoenzymatiques MDH chez différentes espèces de Vertébrés, obtenus par électrophorèse à pH 8,5, suivi d'inhibition avec du PCMB. De cette façon, on constate que chez les Vertébrés évolués (Oiseaux et Mammifères) le spectre isoenzymatique se simplifie par la disparition des isoenzymes du type mitochondrial, la fraction isoenzymatique soluble restant non affectée. Toutefois, chez les Vertébrés inférieurs, l'action du PCMB n'implique point des modifications essentielles du spectre isoenzymatique, mais une faible atténuation du groupe constituant la fraction soluble, cytoplasmique. Ces observations sur l'effet du PCMB sont valables pour tous les extraits musculaires des espèces étudiées, quelle que soit la nature du milieu d'extraction employé ou le pH de l'analyse électrophorétique.

Il faut aussi mentionner que l'inhibition thermique ne produit pas des modifications essentielles au niveau des isoenzymes des muscles striés de Vertébrés.

Ainsi, il ressort que les formes MDH mitochondriales s'individualisent comme des entités distinctes seulement dans les muscles des Vertébrés supérieurs en contraste avec les Vertébrés moins évolués. Cette constatation est en parfaite concordance avec celle signalée antérieurement pour les tissus cérébraux des mêmes espèces [11].

Un autre aspect concernant l'étude comparatif des isoenzymes MDH musculaires des différents Vertébrés est constitué par leur hétérogénéité. Ainsi, la fraction mitochondriale MDH nettement mise en évidence dans les muscles des Mammifères et des Oiseaux se présente comme une bande diffuse où l'on distingue à pH 8,5 un nombre de 2—3 composants; mais à pH 7, la fraction mitochondriale MDH apparaît plus homogène, notamment sous la forme d'un seul spot bien individualisé. En échange, au niveau de la fraction MDH cytoplasmique l'on constate un nombre variable de composants, surtout quand l'électrophorèse est effectuée à pH 8,5. De ce point de vue, on peut distinguer deux groupes: un, formé par les espèces de Mammifères et d'Oiseaux, et l'autre par les espèces de Poissons, Amphibiens et Reptiles. Chez les espèces du premier groupe (fig. 1), la fraction MDH cytoplasmique contient 2—3 composants (pH 8,5) qui sont bien individualisés après traitement au PCMB (fig. 3). Chez les espèces du second groupe, l'hétérogénéité des fractions MDH cytoplasmique est un peu plus accentuée (4—5 composants), en observant un degré avancé d'hétérogénéité dans le cas du muscle de Poisson (Carpe Carassin) où l'on voit nettement cinq composants. Il est bien connu que du point de vue génétique la MDH est déterminée par un seul type de gène et de ce fait qu'il ne peut apparaître de formes hybrides. Pour cette raison, l'hétérogénéité que nous venons de signaler ne peut être attribuée qu'à l'existence de certains conformers qui apparaissent à côté de la forme structurelle principale, génétiquement déterminée. Puisque chez les Vertébrés inférieurs le nombre de conformers est plus grand, on peut supposer que la stabilité conformationnelle de la molécule d'enzyme pourrait être moindre. Ces conformers représentent le siège des modifications moléculaires à l'intérieur de la région enzymatique.

Sous l'aspect de l'hétérogénéité, on remarque une similitude de comportement de la MDH musculaire et de la MDH cérébrale des mêmes espèces. Ce fait donne un appui à l'idée que le profil isoenzymatique MDH des différents tissus des mêmes espèces est identique ou presque, quoique d'appréciables différences peuvent exister entre diverses espèces.

En ce qui concerne la mobilité électrophorétique on constate un comportement similaire avec les isoenzymes MDH du cerveau. Ainsi, les isoenzymes MDH du muscle de Mammifères présente une mobilité électrophorétique plus grande que les autres espèces, fait qui est confirmé dans le cas des extraits obtenus dans de divers milieux, aussi bien qu'au cas des deux valeurs de pH où l'électrophorèse a été effectuée. Ce fait suggère, comme un reflet du processus d'évolution moléculaire, certains changements intervenus au niveau des protéines douées d'activité enzymatique du muscle des Mammifères.

Les valeurs de l'activité enzymatique totale de la MDH des extraits musculaires obtenus dans l'eau distillée, sont présentées dans le tableau 1. Tout comme dans le cas du tissu cérébral, on constate que l'activité MDH musculaire des Vertébrés inférieurs (Poissons, Amphibiens) présente les

valeurs les plus petites. En contraste avec le tissu cérébral, les valeurs de l'activité MDH musculaire des espèces appartenant aux autres classes de Vertébrés étudiées sont plus rapprochées. L'activité enzymatique accrue de la déshydrogénase malique des muscles de Vertébrés plus évolués suggère la prépondérance des processus de type oxydatif, par rapport aux Vertébrés inférieurs où l'activité enzymatique MDH est nettement plus petite.

Tableau 1

Valeurs de l'activité spécifique de la déshydrogénase malique musculaire des différentes espèces de Vertébrés (chaque valeur représente la moyenne de cinq déterminations)

Classe	Espèces	u MDH per mg protéine
Poissons	Carpe	282 ± 30
	Carassin	
Amphibiens	Grenouille	404 ± 88
	Triton	399 ± 60
Reptiles	Tortue	772 ± 116
	Serpent	567 ± 98
Oiseaux	Pigeon	601 ± 96
	Poulet	657 ± 103
Mammifères	Rat	790 ± 67
	Bœuf	685 ± 79
	Porc	651 ± 77

Généralement, les caractéristiques du spectre électrophorétique des isoenzymes MDH musculaires dans la série des Vertébrés ainsi que celles de l'activité enzymatique, reflètent certains changements évolutifs et adaptations du système protéique enzymatique, en corrélation avec des modifications des processus métaboliques. Les différences que nous venons de signaler au niveau des isoenzymes MDH musculaires et qui dépendent de l'évolution des différentes espèces de Vertébrés, reflètent en même temps le rôle prépondérant de certains types d'isoenzymes MDH dans le processus de réglage et de contrôle, en corrélation avec les nécessités métaboliques et la position taxonomique des différentes espèces.

Tout comme dans le cas des isoenzymes de la déshydrogénase lactique, les particularités des isoenzymes MDH musculaires dans la série des Vertébrés peuvent être mises en corrélation avec les relations phylogénique entre des espèces de Vertébrés situées à de différents degrés évolutifs.

CONCLUSIONS

— Les isoenzymes MDH musculaires de différentes espèces appartenant à toutes les classes de Vertébrés présentent à plusieurs égards une identité de comportement, respectivement une série de caractéristiques similaires aux isoenzymes MDH du cerveau des mêmes espèces.

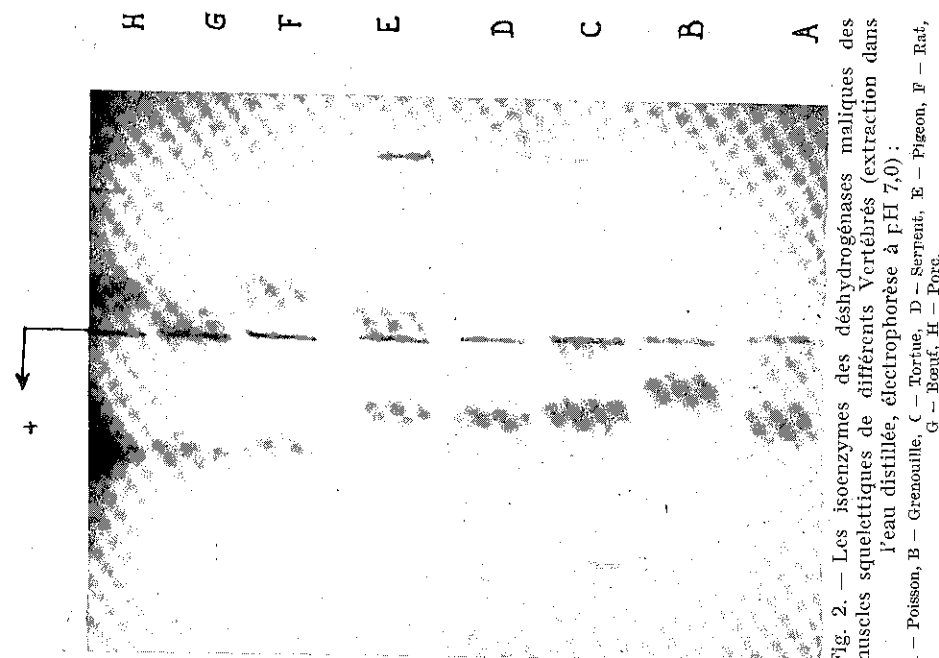


Fig. 2. — Les isoenzymes des déshydrogénases maliques des muscles squelettiques de différents Vertébrés (extraction dans l'eau distillée, électrophorèse à pH 7,0):
A — Poisson, B — Grenouille, C — Tortue, D — Serpent, E — Pigeon, F — Rat, G — Bœuf, H — Porc.



Fig. 1. — Les isoenzymes des déshydrogénases maliques des muscles squelettiques de différents Vertébrés (extraction dans l'eau distillée, électrophorèse à pH 8,5):
A — Poisson, B — Grenouille, C — Tortue, D — Serpent, E — Folet, F — Pigeon, G — Rat, H — Lapin, I — Bœuf, J — Porc.

— Les isoenzymes MDH du cerveau et des muscles des différentes espèces de Vertébrés ne présentent pas une spécificité d'organe, mais seulement une spécificité d'espèce ou de groupe d'espèces à l'intérieur d'une même classe.

— Chez les Vertébrés supérieurs (Mammifères et Oiseaux), les deux types de MDH — cytoplasmique et mitochondrial — peuvent être mis en évidence comme des entités bien individualisées. Chez les Vertébrés inférieurs (Poissons, Amphybiens, Reptiles) la fraction mitochondriale MDH n'est pas individualisée comme une entité distincte.

— Chez les Vertébrés inférieurs, la fraction MDH cytoplasmique contient un plus grand nombre de « conformers » que chez les Vertébrés supérieurs.

— Les muscles de Poissons et d'Amphybiens présentent les plus petites valeurs de l'activité enzymatique MDH.

BIBLIOGRAPHIE

1. COTARIU D., ȘERBAN M., *Revue Roum. Biochim.*, 1969, **6**, 11.
2. DELBRÜCK A., ZEBE E., BUCHER T., *Biochem. Z.*, 1959, **331**, 273.
3. DELBRÜCK A., SCHIMASSEK H., BARSCH K., BUCHER T., *Biochem. Z.*, 1959, **331**, 297.
4. GRIMM F.C., DOHERTY D. G., *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 1980.
5. HENDERSON N. S., *Fed. Proc.*, 1964, **23**, 487.
6. KITTO G. B., WASSARMAN P. M., MICHJEDA J., KAPLAN N. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, **22**, 75.
7. KITTO G. B., WASSARMAN P. M., KAPLAN N. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1966, **56**, 578.
8. KITTO G. B., WILSON A. C., *Science*, 1966, **153**, 1408.
9. ȘERBAN M., COTARIU D., *Revue Roum. Biochim.*, 1968, **5**, 325.
10. — , *St. cerc. biochim.*, 1969, **12**, 173.
11. — , *Revue Roum. Biochim.*, 1970, **7**, 2.
12. THORNE C. J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **42**, 175.
13. — , *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **59**, 624.
14. THORNE C. J. R., COOPER M. M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **81**, 397.

Reçu le 14 janvier 1970

*Institut de Biochimie
Laboratoire de Protéines*

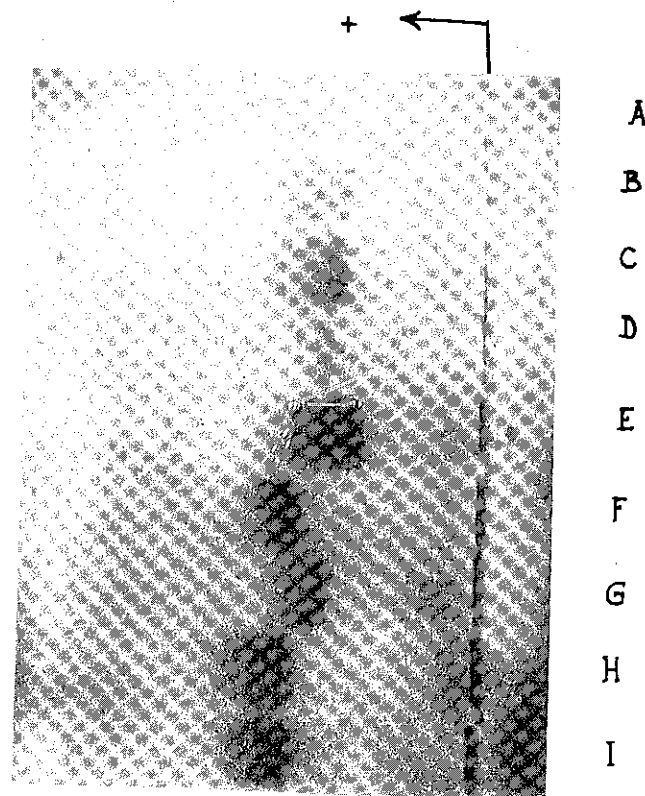


Fig. 3. — Les isoenzymes des déshydrogénases maliques des muscles squelettiques de différents Vertébrés, après inhibition avec du p. chloromercuribenzoate (PCMB) (électrophorèse à pH 8,5):

A — Poisson B. — Grenouille, C — Tortue, D — Serpent, E — Pigeon,
F — Rat, G — Lapin, H. — Bœuf, I — Porc.

THE ENZYMOGRAM, A GENETIC INDEX

BY

L. M. BURUIANĂ*

Enzyme polymorphism is in general a character directed by the hereditary information. Certain enzymograms are correlated with the morpho-productive qualities and could serve as index of their transmissibility during the inbreeding works. This hypothesis has been verified and the modifications encountered during the inbreeding have been pointed out for the cow milk phosphatase and tissue cathepsin of some species and breeds.

This biochemical method offers a possibility to control and manage the selection operations and to elucidate their intimate mechanism.

The transmission of the genetic message and the mechanism of its materialisation as biochemical compounds, are now better understood as a result of molecular biology studies. The specific physico-chemical properties of certain compounds can furnish important information about the composition, structure and activity of the genetic matrix. Active proteins, the enzymes, are preferentially used in this purpose, they being always involved in the differentiation, development and further function of the living body. This preference is justified also because the different peculiarities of shape and function in organism are achieved mainly by the modulation of the enzymes activity. This is especially accomplished by the so called polymorphism of the enzyme. It was discovered 12 years ago and its existence is explained by the variation of the enzyme protein structure as a consequence of the nature and sequence of its amino acid content. The different molecular species resulting, which present the same catalytic activity, are called isoenzymes or multiple molecular forms. Because the chemical composition and arrangement of the amino acids are directed genetically it is easy to understand why the polymorphism could be utilized as genetic index.

The separation by different methods of the isoenzymes gives a spectrum known usually as the enzymogram of the respective enzyme.

* Homage to professor N. Teodoreanu on his 80th anniversary.

Enzyme activity can be modified also by certain metabolites, but this modification is transient and not depending on the genetic determinism as in the case of isoenzymes. It is possible, however, that the prolonged influence of the metabolite induces also the modification of the hereditary factors which manage the biosynthesis of the enzyme itself and finally its enzymogram. This reciprocal influence between the genetic information of the matrix and different factors plays an important role in the process of adaptation and transformation of plant and animal qualities.

A characteristic example is that of cross-breeding operations which can modify the pattern of the enzymogram as a consequence of the reciprocal influence exerted on the chromosomal DNA or by another unknown mechanism. Correlating some peculiarities of the enzymogram with the productive qualities it would be possible to predict the influence of the inbreeding. Specific modifications of the enzymogram could further outline the possible effects of the cross-breeding as a consequence of metabolism changes.

We have checked up this hypothesis to test the effect of the inbreeding in some races of animals. The results obtained in the case of some enzymes are resumed underneath.

MATERIALS AND METHODS

We have determined the polymorphism of different enzymes which catalyse essential metabolic reactions like the phosphatase [6], the cathepsin [4], the transaminase, the carbonic anhydrase, creatine phosphokinase [7], the 5-nucleotidase [5], the aldolase, etc. In the present paper we report only the modifications of the enzymogram of the cow milk phosphatase (alkaline) and that of the tissular cathepsin of some species after the inbreeding.

The phosphatase is an enzyme of great importance for milk formation in the udder. It participates in the regulation of many organic phosphate esters involved in the udder metabolism. However, it is strongly adsorbed by fat globules, approximately 50% is remaining in the milk after fat separation by centrifugation [8]. The phosphatase of the defatted milk is identical with that adsorbed on the fat globules as we have already proved [8]. The separation of the isoenzymes was performed by the column chromatography method on Sephadex.

10 ml of the defatted milk passed through a column 25 × 2 cm filled with Sephadex G-200, equilibrated with Tris buffer 0.05 M + 0.1 M NaCl pH 8.2. The elution was made by the same buffer solution till complete desorption of the protein.

The phosphatase activity of different fractions eluted was determined by the King & Armstrong method [9] described in detail in a previous work [6].

The cathepsins are intracellular proteinases which participate in protein metabolism in tissues. Their enzymogram was obtained also by column chromatography. The cathepsin solution was prepared by homogenizing the respective tissue in proportion of 1 : 10 w/v with acetate buffer M/5 pH 4.0. After centrifugation (30 minutes at 10,000 g), 12 ml from the supernatant passed through a column 10 × 1.5 cm filled with Sephadex G-25 medium, equilibrated with acetate buffer solution. The elution was performed by discontinuous gradient with : 0.1, 0.2 and 0.5 M natrium chloride solution. The cathepsin activity of different fractions was determined by the Anson method [1], modified [4]. The protein content of enzymes solutions has been determined by the Miller technique [10].

RESULTS AND DISCUSSION

I. Modification of the phosphatase enzymogram of cow milk by inbreeding

As we have reported [6] milk phosphatase is polymorphic. Its pattern varies with the breed as it results from the following figures (Figs 1, 2). They represent the enzymograms of the milk phosphatase of different breeds of cows from Romania. It must be underlined that the milk of

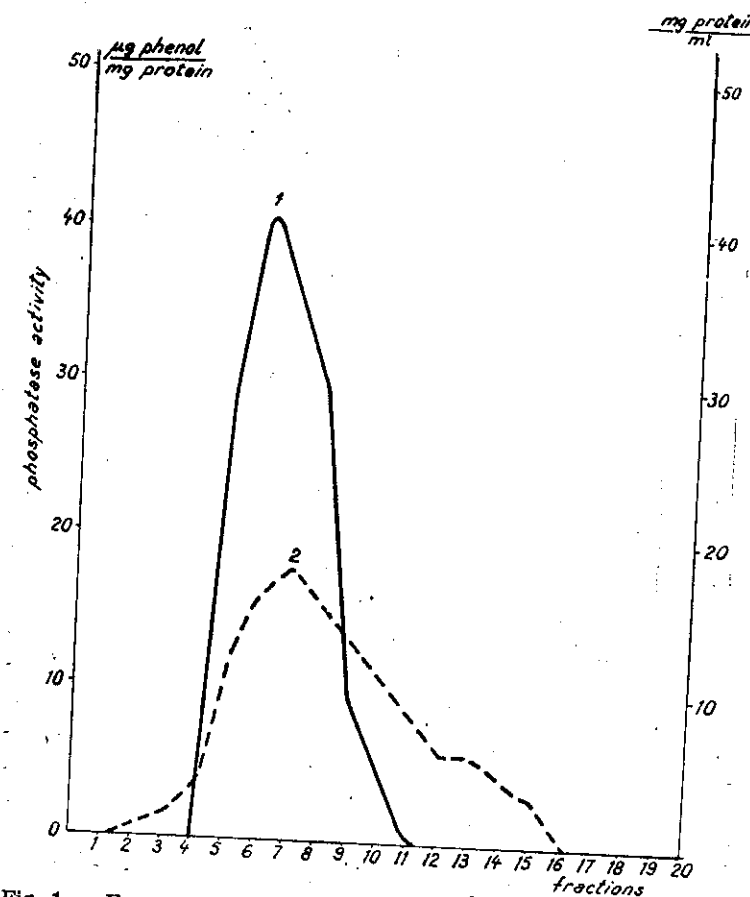


Fig. 1. — Enzymogram of cow milk phosphatase, Spotted Romanian breed. Curve 1. Phosphatase activity. Curve 2. Proteinogram.

the Romanian Spotted, Red Danish, Brown and Pinzgau breed shows a single and rarely 2 protein fractions with phosphatase activity, while that of the Holstein breed is characterised always by the presence of 4 fractions (isoenzymes). This high polymorphism must be correlated with a particular structure of the chromosomal DNA, perhaps with the existence of a specific polyallelic gene and implicitly with the high milk yield, characteristic of the Holstein breed. This character is easily trans-

missible, fact which appears clearly from the new pattern of the enzymograms after inbreeding. It recalls obviously that of the Holstein pure breed, as it appears from the enzymograms of the following figure (Fig. 2). The biochemical modifications of the enzyme structure proves that a persistent and specific change of the genetic information has occurred, which direct the biosynthesis of the enzyme protein.

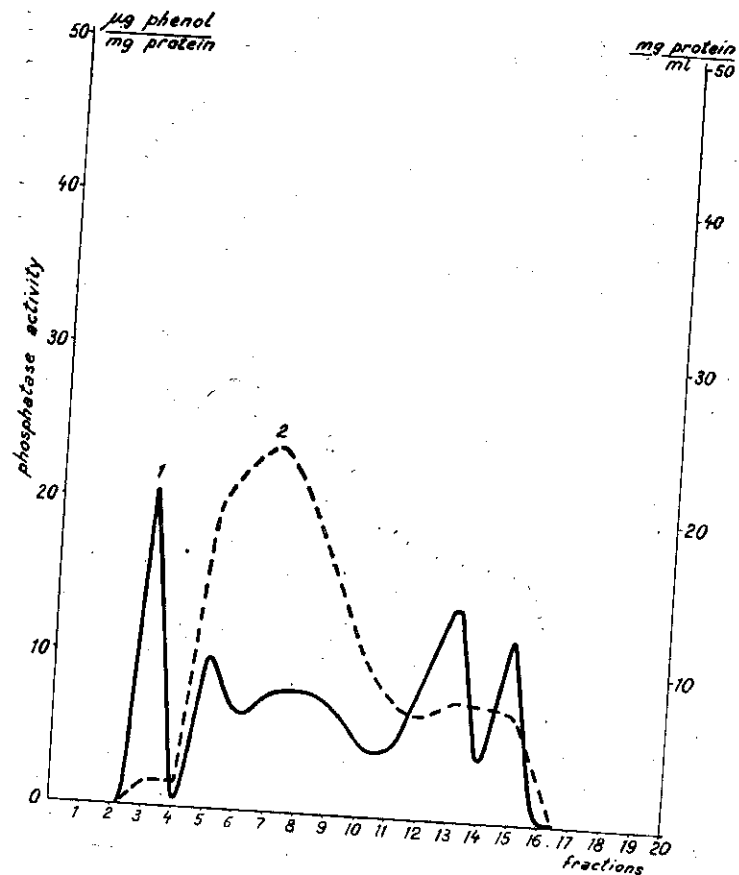


Fig. 2. — Enzymogram of cow milk phosphatase, Holstein breed. Curve 1. Phosphatase activity. Curve 2. Proteinogram.

It must be concluded: firstly that the high milk yield is correlated with a particular pattern of the phosphatase enzymogram of the milk and secondly that the transmissibility of this character is accompanied by a modification of the enzymogram which recalls this pattern. It constitutes therefore a *genetic index* for the inbreeding efficiency.

Finding correlations between the specific productive qualities and the pattern of certain enzymograms and, on the other hand, surprising the characteristic modification of the enzymograms after inbreeding are problems of great importance for the genetic biochemistry. Practically,

it will also spare time and money in the difficult and prolonged operations of animal breed improvement. This type of researches will throw surely a new and brighter light upon the mechanism of hybridation and other techniques utilized in animal husbandry.

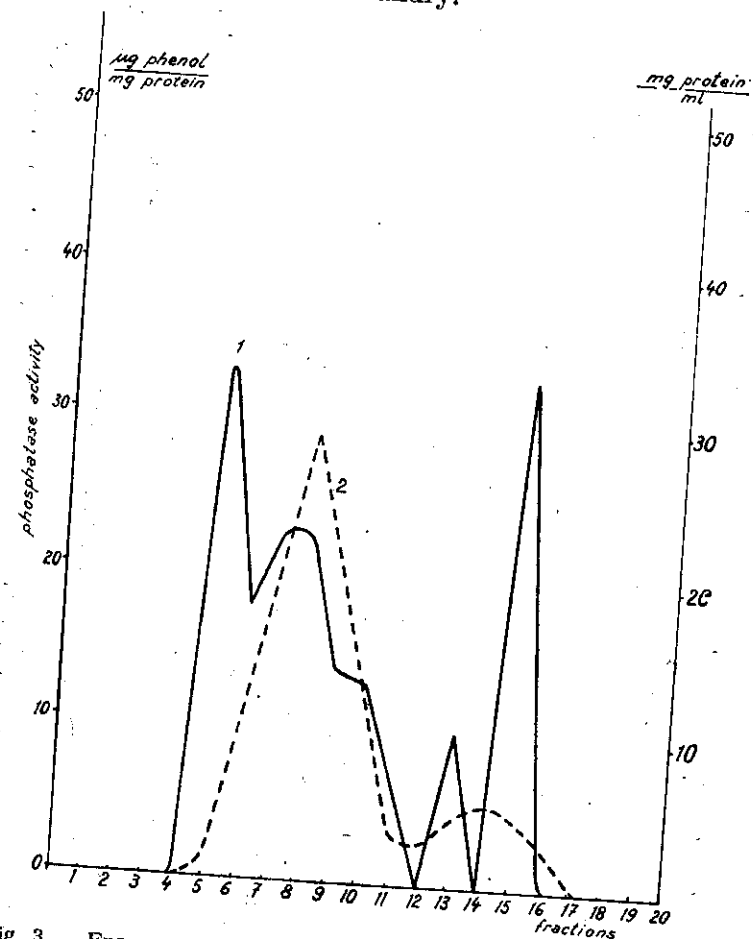


Fig. 3. — Enzymogram of cow milk phosphatase, Spotted Romanian x Holstein hybrid. Curve 1. Phosphatase activity. Curve 2. Proteinogram.

II. The modification of the cathepsin enzymogram of tissues by inbreeding

The cathepsins are intracellular proteinases found in most animal tissues. They play a very important role in the biosynthesis of the specific proteins of animal body. Presumably proteins, e.g. serum albumine, entering cells by a mechanism involving pinocytosis, are degraded by intracellular cathepsins with the liberated amino acids becoming available for synthesis of new protein molecules.

The fragmentation and resynthesis of different protein molecules like antibodies can also be attributed to the cathepsin action. The biosyn-

thesis of different cathepsins is genetically controlled and its enzymogram varies with the species and breed. The cathepsins have the advantage that their activity is not influenced by the protein intake. The cathepsin enzymogram of the same tissue varies with the species and the breed as it has been shown previously [2], [4].

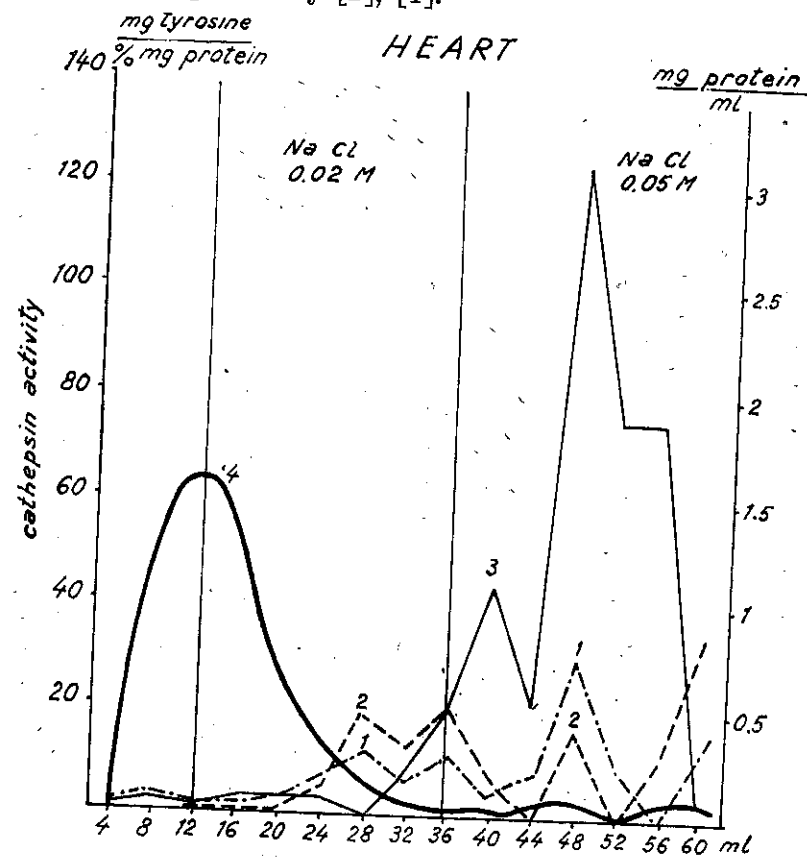


Fig. 4. — Enzymogram of cathepsin from hen heart. Curve 1. Rhode Island breed. Curve 2. Leghorn breed. Curve 3. Rhode \times Island hybrid. Curve 4. Proteinogram.

1. The enzymogram of different organs in the hen

The enzymogram of the heart. The species analyzed for multiple molecular forms of cathepsin were Rhode Island and Leghorn hens, pure breed and their hybrids. The organ was collected immediately after decapitation and the enzyme solution was prepared as it has been described above (see chap. Material and Methods). The enzymograms obtained are represented in figure 4.

It may be observed that isoenzyme distribution is identical while activity is different for each breed (curve 1 and 2). This can be explained by a specific intensity of the proteic metabolism for each breed. After

inbreeding the enzymogram is strongly modified (curve 3). The activity of isoenzymes increases very much and they are shifted towards greater molecular weight. This proves that a modification of the polypeptidic chain structure of the cathepsin has occurred.

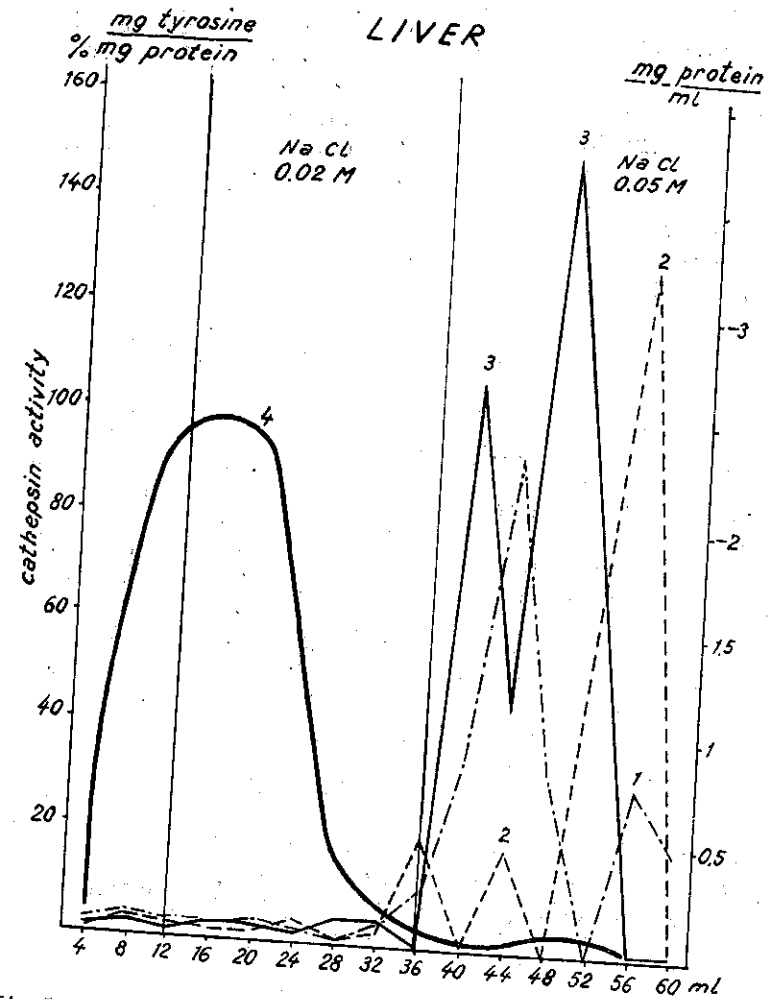


Fig. 5. — Enzymogram of cathepsin from hen liver. Curve 1. Rhode Island breed. Curve 2. Leghorn breed. Curve 3. Rhode Island \times Leghorn hybrid. Curve 4. Proteinogram.

The enzymogram of the liver. The enzymograms of each pure breed and their hybrid are represented in figure 5.

As for the heart, the activity of the hybrid isoenzymes increases. The "mixing effect" is clearly seen in this case.

It must be underlined that the same results have been obtained also for other organs as: spleen, kidney, muscle, brain.

2. The enzymogram of different organs in cattle

The enzymogram of the heart. The place of the isoenzymes and their activity is different in this case, as it resorts from the enzymogram drawn for the Gray of Steppe (Fig. 6, curve 1) and for the Spotted of Romania (Fig. 6, curve 2) breeds.

After inbreeding, the activity decreases markedly and the number of isoenzymes is diminished, 2 instead of 4 peaks (Fig. 6, curve 3).

The enzymogram of the liver. As for the heart, the cathepsin activity of the hybrid isoenzymes decreases strongly (Fig. 7).

The number of isoenzymes diminishes (2 instead of 4 peaks) and the mixing effect is very net. The simplification of the enzymogram denotes a profound change of the proteic metabolism in the hybrids. This must be correlated with the new morpho-physiological characters, as it appears in the descendants.

3. The enzymogram of different organs in swine

The enzymogram of the heart. We must underline that in this species the enzymogram varies widely with the breed. While in Basna breed the number of isoenzymes is limited to only one, as it resorts from figure 8 in the Large White the number is equal to 2 (Fig. 8) and in Mangalitza to 3 (Fig. 9).

A difference appears also as concerns the place of the peaks in enzymograms and therefore the molecular weight of the isoenzymes varies with the breed.

In the cross-breeding Basna \times Large White a remarkable modification occurs, characterized by the appearance of a new isoenzyme with a larger molecular weight (see Fig. 8). The same change is also signalled in the Basna \times Mangalitza cross-breeding (Fig. 9), the cathepsin activity of the isoenzymes being higher than that for each pure breed.

The enzymogram of the liver. For this organ a larger difference exists between the enzymograms of the three species than that encountered for the heart. While in Basna breed the number of isoenzymes is equal to 6, for the Large White it is only 3 and for Mangalitza 2 (Fig. 10).

The highest activity of the isoenzymes has been found in the Large White (Fig. 10) and the smallest in Basna breed. After the cross-breeding between Basna and the Large White (Fig. 10) the cathepsin activity of the isoenzymes diminishes and they shift specifically towards smaller molecular weight. The cross-breeding Basna \times Mangalitza is characterized by the same modifications, but they are more marked than the previous. We suppose that the effect of the inbreeding is emphasized in this case.

If the modifications of the enzymograms of cathepsin after inbreeding are correlated with the morpho-productive characters of the resulting hybrids, we can conclude that: the increasing of the cathepsin activity, the appearance of new fractions (isoenzymes) with higher activity, and the shift of the isoenzymes peaks towards greater molecular weight, point out an activation of the protein metabolism, while the diminishing of cathepsin activity, the disappearance of some isoenzyme peaks and the decreasing

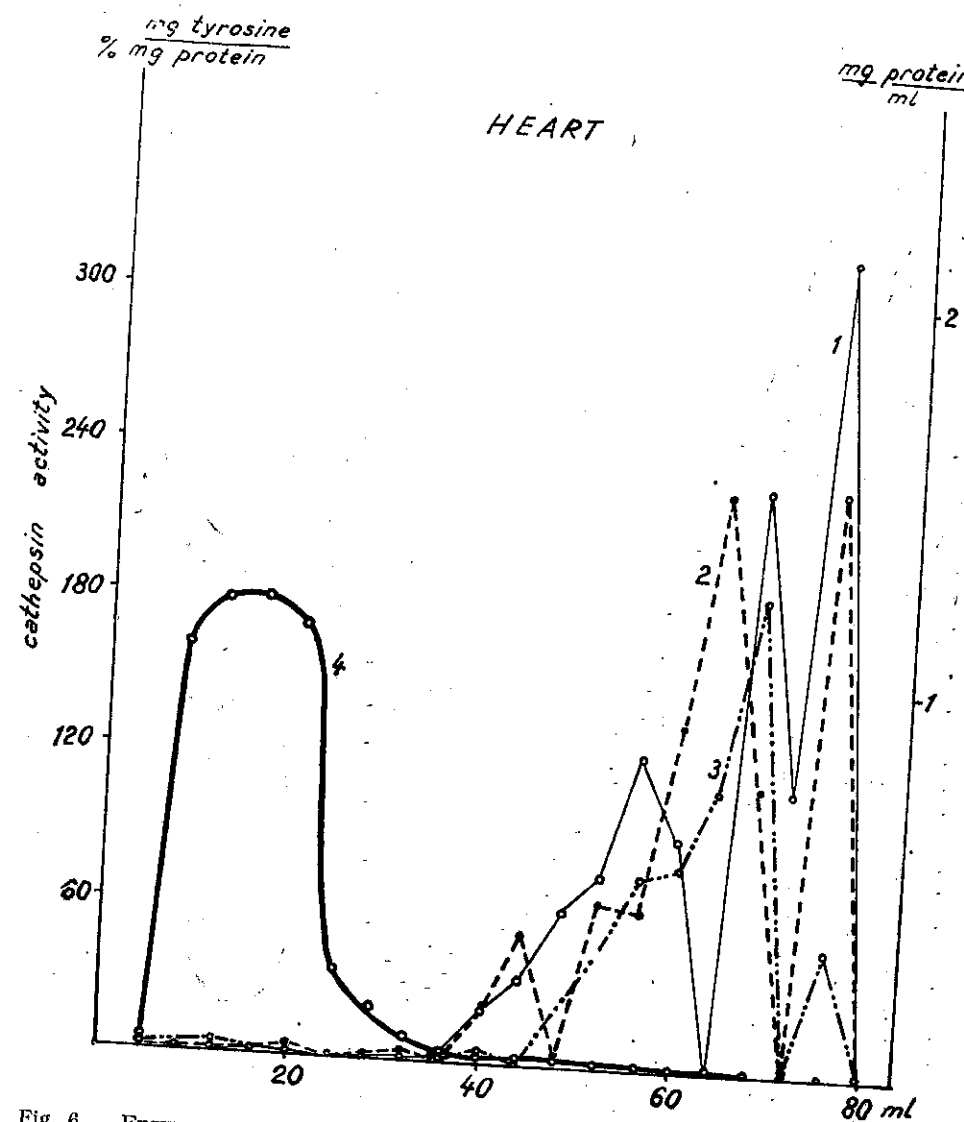


Fig. 6. — Enzymogram of cathepsin from cattle heart. Curve 1. Spotted Romanian breed. Curve 2. Gray of Steppe breed. Curve 3. Spotted \times Gray of Steppe breed hybrid. Curve 4. Proteinogram.

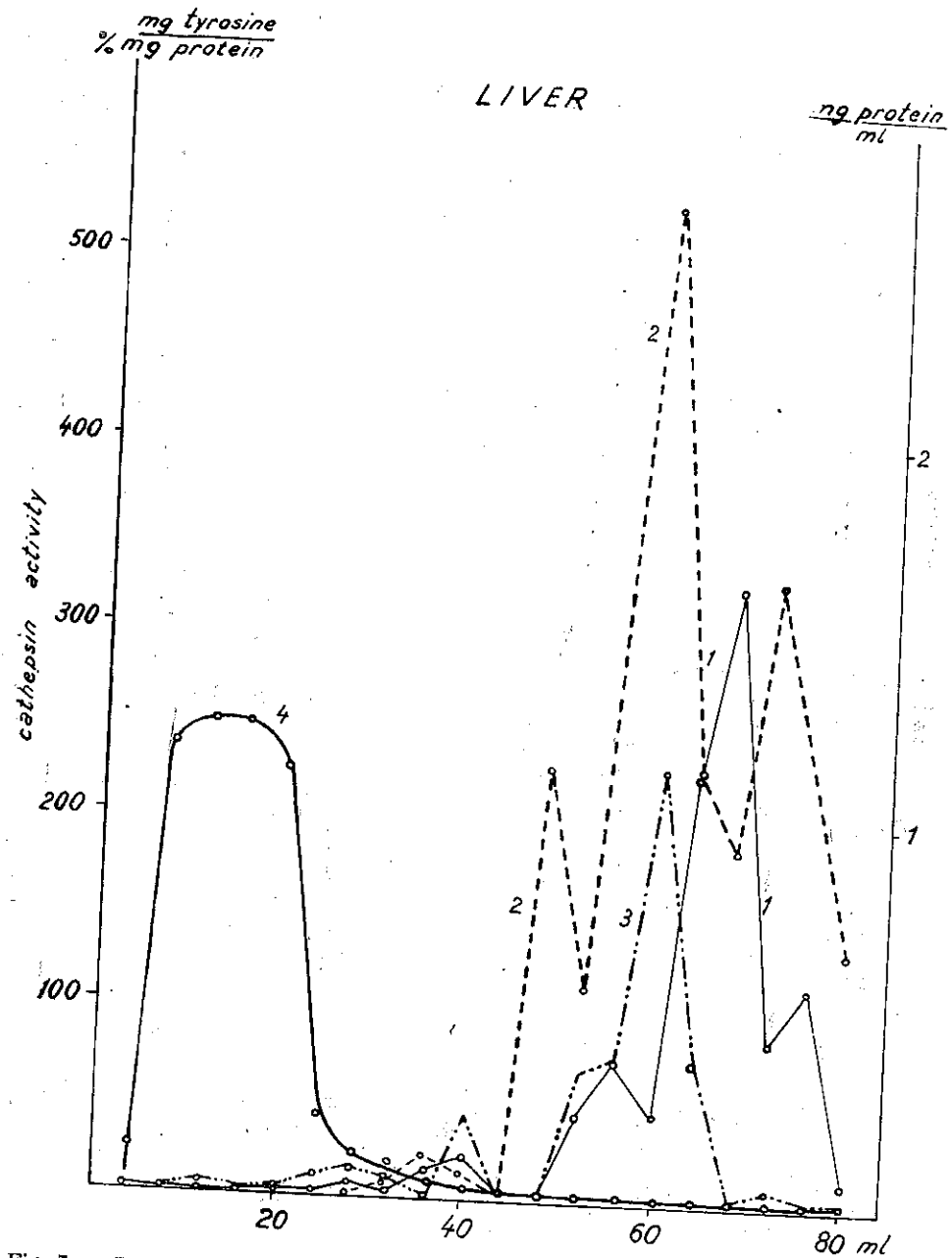


Fig. 7. — Enzymogram of cathepsin from cattle liver. Curve 1. Spotted Romanian breed. Curve 2. Gray of Steppe breed. Curve 3. Spotted Romanian \times Gray of Steppe hybrid. Curve 4. Proteinogram.

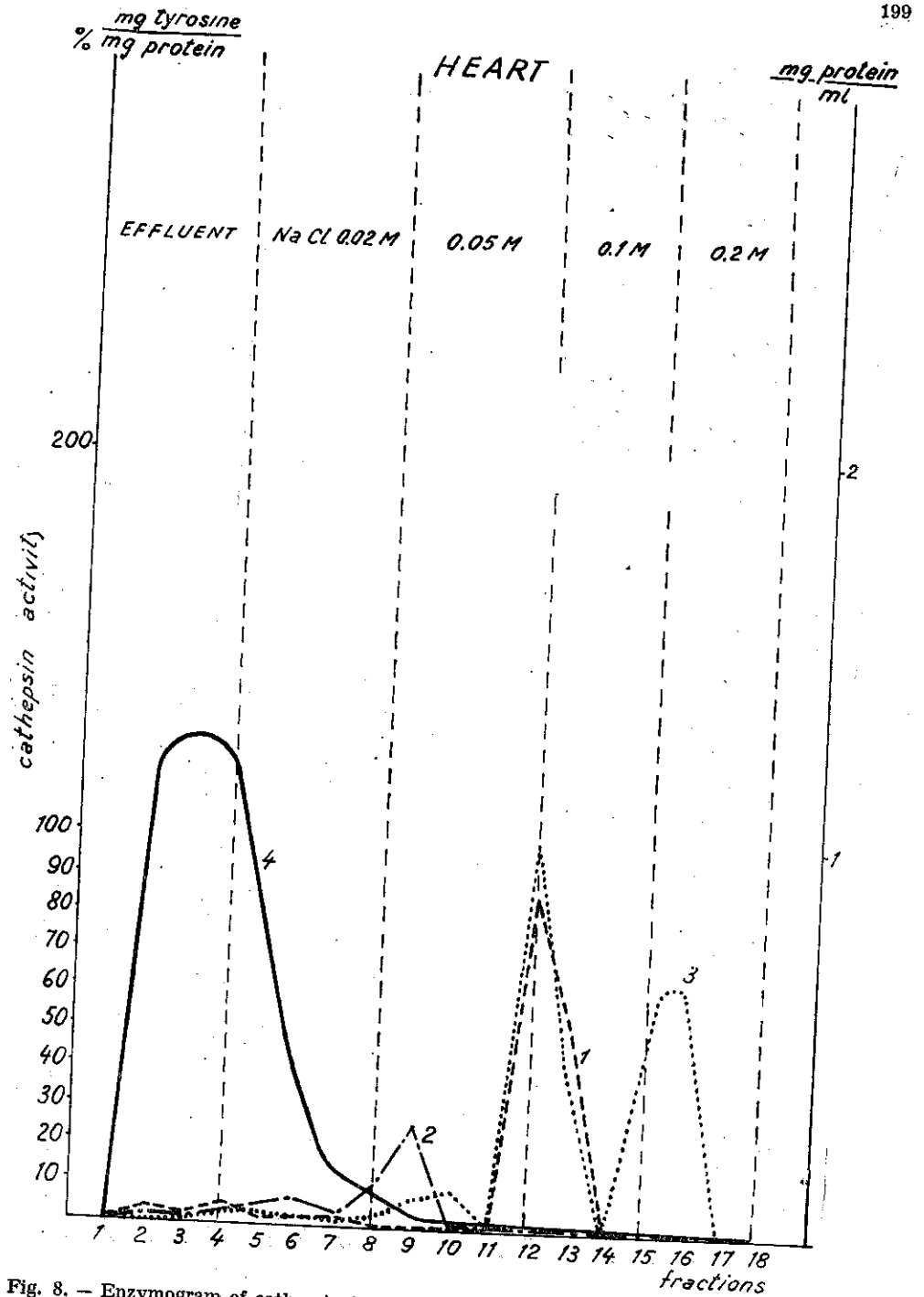


Fig. 8. — Enzymogram of cathepsin from swine heart. Curve 1. Basna breed. Curve 2. Large White breed. Curve 3. Basna \times Large White hybrid. Curve 4. Proteinogram.

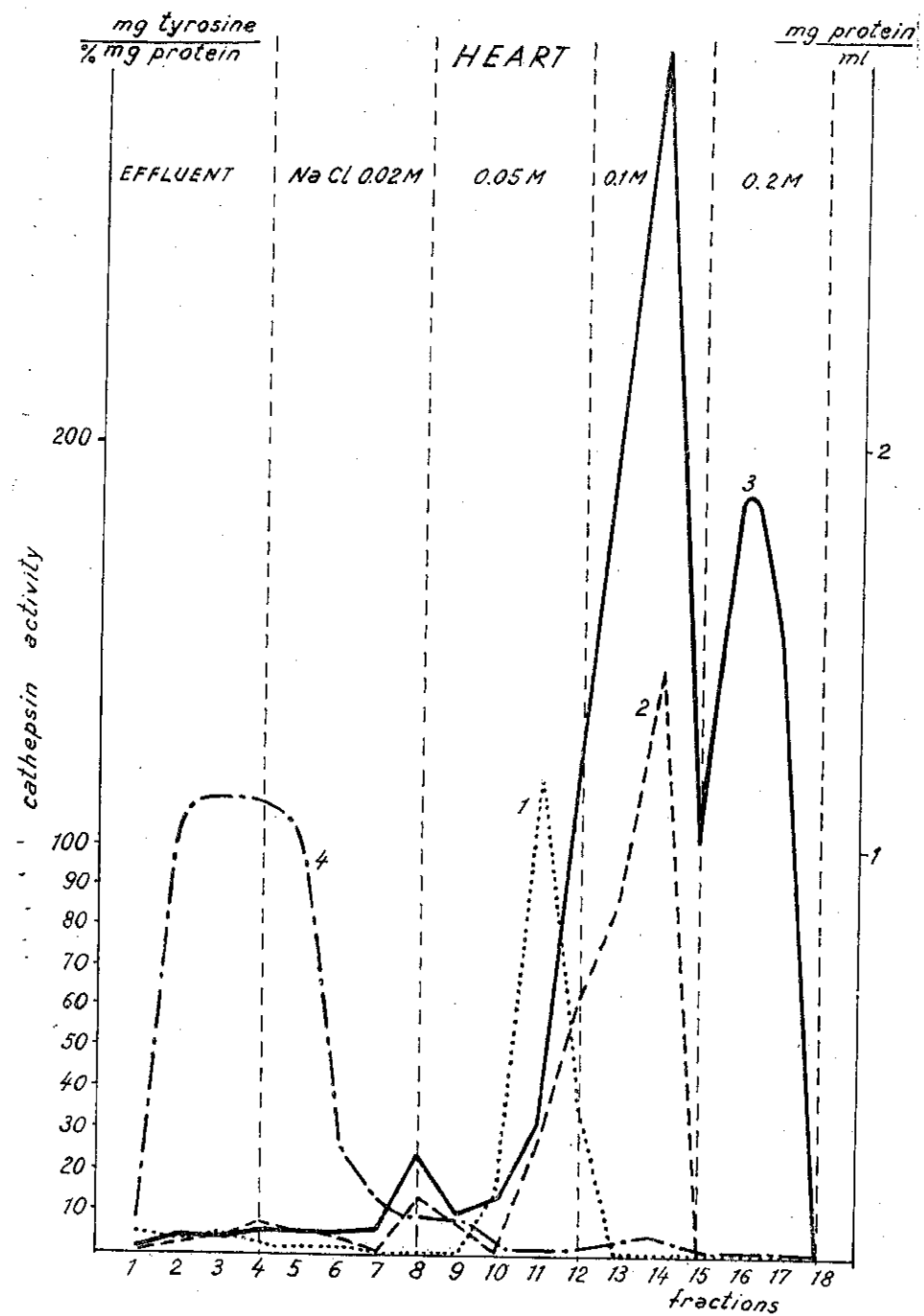


Fig. 9. — Enzymogram of cathepsin from swine heart. Curve 1. Basna breed. Curve 2. Mangalitz breed. Curve 3. Basna × Mangalitz hybrid. 4. Proteinogram.

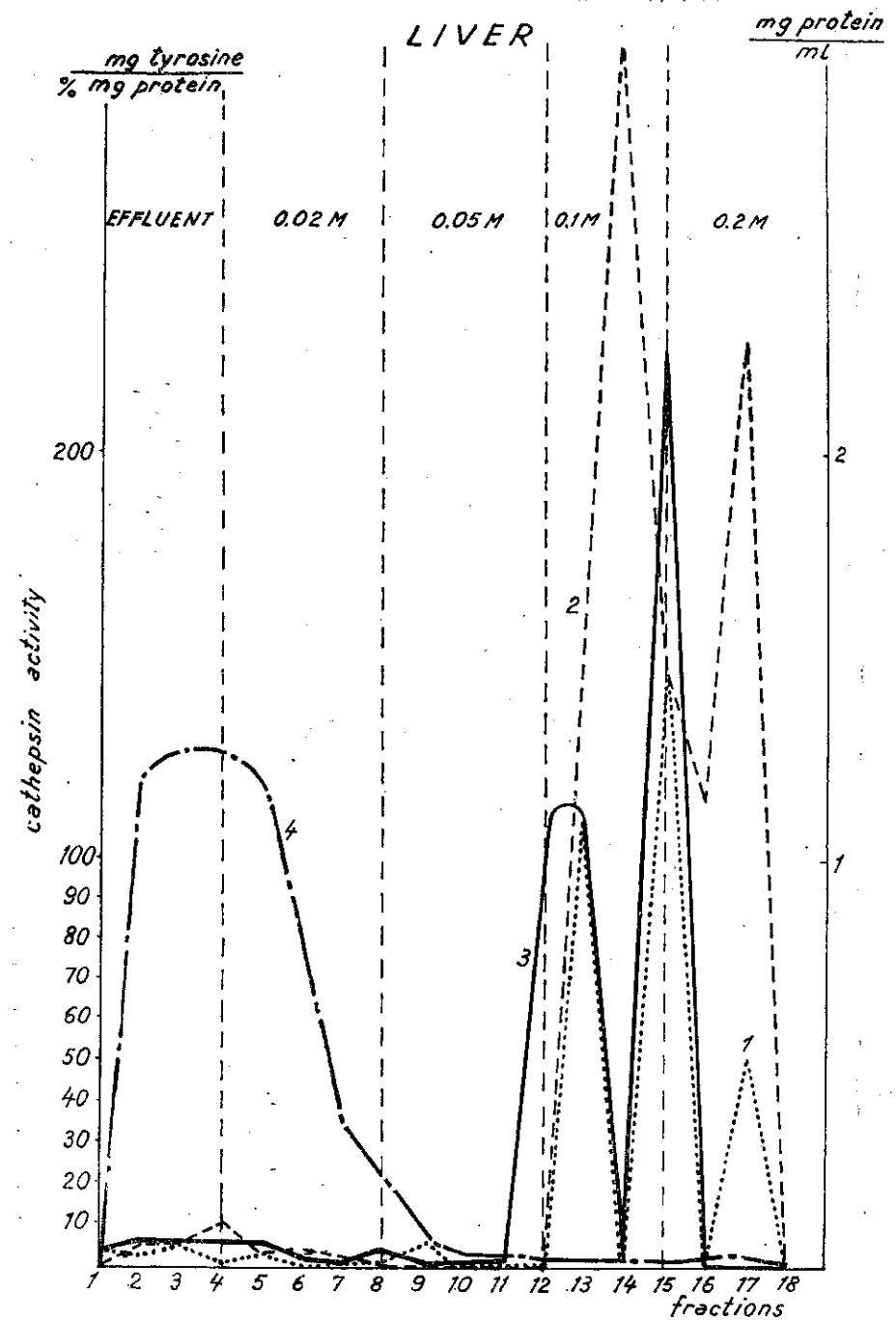


Fig. 10. — Enzymogram of cathepsin from swine liver. Curve 1. Basna breed. Curve 2. Large White breed. Curve 3. Basna × Mangalitz hybrid. Curve 4. Proteinogram.

of their molecular weight, signal a slowing down of the intensity of protein metabolism.

Because the intensity of the protein metabolism is correlated with meat, milk, eggs, wool production, it results that the enzymogram of the tissue proteinases can offer interesting criteria as to its level after inbreeding.

Researches as that described above could afford an efficient means to control and manage the operations of animal improving and selection. In our laboratory we have carried out such studies for a long time and we are convinced that the enzymogram of certain enzymes are an useful means in researches concerning the increase of animal productivity and for clearing up the biochemical mechanism of the inbreeding.

CONCLUSIONS

1. The enzymograms of the cow milk phosphatase (alkaline) are characteristic of different breeds. The effect of inbreeding on the enzymograms has been determined. It is correlated with productive qualities, namely with milk production as pointed out after inbreeding some Romanian breeds with the Holstein breed.

2. The modification of the tissue cathepsin by inbreeding has been proved in some species. The results obtained show that this operation modifies the intensity of protein metabolism in different organs.

3. The study of the enzymogram pattern and its modification could serve to control and manage inbreeding efficiency and its intimate mechanism.

REFERENCES

1. ANSON M. L., J. Gen. Physiol., 1938, **22**, 1, 79.
2. BURUIANĂ M. L., LERCH MARTHA, Lucr. Științ. IANB, Ser. C, 1966, **9**, 529.
3. —, Naturwiss., 1967, **54**, 4, 92.
4. —, Lucr. Științ. IANB, Ser. C, 1968, **11**, 229.
5. BURUIANĂ M. L., DEMA ANCA, *L'activité de la 5-Nucléotidase du liquide séminal du taureau et sa fertilité*, VI^e Congrès Intern. Reprod. Anim. Insém. Artif. Paris, 1968, **2**, 1225.
6. BURUIANĂ M. L., MARIN MARGARETA, *Le lait*, Paris, 1969, p. 481—482.
7. BURUIANĂ M. L., DEMA ANCA, Lucr. Științ. IANB, Ser. C, 1969, **12**.
8. —, Rev. Roum. Biochim., 1969, **6**, 4, 275—282.
9. KING E. J., ARMSTRONG A. R. A., J. Canad. Med. Assoc., 1934, **31**, 376.
10. MILLER G. L., Anal. Chem., 1959, **31**, 964.

Received September 10, 1969

Faculty of Zootechnics,
Department of Biochemistry
Bucharest, Splaiul Independentei 105

CORRÉLATIONS ENTRE LE CARYOTYPE ET LE ZYMOGRAMME DE LA DÉSHYDROGÉNASE LACTIQUE DANS LA TUMEUR GUÉRIN T₈ *

PAR

LILIANA GEORGIAN

Methods of study are described from the cytogenetic viewpoint of the solid and ascitic variants of the Guérin T₈ tumour, as well as the results obtained. On stress the specific nature of change of karyotype in ascitic cells as a result of selective competition, the resulting clones being those best adapted to a liquid medium.

In the same manner, electrophoretic analysis of lactate dehydrogenase of solid and ascitic forms of Guérin T₈ tumour showed one characteristic type in each of the forms.

En 1966, Rivenzon et coll. [18] ont décrit une méthode nouvelle pour obtenir des métastases à partir de l'épithéliome Guérin T₈ du rat en injectant dans le testicule une suspension cellulaire de cette tumeur. A l'endroit même de l'injection se développe une tumeur produisant des métastases dans les ganglions paraaortiques et rénaux, ainsi qu'une ascite. L'étude cytogénétique comparée montre dans la tumeur primitive et dans les métastases solides une garniture chromosomique très semblable, tandis que dans les formes ascitiques la constitution chromosomique est différente. Cet aspect semble dû à un processus sélectif au sein de la population cellulaire tumorale initiale [4].

Pour vérifier cette supposition, basée uniquement sur l'aspect chromosomique, nous avons cherché l'apparition, dans les trois formes de la tumeur, d'un marqueur biochimique, la déshydrogénase lactique [5].

* Article offert en hommage à M. le Professeur N. Teodoreanu pour son 80^e anniversaire

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le liquide ascitique pour l'étude cytogénétique provient de rats Wistar-London inoculés 15 jours auparavant par voie péritonéale. Les tumeurs solides sont des tumeurs primitives (greffées sous la peau ou inoculées dans le testicule) et des métastases récoltées le 25^e jour.

La colchicine, en solution de 0,02 g.p. 100 est administrée par voie péritonéale à la dose de 5 µg par gramme corps. Deux heures plus tard, on recueille 5 ml de liquide d'ascite que l'on centrifuge (150 g) pendant 10 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans 50 ml, d'eau de source et, après un fort barbotage, il est tenu, en vue de réaliser l'hypotonie, à 37°C pendant 35 minutes.

On fixe ensuite dans le mélange méthanol-acide acétique 3/1 pendant 30 minutes, à 4°C, en renouvelant 4 fois le fixateur.

Les lames sur lesquelles on étale la solution fixatrice contenant les cellules, sont séchées à la flamme et colorées au Giemsa.

Pour l'étude chromosomique des tumeurs Guérin T₈ solides, après un traitement identique à la colchicine, nous avons procédé à la dispersion des cellules. L'hypotonie, les fixations, la préparation des lames et leur coloration ont été les mêmes que pour les ascites.

On a utilisé comme témoins 26 caryotypes de rats Wistar normaux.

En total on a analysé 367 métaphases dont 175 appartenant aux 4 ascites, 99 à 2 métastases pararénales, 63 à 2 tumeurs intratesticulaires et 30 à la métastase inguinale. Pour faciliter l'étude, les chromosomes ont été arrangés d'après les critères morphologiques: télacentriques, subtélacentriques, submétacentriques, métacentriques.

Pour l'analyse électrophorétique de la déshydrogénase lactique (LDH), le matériel utilisé provenait de 20 tumeurs, primaires ou métastases solides et ascites développées sur des rats Wistar mâles.

La méthode utilisée a été celle de l'électrophorèse dans un gel d'agar à 0,6 p. 100, sur des lames en verre de 76-26 mm, avec tampon véronal sodique à pH 8,4, à force ionique 0,1, temps de migration de 90 minutes à 280 V et 3,6 mA par lame, à des températures comprises entre + 4 et + 10°C.

Comme révélateur des bandes d'isozymes nous avons choisi la solution de lactate de sodium, dipyrindine nucléotide (DPN) et Nitro Blue Tetrazolium (NBT).

Les courbes d'extinction ont été obtenues par un intégrateur ERI 10.

Nous avons utilisé comme témoin l'aspect de l'électrophorèse de l'LDH dans l'épiderme du rat.

RÉSULTATS

Aucune des cellules étudiées, tant dans les ascites que dans les tumeurs solides n'ont de caryotype diploïde, même si le nombre des chromosomes est identique au nombre modal de l'espèce.

La répartition par groupes de fréquence ainsi que l'analyse morphologique des chromosomes révèlent des différences entre les ascites et les tumeurs Guérin T₈ solides, concernant leurs « stem-lines ».

Au contraire, la « stem-line » des tumeurs solides, primitives ou métastatiques, est sensiblement identique, comprenant 58-64 chromosomes.

Dans les ascites, on observe l'existence d'une « stem-line » principale avec 40-50 chromosomes et d'une autre, beaucoup moins fréquente, de 80-100 chromosomes. De même on observe l'existence de deux classes modales, l'une de 42-44 chromosomes et l'autre de 82-82 chromosomes.

La différence la plus facile à déceler entre la forme solide et la forme ascitique de la tumeur Guérin T₈ est l'existence des chromosomes marqués, à savoir: pour les tumeurs solides, un gros chromosome submétacentrique présent dans 68 p. 100 des cellules et pour l'ascite un chromosome subtélacentrique de grande taille présent dans 63 p. 100 des cellules. Ces deux chromosomes sont absolument spécifiques pour les formes, solide et ascitique, de la tumeur Guérin T₈ et n'ont jamais trouvés l'un à la place de l'autre.

Nous avons cherché aussi le comportement électrophorétique de la LDH dans la tumeur Guérin T₈, dans les métastases solides tout comme dans la forme ascitique, en tant qu'indicateur de la constitution génétique des trois formes tumorales.

Le type électrophorétique de la déshydrogénase lactique (LDH) de l'épiderme normale de rat (témoin) présente les cinq bandes caractéristiques des cinq isozymes connus, dont deux bandes disposées à l'anode, deux à la cathode et une au niveau d'origine. Les bandes sont numérotées selon la nomenclature européenne [20], avec LDH₁ à l'anode jusqu'à LDH₅, comme dernière bande cathodique.

Le type LDH pour les tissus tumoraux solides, des tumeurs primaires et des tumeurs métastatiques, présente la fraction LDH₅ cathodique fortement exprimée par rapport aux autres bandes.

Les bandes LDH₂, LDH₃, et LDH₄ sont plus basses en comparaison des fractions correspondantes de type normal, et la bande LDH₁ anodique est absente.

L'électrophorèse des extraits des cellules ascitiques présente aussi des modifications par rapport au témoin, mais différentes de celles observées dans les tumeurs solides, primaires ou métastatiques. La fraction anodique LDH₁ est également absente, mais la bande la plus apparente n'est plus LDH₅, comme dans les tumeurs solides, mais LDH₄, supérieure à la fraction correspondante du témoin.

La bande cathodique LDH₅ est plus basse en rapport avec la même bande des tumeurs solides et des témoins. Une certaine réduction concerne également la bande LDH₂, mais en comparaison des mêmes bandes des tumeurs solides, cette fraction est élevée. Les bandes LDH₃ et LDH₄ sont les plus grandes dans le type ascitique en comparaison du tissu normal et des tumeurs solides.

On constate certaines différences entre le type de LDH normal et celui appartenant aux extraits de tissu tumoral. En effet la LDH de tumeur solide, primaire du métastatique, présente un modèle très rapproché, presque identique, tandis que la LDH de l'extrait ascitique présente des caractéristiques différentes aussi bien du type normal, que du type des tumeurs solides, différence qui réside dans la présence des bandes LDH₃ et LDH₄ plus fortement exprimées en comparaison des autres modèles et de la bande LDH₅ beaucoup plus basse en rapport avec le témoin et avec les tumeurs solides.

DISCUSSIONS

On observe des différences cytogénétiques entre les formes solides et ascitiques de la tumeur Guérin T₈. En raison des divers milieux (entou-

rage serré des cellules adjacentes dans la tumeur solide, et milieu liquide des cellules ascitiques) les cellules en cause sont caractérisées par des structures génétiques différentes.

Il semble que la « stem-line » des formes tumorales ascitiques et solides constitue le résultat de l'action sélective du milieu pour le maintien des divers types cellulaires. L'existence, dans les formes solides et ascitiques de la même tumeur, des structures cytogénétiques différentes a été aussi mise en évidence par Brillant et coll. [3].

La correspondance entre l'état biologique et la structure génétique explique pour Brillant l'aspect cytogénétique non identique des formes solides et ascitiques de la même tumeur.

Mais c'est l'hétérogénéité cytogénétique des cellules tumorales décrite par Ishihara [10] dans les épanchements tumoraux humains, par Levan et Biesele [13] et par Ford [7] dans les tumeurs ascitiques des rats et des souris, qui offre le plus riche matériel de sélection. Il est probable que la compétition pour le maintien des caractères cytogénétiques les plus favorables, décrite comme un phénomène inhérent à la croissance tumorale, par Hauschka et Levan [9], s'est produite également dans le cas de l'ascite Guérin T₈, en déterminant l'établissement des « stem-lines » prédominantes.

L'étude cytogénétique comparative des formes solides et ascitiques de l'épithéliome Guérin T₈ montre l'existence d'une constitution cytogénétique différente, considérée comme le résultat d'un processus de sélection au sein de la population cellulaire tumorale initiale.

La traduction biochimique de cette différence cytogénétique serait donc un type nouveau de migration électrophorétique de la LDH.

La déshydrogénase lactique a attiré l'attention des biochimistes oncologistes parce que cette enzyme participe aux phénomènes de la glycolyse anaérobie. La majorité des auteurs constate l'augmentation de l'enzyme dans les tumeurs, celle-ci dépassant 19 fois en poids sa valeur par rapport à l'unité de protéine des tissus normaux [6].

L'aspect de la migration électrophorétique de la LDH dans les cancers bronchiques [12], du col utérin [15], dans ceux induits par le béryllium [17] et dans le sarcome J [2] montre que l'augmentation porte surtout sur les isozymes cathodiques. Ce même aspect a été constaté dans les tumeurs solides Guérin T₈.

En comparant les valeurs trouvées pour les isozymes cathodiques LDH₄ et LDH₅, le rapport entre les subunités polypeptidiques est de 1H/3M et respectivement 0H/4M. On peut supposer que dans les tumeurs il y a une synthèse préférentielle de la subunité M, donc une activité accrue des gènes responsables avec la synthèse de cette protéine (on sait que les deux chaînes polypeptidiques, H et M, qui constituent le tétramère de l'enzyme, sont produits par deux gènes structuraux différents) [1], [19].

Les tumeurs solides étudiées, tant primaires que métastatiques, présentent une augmentation très marquée de LDH₅, ce qui indique une synthèse très active des polypeptides M et une tendance marquée à la polymérisation, en tétramères, des chaînes formées.

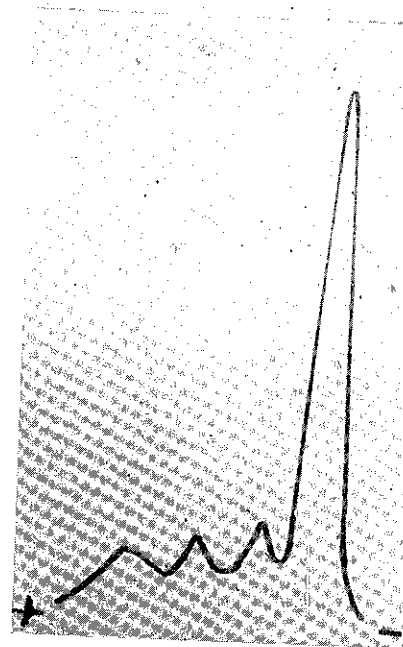
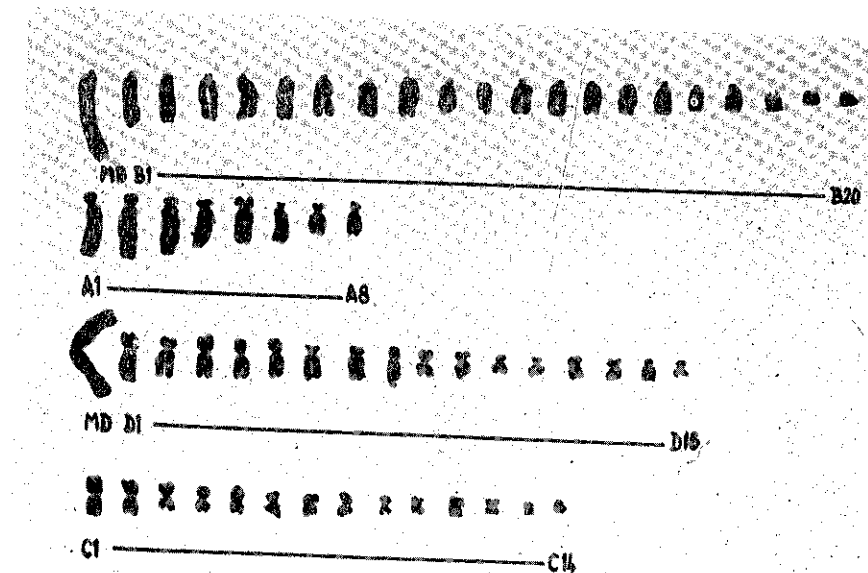


Fig. 1. Tumeur solide : type de migration électrophorétique de LDH et caryotype à chromosome marqueur légèrement sub-métacentrique.

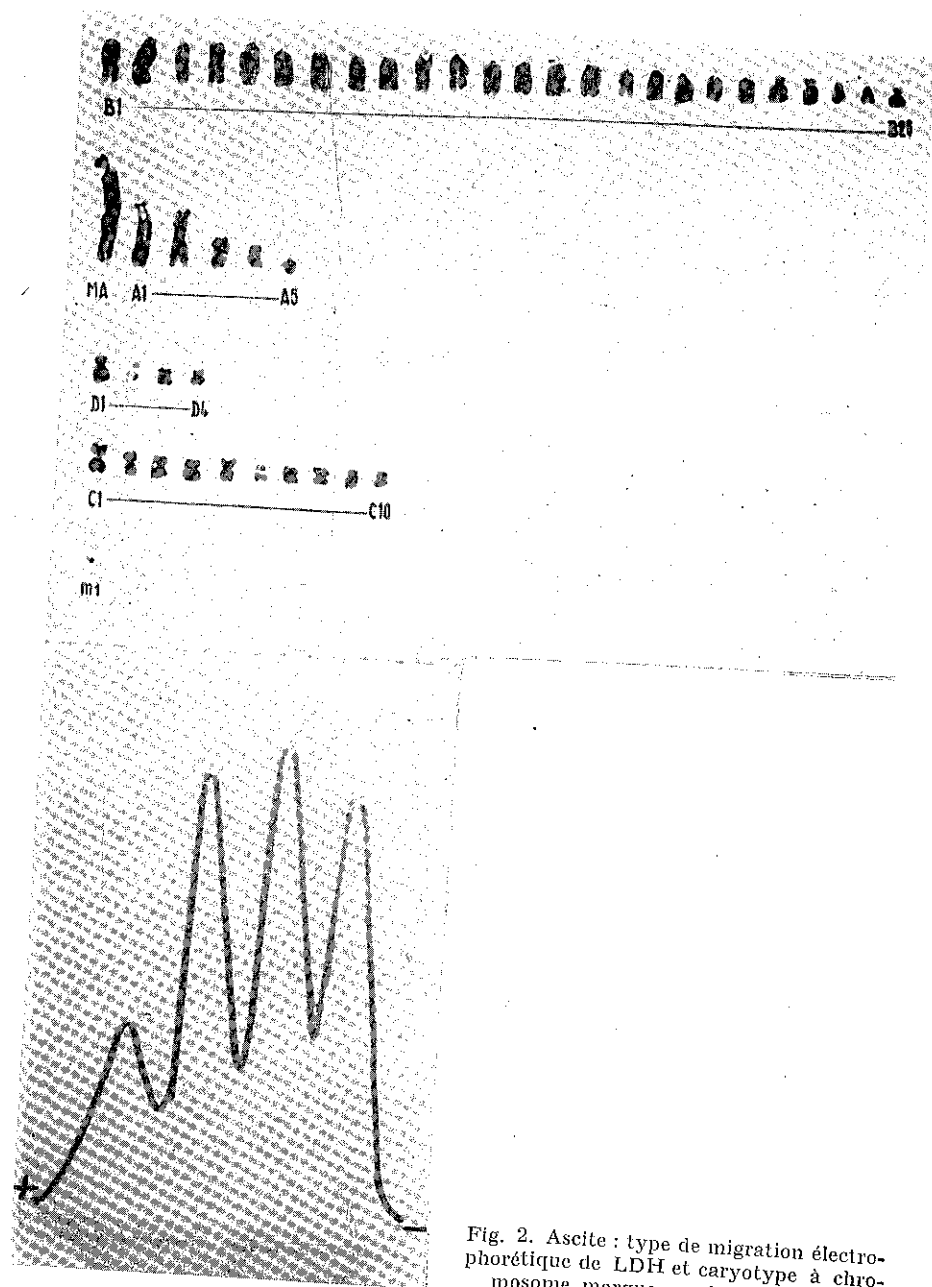


Fig. 2. Ascite : type de migration électrophorétique de LDH et caryotype à chromosome marqueur subtélocentrique.

L'absence totale de LDH₁ et les valeurs très basses des LDH₂, LDH₃ et LDH₄, semblent montrer une synthèse très diminuée du polypeptide H. De même, il semble que toute la quantité du polypeptide H synthétisée concerne les isozymes LDH₂, LDH₃ et LDH₄, fait dû, probablement, à l'affinité plus grande des subunités H pour les subunités M que pour un polypeptide de même espèce. C'est ce que semble confirmer les valeurs décroissantes des LDH₄, LDH₃ et LDH₂.

En ce qui concerne l'identité du type de migration électrophorétique de l'enzyme étudiée, tant dans les métastases solides que dans les tumeurs primaires, le phénomène ressemble à ce qu'on a trouvé dans la production des métastases par injections intraveineuses d'une suspension cellulaire provenant du sarcome de Yoshida [11].

Les isozymes LDH des cellules de l'ascite Guérin T₈ ont une répartition électrophorétique différente tant par rapport au témoin, qu'en rapport avec les tumeurs solides, primaires ou non. Dans les cellules ascitiques, la LDH₅ a une valeur plus basse que chez le témoin et la LDH₁ est complètement absente. En revanche, les LDH₃ et LDH₄ ont des valeurs plus grandes que chez les témoins. On peut supposer donc que, sans qu'il y ait un déficit marqué de la synthèse d'une des subunités, la capacité des polypeptides M à former des homopolymères est beaucoup plus petite que l'affinité réciproque des subunités de type différent. Il se peut que là encore il y ait une synthèse plus basse des subunités H, vu que la LDH₁ y fait complètement défaut.

A la constitution chromosomique différente s'ajoute donc un marqueur biochimique, qui distingue la forme solide de la tumeur Guérin T₈ de sa forme ascitique.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAUR E. W. and PATTIE D. R., *Nature*, 1968, **218**, 341.
2. BETZ E. H. et LELIEVRE P., *G. R. Soc. Biol.*, 1967, **161**, 1152-1155.
3. BRILLANT M. et coll., *Bull. Ass. franç. Cancer*, 1965, **52**, 105-115.
4. CIRNU L. et RIVENZON A., *Bull. Cancer*, 1968, **55**, 151-158.
5. CIRNU L. et coll., *Bull. Cancer*, 1968, **55**, 517-524.
6. DIAMANT B. and GLICK D., *J. Histochem. Cytochem.*, 1967, **15**, 695-701.
7. FORD E. C. et coll., *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1958, **1**, suppl. 1, 253-269.
8. HANSEN-MELANDER E., *Hereditas*, 1958, **44**, 471-487.
9. HAUSCHKA S. T. and LEVAN A., *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1958, **21**, 77-111.
10. ISHIHARA T. and SANDBERG A. A., *Cancer*, 1963, **16**, 885-895.
11. KISHINO I., *J. Med. Biol.*, 1966, **72**, 346-349.
12. LANGVAD E., *Europ. J. Cancer*, 1968, **4**, 107-115.
13. LEVAN A. and BIESELE J. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, **71**, 613-629.
14. LEVAN A., *Exptl. Cell. Res.*, 1956, **11**, 613-629.
15. OKABE K. et coll., *Biochemistry*, 1968, **7**, 79-90.
16. POGOSIANTZ E. et coll., *Vop. Oncol.*, 1962, **8**, 21-36.
17. REEVES A. L., *Cancer Res.*, 1968, **27**, 1895-1899.
18. RIVENZON A. et coll., *Bull. Cancer*, 1968, **55**, 159-166.
19. THOMPSON J. S. and THOMPSON M. W., *Genetics in Medicine*, W. B. Saunders edit., Philadelphia, London, 1966.
20. WIEME R. J., *Lancet*, 1962, **1**, 7223.

Reçu le 10 septembre 1969.

Institut de Pathologie et Génétique
« Dr. V. Babeş »
Laboratoire de Cytogénétique

AVIS AUX AUTEURS

La «Revue Roumaine de Biologie – Série de Zoologie» publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique de tous les domaines de la biologie animale : morphologie, physiologie, génétique, écologie, taxonomie, etc. Les sommaires des revues sont complétés par d'autres rubriques comme : 1. La vie scientifique, qui traite des manifestations scientifiques du domaine de la biologie : symposiums, conseils, etc. 2. Comptes rendus des travaux de spécialité parus en Roumanie.

Les auteurs sont priés d'envoyer leurs articles, notes et comptes rendus dactylographiés à double intervalle (31 lignes par page), en quatre exemplaires.

Les tableaux et l'explication des figures seront dactylographiés sur pages séparées et les diagrammes exécutés à l'encre de Chine noire, sur du papier calque.

Les tableaux et les illustrations seront numérotés avec des chiffres arabes. La répétition des mêmes données dans le texte, les tableaux et les graphiques sera évitée. Les références bibliographiques citées par ordre alphabétique des auteurs comporteront le nom de l'auteur, l'initiale, le titre de la revue, abrégé, conformément aux usances internationales, l'année, le tome, le numéro, la page. Les travaux seront accompagnés d'un court résumé, de maximum 10 lignes. Les textes des travaux ne doivent pas dépasser 15 pages dactylographiées (y compris les tableaux, la bibliographie et l'explication des figures).

Les auteurs ont droit à 50 tirés à part gratuits.

La responsabilité concernant le contenu des articles revient exclusivement aux auteurs.

La correspondance relative aux manuscrits, à l'échange de publications, etc. sera adressée au Comité de rédaction, 296, Splaiul Independenței, Bucarest.

PRINTED IN ROMANIA

AVIS AUX AUTEURS

La «Revue Roumaine de Biologie — Série de Zoologie» publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique de tous les domaines de la biologie animale: morphologie, physiologie, génétique, écologie, taxonomie, etc. Les sommaires des revues sont complétés par d'autres rubriques comme: 1. La vie scientifique, qui traite des manifestations scientifiques du domaine de la biologie: symposiums, conseils, etc. 2. Comptes rendus des travaux de spécialité parus en Roumanie.

Les auteurs sont priés d'envoyer leurs articles, notes et comptes rendus dactylographiés à double intervalle (31 lignes par page), en quatre exemplaires.

Les tableaux et l'explication des figures seront dactylographiés sur pages séparées et les diagrammes exécutés à l'encre de Chine noire, sur du papier calque.

Les tableaux et les illustrations seront numérotés avec des chiffres arabes. La répétition des mêmes données dans le texte, les tableaux et les graphiques sera évitée. Les références bibliographiques citées par ordre alphabétique des auteurs comporteront le nom de l'auteur, l'initiale, le titre de la revue, abrégé, conformément aux usances internationales, l'année, le tome, le numéro, la page. Les travaux seront accompagnés d'un court résumé, de maximum 10 lignes. Les textes des travaux ne doivent pas dépasser 15 pages dactylographiées (y compris les tableaux, la bibliographie et l'explication des figures).

Les auteurs ont droit à 50 tirés à part gratuits.

La responsabilité concernant le contenu des articles revient exclusivement aux auteurs.

La correspondance relative aux manuscrits, à l'échange de publications, etc. sera adressée au Comité de rédaction, 296, Splaiul Independenței, Bucarest.

PRINTED IN ROMANIA