

Biol. Ser. 2

COMITETUL DE REDACTIE

Director :

Academician MIHAI BĂCESCU

Redactor șef :

PETRE-MIHAI BĂNĂRESCU, membru corespondent

Redactor șef adjunct :

Academician NICOLAE SIMIONESCU

Membri :

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

Revista apare de 2 ori pe an

În țară, abonamentele se primesc la oficile poștale. Comenzile din străinătate se primesc la ORION SRL, Splaiul Independenței nr. 202 A, București 6, România, P.O. Box 74-19 București, Tx 11939 CET X R, Fax (40), 13122425.

Manuscrisele se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei, iar cărțile și revistele pentru schimb pe adresa Institutului de biologie, 7965 București, Splaiul Independenței nr. 296.

EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE  
Calea Victoriei 125  
R-79717 București 22  
telefon 650 76 80

ADRESA REDACȚIEI  
Calea Victoriei 125  
R-79717 București 22  
telefon 650 76 80

# Studii și cercetări de BIOLOGIE

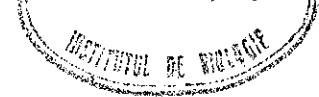
## SERIA BIOLOGIE ANIMALĂ

24/53

TOMUL 45, NR. 2

iulie-decembrie 1993

\* BIBLIOTECĂ \*



### SUMAR

VICTORIA TATOILE, Cercetări asupra genului <i>Bryophaenocladius</i> Thienemann (adulți în România) . . . . .	75
MARIA COCIU, Diptere <i>Scatophagidae</i> din Moldova de Nord . . . . .	81
LILIANA VASILIU-OROMULU, <i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande, 1895) (Insecta: Ordinul <i>Thysanoptera</i> ), un nou dăunător în serele din România . . . . .	87
FELICIA BULIMAR, MARINA HUTU și MAGDA CĂLUGĂR, Mezofauna edafică indicatoare a stării funcționale a solurilor forestiere . . . . .	93
LOTUS MEŞTER, Exocitoza vacuoelor corticale din ovocitele fecundate ale unui teleostean de apă dulce <i>Ictalurus niger</i> (Fam. <i>Catostomidae</i> ) . . . . .	99
OTILIA ZĂRNESCU, ANCA OANCEA, LUCIA MOLDOVAN și ST. MANTEA, Studiu privind rolul condroitin sulfatului în inducerea reacției acrozomale la spermatozoizii de suine . . . . .	105
ANCA OANCEA, OTILIA ZĂRNESCU, LUCIA MOLDOVAN și MARIA CALOIANU, Distribuția glicozaminoglicaniilor în tractul reproducător femeii de stîne . . . . .	109
V.P. HEFCO, ANA OLARIU, I. NEACȘU și ANA ISAICUL, Căile prin care nucleul paraventricular hipotalamic (PVH) și zona hipotalamică medială simpatică afectează eritropoieză . . . . .	115
I. MADAR și NINA ŠILDAN, Atenuarea efectului hiperglicemiant, hipercolesterolemiant și tiomolitic al stresului prin glutamogluconat de magneziu (GGMg) la șobolanii tineri, de vîrstă diferite . . . . .	121
VIORICA VINTILĂ, RODICA GIURGEA și IOANA ROMÂN, Efecte <i>in vitro</i> ale unor fracțiuni de răsină de conifere asupra timocitelor de șobolan . . . . .	129
RODICA GIURGEA, MARTA GABOS și ROMA RADU, Efectele metioninei și tioureei asupra timusului, bursei lui Fabricius și tiroidei la puie de găină . . . . .	133
D. COPREAN, RODICA GIURGEA, DINA COPREAN, GABRIELA PINTILIE și V. MIHĂILĂ, Modificări metabolice cauzate de intoxicația cu alcool alilic și rolul hepatoprotector al tratamentului cu ulei de <i>Oenothera biennis</i> . . . . .	137
C. PUICĂ, RODICA GIURGEA și D. COPREAN, Efectele tratamentului cu pentoxifiolină asupra dezvoltării embrionare la șobolanul alb . . . . .	143
I. ST. BONTAŞ, Implicarea unor dehidrogenaze în metabolizarea metanolului la bacteria metilotrofă <i>Methylomonas</i> sp. M <sub>14.1</sub> . . . . .	147

St. cere. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 73-150, București, 1993

## CERCETĂRI ASUPRA GENULUI *BRYOPHAENOCLADIUS* THIENEMANN (ADULȚI) ÎN ROMÂNIA

VICTORIA TATOLE

Le présent travail apporte des données nouvelles sur les exemplaires adultes du genre *Bryophaenocladius* Theinemann, faiblement connu en Roumanie. Ainsi, 8 espèces mentionnées dans la liste de la famille *Chironomidae* sont présentées, dont les échantillons se trouvent dans les collections de l'Institut de Biologie de Bucarest.

În cadrul subfamiliei *Orthocladiinae* (Fam. *Chironomidae*) genul *Bryophaenocladius* se numără între cele mai bine reprezentate în specii. După Ase și Crainston, 1990, în palearctic sunt cunoscute 22 de specii în cadrul acestui gen. În România, după Cure (2), sunt semnalate 9 specii, dintre care două, *nigrus* și *pechinatus*, au fost descrise de către Albu în 1974 (1), în cadrul unei noi categorii taxonomicice distincte în cadrul genului *Bryophaenocladius*, subgenul *Odontocladius*. Deși invalidat, conform articolului 13 b al ICZN, existența subgenului nu se pare consistentă și vom reveni cu o argumentare în acest sens.

În această lucrare prezentăm diagnozele altor 8 specii ale genului *Bryophaenocladius* semnalate până în prezent în fauna României.

Diagnozele s-au elaborat pe baza materialului existent în colecția de *Chironomidae* a Institutului de Biologie al Academiei Române.

### *Bryophaenocladius flexidens* (Brundin, 1947)

Brundin, 1947 : Ark. Zool., 39 A (3) : 25 (*Chaetocladius*)

**Diagnoza** ♂ : capul maron-roșcat ; ochii reniformi ; peri pe vertex : post-orbitali și verticali interni ; palpus de culoare galbui, dimensiunile ( $\mu$ ) : 46, 100, 91, 136, peri pe palp mai puțin numeroși ; antenele maronii, AR = 1,47. Toracele maron deschis ; dungile mezonotale galbui ; pronotul, scutelul, gropița humerală mai închise ; pronotul despicate, dar sudat. Aripile bordate cu microtrihi și macrotrihi pe partea dorsală ; 2, 3 macrotrihi la baza aripii ; R<sub>1</sub> și R<sub>2+3</sub> evidente ; r-m înaintea lui fCu ; lobul anal dreptunghiular, rotunjit, apoi ușor excavat : sevama bordată cu macrotrihi. Picioarele maron deschis ; ta<sub>4</sub> mai mare ca ta<sub>5</sub> ; LR (I) = 0,67 ; LR (II) = 0,47 ; LR (III) = 0,56. Abdomenul maro ; cu peri răspândiți dezordonat ; hipopigiu (planșa I) prezintă vârf anal ; bazistilul simplu, dreptunghiular ; mai puțin impozant dististilul ; apendicele bazistilului slab reprezentat.

**Răspândire** : Europa. (Austria, Spania, Franța, Marea Britanie, Suedia, Finlanda. În România : Masivul Retezat (Gura Zlata).

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 75—80, București, 1993.

*Bryophaenocladius ictericus* (Meigen, 1830)

Meigen, 1830 : Syst. Beschr., 6 : 253 (*Chironomus*)

**Sin.** : *bipunctuellus* (Zetterstedt, 1850) : Dipt. Scand., 9 : 3545 (*Chironomus*)  
*pertenuis* (Walker, 1856) : Ins. Brit., Dipt., 3 : 182 (*Chironomus*)  
*ochraceus* (Goetghebuer, 1921) : Mém. Mus. r. Hist. nat. Belg.,  
31 : 84 (*Dactylocladius*)

**Diagnoza ♂ :** capul gălbui deschis : ochii reniformi, glabri ; peri pe vertex : postorbitali și verticali externi ; palpul gălbui deschis, din 4 articole, dimensiunile ( $\mu$ ) : 32, 69, 82, 95. Toracele maron deschis ; dungile mezo-notale și scutelul mult mai deschise la culoare. Aripa cu nervuri bine conturate, cu bordură de peri ; peri și pe R ; C și toate nervurile R evidente, dar  $R^4 + ^5$  cea mai bine conturată ; r — m înaintea lui fCu, dar nu la mare distanță de aceasta ; Cu<sub>2</sub> ușor înclinată ; An se termină mult după fCu ; lobul anal, obtuz ; scvama cu 5 peri ; lungimea (mm) : 214 (cu scvamă) 187 (până la arculus). Abdomenul maron deschis, chiar gălbui ; peri răspândiți dezordonat, mai numeroși pe segmentele ultime ; hipopigiu (planșa I b) cu vârf anal rotunjit ; bazistilul bine dezvoltat, rotunjit ; apendicele bazistilului nu foarte dezvoltat ; dististolul mic, cu un spin foarte puternic și 4 peri ; peri pe toată suprafața, dar și pe marginea internă a bazistilului cu o pilozitate uniformă.

**Biologie:** în litoralul apelor de munte reci.

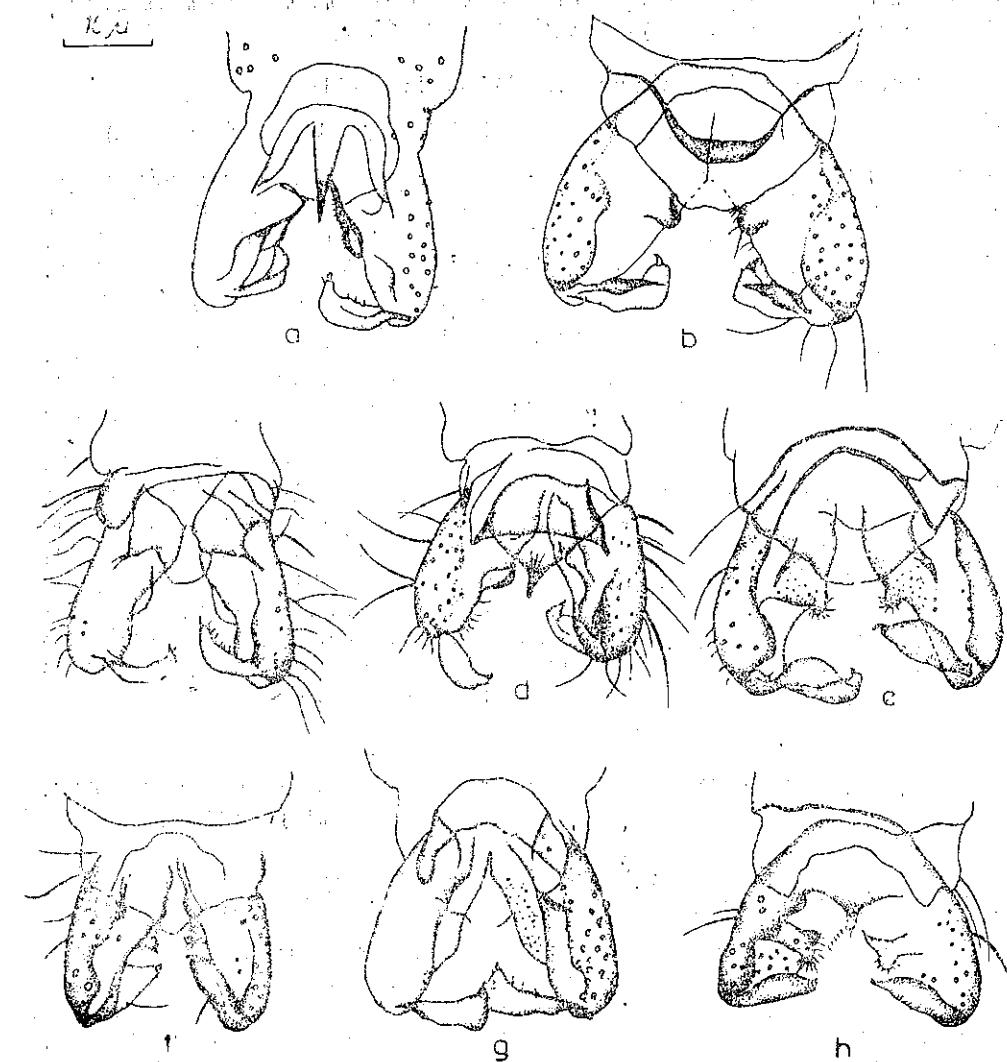
Răspândire : Europa (Austria, Belgia; Germania, Suedia, Finlanda, Jugoslavia. În România : Masivul Retezat (Gura Zlata).

*Bryonphaenocladius inconstans* (Brundin, 1947)

Brundin 1947 : Ark. Zool. 39A(3) : 28 (*Eudactylocladius*).

**Diagnoza ♂:** capul negru, întunecat; peri pe vertex, în spatele ochilor laterali; palp întunecat cu microtrihi și macrotrihi; din 4 articole, dimensiunile ( $\mu$ ): 56, 93, 74, 102, 3; antena din 14 articole, scapa, brună, neagră, flagelul și panașul, brune deschis. AR = 1,38. Toracele negru, cu excepția spațiilor dintre dungile mezonotale, care sunt mai palide; scutelul, total întunecat, haltere, negre-maro gălbui. Aripa cu microtrihi; lobul anal rotunjit, bont, neevidențiat;  $R_1$  cu un sir de peri;  $R_{2+3}$  proximal față de mijlocul dintre  $R_1$  și  $R_{4+5}$ ; C aproape o depășește; fCu mai distală în comparație cu r - m; An se termină cu puțin înainte de mijlocul lui Cu<sub>2</sub>; lungimea (mm): 167 (cu scvamă); 147 (până la arculus). Picioarele, brune-gălbui, cu peri lungi; ta<sub>4</sub> la P<sub>2</sub> și P<sub>1</sub> mai lungi decât ta<sub>5</sub>; LR (I) = 0,53; LR (II) = 0,39; LR (III) = 0,45. Abdomenul, maroniu; perii prezente, dar nu bine reprezentate, dispuși dezordonat; mai mult prezente pe tergitele VII, VIII și mai bogat reprezentate cei laterali; hipopigiu (plansa I e): tergitul anal cu peri mai numeroși și puternici; vârful anal foarte scurt și lat de formă discoidală; apendicele bazistilului foarte lat și el, rotunjit; dististilul efilat.

### **Bioologie : specie reofilă.**



*Planșa I.* — Aspectul hipopigiu lui la : a — *Bryphaenocladius flexidens* (Brundin); b — *Bryphaenocladius ictericus* (Meigen); c — *Bryphaenocladius inconstans* (Brundin); d — *Bryphaenocladius illimbatus* (Edwards); e — *Bryphaenocladius nidorum* (Edwards); f — *Bryphaenocladius scanicus* (Brundin); g — *Bryphaenocladius subvernalis* (Edwards); h — *Bryphaenocladius tuberculatus* (Edwards).

**Răspândire :** Europa (Suedia și Danemarea). În România: numai ca adult; de pe Valea Oltului și Ieșenița (Porțile de Fier).

*Bryophaenocladius illimbatus* (Edwards, 1929)

Edwards, 1929: Trans. R. ent. Soc. Lond., 77: 343 (*Spaniotoma*)

**Diagnoza ♂:** capul brun, întunecat, ochii nepăroși; peri pe vertex: pe linia mediană, în spatele ochilor, latero-dorsali 4–6 peri; palpul din 4 segmente, cu microtrihi, cu macrotrihi, în special pe segmentele bazale; dimensiunile ( $\mu$ ): 69–75; 88–94; 75–82; 95; antena din 14 articole; scapa maro-negricioasă; flagelul și panașul maron-gălbui; AR = 1,52. Toracele maron-inchis, cu excepția dungilor mezonotale care sunt mai pale; scutelul, către gălbui; haltere, gri; pronotul divizat median; peri distribuți neuniformi. Aripa, culoare gri, fără aspect lăptos, punctată, cu microtrihi; lobul anal foarte puțin dezvoltat, ușor rotunjit; C evidentă;  $R_{4+5}$  aproape dreaptă și se sfârșește înaintea  $Cu_1$ ; fCu numai cu puțin înaintea lui r-m care este scurtă și oblică;  $Cu_2$  înclinată de la jumătate; partea bazală a furcii strâmtă. An dreaptă și abia ajunge la fCu; lungimea (mm): 1,63 (cu scvamă) și respectiv 1,37 (până la areculus). Picioarele, maron-gălbui; cu peri lungi pe partea posterioară a tăi și ta<sub>4</sub> și ta<sub>5</sub> subegale; peste 2 × mai lungi ca late; empodium scurt; LR (I) = 0,53; LR (II) = 0,41; LR (III) = 0,55. Abdomenul brun; peri distribuți dezordonat; hipopigiu (planșa I d) maro-gălbui; vârful anal bine evidențiat, cu pilozitate fină la baza sa; bazistilul larg, rotunjit, puternic chitinizat și aproape gol; dististilul încovoiat, adus.

**Biologie:** larvele sunt reofile.

**Răspândire:** Europa (Marea Britanie, Spania). În România: Valea Cernei, Valea Oltului (Râul Vadului); Luđuş; Toplet (Caraș Severin).

*Bryophaenocladius nidorum* (Edwards, 1929)

Edwards, 1929: Trans. R. ent. Soc. Lond., 77: 342 (*Spaniotoma*)

**Diagnoza ♂:** cap brun întunecat, ochii nepăroși, reniformi, fără prelungiri dorsale; palpul din 4 articole, cu microtrihi și macrotrihi, preponderent pe segmentele bazale, dimensiunile ( $\mu$ ): 54–63; 132,3–138,6; 170,1–176,4; 144,9–151,2; peri pe vertex: macrotrihi postorbitali, reduși; antena din 14 articole, maron-deschis, gălbui, panașul și flagelul de aceeași culoare; scapa, maron inchis; AR = 1,5. Toracele, maron inchis, cu excepția dungilor mezonotale, care sunt mult mai pale; pronotul divizat median în doi lobi, care sunt reuniți printr-o sutură. Aripa gălbui, puternic transparentă, cu reflexe luminoase; cu pilozitate marginală; lobul anal bine evidențiat, rotunjit, fCu evidentă, poate puțin prea apropiată la bază, îngustă; r-m bine distanțată, înaintea lui fCu;  $R_1$  cu macrotrihi; C, R,  $R_1$  mult evidente față de celelalte, extrem de pale; lungimea (mm): 2,07 (cu scvamă); 1,82 (până la areculus). Picioarele, brune-gălbui, cu peri lungi pe partea posterioară; ta<sub>4</sub> și ta<sub>5</sub> subegale; empodium scurt: LR (I) = 0,59; LR (II) = 0,43; LR (III) = 0,61. Abdomenul galben-maroniu deschis; peri bine reprezentăți, distribuți, dezordonat; mult mai bogat reprezentați, cei lateralni. Hipopigiu (planșa I e) galben-

maroniu, luminos; vârful anal scurt, slab evidențiat; bazistilul, puternic dezvoltat, mai ales prin comparație cu dististilul; macrotrihi puternici, mai ales lateral; apendicele lobului basal bine evidențiat, cu o pilozitate marcantă; dististilul mult mai mic, subțire terminat cu un spin proeminent, însotit de un al II-lea mai mic și de macrotrihi.

**Biologie:** specie reofilă; în biodermă.

**Răspândire:** Europa (Germania, Marea Britanie). În România, după larvă: Porțile de Fier; Tismana (Jiu); după adult: Porțile de Fier.

*Bryophaenocladius scanicus* (Brundin, 1947)

Brundin, 1947: Ark. Zool., 39 A(3): 3 = (*Eudactylocladius*)

**Diagnoza ♂:** cap maron, dar nu întunecat; ochii nepăroși; peri postorbitali; palpul din 4 articole; dimensiunile ( $\mu$ ): 50,4; 138,6; 107; 157,5; antena din 14 articole; scapa brună, cu contur mai întunecat; flagelul și panașul maron-gălbui; AR = 1,27; 1,44. Toracele maron deschis, luminos, cu dungile mezonotale mai pale; scutelul gălbui; haltere maron. Aripa verzulie, tivită cu peri marginali; lobul anal bine dezvoltat, drept; scvama cu cca 11 macrotrihi; pe R cca 18 macrotrihi;  $R_{4+5}$  foarte evidentă, se termină aproape odată cu  $Cu_1$ ; r-m cu mult înainte de fCu; r.m evidentă și oblică; fCu strâmtă. An dreaptă, apoi, după fCu o însoteste paralel pe  $Cu_2$ , terminându-se cam la 1/2 acesteia; lungimea (mm): 165 (cu scvamă); 137 (până la areculus). Picioarele maron-gălbui, cu peri relativ lungi pe toate segmentele; ta<sub>4</sub> și ta<sub>5</sub>, subegale; empodium scurt; LR(I) = 0,59–0,61; LR(II) = 0,43–0,46; LR (III) = 0,57–0,59. Abdomenul maron-gălbui, luminos; peri distribuți dezordonatai, dar ceva mai adunați median pe tergitele VI, VII, VIII. Hipopigiu (planșa I f) maron-gălbui; vârful anal slab evidențiat; bazistilul puternic, aproape dreptunghiular; dististilul îngust și scurt în comparație cu bazistilul, ușor încovoiat.

**Biologie:** specie reofilă.

**Răspândire:** Europa (Suedia). În România: Valea Oltului; Ialomița; Porțile de Fier; Retezat.

*Bryophaenocladius subvernalis* (Edwards, 1929)

Edwards, 1929: Trans. R. ent. Soc. Lond., 77: 341 (*Spaniotoma*)

**Diagnoza ♂:** capul maron; ochii reniformi, mai înguști și mai întunecăți în jumătatea anterioară; peri pe vertex: postorbitali și verticali interni; palpul gălbui, din 4 articole, dimensiunile ( $\mu$ ): 37, 74, 112, 130, cu microtrihi și macrotrihi, preponderent pe articolele 1 și 2; antenele gălbui, scapa maron, panaș foarte bogat, AR = 1,5. Toracele maron deschis; dungile mezonotale și mai deschise; pronotul despicate; scutelul gălbui; gropița humerală gălbui-albicioasă. Aripile cu nervurile bine evidențiate; tivite cu peri marginali; macrotrihi pe marginea superioară și pe  $R_1$ ; C puternic evidentă;  $R_{2+3}$  atinge C la 1/3, cu care se atinge foarte mult; r-m aproape orizontală; fCu dincolo de r-m;  $Cu_2$  ușor înclinată; An depășește, dar nu cu prea mult fCu; lobul anal dreptunghiular, dar bine

rotunjit; macrotrihi bordează sevama; lungimea (mm); 1,94 (cu sevamă); 1,49 (până la arculus); halterele gălbui; Picioarele gălbui; cu microtrihi mulți; LR(I) = 0,54; LR(II) = 0,44; LR(III) = 0,39. Abdomenul maron deschis; peri distribuți dezordonatați; hipopigiu (plansa I g). cu vârf anal lung; bazistilul aproape dreptunghiular cu macrotrihi puternici; dististilul în raport cu bazistilul foarte subțire, mai dilatat la mijloc, de asemenea cu macrotrihi.

**Biologie:** specie fitofilă; în bioderma și plantele acvatice ale apelor.

**Răspândire:** Europa (Franța, Marea Britanie, Irlanda). În România: Jiul de Vest (Livezeni), Olteț (în defileu), după larvă; Sinaia, Relezat, după adult.

#### *Bryophaenocladius tuberculatus* (Edwards, 1929)

Edwards, 1929: Trans. R. ent. Soc. Lond., 77: 341 (*Spaniotoma*)

**Diagnoza ♂:** capul maron întunecat; ochii reniformi; peri postorbitai prezenti; palpal din 4 articole mai deschise la culoare; dimensiunile (μ): 65, 130, 98, 121; antenele maron deschis, scapă brună, AR = 1,1. Toracele mai întunecat; dungile mezontale de asemenea. Aripile cu irizații gri; C mai puțin evidentă;  $R_{2+3}$  se termină la 1/3 din distanța dintre  $R_1$  și  $R_{4+5}$ ; fCu dincolo de r-m; Cu<sub>2</sub> cu 1/4 sa terminală mult aplacată în jos; lobul anal dezvoltat, rotunjit, obtuz; sevama cu peste 6 peri; lungimea (mm); 211 (cu sevamă); 184 (până la arculus); haltere galbene. Picioarele maron gălbui; LR(I) = 0,59; LR(II) = 0,66; LR(III) = 0,58. Hipopigiu (plansa I h) cu vârf anal scurt; bazistilul proeminent, impozant; apendicele bazistilului mai puțin evidenți; dististilul esfilat, mult redus comparativ cu bazistilul.

**Biologie:** specie reofilă.

**Răspândire:** Europa (Franța, Marea Britanie). În România: Valea Oltului, Portile de Fier, după adult.

#### BIBLIOGRAFIE

1. ALBU P., Ent. Tidskr. Suppl., 95: 9–12, 1974.
2. CURE V., Arch. Hydrobiol. Suppl., 2: 193, 1985.
3. WIEDERHOLM T. (ed.), Scandinavica, Suppl., 19, 1983.
4. \* \* \* Catalogue of Palearctic Diptera, vol. 2, Académiai Kiadó, Budapest, 1990.

Primit în redacție la 17 mai 1993

Institutul de biologie  
București, str. Frumoasă nr. 31B

Scatofagidele sunt diptere în cea mai mare parte higrofile și ombrofile. Zona de care ne ocupăm în lucrarea de față întrunește cerințele acestei familii, caracterizându-se printr-un grad înalt de umiditate, printre-o floră și o vegetație deosebit de bogată.

Din datele existente în literatură, precum și din observațiile din teren rezultă că aceste diptere prezintă preferință pentru anumite habitate; astfel, unele specii ocupă biotopi caracteristici și bine delimitați, pe când în zonele din imediata apropiere dar care nu prezintă aceste condiții ele lipsesc sau sunt întâlnite numai accidental. Marea majoritate a speciilor preferă locurile umbroase și umede și doar foarte puține se găsesc în locuri deschise și însorite. O astfel de specie heliofilă este *Scatophaga stercoraria*.

Scatofagidele au preferință pentru floră și vegetație din apropierea apelor curgătoare și stătătoare, lipsind cu desăvârsire la câteva sute de metri pe pajisetile cu o vegetație ierboasă la fel de bogată dar expuse o mare parte din zi la soare.

Un alt habitat preferat al acestor diptere îl constituie flora existentă în pădurile de foioase, pădurile de amestec și pădurile de conifere. De altfel, fauna cea mai bogată de scatofagide este întâlnită în nord în apropierea liniei pădurilor, în partea de sud a tundrei și în zona alpină a Sibiriei sudice, în tundra montană și în taiga (4).

Coronamentul arborilor este mai puțin frecventat de scatofagide. Totuși aici au fost găsite cîteva specii: *Microprosopa pallidicauda*, *Scatophaga stercoraria* și *S. incola*. Ultimale două din aceste specii prezintă un anumit grad de sinantropie, astfel că au fost observate în livezile de pomi fructiferi și chiar la ferestrele sălașelor existente pe dealurile din zona cercetată.

#### *Norellisoma nervosa* (Meigen, 1826)

Dimensiuni 7,5–8,5 mm.

Adulții zboără din mai până în august.

**Răspândire generală:** Europa centrală (P. Sack, 1937); Franța, Elveția, Germania, Cehoslovacia (Gorodkov, 1986).

St. cerc. biol., Seria biol. anim. t. 45, nr. 2, p. 81–86, București, 1993.

#### DIPTERE SCATOPHAGIDAE DIN MOLDOVA DE NORD

MARIA COCIU

Dans le présent travail sont citées 15 espèces des Scatophagidae, appartenant à 5 genres, identifiées en Moldavie du Nord; l'espèce *Scatophaga obscura* est mentionnée pour la première fois dans notre pays. Par la suite sont présentées la dispersion zoogéographique mondiale de chacune des espèces citées, les périodes de vol des adultes après les renseignements fournis par la littérature et après les observations personnelles, ainsi que les plantes sur lesquelles les données ont été collectées.

Scatofagidele sunt diptere în cea mai mare parte higrofile și ombrofile. Zona de care ne ocupăm în lucrarea de față întrunește cerințele acestei familii, caracterizându-se printr-un grad înalt de umiditate, printre-o floră și o vegetație deosebit de bogată.

Din datele existente în literatură, precum și din observațiile din teren rezultă că aceste diptere prezintă preferință pentru anumite habitate; astfel, unele specii ocupă biotopi caracteristici și bine delimitați, pe când în zonele din imediata apropiere dar care nu prezintă aceste condiții ele lipsesc sau sunt întâlnite numai accidental. Marea majoritate a speciilor preferă locurile umbroase și umede și doar foarte puține se găsesc în locuri deschise și însorite. O astfel de specie heliofilă este *Scatophaga stercoraria*.

Scatofagidele au preferință pentru floră și vegetație din apropierea apelor curgătoare și stătătoare, lipsind cu desăvârsire la câteva sute de metri pe pajisetile cu o vegetație ierboasă la fel de bogată dar expuse o mare parte din zi la soare.

Un alt habitat preferat al acestor diptere îl constituie flora existentă în pădurile de foioase, pădurile de amestec și pădurile de conifere. De altfel, fauna cea mai bogată de scatofagide este întâlnită în nord în apropierea liniei pădurilor, în partea de sud a tundrei și în zona alpină a Sibiriei sudice, în tundra montană și în taiga (4).

Coronamentul arborilor este mai puțin frecventat de scatofagide. Totuși aici au fost găsite cîteva specii: *Microprosopa pallidicauda*, *Scatophaga stercoraria* și *S. incola*. Ultimale două din aceste specii prezintă un anumit grad de sinantropie, astfel că au fost observate în livezile de pomi fructiferi și chiar la ferestrele sălașelor existente pe dealurile din zona cercetată.

#### *Norellisoma nervosa* (Meigen, 1826)

Dimensiuni 7,5–8,5 mm.

Adulții zboără din mai până în august.

**Răspândire generală:** Europa centrală (P. Sack, 1937); Franța, Elveția, Germania, Cehoslovacia (Gorodkov, 1986).

St. cerc. biol., Seria biol. anim. t. 45, nr. 2, p. 81–86, București, 1993.



1971, 1 ♂, 18.VI.1971, 2 ♂♂, 15.V.1973; Bodea 1 ♂, 5.VII.1976 (leg. I. Ceianu); Valea Seacă 1 ♂ și 1 ♀, 25.VI.1979 (leg. M. Cociu); Vf. Rarău 1 ♂ și 1 ♀, 8.VII.1977 (leg. M. Cociu); Brodina 2 ♀♀, 15.VII.1979 (leg. M. Cociu); Vicovul de Sus 5 ♂♂, 19.VII.1980 (leg. M. Cociu); Poiana Stampei 5 ♂♂ și 2 ♀♀, 21.VIII.1985 (leg. M. Cociu); Dorna Candreni 2 ♂♂ și 3 ♀♀, 15.VIII.1987 (leg. M. Cociu); Șarul Dornei 1 ♂ și 2 ♀♀, 19.VII.1985 (leg. M. Cociu); Pădurea Dorobanțu (Botoșani) 9 ♂♂ și 12, ♀♀, 5.VII.1988 (leg. M. Cociu); Pădurea Adâncata (Suceava) 8 ♂♂ și 7 ♀♀, 29.VII.1988 (leg. M. Cociu); Pădurea Dragomirna (Suceava) 6 ♂♂ și 1 ♀, 30.VII.1988 (leg. M. Cociu).

*Scatophaga incola* Becker, 1900

Dimensiuni 7,5—9 mm.

Adulții sunt prezenti în luna iulie (Sack, 1937). Noi am găsit din mai până în noiembrie.

Răspândire generală: Europa: Suedia, Finlanda; C.S.I.: Federația Rusă, Alasca și Labrador (Gorodkov, 1986).

Materialul colectat: Vârful Rarău, 2 ♀♀, 8.VII.1977; Izvorul Alb (Clung Moldovenesc) 1 ♀, 3.VII.1986; Valea Caselor 1 ♂, 8.VIII.1986; Răduți 3 ♂♂, 15.VII.1979; Vicovul de Sus 2 ♀♀, 19.VII.1979; Brodina 2 ♂♂, 24.VII.1979.

*Scatophaga suilla* (Fabricius, 1794)

Dimensiuni: 6—7 mm.

Adulții zboară din aprilie până în septembrie (Sack, 1937). Noi i-am găsit și în luna octombrie.

Răspândire generală: Europa centrală și septentrională, Siberia (P. Sack, 1937); America de Nord, Asia și Europa (Cehia, Slovacia, Finlanda și în partea europeană a C.S.I.), în Mongolia și Siberia (Drascovits, 1981), Europa (Suedia, Finlanda, Marea Britanie, Cehoslovacia) și Alpi; C.S.I. (Federația Rusă, Ucraina, Republica Moldova), Kazahstan, Uzbekistan, Tadjikistan, Kirkizia, Turcmenia, Siberia de vest, Mongolie (Gorodkov, 1986).

Materialul colectat: Podul Bucătarului 1 ♂, 27.V.1974, 1 ♂, 21.VII.1976; Valea Caselor 1 ♂, 17.VII.1976, 1 ♀, 27.VI.1976; Valea Putnei 1 ♂, 12.IX.1970, 1 ♂ și 1 ♀, 8.VI.1976; Dorna Candreni 1 ♀, 20.VII.1979.

*Scatophaga obscura* (Fallen, 1819)

Dimensiuni 4—5 mm.

Adulții sunt prezenti din iunie până în septembrie.

Răspândire generală: Germania, Austria, Silezia, Scandinavia (Séguy, 1934); Austria, Estonia și Peninsula Scandinavă (Drascovits, 1981).

Materialul colectat: Valea caselor (C-lung Moldovenesc) 4 ♂♂ și 3 ♀♀, 1.VIII.1988; Șarul Dornei 1 ♂, 13.VIII.1989.

*Chaetosa punctipes* (Meigen, 1826)

Dimensiuni 4—5 mm.

Adulții zboară din mai până în august.

Răspândire generală: Europa, Siberia, Labrador (Sack, 1937); Germania (Meigen), Piemont, Austria, Prusia orientală (Becker, Pandille), Arkhangel (Frey), Siberia (Bergrøth, Sahlgberg) citați de Séguin, 1934; America de Nord, Siberia, Mongolia și Europa (Drascovits, 1981).

Materialul colectat: Valea Caselor 2 ♂♂, 15.VII.1980 și 1 ♂, 26.VII.1982.

*Microprosopa haemorrhoidalis* (Meigen, 1826)

Dimensiuni 5—6 mm.

Adulții sunt prezenti din iunie până în august.

Specie rară.

Răspândirea generală: Europa centrală și septentrională, Siberia, Groenlanda (P. Sack, 1937); Europa: Norvegia, Franța, Alpi, C.S.I.: Federația Rusă, Orientul îndepărtat, Asia de Nord, Alasca și Groenlanda (Gorodkov, 1986).

Materialul colectat: Vârful Rarău 1 ♂, 8.VII.1987 și 2 ♂♂, 20.VII.1988. S-au făcut cosiri cu fileul pe vegetația din imediata apropiere a cabanei.

*Microprosopa hoerlandti* Sifner, 1981

Dimensiuni 6—7 mm.

Răspândire generală: Asia, Iran.

Materialul colectat: Valea Seacă (Clung Moldovenesc) 1 ♂, 24.VII.1979.

*Microprosopa pallidicauda* (Zetterstedt, 1838)

Noi am capturat adulți în lunile iunie și iulie.

Răspândire generală: Europa centrală și Boreală, Siberia (Séguy, 1952); Europa: Norvegia, Suedia, Finlanda, Cehoslovacia, Elveția, C.S.I.: Federația Rusă, Siberia de Vest, Siberia de Est; America de Nord: Alaska (Gorodkov, 1986).

Materialul colectat: Vârful Rarău — 1651 m, 2 ♀♀, 12.VII.1979.

*Megaphthalma pallida* (Fallen, 1819)

Dimensiuni: 4—5 mm.

Adulții zboară din iunie până în septembrie.

Răspândire generală: Europa centrală și septentrională (Sack, 1937); Franța (împrejurimile Parisului, iulie-august), Anglia și America de Nord (Séguy, 1934); Europa: Suedia, Finlanda, Elveția, Marea Britanie și Cehoslovacia, C.S.I.: Federația Rusă, Estonia, Letonia și Lituania, Bielorusia și Ucraina și Siberia de Vest (Gorodkov, 1986).

Materialul colectat: Valea Putnei 1 ♀, 15.VII.1975 (leg. I. Ceianu).

## BIBLIOGRAFIE

1. COCIU MARIA, St. cerc. biol., Seria biol., anim. 33, 1 23–29, 1981.
2. COCIU MARIA, Trav. Mus. Hist. Nat. „Grigore Antipa”, XXII: 303–311, 1980.
3. DRASCOVITS AGNES, Fauna Hungariae, 145: 1–52, 1981.
4. GORODKOV K.B., Catalogue of Palearctic Diptera, vol. 11, p. 11–41, 1986.
5. HACKMAN W., Fauna Fenicia, vol. II, p. 1–66, 1956.
6. SÉGUY E., Diptères. Muscidae Acalyptratae et Scatophagidae in: Faune de France, vol. 28, Paris, p. 634–736, 1934.
7. ŠIFNER F., Acta entomologica Musei Nationalis Pragae, 40: 95–104, 1981.
8. THALHAMMER I., Fauna Regni Hungariae, Budapest, 1899.

Primit în redacție la 12 aprilie 1993

Institutul de biologie  
București, str. Frumoasă, nr. 31B

**FRANKLINIELLA OCCIDENTALIS (PERGANDE, 1895)  
(INSECTA: ORDINUL THYSANOPTERA), UN NOU  
DĂUNĂTOR ÎN SERELE DIN ROMÂNIA**

LILIANA VASILIU-OROMULU

*Frankliniella occidentalis*, indentified in Romania on greenhouse raised carnation, may be considered now an economically valuable species. It has a wide distribution in most of our green-houses and is a recognized damaging agent of floral and legume cultures.

**INTRODUCERE**

Schimburile internaționale în domeniul floriculturii, legumiculturii și agriculturii constituie cauza introducerii numeroșilor dăunători în culturi.

Un caz recent este tripsul *Frankliniella occidentalis*, denumit de americani „flower thrips” sau „Alfalfa thrips” și considerat inițial endemic pentru California unde produce pagube mari la *Prunus armeniaca*, *Solanum tuberosum* și *Citrus sinensis*, a fost semnalat ulterior din Alaska până în Costa Rica. Mound și Walker îl citează în Noua Zeelandă în 1983, Wo în Korea în 1984. În cursul ultimilor ani, pagubele produse culturilor au permis decelarea prezenței acestei insecte și în Europa: în Olanda în 1987 (Van de Vrie), în Franța în 1987 (A. Bournier & J.P. Bournier), în Suedia și în 1986 (Petterson), în Anglia în 1986 (Barletta), în Germania în 1986 (R. zur Strassen), în Cehoslovacia în 1989 (Pelikán) și în Ungaria în 1989 (Jenser).

În Europa cât și în nordul Americii, tripsul se dezvoltă în sere, dar începând cu 1990 a fost găsit și în mediu natural. Astfel în America insecta este considerată dăunătoare la 139 specii de plante, în Olanda la 64 specii de plante, iar în Ungaria la 23 specii de plante din afară serelor.

În România, în anul 1990 am semnalat prezența tripsului pentru prima dată în țară, în serele de la Ișalnița (județul Dolj), ulterior și în județul Brașov, municipiul București etc.

**MATERIAL SI METODĂ**

Insectele au fost recoltate direct din sere de pe *Gerbera Anandria* (L.) Schultz — Bip., *Dianthus caryophyllus* L. și *Cucumis sativus* L.

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 87–92, București, 1993

## DISCUȚII

În serele din România sunt deja cunoscute următorii tripsi: *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché 1833), *Hercinothrips femoralis* (O.M. Reuter 1891), *Parthenothrips draceneae* (Heeger 1854) și *Thrips tabaci* Lindeman 1888.

Deoarece în literatură română de specialitate nu există o descriere a noii specii de carantină, *Frankliniella occidentalis*, prezentăm o diagnoză succintă a insectei, relevând caracterele ce permit diferențierea ei de alte specii ale aceluiași gen și cărora daune sunt foarte slabe.

*Frankliniella occidentalis* (Pergande 1895) face parte din Ordinul *Thysanoptera*, S/Ord. *Terebrantia*, Familia *Thripidae*.

Antenele sunt formate din 8 articole, palpii maxilaterali din 3 articole, perii interocelari se află înaintea ocelilor posterioiri, protoracele are un păr setiform antero-unghiular și cu câte 2 peri postero-unghiulari. Nervura principală a aripilor anterioare este prevăzută cu peri pe întreaga ei lungime. Rândul de peri postero-marginali de pe segmentul al 8-lea abdominal este complet dezvoltat.

Femeala are 1,2–1,9 mm lungime, iar masculul 0,9 mm. Sunt cunoscute la femele 3 variante de colorit al corpului „palid”, „intermediar” și „închis”, deci de la galben-deschis până la maro închis. Masculul este totdeauna galben-deschis, greu de separat de alte specii.

Pentru diferențierea corectă a speciei *Frankliniella occidentalis* de *Frankliniella pallida*, larg răspândită în România, prezentăm în continuare, caracterele principale ale celor 2 specii.

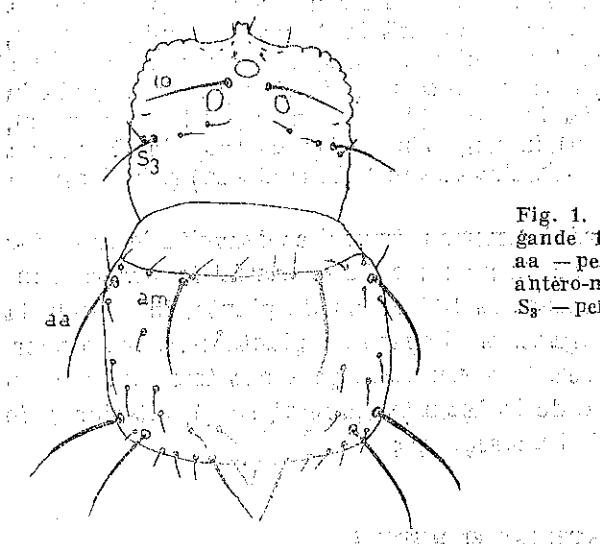


Fig. 1. — *Frankliniella occidentalis* (Pergande 1895), cap și pronotum — dorsal: aa — peri antero-unghiulari; am — peri antero-marginali; io — peri interocelari; S<sub>3</sub> — peri postoculari S<sub>3</sub> (după R. zur Strassen 1986).

Astfel, la *Frankliniella occidentalis* (fig. 1) — peri postoculari S<sub>3</sub> sunt puternici, aproximativ de aceeași grosime și puțin mai scurți decât peri interocelari; peri antero-marginali ai pronotumului sunt de aceeași lungime și grosime cu peri antero-unghiulari; marginea anterioară a

pronotumului, între cei doi peri antero-marginali este prevăzută cu 4 peri scurți (rar 2 sau 5); aripile anterioare au pe nervura principală 15–18 peri (adesea 16–17); distanța dintre ocelii posteriori este de 40–44 µm; articoulul 3 antennal are 54–63 µm lungime.

La *Frankliniella pallida* (fig. 2) peri postoculari S<sub>3</sub> sunt subțiri și cel mult jumătate din lungimea perilor interocelari; peri antero-marginali ai pronotumului sunt mult mai subțiri și mai scurți decât cei

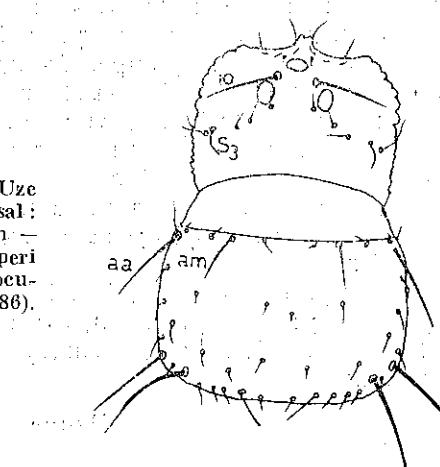


Fig. 2. — *Frankliniella pallida* (Uze 1895), cap și pronotum — dorsal: aa — peri antero-unghiulari; am — peri antero-marginali; io — peri interocelari; S<sub>3</sub> — peri postoculari S<sub>3</sub> (după R. zur Strassen 1986).

antero-unghiulari; marginea anterioară a pronotumului, între cei doi peri antero-marginali este prevăzută cu 2 peri scurți (rar 3); aripile anterioare au pe nervura principală 8–10 peri (rar până la 13); distanța dintre ocelii posteriori este de 28–34 µm lungime.

La speciile *Frankliniella intonsa* și *Frankliniella tenuicornis*, specii prezente în România, peri S<sub>3</sub> sunt mai puternic dezvoltăți decât la cele două specii sus menționate.

## Biologia speciei

Femeala de *Frankliniella occidentalis* introduce ouăle cu ajutorul tarieriei în parenchimul frunzelor, florilor sau fructelor. La o temperatură de 20–21°C și 80–90% umiditatea relativă a atmosferei, o femelă depune

Tabelul nr. 1

Durata medie (în zile) a stadiilor de dezvoltare ale speciei *Frankliniella occidentalis*, la diferite temperaturi (după Bryan și Smith, 1958).

Temperatura (°C)	Ou	Larvă I	Larvă II	Pronimfă	Nimfă	Total
15	13	7	12	4,2	8	44,2
20	6	3,3	5,7	2	4,8	21,8
26,7	4	2,3	3,8	1,1	2,8	13,9

1–3 ouă în 24 ore. Ouăle sunt reniforme, de 200 $\mu$ m lungime. La temperatură de 26°C, ecloziunea are loc după 4 zile (incubarea poate dura mult timp dacă temperatura este mai scăzută). La temperaturi mai ridicate și umiditate scăzută, ouăle nu rezistă, mortalitatea fiind în acest caz importantă.

Larva de stadiul I eclozează, cu capul străbate epiderma țesutului vegetal, apoi prin mișcări ondulatorii ale corpului, se degajează complet, dar se întâmplă uneori din cauza cuticulei prea rezistente să fie reținută prizonieră (Bournier, 1987). Această larvă alb-hialină, neonată, începe să se hrănească din momentul ecloziunii ei, înțepând și apoi aspirând conținutul celular cu ajutorul pompei faringiene.

La o temperatură de 26°C năpârlirea are loc după 3 zile. Larva de stadiul II, de culoare galbenă, este foarte agilă, se hrănește intens și năpărlește după 3 zile, devine din ce în ce mai puțin mobilă și se retrage în sol, la câțiva centimetri adâncime. Sunt 2 stadii nimfale ce durează 1–2 zile și respectiv 3 zile. Pronimfa și nimfa nu se hrănesc și sunt practic imobile. Femela arripătă ajunge la colorația ei definitivă abia după 48 ore de la celoziune.

Ponta începe după 3 zile, femelele virgine depun ouă din care ies masculi (partenogeneză arenotocă), iar cele fecundate, produc o majoritate de femele. În funcție de condițiile climatice se pot succeda 5–7 generații pe an.

#### Daune

*Frankliniella occidentalis* în România a fost identificată până în prezent în sere, pe gerbere, garoafe și castraveti. Se consideră un număr de 3,6 adulți de tripsi per floare, ca să producă pagube la aceste culturi. Petele albicioase, ulterior brunificate pe care tripsi le determină florilor și fructelor în urma procesului de hrănire, cât și transmiterea virusului TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) ce induce necroze tipice, toate aceste aspecte conduc la scădere a valorii economice a produselor din sere. Virusul se multiplică numai în corpul larvei, fiind necesare 15 minute din momentul hrăririi, ca tripsi să infesteze noi plante sănătoase (Sakimura în Lewis 1973).

La Ișalnița au fost prelevate probe de gerbere de diferite culori. Se remarcă o corelare a intensității atacului insectei în funcție de culoarea ligulelor. Astfel, gerberele albe sunt cele mai puternic atacate – în proporție de 94% – determinând nevandabilitatea întregii culturi (fig. 3–4). Atacul de *Frankliniella occidentalis* se datorează aici, unui număr de 65 adulți per inflorescență. Gerberele de culoare galben-închis sunt de asemenea dăunate de tripsi, dar în procent mai scăzut, de 40%, iar cele de culoare galben-deschis de numai 26%. Singurele, gerberele de culoare roșie rezistă atacului. Această interdependență, culoare-atac poate fi utilizată cu succes în folosirea capcanelor cu adezivi colorați pentru recoltarea tisanopterelor în natură (rezultatele noastre contrazic studiile polonezului Grómadska 1954).

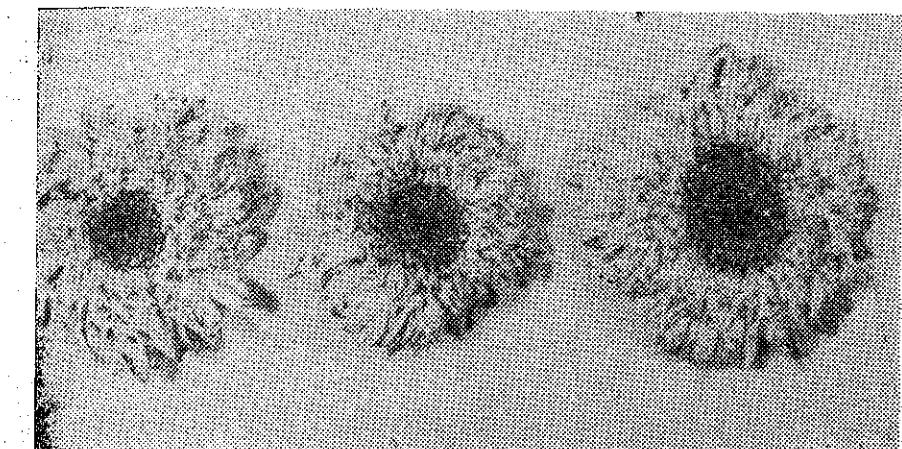


Fig. 3. – Atac de *Frankliniella occidentalis* la gerbere albe.

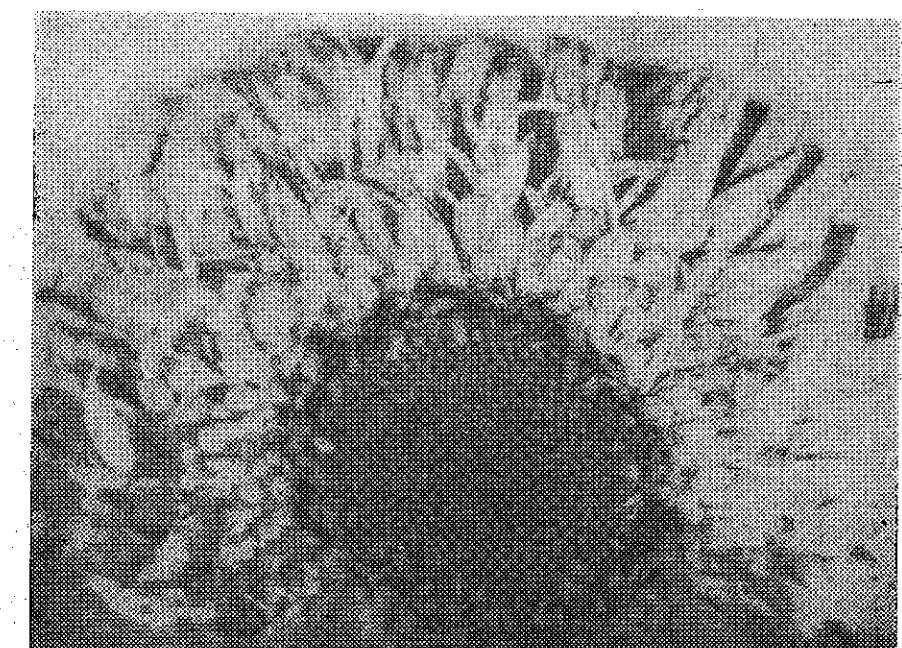


Fig. 4. – Atac de *Frankliniella occidentalis* la gerberă albă (mărit).

La garoafe, butașii prezintă adesea aspectele caracteristice atacului insectei (fig. 5). Florile, de asemenea sunt devalorizate prin petele și necrozele produse de tripsi.

Dintre culturile de legume s-a remarcat deja atacul speciei *Frankliniella occidentalis* la castraveti, dar, cu siguranță va produce pagube importante atât la celelalte legume cât și la plantele ornamentale din sere.

De aceea trebuie efectuată o combatere științifică corectă a insectei, prin cunoașterea biologiei ei cât și folosirea celor mai noi și eficiente insecticide utilizate pe plan mondial.

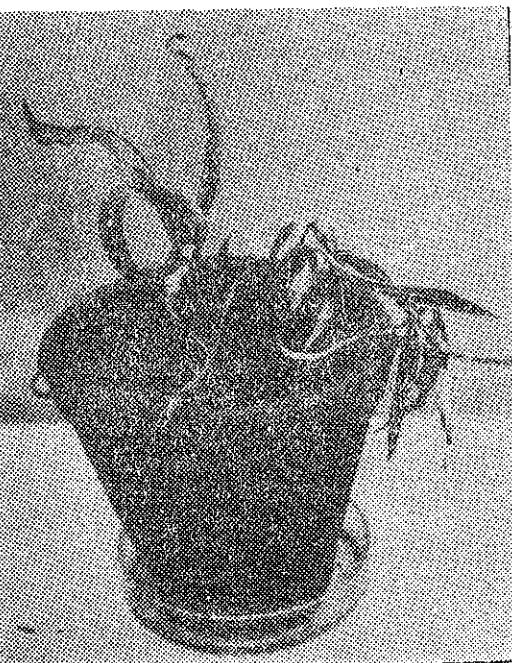


Fig. 5. — Butaș de garoafă ataçat de *Frankliniella occidentalis*.

#### CONCLUZII

*Frankliniella occidentalis* (Pergande 1895) este o specie de tisanoptere, nouă pentru România.

Se dezvoltă în sere, producând pagube importante la culturile florale și legumicole.

#### BIBLIOGRAFIE

- BOURNIER A., BOURNIER J.P., 1987, Phytoma, 388 : 14–17.
- BRYAN D.E., SMITH R.F., 1956, Univ. California Publ. Entomology, 10, 6 : 359–410.
- GROMADSKA M., 1954, Ekol. pol., 2, 93–137.
- JENSER G., 1990, Anz. Schädl., Pflanzenschutz, Umweltschutz, 63 : 114–116.
- LEWIS T., 1973, *Thrips, their Biology, Ecology and Economic Importance*, Acad. Press.
- MANTEL W.P., VRIE M. VAN DE, 1988, Ent. Ber. Amst., 48 : 140–144.
- PELIKAN J., 1989, Ochrana Rostlin, 25 (LXII), 4 : 271–278.
- SCHLIEPHAKE G., 1989, Hercynia N.F., 26, 4 : 417–423.
- STRASSEN R. ZUR, 1986, Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.-Schutzdienst, 38 : 86–88.
- STRASSEN R. ZUR, 1986, Gesunde Pfl. 33, 3 : 91–98.
- STRAUSS M., SCHICKEDANZ F., 1986, Gesunde Pfl., 38, 7 : 312–315.
- TERRY L. I., DEGRANDI-HOFFMAN G., 1988, Can. Entomol., 120 : 1003–1016.
- TERRY L. I., BARSTOW B.B., 1988, J. Econ. Ent., 81, 6 : 1785–1791.
- WOO K. S., 1974, Korean J. Ent. 4, 2 : 1–90.
- ZAWIRSKA J., 1983, Zeszyty Problematyczne Postępow Nauk Rolniczych, 291 : 393–405.

Primit în redacție la 28 mai 1993

Institutul de Biologie

București, Splaiul Independenței, nr. 296

## MEZOFAUNA EDAFICĂ INDICATOARE A STĂRII FUNCȚIONALE A SOLURILOR FORESTIERE

FELICIA BULIMAR, MARINA HUȚU și MAGDA CĂLUGĂR

The authors make a synthesis of the researches from different natural and anthropic forest ecosystems including silvosteppe forests and those at the upper altitudinal limit. There was observed a close dependence between the degree of anthropisation and amplitude of the structural modifications: the significant reduction of the total density of microarthropods, modification of the proportion among main detritomicrophytophagous groups (Oribatida/Collembola), excessive development of the populations of Acaridae, a fact which indicates the predominance of the anaerobic decomposition processes, unfavourable to humification.

Animalele edafice țin sub control excesul de producție vegetală, modereză ciclurile diverselor elemente prin intermediul verigilor de prădători și, mai ales, exercită un control calitativ și cantitativ asupra descompunerii resturilor organice din sol (16), (18), (25).

Legătura strinsă a animalelor edafice, în special a formelor puțin mobile, cu mediul lor de viață, le recomandă ca buni indicatori ai stării funcționale a solurilor pe care le populează. Diagnozele zoopedologice se dovedesc foarte utile, îndeosebi atunci cînd nu se mai pot obține informații despre insușirile solului pe baza covorului vegetal, acesta fiind profund modificat antropic. O politică reală de conservare a „patrimoniului” sol trebuie să se întemeieze pe indicatori biologici (17).

#### MATERIAL SI METODE

Investigațiile noastre mezofaunistice în ecosisteme forestiere au fost efectuate succesiv în decursul ultimilor 15 ani, în solul diferitelor zone de vegetație, de la păduri de silvostepă, pînă la cele aflate la limita altitudinală superioară (2–15), (19–24), (26). S-au analizat, totodată, păduri pluriene și echiene, cu meduri diferite de gospodărire, afectate și neafectate de factorul antropic – rezervații, plantații evasimono-specifici, tăieri selective etc. (tab. nr. 1).

Seturi egale de probe de sol, cu suprafață de 100 cm<sup>2</sup>, au fost prelevate în perioada mai – septembrie, în fiecare an, din orizontul organic al stațiunilor luate în studiu. Animalele extrase prin metoda Berlese – Tullgren au fost triate, inventariate și determinate pînă la nivel de familie pentru majoritatea ordinelor și pînă la nivel de specie, pentru colembole, oribatide și uropodide. Valorile abundențelor au stat la baza calculării unor parametri cenotici structurali.

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 93–97, București, 1993

Tabelul nr. 1  
Caracterizarea staționarelor

Elaj de vegetație	Staționare	Localizare (Jud.)	Alt. (m)	Tipuri de sol	pH
Alpin, 0° -1°C/an, peste 1200 mm/an	I. Tufăriș cu smîrdar	Călimani (SV)	1900	brun podzolic, humicofluviat, oligohazic	4,2 - 4,5
Subalpin, 1° -2,5°C/an, 800 - 1200 mm/an	II. Tufăriș cu ienupăr	Călimani (SV)	1850	,	3,9 - 4,1
Boreal, 2° -5,5°C/an,	III. Tufăriș cu jineapăn	Călimani (SV)	1800	,	4,0 - 4,5
700 - 1100 mm/an	IV. Moldiș limită sup.Z.	Călimani (SV)	1725	brun podzolic, oligohazic	3,8 - 4,0
	V. Moldiș lim. L.(R)	Călimani(SV)	1300	brun acid litic mezobazic	4,3 - 4,5
	VII. Moldiș brăd. făget(R).	Știuțoara (SV)	960	brun feriliv, umbricofluviat	4,5 - 4,8
Nemoral	VIII. Brădet-făget	Risca (SV)	500	brun acid slab pseudogel.	4,4 - 4,6
	IX. Brădet, gr. usc. :40 % grad uscare : 20 - 30%	Marginea (SV)	470	livic albic pseudogel	5,0 - 5,2
	X. Brădet, gr. usc. :40 %	Gemenea (SV)	440	brun luvic mult pseudogel.	5,1 - 5,3
	XI. Moldiș (plantajie)	Piatra Soimului (NT)	460	livic albic pseudogel	4,3 - 4,5
	XII. Moldiș (plantajie)	Agapia (NT)	770	brun podzolic humicofluviat	4,3 - 4,5
	XIII. Brădet (plantajie)	Dealul Mare (IS)	380	brun acid moderat erodat	4,9 - 5,1
	XIV. Carpino-făget	Voinesti (IS)	280	brun mezobazic tipic	5,0 - 5,1
	XV. Carpino-făget cu tei alb	Popesti (IS)	593	brun luvic	5,8 - 6,2
	XVI. Stejăret (sleau de deal)	Popesti (IS)	220	brun de pădure, argilo-luvial, pseudogleizat	5,5 - 6,0
	XVII. Stejăret (sleau de deal) gr. usc. : peste 30%	Popesti (IS)	210	brun luvic, pseudogleizat	4,2 - 4,8
Silvostera, 10°C/an	XVIII. Stejăret (sleau de cimpie)	Tămăduinaca (AG)	100	cernoziom degradat	4,8 - 5,3
					6,8 - 7,0

\* Multumim colegilor dr. T. Chițu, dr. N. Ștefan, dr. G. Davidescu, dr. Gh. Lupușcu pentru informații climatice, floristice și pedologice.  
Z = zimbru; R = rezervație; L = Luzula silvatica

### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza datelor de care dispunem relevă o strânsă dependență între gradul de influență antropică asupra mediului și amplitudinea schimbărilor decelate în structura cenozelor de microartropode edafice (fig. 1).

Densitatea totală a populațiilor de microartropode edafice scade, în mod natural, odată cu altitudinea, de la aproximativ  $150 - 160 \cdot 10^3 / m^2$

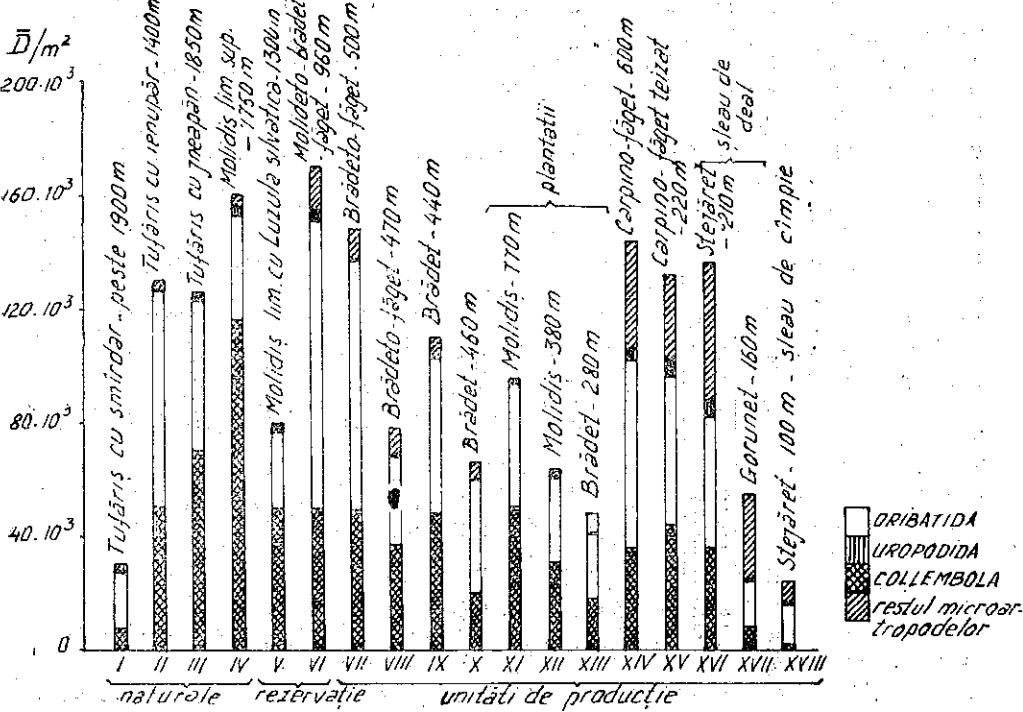


Fig. 1. -- Densitatea medie totală a principalelor grupe de microartropode edafice din diferite tipuri de ecosisteme forestiere.

în păduri montane și piemontane (moldiș de limită superioară — staționar IV și păduri de răsinoase cu fag — staționarele VI și VII), la  $120 - 140 \cdot 10^3 / m^2$  în păduri colinare (amestec de foioase — staționarele XIV-XVI), fiind abia de  $23 \cdot 10^3 / m^2$  într-o pădure de silvostepă, cu pronuntat caracter termoxerofil (staționar XVIII).

Descreșterea numerică a populațiilor merge, de regulă, paralel cu schimbarea calității humusului produs. La altitudini mari, într-un climat rece și umed, pe soluri foarte puternic acide, descompunerea neeromasei este lentă și incompletă, ducând la formarea humusului de tip moor sau moder (1). În aceste condiții, dintre principalele grupe de microartropode detritomicrofitofage, domină de obicei colembolele (raportul oribatide/colembole este subunitar). În pădurile de conifere în amestec cu fag și în cele de amestec de foioase (colinare și de șes), descompunerea litierei

decurge mai alert, formindu-se preponderent humus de tip mull. În solul pădurilor respective, raportul O/C este în general supraunitar, indicând procese intense de humificare, asigurate de o floră și o faună edafică mult diversificată și amplificată numeric.

Ponderea participării microartropodelor detritomicrofitofage (îndeosebi a colembolelor și oribatidelor) scade odată cu altitudinea, ea trećind treptat și tot mai mult de partea macroartropodelor, ale căror densități sunt în general mult mai mari în pădurile de foioase din zona colinară și de săs.

De remarcat însă că, în condițiile de mediu modificate prin influența antropică – plantații de conifere extrazonale (staționarele X și XI), păduri în care se manifestă fenomenul de uscare anormală a unor esențe lemnoase (staționarele VIII, X, XVII), unități de producție forestieră (staționar VII), comparativ cu păduri similare, aflate în regim de rezervație (staționar VI), se constată o reducere numerică substanțială, în cele mai multe cazuri semnificativă, a densității globale a microartropodelor. Totodată, au loc schimbări structurale care, interpretate în corelație cu alte date disponibile, pot constitui indicații utile cu privire la starea funcțională a solurilor analizate. Se observă, de exemplu, că în păduri afectate de influențe antropică, raportul O/C scade adesea, sau chiar devine subunitar, în zone în care, în mod normal, oribatidele domină net, fapt ce ilustrează virarea proceselor de descompunere a necromasei spre un curs nefavorabil humificării (staționarele VIII și IX).

Modificări similare în descompunerea resturilor organice din sol, cu preponderența proceselor anaerobe nepropice humificării, sunt semnalate și de o mărire anormală a densității acarididelor, care se produce în condițiile unui substrat cu umiditate crescută și stagnantă, aceleși condiții care favorizează apariția fenomenului de pseudogleizare.

Datele obținute de noi și care confirmă pe cele din literatura de specialitate, au demonstrat că virtuți certe de bioindicatori au și uropodidele, prin marea lor sensibilitate față de schimbări relativ discrete ale mediului de viață. Ele sunt, de altfel, primii acarieni care își reduc densitatea, adesea pînă la dispariție, în medii modificate de factorul antropic (fig. 1). De asemenea, în solul pădurilor unde acești acarieni au densitatea cea mai ridicată, raportul numeric subunitar dintre speciile microfitofage și cele zoofage este un indiciu că procesele de descompunere a necromasei tind spre formarea humusului de tip mull. De aceea, orice creștere anormală a numărului de indivizi micetofagi, în păduri de foioase, reprezintă un semnal de schimbare a direcției proceselor de descompunere spre formarea de humus de tip moder (de exemplu, în caz de acidificare a mediului sau de extragere selectivă a foioaselor din păduri de conifere în amestec cu foioase) (20).

#### CONCLUZII

În condiții naturale, descreșterea densității totale a populațiilor de microartropode merge paralel cu schimbarea calității humusului. În pădurile de conifere de la altitudini mari, raportul oribatide/colembole (O/C) subunitar indică o descompunere lentă și incompletă a necromasei, ducind la formarea humusului de tip moor sau moder. În pădurile colinare

și de săs (conifere în amestec cu fag, amestec de foioase), diversitatea faunei și amplificarea ei numerică, raportul O/C supraunitar, creșterea aporțului macroartropodelor, reflectă o descompunere mai rapidă și completă a necromasei, rezultind humus de tip mull.

În condițiile modificării mediului sub influența antropică se constată reducerea semnificativă a densității globale a microartropodelor. Schimbarea raportului O/C în subunitar, acolo unde în mod normal este supraunitar, însoțită de explozia populatională a acarididelor, ilustrează preponderența proceselor anaerobe, nefavorabile humificării.

#### BIBLIOGRAFIE

1. BRAUNS A., *Praktische Bodenbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 1–470, 1968.
2. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VI : 249–263, 1980.
3. BULIMAR FELICIA, Luer. Conf. Ecol. Constanța, p. 32–34, 1982.
4. BULIMAR FELICIA, Studii și comunic., Soc. Șt. Biol. (Fil. Rechin), II : 367–382, 1982.
5. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VII : 285–304, 1983.
6. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., IX : 115–128, 1987.
7. BULIMAR FELICIA, A IV-a Conf. Naț. Entomol. Cluj, p. 277–282, 1988.
8. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Bucovinei, Suceava, XI : 33–44, 1991.
9. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Bucovinei, Suceava, XI : 45–55, 1991.
10. BULIMAR FELICIA, HUȚU MARINA, CĂLUGĂR MAGDA, St. cerc. biol., Seria biol. anim., 44, 2 : 111–115, 1992.
11. BULIMAR FELICIA, An. șt. Univ. „Al.I. Cuza” Iași, 38, s. II-a, Biol., Zool., 1992.
12. BULIMAR FELICIA, An. Muz. Șt. Nat. Piatra Neamț, s. Bot.–Zool., 1992.
13. CĂLUGĂR MAGDA, VASILIU N., An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VI : 265–282, 1980.
14. CĂLUGĂR MAGDA, VASILIU N., An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VII : 243–274, 1983.
15. CHIFU T. și colab., An. șt. Univ. „Al.I. Cuza” Iași, 35, s. II-a Biol. (supl.) : 65–112, 1989.
16. CROSSLEY D.A., *The role of arthropodes in forests ecosystems*, Ed. by W.J. Mattson, Springer Verlag, p. 49–55, 1977.
17. GHILIAOV M. S., Pedobiol., 18 : 300–309, 1978.
18. GODEAS ALICIA, M., Pedobiol., 30 : 323–331, 1987.
19. HUȚU MARINA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VI : 237–247, 1980.
20. HUȚU MARINA, Pedobiol., 23 : 68–89, 1982.
21. HUȚU MARINA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VII : 275–283, 1983.
22. HUȚU MARINA, CĂLUGĂR MAGDA, BULIMAR FELICIA, A IV-a Conf. Naț. Ecol., Piatra Neamț, p. 197, 1989.
23. HUȚU MARINA, BULIMAR FELICIA, CĂLUGĂR MAGDA, Zilele Acad. Iașiene, 1992.
24. HUȚU MARINA, BULIMAR FELICIA, St. și cerc. biol., Biol. anim., Buc., 45 p. 1 : 25–30, 1993.
25. KURČEVA G. F., Pocivovedenie, 4 : 16–23, 1960.
26. VASILIU N., CĂLUGĂR MAGDA, An. Muz. Jud. Suceava, Șt. Nat., VIII : 107–122, 1985.

Primit în redacție la 17 martie 1993

Institutul de Cercetări Biologice Iași,  
B-dul Copou, nr. 20A

EXOCITOZA VACUOLELOR CORTICALE DIN  
OVOCITELE FECUNDATE ALE UNUI TELEOSTEAN  
DE APĂ DULCE, *ICTIOPUS NIGER*  
(FAM. CATOSTOMIDAE)

LOTUS MEŞTER

Cortical alveoli and their breakdown in the eggs of black buffalo were morphologically investigated by light and transmission electron microscopy. Cortical alveoli of various sizes existed in multiple layers within the cortical cytoplasm of eggs. Cortical alveoli have heterogeneous contents with electron-less dense granules. After fertilization a wave of cortical alveolus exocytosis is induced, which was propagated from the animal pole to the vegetal pole, and was completed within about 10 min. The contents of the cortical alveoli were released into the perivitelline space by the fusion of the plasma and cortical alveolar membranes. The surface of oocyte becomes smooth and has less microvilli after exocytosis. In the *Ictiobus* egg, the flow of the cortically distributed cytoplasm to form a typical blastodisc at the animal pole seems to occur only after cortical alveoli exocytosis.

Fecundarea este un proces fundamental, ce inițiază o cascadă de reacții celulare esențiale pentru continuarea procesului de dezvoltare embrionară. Dintre mecanismele ce au loc imediat după fecundare, un loc aparte îl ocupă exocitoza vacuolelor corticale. Ovocitele mature de la numeroase specii de animale (nevertebrate, pești, amfibieni, mamifere) prezintă în regiunea corticală unul sau mai multe straturi de vacuole corticale, care sunt exocitate după fecundare (3), (5), (15), (19), (22), (23).

Studiiile vacuolelor corticale la pești au fost inițiate de Yamamoto (26) și au fost extinse ulterior pe numeroase specii (4), (6), (9), (10), (11), (12), (15). Cercetările au evidențiat heterogenitatea ultrastructurală a acestor formațiuni celulare și importanța exocitozei lor rapide după fecundare pentru separarea membranei plasmatici a ovocitei fecundate de corion și formarea membranei de fecundare, care blochează polispermia. Formarea vacuolelor corticale a fost examinată în cursul dezvoltării ovocitelor la diverse specii. S-a constatat că veziculele viteline din ovocitele tinere și vacuolele corticale sunt similare ca structură și compoziție chimică, sugerându-se că teiemenii anterioi să nu mai fie utilizati (18), (22), (25).

Cercetările noastre anterioare asupra unor specii de pești au evidențiat heterogenitatea acestor structuri în ovocitele mature și au stabilit timpul necesar până la terminarea procesului de exocitoză a vacuolelor corticale, care începe imediat după fecundare (15), (16). În vederea obținerii unor aspecte suplimentare, cercetările au fost extinse pe o specie de pești recent aclimatizată în apele țării noastre, denumită *Ictiobus niger* (bufalo negru) (17). În literatura de specialitate sunt puține date asupra

ovocitelor de *Ictiobus* (7), (14), și lipsesc observațiile cu privire la structura și exocitoza vacuolelor corticale după fecundare. Observațiile noastre morfologice pot contribui la înțelegerea mai aprofundată a procesului de fecundare de la această specie și a procesului de exocitoză, în condițiile culturii sale intensive.

#### MATERIALE ȘI METODE

Ovocite mature nefecundate de *Ictiobus niger* și ovocite la intervale deosebite după fecundare (1, 3, 5, 10, 20 min), au fost obținute de la Stațiunea de cercetări piscicole Nucet (Dâmbovița). Toate tipurile de ovocite au fost fixate în 2,5% glutaraldehidă preparată în soluție tampon cacodilat 50 mM pH 7,4 ce conținea 3% sueroză, timp de 60 min la rece (4°C). Pentru studiile de microscopie electronică, ovocitele au fost spălate de mai multe ori cu soluție tampon cacodilat 50 mM pH 7,4 și au fost ulterior fixate într-o soluție de albastru alcian 1% preparat în acid acetic 1 N, timp de 2 ore. Preparatele au fost spălate în mai multe băi cu soluție tampon cacodilat și au fost post-fixate în 1% tetraoxid de osmu preparam în 50 mM tampon cacodilat ce conținea 0,5% roșu de rutenu, timp de 6 ore la rece. Preparatele au fost spălate de mai multe ori în soluție tampon cacodilat, au fost deshidratate în alcool și propilen oxid și au fost incluse în Epon 812. Secțiuni ultrafine, colorate cu acetat de uranil, au fost examineate la un microscop electronic Philips 201.

Pentru studiile de microscopie optică, ovocitele fixate în soluție de glutaraldehidă 2,5% au fost incluse la parafină și secționate la microtom. Secțiunile au fost colorate cu albastru alcian 1% și cu reactiv Schiff, pentru evidențierea vacuolelor corticale și a conținutului lor glicoproteic. Pentru evidențierea proteinelor în ovocite s-a utilizat o colorație cu albastru de bromfenol.

#### REZULTATE

*Structura și ultrastructura vacuolelor corticale din ovocitele mature.* Observațiile de microscopie optică pe secțiuni colorate cu Schiff și albastru alcian evidențiază în citoplasma corticală a ovocitelor mature de *Ictiobus* prezența mai multor straturi de vacuole corticale de mărimi deosebite (Fig. 1 A). Vacuolele corticale dău o reacție pozitivă atât pentru glicoproteinile acide cât și cele neutre, sugerând existența unui conținut heterogen. Vacuolele corticale dispuse imediat sub membrana plasmatică a ovocitelor mature sunt mai mici, în comparație cu cele aflate în straturile mai profunde ale citoplasmei (Fig. 1 A). Acestea din urmă se află disperse printre placetele de vitelus, care se găsesc concentrate sub straturile de vacuole corticale (Fig. 1 B).

Studiile de microscopie electronică pe ovocitele mature de *Ictiobus* au evidențiat ultrastructural existența unor populații de vacuole corticale foarte deosebite ca structură (Fig. 2 A). Unele vacuole corticale apar cu o structură electrono-densă omogenă, în timp ce altele prezintă granule electrono-opace disperse mai ales la periferie (Fig. 2 B). La măriri mai mari se distinge membrana lipo-proteică ce delimită aceste struc-

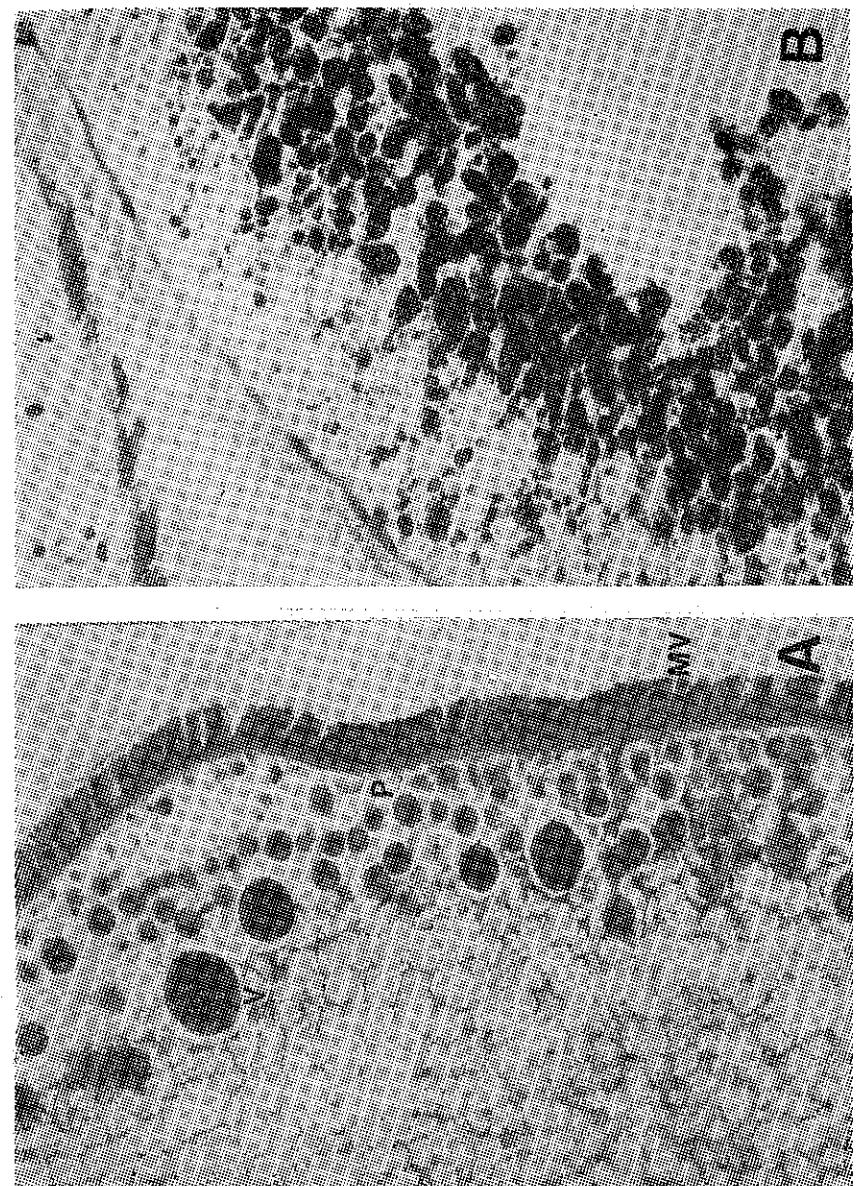


Fig. 1. — A — Imaginea de microscopie optică a unei corticale a zonei de la ovocite mature de *Ictiobus niger* după colorație cu PAS-alcian, care evidențiază straturile de vacuole corticale (20×0,40) B — imaginea de microscopie optică a ovocitului matur de *Ictiobus niger* după colorație cu albastru de bromfenol pentru evidențierea placeteelor de vitelus bogate în proteine (20×0,40)



Fig. 1. — C — imagine de microscopie optică a ovoцитului de *Ictiobus niger* la 5 min după fecundare. Colorație PAS — albastru alcian. Se observă spațiul perivitelin și prezența vacuolelor corticale exocitate ( $20 \times 0,40$ ); D — imagine de microscopie optică a ovoцитului de *Ictiobus niger* la 10 min după fecundare. Colorație PAS — albastru alcian. Se observă spațiul perivitelin larg cu un conținut coloidal și cu numeroase vacuole corticale ( $20 \times 0,40$ ). Prescurtări: MV — microvili; P — membrana plasmatică; V — vacuolă corticală; SP — spațiu perivitelin.

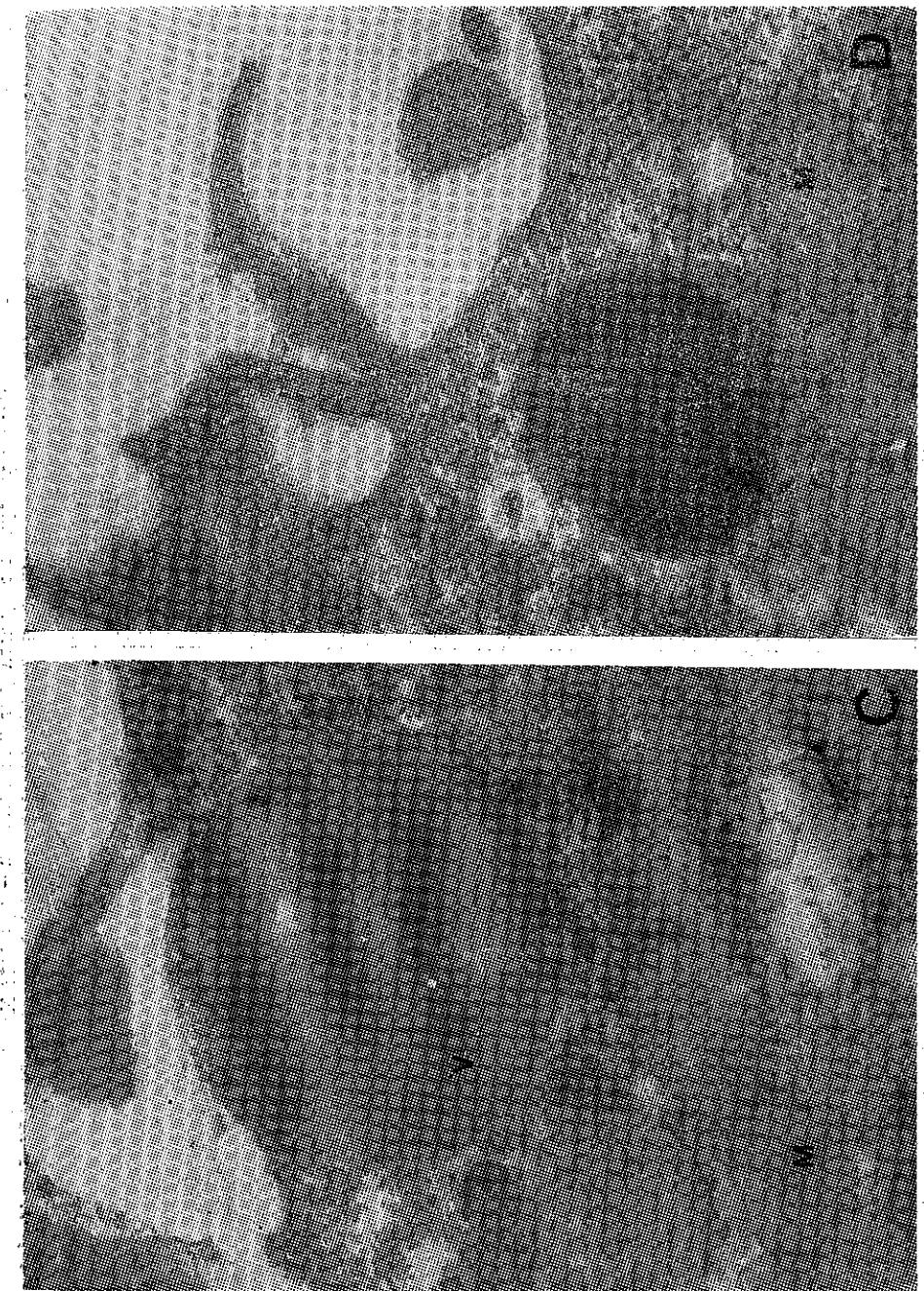


Fig. 2. — C — zonă corticală la 2 min după fecundare; D — zonă corticală la 10 min după fecundare ( $\times 45150$ ).

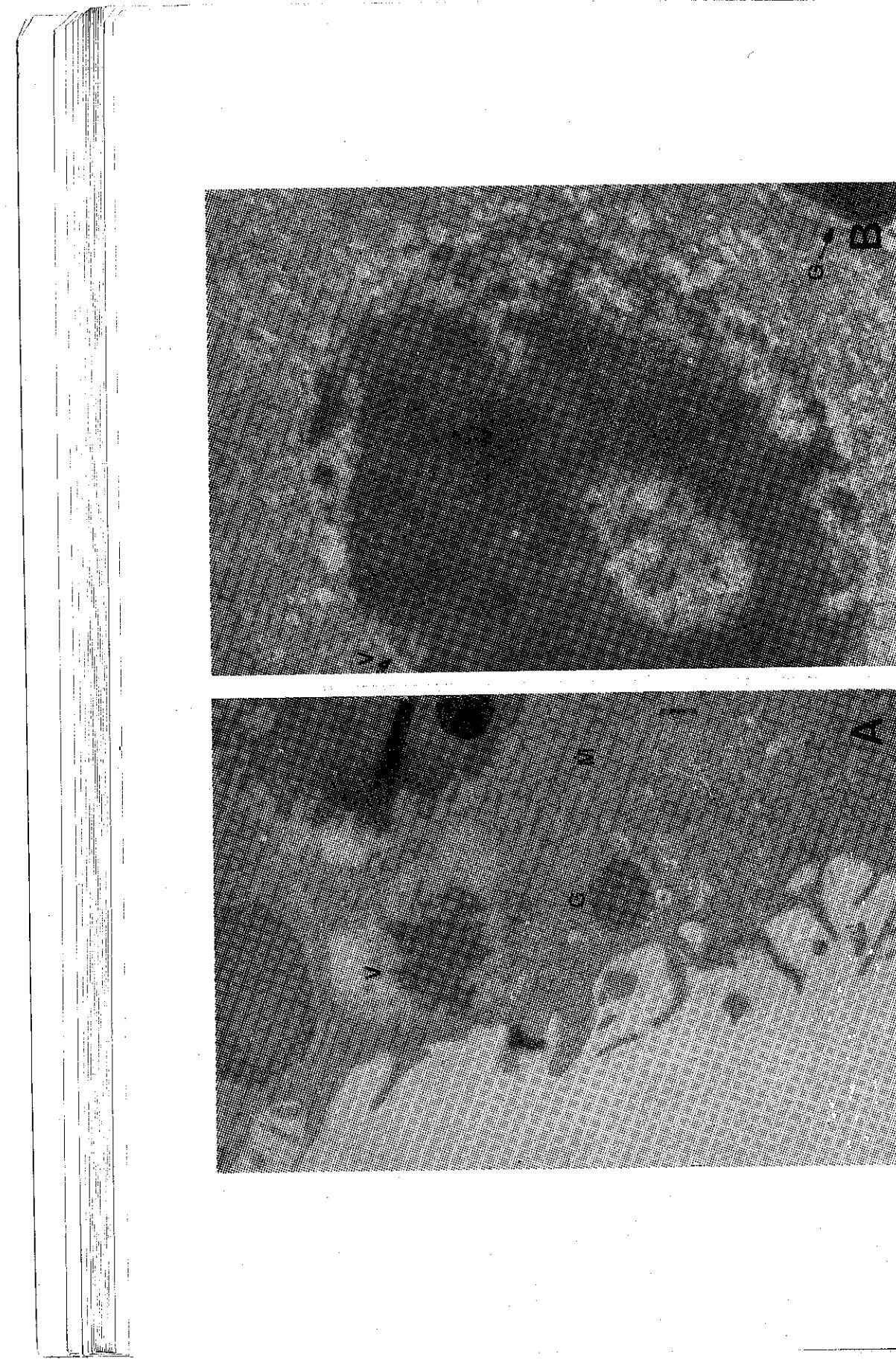


Fig. 2. — Imagini de microscopie electronică a ovocitelor de *Ictiobus*. A — Zona corticală a ovocitului matur nefecundat (X 9870); B — ultrastructura unei vacuoile corticale (X 14980).

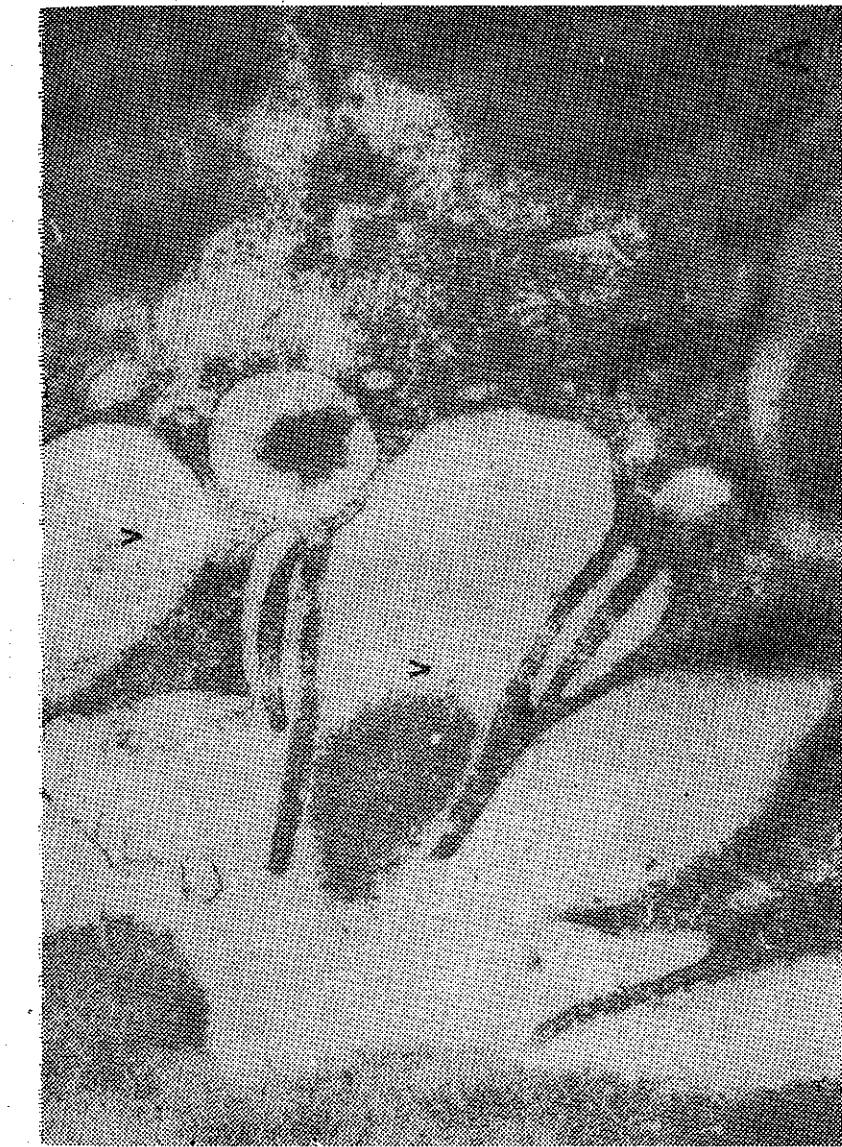


Fig. 3. — Imagini de microscopie electronică a ovocitelor de *Ictiobus niger* după fecundare. A — Zonă corticală la 2 min după fecundare, ce evidențiază procesul de exocitoză al vacuoilor corticale (X 45150).

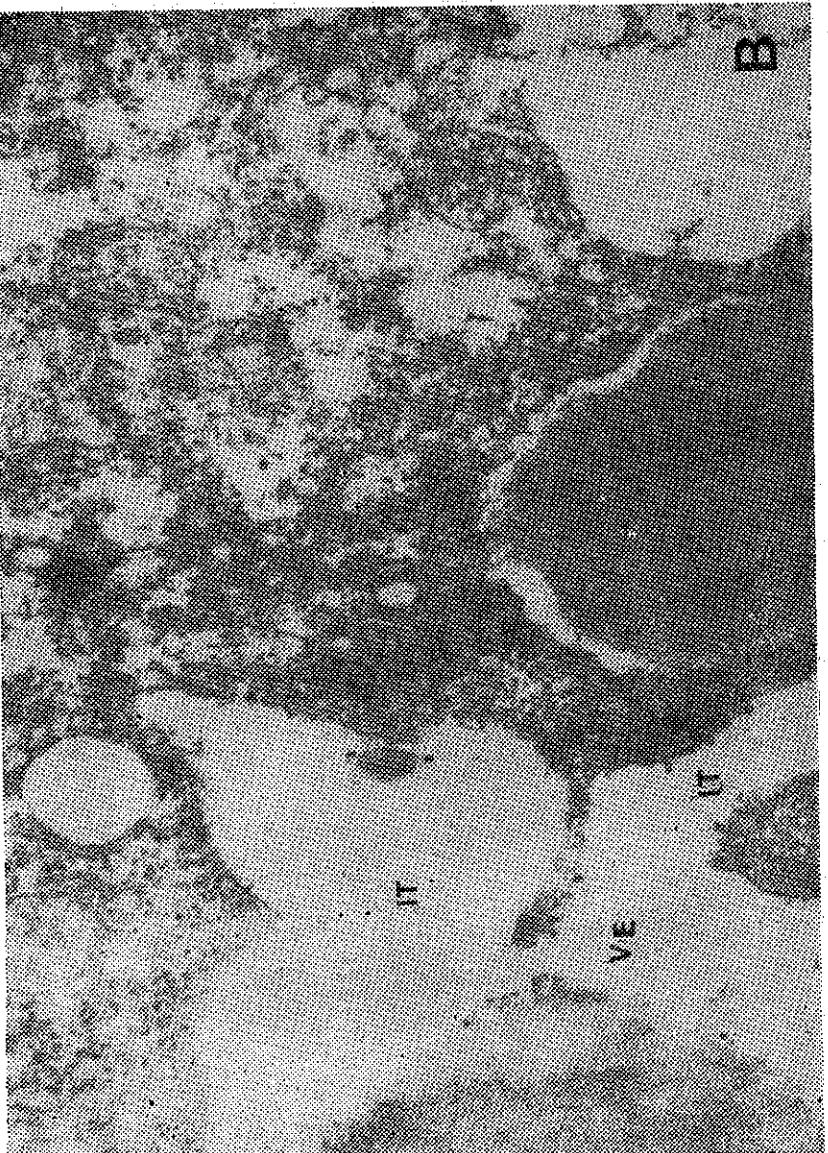


Fig. 3. — B — zonă corticală a ovocitelui la 5 min după fecundare în zona polului animal. Prescurtări: V — vacuolă corticală; G — granul cortical; M — mitocondrie; VE — vacuolă exocitată; IT — incisuri tubulare ale plasmalemei.

3

turi, care vine în contact cu numeroase vezicule citoplasmaticice, probabil vezicule derivate din aparatul Golgi (Fig. 2 B). Membrana plasmatică a ovocitelor mature nefecundate prezintă numeroși microvili, iar vacuolele corticale din stratul periferic sunt dispuse în strânsă apoziție cu membrana plasmatică (Fig. 2 A).

*Modificările morfologice ale ovocitului după fecundare.* Studiile de microscopie optică, realizate pe ovocite la intervale deosebite după fecundare, evidențiază foarte clar o dinamică a procesului de exocitoză a vacuolelor corticale la *Ictiobus niger*. Procesul de exocitoză al vacuolelor corticale începe rapid după fecundare, în zona de intrare a spermatozoidului din regiunea polului animal. La 5 min după fecundare, se constată formarea unui spațiu perivitelin larg, ce conține un material coloidal amorf și numeroase vacuole corticale în curs de dezagregare (Fig. 1 C). Procesul de eliminare al vacuolelor corticale se extinde lent la toată suprafața ovocitei fecundate, astfel că la 10 min după fecundare marea lor majoritate sunt eliberate în spațiul perivitelin al ovocitei (Fig. 1 D).

Observațiile de microscopie electronică obținute pe ovocite după fecundare, evidențiază la suprafața celulei un proces intens de exocitoză. Se observă formarea unor deschideri largi, ca rezultat al fuzionării membranei plasmaticice a ovocitei cu membrana vacuolelor corticale și eliberarea conținutului lor granular spre exterior (Fig. 2 C, 3 A). Imaginile de microscopie electronică sugerează existența unor mecanisme active, capabile să deplaseze straturile interne de vacuole corticale spre periferia celulei. Apare foarte probabilă existența unor filamente citoșcheletice ce coordonează deplasările intracelulare ale unor organite. Tratarea ovocitelor de amfibieni cu citochalasină B determină o reorganizare a vacuolelor corticale, sugerând asocierea acestor structuri cu rețea de filamentelor de actină (2), (20). Această rețea contribuie parțial la contracția corticală și la deplasarea vacuolelor corticale din straturile interne spre periferia celulei. S-a apreciat și existența unui reticul endoplasmic cortical ce cooperează cu rețea de microfilamente și care facilitează exocitoza vacuolelor corticale, asigurind undă de exocitoză în cursul activării ovocitelor (1), (2).

Că urmare a exocitozei vacuolelor corticale și a mișcărilor citoplasmaticice, în citoplasma corticală din regiunea polului animal ocupată anterior de vacuolele corticale, se acumulează numeroase mitocondrii, membrane ale reticulului endoplasmic și ribozomi (Fig. 2 C, 2 D, 3 B).

#### DISCUȚII

Dinamica procesului de exocitoză al vacuolelor corticale constată la *Ictiobus niger* apare similară cu cea descrisă la alte specii de pești (11), (12), (16). Procesul începe la polul animal în zona unde pătrunde spermatozoidul și se termină la polul vegetal, în decurs de circa 10 min de la fecundare. Totuși, timpul necesar pentru eliminarea totală a vacuolelor corticale apare diferit în funcție de specia de pește analizată. La unele specii de pești (3), (9), exocitoza se desfășoară rapid în decurs de 1—5 min, pe când la alte specii, exocitoza vacuolelor corticale se extinde pe o perioadă de 10—30 min (16), (19). Un proces de exocitoză mai lent, așa cum s-a observat și la *Ictiobus niger*, se poate datora prezenței mai

multor straturi de vacuole corticale în ovocite. La *Fundulus heteroclitus* există un singur strat de vacuole corticale și exocitoza lor are loc în decurs de 2 min de la fecundare (3).

Mecanismele celulare ce declanșează fuziunea vacuolelor corticale cu membrana plasmatică ovocitară nu sunt lămurite. S-a constatat că fecundarea ovocitei și activarea să sunt însoțite de o creștere a permeabilității membranei celulare pentru ionii de calciu, care este inițiată la locul de intrare al spermatozoidului și se propagă de-a lungul întregii membrane celulare (12), (19), (27). Trebuie subliniat faptul că exocitoza vacuolelor corticale din ovocitele fecundate de Teleosteeni este influențată de temperatură, suferind și interferență altor factori. Cercetările efectuate pe ovocite de mamifere au arătat existența unor interrelații între filamentele de actină și membrana plasmatică, iar modificările acestor asocieri ce sunt alterate în urma fecundării ar constitui un factor ce favorizează fuziunile de membrană (1). Indirect, s-a sugerat și participarea microtubulilor în stabilizarea porului de exocitoză (16). În afara acestor aspecte, au fost propuse și alte mecanisme, ca de exemplu producerea de ințizitel-trifosfat și diacilglicerol. Diacilglicerolul prin activarea proteinkinazei C, poate influența exocitoza vacuolelor corticale (5).

Studiile comparative efectuate pe pești și alte specii de animale au dus la concluzia că exocitoza vacuolelor corticale constituie unul din factorii ce determină blocarea polispermiei (8), (10), (23). Materialul coloidal eliminat din vacuolele corticale în spațiul perivitelin, determină ridicarea corionului și constituie un factor de aglutinare pentru spermatozoizi. Deși există unele păreri că la blocarea polispermiei participă și alți factori, aportul lor nu apare esențial. Exocitoza vacuolelor corticale joacă un rol important în formarea membranei plasmatici a ovocitei fecundate. Integrarea membranei vacuolelor corticale în membrana plasmatică a ovocitei fecundate determină o creștere a suprafeței totale de membrană și îi conferă o compozitie proteică particulară. Creșterea suprafeței de membrană este sugerată de formarea unor microvili și a fost observată la numeroase specii de pești (11), (13), (21). S-a sugerat și părerea că o parte din excesul de membrane adus de vacuolele corticale este eliminat în spațiul perivitelin (19), proces normal pentru ovocitele ce prezintă mai multe straturi de vacuole corticale în structura lor.

După eliminarea tuturor vacuolelor corticale, în ovocita activată are loc un proces de reorganizare a unor componente intracelulare în regiunea polului animal. Studiile de microscopie electronică evidențiază în regiunea corticală a polului animal o concentrare de mitocondrii, membrane ale reticulului endoplasmic și numeroși ribozomi, care probabil vor facilita inițierea diviziunilor celulare. În ovocitele de *Fundulus*, fluxul de citoplasmă spre polul animal are loc numai după eliminarea vacuolelor corticale (3). O exocitoză alterată a vacuolelor corticale afectează semnificativ capacitatea de activare a ovocitelor fecundate.

#### BIBLIOGRAFIE

1. BEMENT W. M., CAPCO D. G., J. Electr. Microsc. Tech., 16: 202-234, 1960.
2. BEMENT W. M., CAPCO D. G., J. Cell. Biol., 108: 885-892, 1989.
3. BRUMMETT R. A., DUMONT J. N., J. Exp. Zool., 216: 63-79, 1981.
4. BEAMS H. W., KESSEL R. G., Am. J. Anat., 136: 105-122, 1973.

5. CRAN D. G., ESPER C. R., J. Reprod. Fert. Suppl., 42: 177-188, 1990.
6. DONOVAN M., HART N. H., J. Exp. Zool., 237: 391-405, 1986.
7. EMELIANOVA N. G., MAKEEVA A. P., Vopr. Ichtiol., 23: 81-86, 1983.
8. GINSBURG A. S. in Fertilization in Fishes and the Problem of Polyspermy, ed. Detlef T.A., Israel Program for Scientific Translation, 1972.
9. HART N. H., YU S. F., J. Exp. Zool., 21: 137-155, 1980.
10. IWAMATSU T., Annal. Zool. Jap., 41: 148-153, 1968.
11. IWAMATSU T., OHTA T., Roux's Archives of Develop. Biol., 180: 297-309, 1976.
12. IWAMATSU T., YOSHIMOTO Y., HIRAMOTO Y., Develop. Biol., 125: 451-457, 1988.
13. KOBAYASHI W., J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Sci. Zool., 24: 87-102, 1985.
14. MAKEEVA A. P., Ribnoe Hozinstvo, 11: 25-28, 1980.
15. MESTER L., SCARLAT A., SCRIPCARIU D., MESTER R., Travaux du Mus. d'Hist. Nat. „Gr. Antipa”, 26: 233-238, 1984.
16. MESTER L., SCRIPCARIU D., MARINESCU F., NICHITEANU R., MESTER R., Travaux du Mus. d'Hist. Nat. „Gr. Antipa”, 27: 237-242, 1985.
17. NICULESCU-DUVAZ M., GIURCA R., POPOVICI V., Bul. Cer. Piscicole, 32: 56-66, 1979.
18. NOSEK J., Histochem. J. 16: 435-437, 1984.
19. OHTA T., IWAMATSU T., TANAKA M., YOSHIMOTO Y., Anatomical Rec., 227: 486-496, 1990.
20. RYABOVA L. V., BETINA M. I., VASSETZKY S. G., Cell Differ., 19: 89-96, 1986.
21. SCHROEDER T. E., Develop. Biol., 70: 306-326, 1979.
22. SELMAN K., WALLACE R. A., BARR V., J. Exp. Zool., 246: 42-56, 1988.
23. SCHUEL H., Gamet. Res., 1: 299-382, 1978.
24. SCHUEL H., in Biology of Fertilization, vol. 3, ed. Metz C.B., Monroy A., Acad. Press New York, pp. 1-43, 1985.
25. WALLACE R. A., SELMAN K., J. Electron. Microsc. Tech., 16: 175-201, 1990.
26. YAMAMOTO T., Int. Rev. Cytol., 12: 361-405, 1961.
27. YOSHIMOTO Y., IWAMATSU T., HIRANO K., HIRAMOTO Y., Dev. Growth and Differ., 28: 583-596, 1986.

Primit în redacție la 24 mai 1993

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

## STUDII PRIVIND ROLUL CONDROITIN SULFATULUI ÎN INDUCEREA REACȚIEI ACROZOMALE LA SPERMATOZOIZII DE SUINE

OILIA ZĂRNEȘCU\*, ANCA OANCEA\*\*, LUCIA MOLDOVAN\*\* și ST. MANTEA\*\*\*

The aim of the present study was to evaluate effects of chondroitin sulfate on inducing acrosome reaction in swine sperm.

Washed swine spermatozoa were incubated for 1, 9 and 12 h with 0, 10, 50 or 100 µg/ml chondroitin sulfate. Acrosome reactions were evaluated by a light microscope procedure. The addition of chondroitin sulfate significantly increased the incidence of acrosome reactions. The highest percentage of sperm exhibiting an acrosome reaction was to 100 µg/ml chondroitin sulfate. The optimum time necessary to induced the acrosome reaction in swine spermatozoa was 9 h.

La mamifere, capacitatea și reacția acrozomală sunt procese esențiale care preced fertilizarea propriu-zisă, (1).

Procesul de fertilizare la mamifere este dependent, în mare măsură, de prezența unor glicozaminoglicani în segmentele tractului reproducător femel, unde se găsesc atașați la un miez proteic sub formă de proteoglicani (2). La majoritatea speciilor, populația de spermatozoizi fertili ce ajunge în oviduct au acrozomul intact în momentul întâlnirii cu celulele cumulusului cophorus (3). Inițierea fertilizării implică însă inducerea reacției acrozomale, ceea ce sugerează că membrana plasmatică ce acoperă domeniul acrozomal constituie situsul unor din moleculele de recunoaștere a zonei pellucida (4).

Printre factorii care induc reacția acrozomală, adică conversia zimogenului proacrozină la acrozină (5), se inseră: galactosyltransferaze, autoantigenele spermaticice, antigenul PH-20 (6). Glicoconjugatele sunt implicate în recunoașterea spermatozoid-oocit, atât la vertebrate, cât și la nevertebrate. În timp ce evenimentele procesului de fertilizare diferă între specii, există un remarcabil conservatorism în abilitatea spermatozoidului de a folosi glicoconjugatele din secrețiile tractului genital și din matrixul extracellular al oocitului.

Studii anterioare au evidențiat rolul condroitin sulfatului în inducerea reacției acrozomale *in vitro* la spermatozoizii bovini (7), (8).

Scopul prezentei lucrări a fost evidențierea printr-o metodă de microscopie optică a inducerii reacției acrozomale la spermatozoizi de suine de către condroitin sulfatul extras și purificat de noi.

### MATERIAL SI METODE

Materialul seminal de suine (procurat de la ROMSUN-TEST Periș) a avut următoarele caracteristici: volumul ejaculatului 300 ml; spermatozoizi viabili 75%; densitatea  $4 \cdot 10^6$ /ml.

*St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 105-108, București, 1993.*

Spermatozoizii au fost separați de plasma seminală prin centrifugare la 500 r.p.m. timp de 15 minute, la temperatura camerei. Sedimentul a fost resuspendat în ser fiziologic și în mediul Tyrode (163 mM NaCl și 2,25 mM CaCl<sub>2</sub>) modificat (9), care conținea albastru de trypan 0,4%.

Spermatozoizii au fost incubați apoi în prezență de condroitin sulfat în concentrații variabile: 10, 50 și 100 µg/ml, la temperatura de 37°C, timp de 1 oră, 9 ore și respectiv 12 ore. S-a realizat, de asemenea, o probă martor în aceleși condiții, dar în absență condroitin sulfatului.

Condroitin sulfatul folosit în acest experiment a fost obținut de noi din trahei bovine (10).

Reacția acrozomală s-a evaluat printr-o metodă de microscopie optică. Din fiecare probă s-au realizat froturi care au fost colorate prin tehnica Bryan și Akruck, modificată (11). Colorarea s-a realizat inițial cu o soluție galben naftol S 0,1% în acid acetic 1% și apoi cu un amestec format din galben naftol S 0,2% și eritrozină B 0,2%. Froturile au fost deshidratate, clarificate și montate în balsam de Canada. Pentru determinarea procentului de spermatozoizi ce au suferit reacția acrozomală s-au luat în considerație cel puțin 100 celule.

#### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin incubarea spermatozoizilor de vier în mediul Tyrode ce conține trei concentrații de condroitin sulfat (10, 50 și respectiv 100 µg/ml), la temperatura de 37°C și tempi diferiți, s-au obținut rezultatele din figura 1. Datele prezentate arată că procentul cel mai mare de spermatozoizi ce

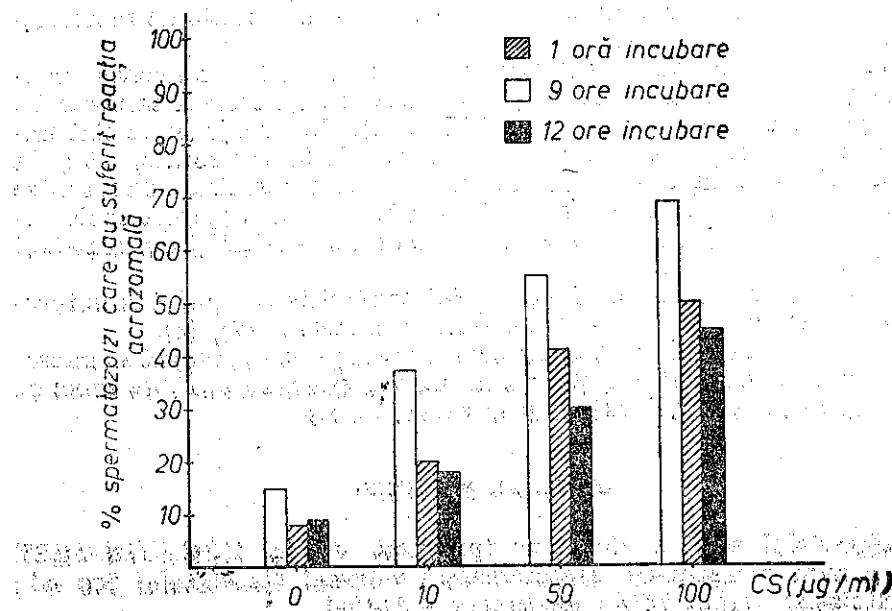


Fig. 1. — Procentul de spermatozoizi ce au suferit reacția acrozomală în prezență de 10, 50 și 100 µg/ml condroitin sulfat și în absență acestuia (0).

Fig. 2. — Spermatozoizi care au suferit reacția acrozomală, incubați în prezență de 100 µg/ml condroitin sulfat timp de 9 ore, colorație galben naftol S și eritrozină B, ×200

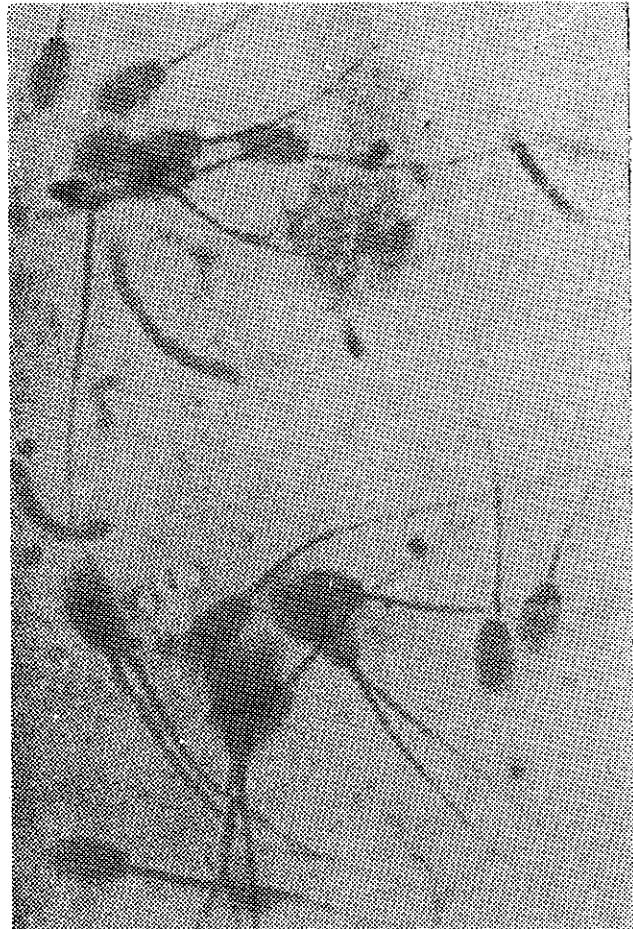


Fig. 3. — Spermatozoizi fără reacție acrozomală, incubați în mediu fără condroitin sulfat, timp de 9 ore, colorație galben nafton S și eritrozină B, ×200.

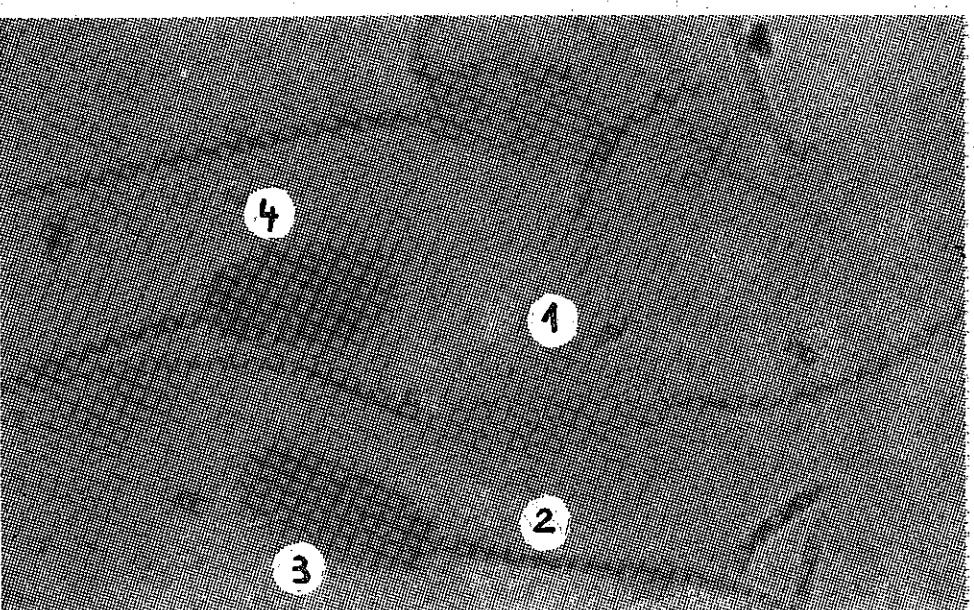


Fig. 4. — Categoriile de spermatozoizi evidențiate în urma colorării cu galben naftol S și eritrozină B,  $\times 400$ : 1. viabil cu acrosom intact; 2. viabil cu acrosom detașat; 3. neviabil cu acrosom intact; 4. neviabil cu acrosom detașat.

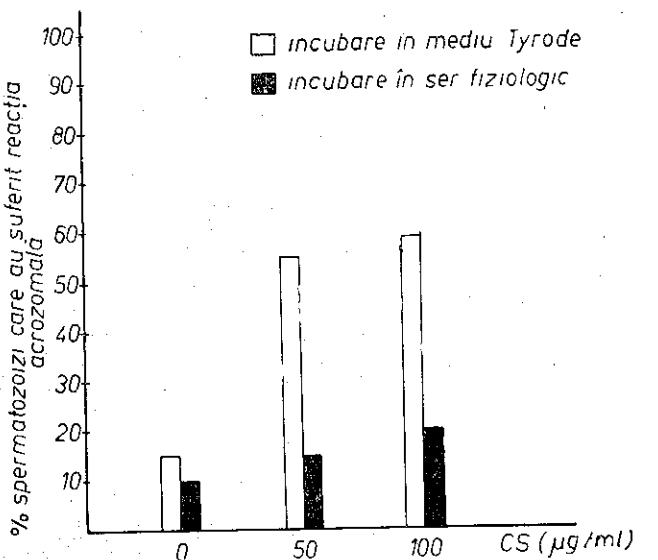


Fig. 5. — Procentul de spermatozoizi ce au suferit reacția acrozomală, incubați în ser fiziologic și în mediul Tyrode, în prezență de 50 și 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  condroitin sulfat.

au suferit reacția acrozomală (69%) a fost obținut în mediu ce conținea 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  condroitin sulfat (figura 2) comparativ cu proba fără condroitin sulfat (figura 3).

De asemenea, timpul optim de incubare a spermatozoizilor s-a dovedit a fi de 9 ore. Spre deosebire de spermatozoizii bovin care au suferit reacția acrozomală într-un procent mare (75%) după 22 ore de incubare în mediu cu condroitin sulfat (12), rezultatele noastre sugerează că spermatozoizii de vier nu-și pot păstra mult timp viabilitatea „in vitro”.

Datele obținute privind inducerea reacției acrozomale la spermatozoizii de suine folosind condroitin sulfat din trahei bovine, se corelează cu studiile anterioare (13) care au demonstrat că un glicozaminoglican de tip condroitin sulfat din secrețiile uterine de porcine este implicat în conversia proacrozinei în acrozină.

Concentrațiile de condroitin sulfat folosite în experimentele noastre au fost în limite fizioleice, deoarece s-a raportat că în lichidul follicular de bovine și porcine, acest glicozaminoglican se găsește în concentrație de aproximativ 0,2 mg/ml (14).

Prin colorația folosită, cu galben naftol S și eritrozină B, se evidențiază în microscopia optică patru categorii de spermatozoizi: viabili cu acrosom intact, viabili cu acrosom detașat, neviablei cu acrosom intact și neviablei cu acrosom detașat (figura 4). Vizualizarea reacției acrozomale în microscopia optică se bazează pe incapacitatea spermatozoizilor ce au suferit acest proces de a prelua colorantul. Astfel, spermatozoizii ce au suferit reacția acrozomală apar incolori sau roz pal, în timp ce aceia care nu au suferit acest proces sunt închiși la culoare. Acrosomul și regiunea fără acrosom a spermatozoizilor morți este mult mai închisă la culoare decât respectivele zone din spermatozoizii vii.

Am studiat, de asemenea, influența mediului de incubare asupra inducerii reacției acrozomale *in vitro*. Astfel, incubând spermatozoizii în ser fiziologic, în prezență de 50 și 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  condroitin sulfat, timp de 9 ore la temperatura de 37°C, s-au obținut rezultatele prezentate în figura 5. Procentul cel mai mare de spermatozoizi care au suferit reacția acrozomală, în acest caz, este de 26%. Aceasta demonstrează că mediul Tyrode, care conține și clorură de calciu, este preferabil pentru incubarea spermatozoizilor. Datele noastre sunt în concordanță cu cele care demonstrează că prezența  $\text{Ca}^{2+}$  în mediu, conduce la creșteri semnificative ale procentului de spermatozoizi care au suferit reacția acrozomală (15).

În concluzie, rezultatele obținute de noi demonstrează că glicozaminoglicanul condroitin sulfat, extras din trahei bovine, induce reacția acrozomală la spermatozoizii de suine.

#### BIBLIOGRAFIE

- KUSUNOKI, H., KATO, S., KANDA, S., J. Exp. Zool., 250: 346, 1989.
- BARLOW, H. G., Thromb. Res., 31: 513, 1983.
- BALL, G. D., BELLIN, M. E., AX, R. L., FIRST, N. L., Mol. Cell. Endocrinol., 28: 113, 1982.
- PHILLIPS, D. M., J. Ultrastruct. Res., 72: 1, 1980.
- GALLAGHER, J. T., HAMPSON, I. N., Biochem. Soc. Trans., 12: 541, 1984.
- WASSARMAN, P. M., Science, 235: 554, 1987.

7. AX, R. L., DICKESON, K., LENZ, R. W., J. Dairy Sci. 68 : 387, 1984.
8. LENZ, R. W., MARTIN, J. L., BELLIN, M. E., AX, R. L., J. Dairy Sci., 71 : 1073, 1987.
9. LEIBFRIED, M. L., BAVISTER, B. D., Gamete Res., 4 : 57, 1981.
10. NEGROIU, G., MIRANCEA, N., MIRANCEA, D., OANCEA, A., MOLDOVAN, L., Rev. Roum. Biochim., 29, 1 : 23, 1992.
11. BRYAN, J.H.D., AKRUK, S. R., Stain. Technol., 52 : 47, 1977.
12. LENZ, R. W., BALL, G. D., LOHSE, J. K., FIRST, N. L., AX, R. L., Biol. Reprod., 28 : 683, 1983.
13. WINCEK, T. J., PARRISH, R. F., POLAKOSKI, K. L., Science, 203 : 553, 1979.
14. AX, R. L., RYAN, R. J., Biol. Reprod. 20 : 1123, 1979.
15. LEE, C. N., LENZ, R. W., AX, R. L., J. Anim. Sci., 57 : 352, 1983.

Primit în redacție la 5 mai 1993

\* Facultatea de Biologie  
București, Splaiul Independenței 91-95

\*\* Institutul de biologie dezvoltării  
București, Splaiul Independenței 296

\*\*\* ROMSUIN - TEST, Periș

## DISTRIBUȚIA GLICOZAMINOGLICANILOR ÎN TRACTUL REPRODUCĂTOR FEMEL DE SUINE

ANCA OANCEA\*, OTILIA ZĂRNESCU\*\*, LUCIA MOLDOVAN\* și MARIA CALOIANU\*

Our objective was to isolate glycosaminoglycans from various regions of the female genital tract in swine in order to establish their concentrations and composition. Oviducts, uterine horns and cervixes from 20 female swine reproductive tracts in various phases of the estrous cycle were obtained at slaughter. The levels of the glycosaminoglycans at every studied segment were quantitated by uronic acid determination. The concentrations of glycosaminoglycans decreased significantly from the cervix to oviducts. It was observed, also, that in the individuals being in the estral cycle phase after ovulation, the amount of glycosaminoglycans in all the segments is higher than in the corresponding segments from the individuals before the ovulation. The electroforetic patterns of the glycosaminoglycans extracted by us from the female swine reproductive tract have shown that these are of chondroitin sulfate type.

Înaintea fertilizării, spermatozoizi trebuie să suferă un proces denumit reacție acrozomală. S-a observat că diferenți glicozaminoglicani au un rol semnificativ în declanșarea reacției acrozomale *in vitro* la bovine (1) (2) și iepure (3) și că influența lor asupra acestui proces este corelată cu gradul lor de sulfatare.

Proteoglicanii izolați din lichid folicular bovin au rolul de a crește procentul de spermatozoizi care suferă reacția acrozomală *in vitro*. Studiile efectuate (4) au arătat că numai lanțurile polizaharidice de glicozaminoglicani ale proteoglicanicilor sunt componente active în influențarea declanșării reacției acrozomale. S-a observat, de asemenea, că reacția acrozomală (conversia proacrozinei la acrozină) este accelerată de un glicozaminoglican uterin (5) sau de glicozaminoglicani disponibili comercial (6).

Toate rezultatele demonstrează că interacțiile spermatozoizilor cu glicozaminoglicanii în tractul reproducător femel au o importanță deosebită pentru realizarea unei fertilizări normale.

Obiectivul acestei lucrări este de a demonstra existența unor cantăți semnificative și variabile de glicozaminoglicani în diferite segmente ale tractului reproducător femel de suine și de a caracteriza biochimic și electroforetic aceste tipuri.

### MATERIALE ȘI METODE

Tracturile reproducătoare femele de suine (de la 20 de indivizi) au fost prelevate imediat după sacrificarea seroafelor, de la abatorul Romsuin-Test, Periș.

Stadiul ciclului estral al fiecărui individ a fost estimat în funcție de mărimea și morfologia corpilor galbeni (7). Din totalul de 20 tracturi reproducătoare femele studiate, 10 au fost de la femele aflate înaintea

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 109-113, București, 1993

ovulației și 10 de la femele la care ovulația a avut loc cu 1–2 zile înaintea sacrificării.

De la toate tracturile reproducătoare femele s-au prelevat segmente de țesut din următoarele regiuni: infundibul, zonă ampulară, istm, joncțiunea utero-tubără, baza cornelor uterine (fig. 1). Din fiecare fragment s-a prelevat mucoasă internă, care a fost uscată. S-a realizat apoi hidroliza acidă (cu HCl 6N) a fragmentelor de țesut uscat, timp de 8 ore, la 105°C. Din hidrolizatele obținute s-a dozat cantitatea de acizi uronici după metoda Bitter-Muir (8).

Pentru determinarea tipului de glicozaminoglican din tractul reprodusător femei, acesta a fost extras și purificat conform (9). Materialul obținut a fost studiat prin electroforeză, comparativ cu glicozaminoglicani etalon (contro-urită sulfat Fluka și heparină Evans Medical LTD). Electroforeza s-a realizat după metoda Mec Devitt și Muir (10), în gel de agaroză 0,7% și acriladmidă 1,2%. Migrarea a durat 3 ore, la o intensitate a curentului de 12 mA. Identificarea s-a făcut prin colorare cu albastru de toluidină 0,2% iar decolorarea cu acid acetic 3%.

#### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datorită faptului că la unele specii de animale domestice capacitatea și reacția acrozomală sunt induse în prezența glicozaminoglicanicilor, studiile noastre au abordat aspecte privind evidențierea concentrației glicozaminoglicanicilor la nivelul diferitelor segmente ale tractului genital femel de la suine (specie mai puțin studiată din acest punct de vedere).

După cum se știe, mușcul din tractul reprodusător femei are un rol important în transportul spermatozoizilor și ovulelor. Glicozaminoglicanicii din secrețiile tractului reprodusător au capacitatea de a se lege specific de spermatozoizi într-o manieră tipică unei interacții receptor-ligand (11).

Tractul genital femel al mamiferelor prezintă o porțiune inițială — oviductul; în continuarea căreia se găsește uterul urmat de cervix. La rîndul său, oviductul prezintă trei segmente: infundibul, ampula și istm.

Oviductul are un rol important în transportul gametelor, reprezentând locul unde are loc fecundația și asigură, pentru o perioadă scurtă de timp, supraviețuirea gametelor și a zigotului.

Rezultatele noastre privind variația concentrației de glicozaminoglicani la nivelul diferitelor segmente ale tractului genital femel de suine,

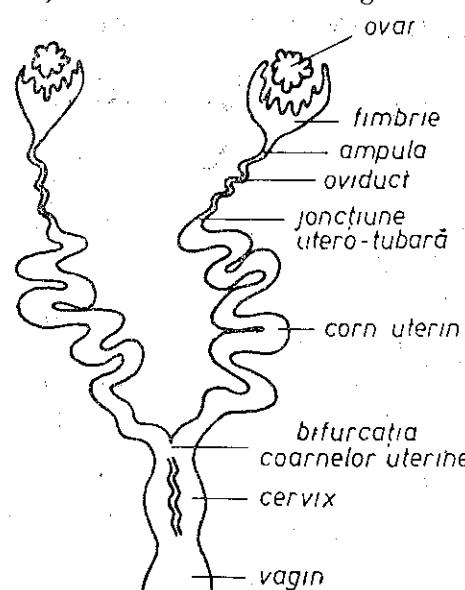


Fig. 1. — Schema tractului reprodusător feminin la suine.

arată o scădere semnificativă a conținutului de glicozaminoglicani de la cervix spre oviduct la toate animalele studiate. Datele obținute sunt prezentate în tabelul 1 și reprezintă media rezultatelor pentru același segment de la toți indivizii studiați.

Tabelul nr. 1  
Concentrația glicozaminoglicanicilor în diferite segmente ale tractului genital femel de suine

Segmentul de tract	Concentrația glicozaminoglicanicilor*
Infundibul	0,53
Porțiunea ampulară	0,66
Oviduct — porțiunea mediană	0,68
Joncțiunea utero-tubără	0,99
Baza coarnelor uterine	1,18
Cervix	1,26

\* Valorile sunt exprimate ca grame acizi uronici la 100 grame țesut uscat.

Rezultatele obținute de noi se coreleză cu cele raportate în literatură pentru alte specii de animale domestice (12), (13). Glicozaminoglicanii au fost identificați, de asemenea, în tracturile reprodusătoare femele de iepure (14) și om (15).

Studiind concentrația de glicozaminoglicani comparativ pentru aceleasi segmente de tract proveniente de la animale aflate în diferite faze ale ciclului estral, s-a observat că există o variație a concentrației cu faza ciclului.

La indivizii la care ovulația a avut loc cu 1–2 zile înaintea sacrificării, concentrația cea mai mare de glicozaminoglicani (1,35%) apare la nivelul regiunii ampulare a oviductului (fig. 3-II), în timp ce la indivizii la care

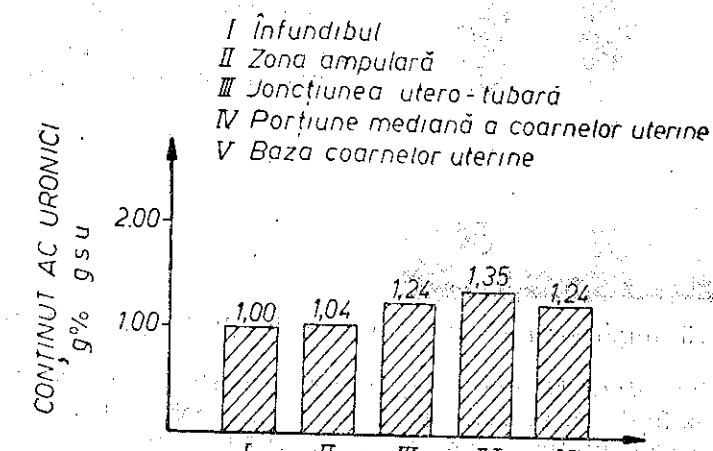


Fig. 2. — Concentrația glicozaminoglicanicilor în segmentele tractului reprodusător feminin de suine — 5–6 zile înaintea ovulației

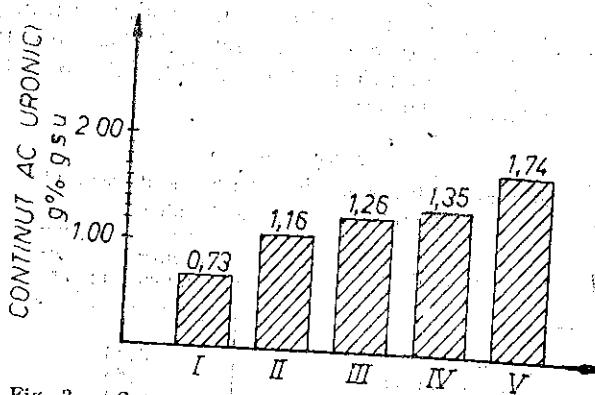


Fig. 3. — Concentrația glicozaminoglicanicilor în segmentele tractului reprodusor femel de suine – 1-2 zile după ovulație.

nu a avut loc ovulația, cantitatea cea mai mare de glicozaminoglicani (1,24%) s-a găsit la nivelul joncțiunii utero-tubare (fig. 2-III).

După cum se stie, la suine situsul de fertilizare se află la nivelul joncțiunii ampulo-istmice. Valorile crescute de glicozaminoglicani găsite de noi la nivelul joncțiunii ampulare la indivizi care au suferit ovulația

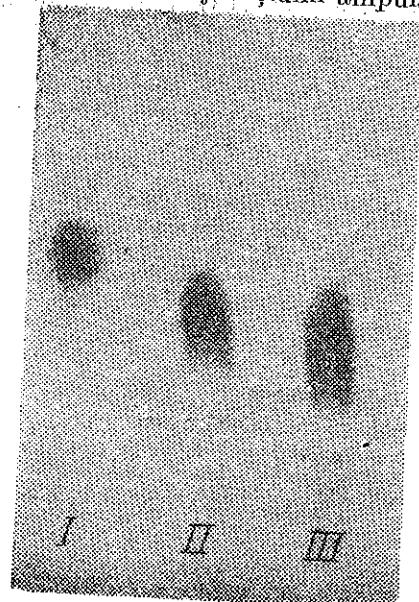


Fig. 4. — Electroforeza în gel de agaroză-poliacrilamidă a glicozaminoglicanicilor: I — heparină; II — condroitin sulfat; III — glicozaminoglican din tractul genital femel de suine.

demonstrează implicarea acestor macromolecule în procesul de fertilizare.

La suine, uterul și coarnele uterine sunt foarte dezvoltate și prezintă numeroase falduri. La această specie, nidarea ovulului fecundat, se produce în coarnele uterine. Comparind diferențele segmente ale coarnelor uterine în ceea ce privește cantitatea de glicozaminoglicani, am constatat că proporția cea mai mare se găsește fie la nivelul median al coarnelor uterine – în cazul indivizilor neovulați (fig. 2-IV), fie la nivelul bazei

coarnelor uterine – la indivizi proaspăt ovulați (fig. 3 – V). Procentul cel mai mare de glicozaminoglicani (1,74%) găsit la nivelul bazei coarnelor uterine la individul proaspăt ovulat, poate fi legat de pregătirea acestui segment pentru nidarea oului.

Datele raportate anterior în literatura de specialitate relevă că, în general, în tractul reprodusor estrogenii stimulează producerea de glicozaminoglicani, în timp ce progesteronul are un efect inhibitor (16).

Pentru a determina tipul de glicozaminoglican prezent în mucoasa internă a tractului reprodusor femel de suine, am realizat o extracție a acestuia (prin hidroliză enzimatică cu papaină, urmată de precipitații succesive cu etanol) și apoi electroforeza extractului obținut, comparativ cu glicozaminoglicani etalon (condroitin sulfat Fluka și heparină Evans Medical LTD). Studiul electroforetic (fig. 4) demonstrează că glicozaminoglicanul din tractul genital femel de suine este de tip condroitin sulfat.

#### CONCLUZII

În secrețiile tractului reprodusor de suine există glicozaminoglicani a căror concentrație variază de la un segment de tract la altul. Noi am observat o scădere a conținutului de glicozaminoglicani de la cervix spre oviduct, ceea ce poate servi la asigurarea că reacția acrozomală nu are loc prematur.

De asemenea, am observat că există o variație a concentrației glicozaminoglicanicilor la nivelul același segment în funcție de fază ciclului estral, ceea ce semnifică o reglare hormonală a secreției acestora.

Studiul electroforetic al glicozaminoglicanicilor din tractul reprodusor femel de suine, comparativ cu glicozaminoglicani etalon, a demonstrat că glicozaminoglicanii studiați sunt de tip condroitin sulfat.

#### BIBLIOGRAFIE

- HANDROW R. R., LENZ R. W., AX R. L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 107 : 1326, 1982.
- LENZ R. W., BALL G. D., LOHSE J. K., FIRST N. L., AX R. L., Biol. Reprod., 28 : 683, 1983.
- LENZ R. W., BELLIN M. E., AX R. L., Gamete Res., 8 : 11, 1983.
- LENZ R. W., AX R. L., GRIMEK H. J., FIRST N. L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 106 : 1092, 1982.
- WINCEK T. J., PARRISH R. F., POLAKOSKI K. L., Science, 203 : 553, 1979.
- PARRISH R. F., WINCEK T. J., POLAKOSKI K. L., J. Androl., 1 : 89, 1980.
- IRELAND J. J., MURPHEE R. L., COULSON P. B., J. Dairy Sci., 63 : 155, 1980.
- BITTER T., MUIR H. M., Anal. Biochem., 4 : 330, 1962.
- MOLDOVAN L., OANCEA A., St. Cerc. Biochim., 35 : 27, 1992.
- McDEVITT C. A., MUIR H., Anal. Biochem., 44 : 612, 1971.
- HANDROW R. R., BOEHM S. K., LENZ R. W., ROBINSON J. A., AX R. L., J. Androl., 5 : 51, 1984.
- LEE C. N., AX R. L., J. Dairy Sci., 67 : 2006, 1984.
- LEE C. N., CLAYTON M. K., BUSHMEYER S. M., FIRST, N. L., AX R. L., J. Anim. Sci., 63 : 861, 1986.
- JANSEN R. P. S., BAJPAI V. K., Biol. Reprod., 26 : 155, 1982.
- KITAMURA K., AKIRA I., MORI Y., HIRAKAWA S., Biochem. Med., 23 : 159, 1980.
- ZACHARIAE F., THORSOE H., in *Hormone and connective tissue*, G.A. Hansen, p. 257, 1966.

Primit în redacție la 5 mai 1993

\* Institutul de biologie dezvoltării  
București, Splaiul Independenței nr. 296

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

100

## CĂILE PRIN CARE NUCLEUL PARAVENTRICULAR HIPOTALAMIC (PVH) ȘI ZONA HIPOTALAMICĂ MEDIALĂ SIMPATICĂ AFECTEAZĂ ERITROPOIEZA

V.P. HEFCO, ANA OLARIU, I. NEACŞU și ANA ISAICUL\*

In the male rats, mechanical lesion of the PVH induced a long lasting increase in the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin and mean erythrocytary hemoglobin concentration and a decrease of the mean erythrocytary volume. Mechanical isolation of the PVH, either alone or together with the medial hypothalamic sympathetic area, induced the same sense of modifications which, as a rule, are non-significant. It seems that PVH affects erythropoiesis mainly through its role on the endocrine system control.

Eritropoieza este controlată în primul rind de eritropoietina renală, reglată de hipoxie și de o serie de hormoni precum testosteronul, hormonii tiroidieni, somatotropina, ACTH, glucocorticoizi și de catecolamine prin mecanismul beta-adrenergic (6).

Nucleul paraventricular hipotalamic (PVH) este implicat în reglarea și integrarea diferitelor funcții neuroendocrine și vegetative, inclusiv cele homeostatice (19). Componenta parvocelulară a PVH conține neuroni ce secreta corticoliberină, tiroliberină, peptidul intestinal vasoactiv (VIP), somatostatină, dopamină, angiotensină II și o varietate de substanțe opioide (9, 11, 19). Aceste substanțe sunt eliberate în zona neurohemală externă a eminentei mediane, de unde, prin sistemul vascular port-hipofizar, ajung în adenohipofiză, controlând activitatea acesteia. Din cele relatate mai sus se observă posibilitatea intervenției PVH în controlul secreției unor hormoni care pot afecta eritropoieza prin reglarea secreției eritropoietinei sau a metabolismelor intermediare, prin care se furnizează substratul plastic și energetic necesar eritropoiezii.

PVH primește informații de la visceroreceptori prin nucleul tractului solitar (NTS), de la somatoreceptori prin releu pontin sau mezencefalic, din zonele sistemului limbic, unele organe circumventriculare și diferenți nuclei hipotalamici (16). Eferențele neuronilor PVH inervează atât neuronii preganglionari parasimpatici și simpatice prin conexiunile pe care le prezintă cu neuronii nucleului dorsal motor al nervului vag (DX) și, respectiv, neuronii preganglionari simpatici din coloana intermediolaterală toracală (21), cit și neuronii NTS sau alți neuroni care furnizează informații neuronilor PVH despre starea funcțiilor vegetative. Numărul imens de conexiuni aferente și eferente ale PVH, atestă posibilitatea intervenției sale pe calea nervoasă în reglarea homeostaziei.

Pentru a urmări căile prin care PVH influențează eritropoieza, noi am lezat sau izolat acest nucleu, singur sau împreună cu întreaga zonă hipotalamică mediană simpatică și am urmărit numărul de hematii, hematocritul, hemoglobina și unii indici derivați.

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 115–120, București, 1993

## MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolani masculi rasa Wistar în greutate de 200–300 g, hrăniți după rețetă McCollum. Lezarea PVH s-a făcut stereotaxic cu ajutorul unui cuțit descris anterior (10), destinat să facă o leziune la nivelul PVH sub forma unui con inversat. Pentru izolare PVH s-a utilizat un cuțit, îndoit sub forma unui con, având radiul de 1 mm și înălțimea conului de 1 mm. Porțiunea orizontală a cuțitului a fost așezată la 2 mm deasupra vîrfului. Pentru izolare zonei mediale a hipotalamusului s-a utilizat un cuțit de tip Halasz, cu radiusul de 1,2 mm și înălțimea zonei decupate de 2,2 mm. Zona izolată se întindea imediat posterior chiasmei optice pînă la nivelul corpilor mamilari, iar lateral pînă la nivelul fornixului. La lotul cu izolare fronto-laterală a hipotalamusului medial au fost secționate conexiunile anterioare, dorsale și laterale ale arei hipotalamice mediale, iar la lotul cu izolare completă au fost secționate în plus conexiunile aferente și eferente, care trec prin partea posterioară a hipotalamusului. La șobolani fals operați cuțitul a fost coborât 5 mm sub suprafața craniului fără rotiri ulterioare. După operație suprafața craniului a fost presărată cu pudră de streptomycină. Controlul histologic al intervenției hipotalamice a fost efectuat după metoda Guzman-Flores și colab. (ref. 9).

Singele pentru analize a fost recoltat la aceeași oră din sinusul orbital după o prealabilă anestezie cu eter. Numărătoarea hematilor s-a efectuat la microscop de pe lama hemocitometrului. Determinarea hemoglobinei s-a făcut colorimetric folosind reactivul Drabkin, iar hematocritul s-a determinat prin metoda microhematoцитului. Calculul statistic s-a făcut pe baza testului „t” al lui Student, semnificația calculindu-se comparativ cu animalele fals operate.

## REZULTATE

Leziunea PVH determină creșterea numărului de hematii, a hematocritului, hemoglobinei, concentrației medii a hemoglobinei eritrocitare și scăderea volumului eritrocitar mediu. În general, variații mai mari apar în primele săptămâni postoperator (tabelul 1). Izolare PVH singură sau împreună cu zona hipotalamică medială și simpatică, cînd funcția secretorie a neuronilor izolați continuă, determină variații în același sens, dar care, de regulă, sunt nesemnificative (tabelul 2).

## DISCUȚII

Masa normală de hematii, capabilă de a asigura transportul optim de O<sub>2</sub>, este menținută la un nivel corespunzător, prin semnalele feedback, care au originea la nivelul rinichiului. Aceste semnale sunt mediate de eritropoietină și modulate de compoziția lanțului de transport al O<sub>2</sub> (18). La nivel renal, sinteza eritropoietinei este controlată de un senzor de O<sub>2</sub>, probabil, o proteină heminică, localizat în zona de sinteză a eritropoietinei.

Tabelul nr. 1

Modificarea unor indici eritrocitari după leziună (L) nucleului paraventricular hipotalamic. FO — fals operati; CHEM — concentrația medie a hemoglobinei eritrocitare; VEM — volum eritrocitar mediu. Fiecare lot conține 8 șobolani. Valorile reprezintă M±ES

Indice		Lot		CHEM	VEM ( $\mu\text{m}^3$ )
		7Z	14Z		
FO	9.032±228	52,28±0,3	13,81±0,3	26,3±0,6	58,52±1,75
	10.003±305 $p < 0,05$	53,37±0,3 $p < 0,05$	14,92±0,3 $p < 0,05$	27,96±0,4 $p < 0,05$	54,14±1,83 NS
L	8.943±274	47,00±0,72	13,19±0,3	27,57±0,4	53,95±1,52
	10.100±112 $p < 0,01$	48,83±0,54 NS	14,41±0,35 $p < 0,05$	30,19±0,9 $p < 0,02$	48,27±0,7 $p < 0,01$
FO	7.264±300	45,14±0,9	12,72±0,20	28,21±0,55	62,82±1,77
	8.658±296 $p < 0,01$	47,00±1,2 NS	13,38±0,21 $p < 0,05$	28,51±0,31 NS	54,53±1,05 $p < 0,001$
21Z	7.982±298	46,17±0,9	13,38±0,30	29,02±0,59	58,38±1,94
	8.518±370 NS	44,28±0,8 NS	13,77±0,25 NS	30,45±1,14 NS	53,30±0,56 $p < 0,05$
30Z					

Z = zile postoperator; NS = nesemnificativ.

Scăderea PO<sub>2</sub> din jurul tubului proximal reprezintă semnalul, care găzduiește sinteza de eritropoietină renală. Eritropoietina acționează în special asupra celulelor tardive precurosoare a eritrocitelor din măduva osoasă hematogenă, numite unități formatoare de colonii-eritroid (CFU-E). De asemenea, ea declanșează creșterea celulelor precurosoare mai timpuriu, burst-forming units-eritroid (BFU-E) și, probabil, afectează și celula sușă a eritrocitelui (4). Efectul eritropoietinei asupra celulei precurosoare a hematiei, este mediat de receptori specifici, complexul receptor-eritropoietină fiind responsabil de supraviețuirea celulelor precurosoare. În prezența complexului receptor-eritropoietină celulele precurosoare se transformă în hematii; în absența lui, ele mor (12).

La om, se consideră că declanșarea producției eritropoietinei, are loc în momentul cînd hematocritul scade sub 33% (7,15). Totuși, dacă se măsoară concentrația eritropoietinei la subiecții care au donat 1–2 unități de sînge, se constată că scăderi mici, aproape imperceptibile, ale hematocritului, sunt asociate cu creșteri evidente ale titrului eritropoietinei (5). Deci, ca și în cazul debitului cardiac, care reprezintă un alt mecanism de transport al O<sub>2</sub>, activat de hipoxie, producția eritropoietinei este activată odată cu scăderea hematocritului sub valorile care indică polycitemie.

Stimularea eritropoiezii prin factori specifici, se realizează și printr-un mecanism nervos. Deși măduva osoasă prezintă o puternică iner-

Tabelul nr. 2

Modificarea unor indicei eritrocitari după leziună nucleară paraventriculară hipotalamică (L) sau izolare lui singură (PVH) și împreună cu aria hipofalamică medială la nivel frontal-lateral (IFL) sau complet (IC). Ht – hematoцит, Hb – hemoglobina (g%), CHEM – concentrația medie a hemoglobinei eritrocitare. Numărul de şobolani pe lot era de 8; M ± ES; c – Z – zile postoperator; NS – nesemnificativ; FO – fals operat.

Lotul \ Indice		Normal	FO	L	IPVH	IFL	IC
7Z	Ht	41,83 ± 0,7 NS	40,33 ± 0,8 NS	43,27 ± 0,77 p < 0,02	42,75 ± 0,928 NS	43,66 ± 2,33 NS	42,33 ± 0,614 NS
	Hb	11,50 ± 0,2 NS	11,00 ± 0,21 NS	12,51 ± 0,2 p < 0,05	11,70 ± 0,44 NS	11,58 ± 0,3 NS	12,00 ± 0,3 NS
	CHEM	27,48 ± 0,5 NS	27,26 ± 0,6 NS	28,91 ± 0,5 p < 0,05	27,36 ± 0,3 NS	26,52 ± 0,3 NS	28,35 ± 0,6 NS
14Z	Ht	42,80 ± 0,58 NS	43,50 ± 0,63 NS	56,57 ± 1,3 NS	44,78 ± 0,924 NS	47,66 ± 1,8 p < 0,05	44,25 ± 0,945 NS
	Hb	11,45 ± 0,143 NS	11,53 ± 0,217 NS	12,21 ± 0,222 p < 0,05	11,53 ± 0,44 NS	12,38 ± 0,45 NS	12,06 ± 0,24 NS
	CHEM	26,22 ± 0,41 NS	26,15 ± 0,09 NS	27,11 ± 0,12 p < 0,001	26,46 ± 0,508 NS	26,38 ± 0,63 NS	27,41 ± 0,288 p < 0,001
21Z	Ht	43,74 ± 0,86 NS	43,16 ± 1,19 NS	46,00 ± 1,21 NS	45,10 ± 1,45 NS	45,80 ± 1,84 NS	44,30 ± 0,61 NS
	Hb	12,07 ± 0,21 NS	11,40 ± 0,33 NS	12,49 ± 0,22 p < 0,05	12,21 ± 0,36 NS	12,27 ± 0,38 NS	12,54 ± 0,22 p < 0,02
	CHEM	26,76 ± 0,64 NS	26,33 ± 0,66 NS	27,19 ± 0,32 NS	26,81 ± 0,42 NS	26,86 ± 0,39 NS	28,29 ± 0,42 p < 0,05
30Z	Ht	43,75 ± 0,94 NS	43,56 ± 0,85 NS	45,60 ± 1,16 NS	44,64 ± 1,24 NS	44,66 ± 2,40 NS	43,30 ± 0,66 NS
	Hb	11,30 ± 0,22 NS	11,43 ± 0,24 NS	11,85 ± 0,23 NS	12,02 ± 0,45 NS	12,06 ± 0,62 NS	12,23 ± 0,13 p < 0,05
	CHEM	26,32 ± 0,21 NS	26,70 ± 0,17 NS	26,01 ± 0,26 NS	26,90 ± 0,43 NS	28,06 ± 0,49 p < 0,02	28,27 ± 0,27 p < 0,001

vătie cu fibre aferente și eferente, reprezentind o intensă zonă reflexogenă, problema reglării nervoase directă a proliferării și diferențierii celulelor hematopoietice, pare a avea un răspuns negativ. Anemia și modificările măduvei osoase, care apar după denervarea membrelor, reprezintă efecte secundare, determinate de modificările microcirculației, ale metabolismelor și a proceselor distrofice ale zonelor hematoformatoare (20). Se pare însă că, asemănător secreției reninei, secreția eritropoietinei este facilitată de catecolamine printr-un mecanism beta-adrenergic (6). După Baciu (ref. 2), hipoxia, stimулul specific al eritropoiezei, acționează atât asupra zonelor chemoreceptive sino-carotidiene, cît și direct asupra centrilor nervoși vegetativi superioiri. Stimularea chemoreceptorilor sino-carotidieni declanșează o serie de reacții reflexe, adaptative, imediate: circulatorii, respiratorii și de repartizare a sângelui. Stimulul hipoxic, care acționează asupra centrilor din hipotalamusul anterior, declanșează secreția de eritropoietină, ceea ce explică poliglobulia periferică. În condițiile noastre experimentale, acest mecanism a acționat, probabil, mai puțin, deoarece lezarea nucleului PVH sau izolare lui împreună cu alte zone simpatice, determină scăderea tonusului sistemului vegetativ simpatetic, sistem care activează secreția eritropoietinei (21).

Eritropoieza poate fi reglată și printr-o serie de substanțe endogene, cum sunt testosteronul, hormonii tiroidieni, corticotropina, glucocorticoizi, somatotropina etc. La om și la animale, hipofizectomia este urmată de anemie evidentă, prin diminuarea eritropoiezii. Hormonii tiroidieni acționează stimulator, în hipotiroidism se constată o hipoplazie a măduvei osoase cu anemie, iar în hipertiroidism, o creștere a numărului de eritrocite. Intensificarea eritropoiezii, observată în condițiile noastre experimentale, nu poate fi atribuită hipertiroidismului, deoarece lezarea PVH, care secrează tiroliberină, determină scăderea concentrației sanguine a  $T_3$  și  $T_4$  (date personale).

Administrarea glucocorticoizilor în limite fiziologice sau stressarea animalelor intensifică eritropoieza (3). În condițiile noastre experimentale glucocorticoizii au putut contribui într-o oarecare măsură la modificările înregistrate ale eritropoiezei, deoarece lezarea PVH sau izolare hipotalamusului medial determină o creștere usoară a corticosteronului plasmatic (date personale).

Cercetările efectuate de Kurtz și col. (14), referitoare la efectul factorului 1 de creștere insuline-like (IGF-1), mediatorul efectelor hormonului de creștere, asupra eritropoiezii in vivo, pe şobolani hipofizectomizați, au arătat că IGF-1 stimulează eritropoieza atât direct, cît și indirect, prin intensificarea secreției eritropoietinei.

La şobolani hipofizectomizați, administrarea simultană a  $T_3$ , IGF-1 și a testosteronului, restabilește sinteza eritropoietinei la nivelul şobolanilor nehipofizectomizați (1). Pe baza acestor rezultate s-a conchis că modificările hormonale, apărute în condițiile hipoxiei, determină modificarea sensibilității secreției eritropoietinei renale, indusă de diferite grade de hipoxie.

Ayind în vedere intensificarea eritropoiezii, care se observă în experiențele noastre în urma intervențiilor asupra zonelor hipotalamice care cuprind și nucleul PVH, se poate conchide că PVH manifestă un efect inhibitor asupra eritropoiezei, care se exercită cu precădere pe cale umorală,

prin controlul statinelor și liberinelor hipotalamice. Creșterea eritropoiezii, înregistrată în urma lezării sau izolării zonei hipotalamice, care conține și PVH, s-ar putea datora în special creșterii concentrației somatotropinei, apărută în urma diminuării cantității de somatostatină produsă de PVH. Într-adevăr, la maimuță, izolarea frontală sau completă a hipotalamusului basal medial, intensifică concentrația STH plasmatic (13). Deoarece între diverse loturi experimentale practicate de noi, nu există variații semnificative ale indicilor urmăriți, sugerează că zona hipotalamică principală, care intervine în reglarea eritropoiezii, este cantonată în partea anteroioară a hipotalamusului.

#### BIBLIOGRAFIE

1. BAUER C., Seminars in Hematol., 28, 3, suppl : 3 : 9, 1991.
2. DOROFTEIU M., *Mecanismele homeostaziei sanguine*, Edit. Dacia, 1989.
3. DYGAI AM., SHAKHOV VP. et al., Biomed. & Pharmacother., 45 : 9, 1991.
4. ERSLEV A. J., Seminars in Hematol., 28, 3, suppl. 3 : 2, 1991.
5. FLAHARTY K. K., CARO J. et al., Clin. Pharmacol. Therapy., 47 : 557, 1990.
6. GANONG W. F., *Review of Medical Physiology*, Appleton et Lange, Norwolk, Conn. Ca, 1989.
7. GARCIA J. F., EBBE S. N., HOLLANDER L. et al., J. Lab. Clin. Med., 99 : 624, 1982.
8. GOLDBERG M. A., DUNNING S. P., BUNN H. F., Science, 242 : 1412, 1988.
9. HEFCO V., NEACSU I., OLARIU A., Rev. Roum. Biol. -Biol. anim., 37, 125 : 1992.
10. HEFCO V., JITARIU P., St. cerc. biol. anim., 41, 1 : 67, 1989.
11. KISS J., MEZEY E., SKIRBOLL L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 1854, 1984.
12. KOURY M. J., BONDURANT M. C., Science, 248 : 378, 1990.
13. KREY L. C., LU K. H., BUTLER W. R. et al., Endocrinology, 96 : 1088, 1975.
14. KURTZ A., ZAPF J., ECKARDT K-U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 7825, 1988.
15. NIELSEN O. J., Clin. Chem. Acta, 176 : 303, 1988.
16. SAWCHENKO P. E., *Stress, Neuropeptides and Sistemic Disease*, Acad. Press Inc., 3, 1991.
17. SAWCHENKO P. E., SWANSON W., VALE W., Proc. Natl. Acad. Sci., 81 : 1983, 1984.
18. SCHUSTER S. J., CARO J., ERSLEV A. J., Hematol. Patol., 1 : 193, 1987.
19. SWANSON L. W., SAWCHENKO P. E., Ann., Rev. Neurosci., 6 : 269, 1983.
20. UJANSKII I. G., *Fiziologicheskie mehanizmi regeneracii krovi*, Izd. Meditina, Moskva, 1968.
21. YOSHIMATSU H., NIIJIMA A. et al., Brain Res., 303 : 147, 1984.

Primit în redacție  
la 12 aprilie 1993

Facultatea de biologie  
Iași, bd. Copou nr. 20A

Institutul de cercetări biologice  
Iași, bd. Copou nr. 20 A

\* Institutul de fiziolgie  
Chișinău, Republica Moldova

#### ATENUAREA EFECTULUI HIPERGLICEMIANT, HIPERCOLESTEROLEMIANT și TIOMOLITIC AL STRESULUI PRIN GLUTAMOGLUCONAT DE MAGNEZIU (GGMg) LA ȘOBOLANII TINERI, DE VÎRSTE DIFERITE

I. MADAR și NINA ȘILDAN

In 30-, 45- and 60-day-old male Wistar rats hyperglycemia, hypercholesterolemia, thymolysis and adrenal hypertrophy were induced by a repeated formalin-stress stimulus, using s.c. daily doses of 0.25 ml 2% formalin solution per 100 g b.w. for 5 days. Simultaneously with the stress induction, magnesium glutamogluconate (GGMg) was injected i.p., using 10 mg GGMg per day and per 100 g b.w. for 5 days. It was observed that this treatment applied on the basis of stress-induction, depending on the age of animals, exerts antihyperglycemic and antihypercholesterolemic effects, reducing at the same time the stress-evoked thymolysis and adrenal hypertrophy. The conclusion is drawn that the age of young rats is a major conditioning factor in the reduction by GGMg of the stress-evoked changes in the investigated parameters.

Magneziul în formă ionică sau în diferite combinații organice are rol fiziologic complex în reacțiile endocrino-metabolice ale organismului (2), (3), (4), (18), (19), (20), (21), (23).

Datele noastre anterioare pledează pentru faptul că la șobolanii tineri stressul formaldehidic, prin diferite mecanisme antiinsulinice, influențează metabolismul glucidic într-o manieră dependentă de vîrstă indivizilor (7), (9), (10), (11), (15). Pe de altă parte, am semnalat recent că la șobolani glutamogluconatul de magneziu are acțiuni „antistress insulin-like” asupra metabolismului glucidic (8), (11), (14), iar alte lucrări recente ale laboratorului nostru arată că GGMg are efect protector asupra reactivității sistemului nervos central în răspuns la acțiunea factorilor xenobiotici stresanți (1), atenuind în același timp activitatea exaltată a axului hipotalamo-hipofizo-suprarenalian și timoliza induse de stres (16). Pornind de la considerentele de mai sus, precum și de la rolul conditionant major al vîrstei șobolanului alb în reacțiile metabolismului glucidic în condiții de stres (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15) și luând în considerare aplicabilitatea largă terapeutică a combinațiilor organice de magneziu (2), (3), (4), (18), (19), (20), (21), (23), în studiul de față ne-am propus să urmărim efectul „antistres” al GGMg asupra hiperglycemei, hipercolesterolemiei, timolizei și hipertrofiei suprarenalelor, induse de stresul formaldehidic repetat, la șobolanii tineri, de vîrste diferite.

*St. cerc. biol., Seria Biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 121-127, București, 1993*

### MATERIALE ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolani albi Wistar masculi de 30, 45 și 60 de zile, proveniți din biobaza laboratorului nostru, ținuți în condiții bioclimatice și dietetice standardizate, repartizați în cîte trei loturi în funcție de vîrstă și de intervenții, după cum urmează :

I. Loturi normale, fără tratament ; II. Loturi supuse stresului formaldehidic repetat ; III. Loturi supuse stresului formaldehidic repetat și tratamentului concomitent cu GGMg.

Stresul formaldehidic a fost induc odată zilnic timp de 5 zile, prin injectarea subcutană în regiunea interscapulară a dozei zilnice de 0,25 ml soluție de formaldehidă 2% („Chemapol”) per 100 g greutate corporală. Paralel cu inducerea stresului, GGMg („Terapia”, Cluj-Napoca) a fost administrat zilnic intraperitoneal, timp de 5 zile, la loturile respective, utilizind doze zilnice de 10 mg GGMg per 100 g animal, din soluția apoasă 5% proaspăt preparată.

La 24 de ore după sistarea inducerii stresului și a tratamentului cu GGMg și în urma unei inanitări de 16–18 ore, animalele, paralel cu mărtorii, au fost sacrificiate prin decapitare și exsanguinări.

Glicemia exprimată în mg glucoză per 100 ml sînge a fost determinată enzimatic-fotocolorimetric din 0,1 ml sînge deproteinizat, utilizând Kit GOD-Perid („Boehringer”, GmbH, Mannheim, Germania) după metoda lui Werner și colab. (25).

Cantitatea colesterolului seric total, exprimată în mg%, a fost estimată cu micrometoda fotocolorimetrică a lui Zlatkis și colab. (26), iar activarea axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian a fost evaluată indirect prin determinarea gradului timolizei și hipertrofiei suprarenalelor, conform procedeului laboratorului nostru (9), (12), (13), (17), (22).

Rezultatele prelucrate statistic sunt comparate pe baza testului t al lui Student, modificările față de valorile de referință fiind considerate statistic semnificative la  $P < 0,05$ .

### REZULTATE

Datele parametrilor studiați sunt rezumate în tabelele nr. 1–4. Din analiza lor rezultă următoarele :

**Glicemia à jeun** (tabelul nr. 1) la loturile normale de 30, 45 și 60 de zile este cantitativ similară, în timp ce sub efectul stresului la cele trei loturi de vîrstă apare o hiperglicemie pronunțată, nivelul glicemiei fiind crescut cu 73,41%, 81,94%, respectiv cu 72,61% față de valoare de referință corespunzătoare. În condițiile tratamentului cu GGMg pe fondul inducerii stresului, efectul hiperglicemiant al stării de stress la cele trei loturi de vîrstă se reduce substanțial (cu 35,76%, 45,80%, respectiv cu 14,48%).

**Colesterolul seric** (tabelul nr. 2) în condiții normale arată variații dependente de vîrstă. Față de valorile normale respective, stresul formaldehidic induce o hiperesterolemie intensă, ridicînd nivelul acesteia cu 17,91%, 41,44%, respectiv cu 11,72%, în timp ce GGMg aplicat pe fon-

Tabelul nr. 1

Nivelul glicemiei la sobolanii Wistar de 30, 45 și 60 de zile, în condiții normale (N), după stresul formaldehidic repetat (S) și după stresul formaldehidic asociat cu administrarea glutamogluconatului de magneziu (S+GGMg)

Loturi	mg glucoză per 100 ml sînge		
	N	S	S+GGMg
30 zile	79±2,46 (12)	137±2,19 (13) +73,41%*) $P < 0,001^{**}$	88±3,91 (14) +11,39%*) $P \geq 0,05^{*}$ -35,76%*) $P < 0,001^{**}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
45 zile	72±3,40 (13)	131±2,90 (12) +81,94%*) $P < 0,001^{**}$	71±2,76 (14) -1,38%*) $P > 0,50^{*}$ -45,80%**) $P < 0,001^{**}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
60 zile	85±4,50 (12)	145±3,65 (13) +72,61%*) $P < 0,001^{**}$	124±4,66 (14) +47,61%*) $P < 0,001^{**}$ -14,48%**) $P < 0,01^{*}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-

Notă : Valorile reprezentă media aritmetică ± E.S. (eroare standard) ;

\*) Modificări procentuale și P față de loturile N corespunzătoare ; \*\*) Modificări procentuale și P față de loturile S corespunzătoare ; Numărul experiențelor este redat în paranteză.

Tabelul nr. 2

Cantitatea colesterolului seric total la sobolanii Wistar de 30, 45 și 60 de zile, în condiții normale (N), după stresul formaldehidic repetat (S) și după stresul formaldehidic repetat asociat cu administrarea glutamogluconatului de magneziu (S+GGMg)

Loturi	mg colesterol per 100 ml ser sanguin		
	N	S	S+GGMg
30 zile	134±3,00 (12)	158±3,81 (13) +17,91%*) $P < 0,001^{**}$	103±2,57 (14) -23,13%*) $P < 0,001^{**}$ -34,84%**) $P < 0,001^{**}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
45 zile	152±4,25 (12)	215±6,40 (12) +41,44%*) $P < 0,001^{**}$	83±3,91 (14) -45,39%*) $P < 0,001^{**}$ -61,39%**) $P < 0,001^{**}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
60 zile	145±5,30 (14)	162±5,40 (13) +11,72%*) $P < 0,05^{*}$	125±3,69 (14) -13,79%*) $P < 0,01^{*}$ -25,51%**) $P < 0,001^{**}$
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-

Notă : Valorile reprezentă medie ± E.S. ; Numărul experiențelor este indicat în paranteză ;

\*) Modificări procentuale și P calculate față de loturile N corespunzătoare ; \*\*) Modificări % și P față de loturile S corespunzătoare.

dul inducerii stresului reduce efectul hipercolesterolemiant al stării de stres într-o manieră dependentă de vîrstă indivizilor ( $-34,84\%$ ,  $-61,39\%$  și  $-25,51\%$ ).

**Greutatea relativă a timusului**, exprimată în mg glandă per 100 g greutate corporală (tabelul nr. 3) la animalele normale prezintă variații dependente de vîrstă indivizilor, scăzind cu înaintarea în vîrstă a animalelor. Stresul formaldehidic repetat induce o timoliză puternică, micșorând greutatea glandei cu  $27,43\%$ ,  $50,76\%$  și cu  $50,64\%$  la cele trei serii de vîrste, în comparație cu valorile normale de referință. GGMg aplicat simultan cu inducerea stresului acționează antitimolitic, atenuând involuția timică indusă de stres direct proporțional cu vîrstă animalelor (cu  $29,68\%$ ,  $48,65\%$ , respectiv cu  $85,62\%$ ).

**Greutatea relativă a suprarenalelor** (tabelul nr. 4) la șobolanii normali de 30 și 60 de zile este similară și mai mare decât în cazul animalelor de 45 de zile. La cele trei loturi de vîrstă stresul formaldehidic provoacă o hipertrofie suprarenaliană semnificativă, mărind greutatea relativă a celor două glande cu  $19,59\%$ ,  $28,59\%$ , respectiv cu  $22,37\%$  față de normalul corespunzător. În cazul loturilor de 30 și 60 de zile tratamentul cu GGMg, pe fondul inducerii stresului, contracarează în mod apreciabil hipertrofia de stres a suprarenalelor, reducând-o cu  $26,86\%$  și cu  $31,01\%$ , în timp ce la lotul de 45 de zile nu diminuează acțiunea stresului la acest nivel ( $-6,79\%$ ,  $P > 0,25$ ).

## DISCUȚII

Hiperglicemia indusă de stresul acut formaldehidic la loturile investigate în studiul de față concordă cu datele noastre anterioare, conform căroră la șobolanii Wistar tineri stresăți răspunsul insulinogenic al sistemului pancreatic beta-insular se reduce (6), gluconeogeneza hepatică se intensifică (15), producția hepatică a glicogenului și glucozei crește (9), iar consumul muscular insulinodependent al glucozei se micșorează (9), (10), (11). Pe de altă parte, starea hiperglicemică indusă de stresul formaldehidic este coreabilă cu datele din literatura de specialitate și poate fi interpretată prin efectele antiinsulinice ale excesului glucocorticoide și adrenalinic (5), (9), (10), (11), cauzat de activarea sistemului hipotalamo-hipofizo-suprarenalian (1), (16). Este de subliniat faptul că, administrarea concomitentă a GGMg cu inducerea stresului, în condițiile noastre experimentale, atenuază semnificativ și dependent de vîrstă efectul hiperglicemiant al stării de stres, sugerând faptul că vîrsta șobolanilor tineri este un factor critic în eficiența acțiunii „antihiperglicemiant-antistres” și „insulin-like” a GGMg. De altfel, se cunoaște că magneziul are roluri multiple de interacțiune cu hormonii principali ai glucoreglării, fiind necesar sintezei de insulină și depozitării catecolaminelor suprarenaliene (2), (3), influențând în același timp, direct sau indirect, activitatea receptorilor beta-adrenergici (18), (19), (20), (24). A fost semnalat recent că în condițiile stresului fizic la om are loc o hipomagneziemie asociată cu hiperadrenalinemie și cu lipoliză, fenomene ce pot fi contracarate prin administrarea sărurilor organice de Mg pe fondul stresului fizic și emoțional (18), (19), (20), (21), (24).

Tabelul nr. 3

Greutatea relativă a timusului la șobolanii Wistar de 30, 45 și 60 de zile, în condiții normale (N), după stresul formaldehidic repetat (S) și după stresul formaldehidic repetat asociat cu administrarea glutamogluconatului de magneziu (S+GGMg)

Loturi	mg timus per 100 g greutate corporală		
	N	S	S+GGMg
30 zile	$390 \pm 8,03$ (11)	$283 \pm 6,45$ (14) $-27,43\%*$ $P < 0,001*$	$367 \pm 10,29$ (13) $-5,89\%*$ $P > 0,10*$ $+29,68\%**$ $P < 0,001**$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
45 zile	$325 \pm 20,30$ (14)	$160 \pm 10,50$ (12) $-50,76\%*$ $P < 0,001*$	$238 \pm 16,24$ (14) $-26,75\%*$ $P < 0,001*$ $+48,75\%**$ $P < 0,001**$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
60 zile	$310 \pm 12,35$ (13)	$153 \pm 12,24$ (13) $-50,64\%*$ $P < 0,001*$	$284 \pm 10,70$ (14) $-8,38\%*$ $P > 0,10*$ $+85,62\%**$ $P < 0,001**$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—

**Notă:** Valorile reprezintă media  $\pm$  E.S.; Numărul experiențelor este indicat în paranteză; \*) Modificări procentuale și P calculate față de loturile N corespunzătoare; \*\*) Modificări % și P față de loturile S corespunzătoare.

Tabelul nr. 4

Greutatea relativă a suprarenalelor la șobolanii Wistar de 30, 45 și 60 de zile, în condiții normale (N), după stresul formaldehidic repetat (S), respectiv după stresul formaldehidic repetat asociat cu administrarea glutamogluconatului de magneziu (S+GGMg)

Loturi	mg suprarenale per 100 g greutate corporală		
	N	S	S+GGMg
30 zile	$34,45 \pm 1,34$ (11)	$41,32 \pm 1,50$ (11) $+19,59\%*$ $P < 0,01*$	$30,22 \pm 1,48$ (12) $-12,27\%*$ $P < 0,05*$ $-26,86\%**$ $P < 0,001*$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
45 zile	$28,40 \pm 2,10$ (14)	$36,52 \pm 2,16$ (12) $+28,59\%*$ $P < 0,02*$	$34,04 \pm 0,91$ (14) $+18,66\%*$ $P < 0,02*$ $-6,79\%**$ $P > 0,25**$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
60 zile	$31,42 \pm 1,35$ (13)	$38,45 \pm 1,93$ (13) $+22,37\%*$ $P < 0,01*$	$26,53 \pm 2,10$ (14) $-17,25\%*$ $P < 0,05*$ $-31,01\%**$ $P < 0,001**$
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—

**Notă:** Valorile reprezintă media  $\pm$  E.S.; Numărul experiențelor este indicat în paranteză; \*) Modificări procentuale și P calculate față de loturile N corespunzătoare; \*\*) Modificări % și P față de loturile S corespunzătoare.

În ceea ce privește corelația dintre hiperglicemia și hipercolesterolemia, cauzate de stresul formaldehidic, în condițiile noastre experimentale, este de menționat faptul că la șobolanul alb hipercolesterolemia și hiperglicemia se asociază cu nivelul crescut al trigliceridelor și acizilor grași liberi (AGL) din serum sanguin (8) și că hipercolesterolemia se datorează colesterogenezei hepatice și adrenaliene la această specie (5), (8). Se știe de asemenea că în stresul fizic hipomagneziemia se produce prin chelarea ionilor de Mg circulańti de către AGL mobilizat din adipocite și prin captarea Mg-ului de către membrana adipocitelor activate de excesul adrenalinic (19), (20), (24). În astfel de condiții, atenuarea lipolizei și hiperglicemiei adrenalinice are loc în urma blocării receptorilor beta-adrenergici cu propranolol (7), (19), (20), (24).

Referitor la coincidența timolizei cu hipertrofia suprarenalelor la cele trei laturi de vîrstă ale șobolanilor stresati, datele noastre pledează pentru activarea intensă a axului hipotalamo-hipofizo-cortico-suprarenalian de către stresorul aplicat, în contextul secreției excesive de corticosteron și adrenalină (8), (9), (12), (13), (23). De fapt, unele date experimentale din laboratorul nostru arată că timusul șobolanului alb este un organ „tintă” extrem de sensibil la excesul glucocorticoidic, răspunzând prin timoliză într-o manieră direct proporțională cu concentrația excesivă a glucocorticoidului circulant (13), (17), (22). Pe lîngă efectul timolitic al excesului glucocorticoidic cauzat de stres se cunoaște că în timoliză la șobolanul alb se implică și hipomagneziemia, printr-un mecanism adrenergic induc de stress, ce poate fi suprimită prin administrare de Mg (19), (24). Astfel, presupunem că efectul antitimidic-antistres al GGMg, în condițiile noastre experimentale, se realizează atât prin reducerea secreției excesive de corticosteron, cât și prin diminuarea acțiunii beta-adrenergice a stresului formaldehidic de către GGMg. Această posibilitate se reflectă de altfel în atenuarea dependentă de vîrstă a efectului timolitic și adrenohipertrofiant de către GGMg pe fondul inducerii stresului. În acest context, datele noastre concordă cu unele observații recente din laboratorul nostru, conform căroră administrarea GGMg-ului la șobolanii Wistar supuști stresului radiațiilor gama-ionizante atenuază acțiunea nocivă a stresului, reducind activarea axului hipotalamo-hipofizo-suprarenalian și a secreției excesive de CRF și ACTH, paralel cu diminuarea hipertrofiei suprarenalelor și timolizei cauzate de stres la șobolanul alb (16).

#### CONCLUZII

Ansamblul datelor experimentale prezentate și discutate mai sus, sugerează următoarele concluzii:

1. La șobolanii tineri Wistar de vîrstă diferite, tratamentul cu glutamogluconat de magneziu (GGMg) atenuază într-o manieră dependentă de vîrstă individelor efectul hiperglicemiant și hipercolesterolemant al stării de stres acut formaldehidic.
2. Efectul antistres al GGMg la șobolanii tineri se reflectă prin atenuarea dependentă de vîrstă a timolizei și hipertrofiei suprarenalelor, parametrii indirecți ai activării axului hipotalamo-hipofizo-suprarenalian.
3. Vîrstă șobolanilor tineri este un factor condiționant major în acțiunea antistres a GGMg.

#### BIBLIOGRAFIE

1. ABRAHAM A. D., BORSA M., SANDU D. V., CICOŞ V., URAY Z., Magnesium Research, 3(2) : 129, 1990.
2. DURLACH J., *Le magnésium en pratique clinique*, Ed. Médicales Internat., Paris, 1985.
3. DURLACH J., *Magnesium in clinical practice*, J. Liley, London, 1988.
4. GOZARIU L., ORBAI P., in : *Symposium les ions de calcium et magnésium dans la thérapie*, Journées Médicales de l'Union Balcanique, Cluj-Napoca, Romania, p. 13—28, 1987.
5. MADAR J., *Contribuții la studiul rolului corticosuprarenalelor în metabolismul glucidic la șobolanii albi*, Teză de doctorat, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj, 1966.
6. MADAR J., GOZARIU L., ȘILDAN N., BASRABAS E., ILONCA A., in : *Pathological Models in Toxicological Studies*, Industrial Head-Office for Medicinal Drugs and Cosmetics, București, 1988, pp. 26—34.
7. MADAR J., GROSU M., ȘILDAN N., ILONCA A., Rev. roum. biol., Sér. biol. anim., 32, 2 : 107—111, 1988.
8. MADAR J., ȘILDAN N., in : *Realizări și perspective în cercetarea biochimică românească*, Ed. Acad. Română, Filiala Cluj-Napoca, Subcomisia Biochimică, 1990, pp. 73—83.
9. MADAR J., ȘILDAN N., FRECUŞ G., St. cerc. biol., Seria biol. anim., 44, 2 : 121—126, 1992.
10. MADAR J., ȘILDAN N., FRECUŞ G., Rev. roum. biol., Sér. biol. anim., 37, 2 : 107—112, 1992.
11. MADAR J., ȘILDAN N., FRECUŞ G., Rev. roum. biol., Sér. biol. anim., 38, 1 : 31—37, 1993.
12. MADAR J., ȘILDAN N., FRECUŞ G., ILONCA D., Bul. Soc. Naț. Biol. Cel., 19 : 58, 1991.
13. MADAR J., ȘILDAN N., ILONCA A., St. cerc. biol., Seria biol. anim., 39, 1 : 59—63, 1987.
14. MADAR J., ȘILDAN N., ILONCA A., TIMAR M., Magnesium Research, 3, 2 : 135—136, 1990.
15. MADAR J., ȘILDAN N., RUSU V. M., ILONCA A., Bul. Soc. Naț. Biol. Cel., 15 : 82, 1988.
16. PUICĂ D. C., ABRAHAM A. D., BORSA M., URAY Z., TIMAR M., Magnesium Research, 3, 2 : 144, 1990.
17. PORA E. A., TOMA V., Ann. Endocrinol., 30 : 519—531, 1969.
18. RAYSSIGUIER Y., Horm. Metab., Res., 9 : 253—256, 1977.
19. RAYSSIGUIER Y., GUEZENNEC C. Y., DURLACH J., Magnesium Research, 3, 2 : 93—102, 1990.
20. RAYSSIGUIER Y., LARVOR P., Magnesium in Health and Disease, 9 : 68—72, 1980.
21. RÜDDEL H., WERNER C., ISING H., Magnesium Research, 3, 2 : 103—107, 1990.
22. ȘILDAN N., *Cercetări comparative asupra fiziolgiei timusului*, Teză de doctorat, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca, 1988.
23. TIMAR M., in : *Symposium les ions de calcium et magnésium dans la thérapie*, Journées Médicales de l'Union Balcanique, Cluj-Napoca, Romania, 1987, pp. 31—39.
24. VORMAN J., FÖRSTER R., GÜNTHER T., EBEL H., Magnesium Research, 5 : 39—41, 1983.
25. WENER W., RAY H. J., WIELINGER H., Z. analyt. Chem., 252 : 224.
26. ZLATKIS A., ZACK B., BOYLE A. J., J. Lab. Clin. Med., 41 : 486—492, 1953.

Primit în redacție  
la 23 martie 1993

*Institutul de cercetări biologice  
Cluj-Napoca, str. Republicii nr. 48*

## EFFECTE IN VITRO ALE UNOR FRACTIUNI DE RĂȘINĂ DE CONIFERE ASUPRA TIMOCITELOR DE ȘOBOLAN

VIORICA VINTILĂ, RODICA GIURGEA și IOANA ROMAN

The coniferous resin fractions induced important modifications upon thymocytes of Wistar rats. The modifications are similar for both sexes, but the intensity of these modifications is dependent on the nature of fractions. The effects of the 7th fraction (F-7) are more intensive those of the other fractions.

Principiile active din răsină de conifere, care sunt monoterpane (alfa și betă, pinenul, camfen, caren, limonen etc) s-au dovedit a avea efecte stimulatoare asupra complexelor procese imunologice (2). Cercetări anterioare ale noastre au demonstrat că aceste fracțiuni, administrate șobolanilor, determină importante modificări structurale, la nivelul hipotalamusului, splinei, glandei tiroidie și suprarenalelor (7).

Continuind în această direcție cercetările, în această lucrare am urmărit efectele fracțiunilor de răsină de conifer asupra timocitelor de șobolan, în experiențe „in vitro”.

### MATERIALE ȘI METODE

Timocitele s-au obținut de la șobolani tineri, din rasa Wistar, de ambele sexe. Șobolanii au fost sacrificați prin decapitare, după o prealabilă anestezie cu eter, s-a prelevat timusul care s-a cintărit pe lot (11 animale pe fiecare lot). Timocitele au fost izolate și suspendate în ser Krebs-Ringer, glucozat (10 mmol glucoză), pH = 7,4. Numărul de timocite a fost determinat prin diluarea lor cu lichidul Türk și citirea pe lama Thomas. Timocitele astfel pregătite au fost introduse în cupa Warburg peste care s-a adăugat fracțiunea de răsină de conifer. Cantitatea de extract de răsină de conifer a fost calculată astfel încit să corespundă la 1/10 din  $DL_{50}$ . Am avut în acest fel lotul martor (s-a introdus în cupă numai suspensia de timocite), loturile F-4, F-5 și F-7. Incubarea s-a făcut timp de o oră, la 38°C, denivelările citindu-se din 15 în 15 minute. După ora de incubare, conținutul cupelor s-a utilizat pentru determinarea următorilor parametrii: proteinele totale (3), gammaglobulinele (3), (8), azotul aminoacicilor liberi (5), acizii nucleici ARN și ADN (6), glucoza (4). Valorile obținute, inclusiv respirația timocitelor, au fost prelucrate statistic, prin testul „t” al lui Student. Valorile aberante au fost eliminate după criteriul Chauvenet. Au fost calculate diferențele procentuale față de martor, iar semnificația statistică s-a considerat de la  $p = 0,05$ .

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 129-131, București, 1993

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Așa după cum reiese din tabelul nr. 1 și nr. 2 efectele celor trei fracțiuni de răsină de conifere sunt deosebit de accentuate asupra timocitelor. Modificările la cele două sexe sunt în general de același sens, dar diferă ca intensitate. Consumul de oxigen este deosebit de intens, în special la masculi, iar pentru ambele sexe, fracțiunea 7 are efectele cele mai puternice. Intensificarea respirației timocitelor se poate datora faptului că monoterpenele și în special alfa-pinenuл necesită cantități mari de oxigen fiind considerat ca un remarcabil tonic (2). Este posibil ca această respirație crescută să determine în unele cazuri o scădere a nivelului glucozei, aceasta fiind utilizată ca material energetic. Cele trei fracțiuni determină o creștere deosebită de accentuată a conținutului de proteine, la ambele sexe. La femele creșterea proteinelor merge în paralel cu creșterea ADN-ului, proces care la masculi îl găsim la lotul tratat cu F-7. La masculii tineri se înregistrează, pentru toate fracțiunile, o creștere a gammaglobulinei, la femele această creștere este semnificativă numai la lotul F-4, pentru celelalte fracțiuni, valorile depășesc valoarea martorului, dar nu sunt asigurate statistic. Terpenele extrase din *Picea excelsa* s-a dovedit că sunt stimulațoare ale imunității, prin creșterea accentuată a gammaglobulinelor (2). Mecanismul de acțiune al acestor fracțiuni de răsină de conifere este greu de precizat. Pentru organismul vegetal aceste componente constituie o rezervă energetică indispensabilă, iar în plan biologic reprezintă o „informație circulantă”. Aceste molecule, grație caracterului lor volatil, dat de scheletul carbonic, ce nu depășește 20 de atomi de carbon, și datorită polarității lor pozitive sau negative au un rol fundamental asupra organismului animal. Moleculele pozitive pot capta electroni și ceda protoni care refac energia vitală și care explică efectele tonice asupra organismului animal și pot influența în acest fel marile sisteme biologice, cum este și imunomodularea. Procesele biologice care apar la nivel chimic molecular sunt condiționate de cimpurile electromagnetice (1), care au fost evidențiate în urma investigațiilor electronografice în extractele de răsină de conifere (date nepublicate).

Tabelul nr. 1

Efectele fracțiunilor de răsină de conifere asupra timocitelor şobolanilor femei

Lot:	Martor	F-4	F-5	F-7
PT	0,030 ± 0,02	0,097 ± 0,009 + 223,33	0,35 ± 0,08 + 1066,66	0,56 ± 0,01 + 1766,66
RNA	0,76 ± 0,20	0,92 ± 0,36 + 21,05	0,92 ± 0,18 + 21,05	4,03 ± 1,94 + 430,26
DNA	0,64 ± 0,07	1,36 ± 0,31 + 112,50	1,33 ± 0,12 + 107,81	2,91 ± 0,34 + 354,68
Ggl.	0,24 ± 0,05	2,20 ± 0,25 + 816,66	0,28 ± 0,018 + 16,66	0,25 ± 0,02 + 4,16
AA	0,77 ± 0,14	0,39 ± 0,05 - 49,36	0,41 ± 0,06 - 46,76	0,20 ± 0,02 - 74,03
Gl.	28,94 ± 1,04	30,37 ± 0,57 + 6,07	12,87 ± 3,25 - 55,53	38,79 ± 3,77 + 34,03
QO <sub>2</sub>	1,00 ± 0,35	2,90 ± 0,19 + 190	1,10 ± 0,50 + 10	3,66 ± 1,14 + 266

Pentru toate loturile sunt trecute mediile ± eroarea standard. La loturile tratate sunt trecute diferențele procentuale față de martor. Valorile semnificative statistic sunt *cursive*. PT = proteine totale (mg); RNA și DNA (mg); Ggl. = gammaglobuline (mg); AA = azotul aminoacicilor liberi (mg); Gl. = glucoza (μg %); QO<sub>2</sub> = consumul de oxigen (umoli O<sub>2</sub>/oră). În toate cazurile cantitățile sunt raportate la 10<sup>7</sup> celule. Alte explicații în text.

Tabelul nr. 2

Efectele fracțiunilor de răsină de conifere asupra timocitelor şobolanilor masculi

Lot:	Martor	F-4	F-5	F-7
PT	0,043 ± 0,002	0,21 ± 0,003 + 179,06	0,22 ± 0,03 + 411,62	0,30 ± 0,01 + 597,67
RNA	1,44 ± 0,26	1,76 ± 0,15 + 22,22	3,93 ± 0,93 + 172,91	16,64 ± 3,57 + 1055,55
DNA	1,23 ± 0,15	1,09 ± 0,24 - 11,39	1,25 ± 0,11 + 1,62	2,57 ± 0,32 + 108,94
Ggl.	0,42 ± 0,06	1,67 ± 0,47 + 297,61	1,95 ± 0,14 + 364,28	2,20 ± 0,21 + 423,80
AA	6,37 ± 1,85	2,37 ± 0,79 - 62,80	1,20 ± 0,25 - 81,17	1,68 ± 0,30 - 73,63
Gl.	44,57 ± 9,17	33,27 ± 1,90 - 25,36	35,33 ± 0,43 - 20,74	46,44 ± 1,38 + 4,19
QO <sub>2</sub>	0,17 ± 0,06	5,21 ± 0,82 + 2964,70	3,51 ± 0,59 + 1964,70	6,55 ± 2,50 + 3752,94

Vezi explicații în tabelul nr. 1 și în text.

În concluzie, cele trei fracțiuni de răsină de conifere produc intense modificări asupra metabolismului timocitelor, cu unele mici diferențe în funcție de sex, dar cu un efect mult mai intens în cazul fracțiunii 7, a cărui component principal este 3-carenuл.

## BIBLIOGRAFIE

1. ČELAN E., *Materia vie și radiațiile*. Edit. Enciclopedică, Bucuresti, 1985.
2. FRANCHOMME P., JOLLOIS R., PENOEL D., MARS J., *L'aromathérapie*. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Imprimerie A. Bontemps, Limoges, France, 1990.
3. GORNALL A. G., BARDAWILL G. J., DAVID M. M., J. biol. Chem., 78 : 751 - 766, 1949.
4. NELSON N., J. Biol. Chem., 153 : 375 - 378, 1957.
5. RAC I., Casop. Likaru. Cesk., 98 : 120 - 123, 1959.
6. SPIRIN A. S., Biohimia, 23 : 656 - 662, 1958.
7. VINTILĂ V., GIURGEA R., PUICĂ C., ROMAN I., St. cerc. biol., seria biol., anim., 44 : 47 - 50, 1992.
8. WOLFSON W. O., COHN C., CALvary E., ICHIBA F., Amer. J. Clin. Pathol., 18 : 723 - 725, 1948.

Primit în redacție  
la 16 martie 1993

Institutul de Biologie

București, Splaiul Independenței nr. 296

și

Institutul de Cercetări Biologice  
Cluj-Napoca, str. Republicii nr. 48

## EFFECTELE METIONINEI ȘI TIOUREEI ASUPRA TIMUSULUI, BURSEI LUI FABRICIUȘ ȘI TIROIDEI LA PUII DE GĂINĂ

RODICA GIURGEA, MARTA GABOS ȘI ROMA RADU

Administration of methionine (0.75% in fodder) during 40 days on the 2nd respectively the 5th day of life to broiler chickens (Me group), and methionine (like Me group) with thiourea in a single dose (7 mg/kg, b.w.) on the 4th day of life (Tu<sub>1</sub> Me group), respectively on the 7th day of life (Tu<sub>2</sub> Me group) induce modifications in the thymus, bursa Fabricii and in the thyroid gland dependent on the nature of treatment and the age of chickens.

Relația dintre structurile limfatice și activitatea glandei tiroide, la mamifere și la păsări este mult studiată sub diferite aspecte. Nivelurile fiziologice ale hormonilor tiroïdieni sunt necesare pentru dezvoltarea și activitatea normală a organelor limfaticice (2), (12), (13), (16). Cercetări anterioare ale noastre au urmărit această relație, prin administrarea de antitiroïdieni sau de hormoni tiroïdieni, la puii de găină, la vîrstă diferite și în modele experimentale diferite (6), (7), (8), (9), (10).

Continuind cercetările în această direcție, în această lucrare am urmărit conținutul de proteine din organele limfaticice centrale și aspectele structurale ale glandei tiroide în urmă administrării asociate de metionină și tiouree.

### MATERIAL ȘI METODE

În aceste experiențe s-au folosit pui de găină, Cornish-Rock, procurăți la o vîrstă de o zi postecloziune și crescuți în condiții zoogienice corespunzătoare. Hrana a constat din furaj concentrat, adecvat vîrstei. Hrana și apa s-au administrat *ad libitum*. Puii au fost grupați în următoarele lotori: *lot martor* (M), care s-a hrănit cu furajul normal, *lot tratat* cu meteonină (Me), (DL-methionin purum Reanal), în doză zilnică de 0,75% în furaj, timp de 40 de zile. Aminoacidul, metionină s-a dat la un lot începând cu ziua a 2-a de viață, iar la alt lot din ziua a 5-a de viață a puiului de găină; *lot tratat* cu metionină și cu tiouree (Thiocarbamid purum Australian), în doză unică de 7 mg/kg corp. Acest antitiroïdian s-a dat la două zile după administrarea meteoninei, deci în ziua a 4-a, la puii care au primit metionină în ziua a 2-a (lotul Tu<sub>1</sub> Me) și în ziua a 7-a pentru cei care au primit aminoacidul în ziua a 5-a de viață (lotul Tu<sub>2</sub> Me). Metionina și tiourea au fost administrate în furaj, dimineața cînd puii erau nehrăniți.

Sacrificarea puielor s-a făcut prin decapitare, după o inanitie de 16 ore, la 10 zile (sacrificarea I), 24 zile (sacrificarea II) și 52 de zile (sacrifi-

carea III). Ultima sacrificare a fost efectuată după închiderea administrării de metionină timp de 10 zile. Imediat după sacrificarea puilor s-a recoltat timusul și bursa lui Fabricius, din care s-au dozat proteinele totale (11), și tiroida. Glanda tiroidă izolată s-a introdus în lichidul Bouin, pentru fixare, timp de 48 de ore, după care s-a prelucrat în văzărea incluziei în parafină. S-a folosit colorația Azan (14).

Cantitatea de proteine totale din organele limfatice a fost prelucrată statistic, prin testul „t” al lui Student. Valorile aberante au fost eliminate după criteriul Chauvenet. S-a calculat diferența procentuală față de martor, iar semnificația statistică s-a considerat de la  $p=0,05$ .

#### REZULTATE SI DISCUȚII

Modificările pe care le înregistram în cazul conținutului de proteine din timus și din bursa lui Fabricius sunt în general asemănătoare ca sens, dar intensitatea acestor modificări este mai accentuată în timus,

Tabelul nr. 1

Proteinele totale din timus și bursa lui Fabricius, la puie de găină tratați cu meteonină (Me), meteonină și tiouree (MeTu), cit și la martor (M)

Lot :	M	Me	Tu <sub>1</sub> Me	Tu <sub>2</sub> Me
TIMUS				
10 zile	103 ± 1,7(8)	+11,7	+18,6	+10,7
24 zile	117 ± 1,6(8)	-1,7	+6	-8
52 zile	123 ± 2,9(8)	-19,5	-12,2	+10,6
BURSA FABRICIUS				
10 zile	100 ± 2,7(8)	+6	+10	+7
24 zile	110 ± 1,3(8)	+1,8	+5,5	+8,2
52 zile	133 ± 3,1(7)	-15	-9,8	+0,8

La lotul martor sunt trecute valorile medii ± eroarea standard, iar la loturile tratate diferențele procentuale față de martor. Valorile semnificative statistic sunt evidente. Alte explicații în text.

decit în bursa lui Fabricius. Atât meteonină cit și meteonina asociată cu inhibitorul tiroidian determină o creștere a conținutului de proteine în cele două organe limfatice, mai accentuat la sacrificarea I-a. Această situație se poate datora unei inhibări a funcției tiroidiene, glandă în care structura histologică se dovedește a fi alterată (tabelul 2). Continuarea tratamentului cu meteonină (sacrificarea II), la cele trei loturi tratate evidențiază un proces de revenire spre normal. Ultima sacrificare, a III-a, cind tratamentul cu meteonină a fost oprit arată o scădere a conținutului de proteine din timus și din bursa lui Fabricius la loturile Me și Tu<sub>1</sub>Me și o creștere la lotul Tu<sub>2</sub>Me în timus. Aceste modificări (tabelul 1) pot fi corelate cu aspectul structural al tiroidei, care prezintă o tendință

de revenire la normal, exceptând lotul Tu<sub>1</sub>Me. S-ar putea vorbi de un catabolism proteic, datorat unei secreții mai mari de hormoni tiroidieni, după procesul de deprimare care a avut loc în perioada cuprinsă între sacrificările I și II. Unele diferențe care apar între cele două structuri limfaticice pot să se datoreze și reactivității diferite a acestora în decursul dezvoltării

Tabelul 2

Modificări histologice în glanda tiroidă

#### SACRIFICAREA I

Lot M — Folliculi bine organizați, cu aspect normal.  
 Lot Me — Creșterea volumului foliculilor, datorat creșterii conținutului de coloid tiroidian, ca fenomen de compensare a unei ușoare hiposecreții. Celulele secretoare nu sunt modificate comparativ cu martorul.  
 Lot Tu<sub>1</sub>Me — Degenerescența țesutului secretor, cu depuneri de grăsimi. Celulele secretoare sunt atrofiate, structura foliculară este alterată, cu stadii diferite de degradare a foliculilor.  
 Lot Tu<sub>2</sub>Me — Degradarea celulară mult mai slabă comparativ cu lotul Tu<sub>1</sub>Me. Aspectul este asemănător lotului Me.

#### SACRIFICAREA II

Lot M — Aspectul normal, dar în coloidul foliculilor se observă aglomerări de substanță, probabil substanță activă, produs de secreție, în apropierea celulelor secretoare. Aceasta denotă o activitate celulară intensă. Se pare că la această vîrstă activitatea tiroidiană este cea mai intensă.  
 Lot Me — Folliculi cu aspect normal, dar depunerile de „substanță activă” sunt mai mici decit la lotul M, corespunzător aceleiași vîrste. Celulele secretoare sunt foarte bine dezvoltate.  
 Lot Tu<sub>1</sub>Me — Se înregistrează o refacere parțială a degradărilor structurale, înregistrate la sacrificarea I, dar foliculii sunt încă net dezorganizați.  
 Lot Tu<sub>2</sub>Me — Coloidul intrafolicular este foarte puțin. Celulele secretoare sunt hypertrofiate. Aspectul general este asemănător lotului Tu<sub>1</sub>Me.

#### SACRIFICAREA III

Lot M — Aspect normal pentru această vîrstă.  
 Lot Me — Aspect asemănător lotului M. Foliculii glandulari se găsesc în diferite faze de creștere, dar numărul foliculilor mari este mai mic decit la lotul M.  
 Lot Tu<sub>1</sub>Me — Se constată o degenerescență a foliculilor, un proces de dezorganizare. Țesutul glandular nu își revine la normal.  
 Lot Tu<sub>2</sub>Me — Se înregistrează o revenire a activității secretoare la normal.

Explicații sunt date în text

ontogenetice (5). Totodată este de menționat și faptul că hormonii tiroidieni au un rol important în procesele metabolice, ei intervenind în modularea activității altor glande endocrine, ca suprarenala, pancreasul etc. (3), (15). În acest sens, influențele pe care le exercită tiroida, prin hormoni săi, asupra țesutului limfatic, pot să se datoreze nu numai efectului direct al acestei glande, ci prin efectul hormonilor tiroidieni asupra altor glande endocrine. În înțelegerea acestor fenomene este important să avea în vedere variațiile ontogenetice ale hormonilor tiroidieni (1), (4), care influențează legarea acestor hormoni de citosolul și de nucleul celulelor limfaticice (4), (17).

Din ansamblul rezultatelor obținute se poate concluziona că tratamentele aplicate puilor de găină afectează conținutul de proteine din timus și bursa lui Fabricius, cît și structura glandei tiroide, dependent de modelul experimental și de perioada urmărită de la începutul tratamentului. De asemenea se constată că varianta Tu<sub>2</sub>Me are un efect mai benefic decât celelalte variante.

#### BIBLIOGRAFIE

1. ASTIER H., In: *Avian endocrinology*. (EPPLER A., STETSON M.H., eds.) Academie Press, New York, 1980.
2. BACHMAN S. E., MASHALY M. M., Dev. Comp. Immunol., 11: 203–213, 1987.
3. BELLUR S., TAHARA K., SAJI M., GROLLMAN E. F., KOHN L. D., Endocrinology, 127, 3: 1526–1540, 1990.
4. DAINAT J., BRESSOT C., BACOU F., REBIER A., VIGNERON P., Molec. Cell. Endocrinol., 35: 195–197, 1984.
5. GIURGEA R., Ann. Biol. Anim. Bloch. Biophys., 17, 2: 173–178, 1977.
6. GIURGEA R., GABOS M., MOYS M., CSATA Z., Arch. exp. Vet. med., 40: 496–500, 1986.
7. GIURGEA R., COPREAN D., MICLE V., St. cerc. biol., Seria biol., anim., 39: 117–119, 1987.
8. GIURGEA R., GABOS M., MOHORODEAN L., St. cerc. biol., Seria biol., anim., 39: 69–72, 1987.
9. GIURGEA R., COPREAN D., Arch. exp. Vet. med., 42: 655–659, 1988.
10. GIURGEA R., MICLE V., St. cerc. biol., Seria biol., anim., 41: 129–131, 1989.
11. GORNALL A.G., BARDAWILL C.J., DAVID M. M., J. Biol. Chem., 177: 751–766, 1949.
12. HADDAD E. E., MASHALY M. M., Poultry Sci., 69: 1094–1102, 1990.
13. KAI O., NAGASE H., ISHIKAWA N., SUZUKI M., KAKEGAWA T., SATO K., Dev. Comp. Immunol., 12: 145–156, 1988.
14. MURESAN E., GABOREANU M., BOGDAN A., BABA I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Edit. Ceres, București, 1975.
15. PLISETSKAYA E., DICKHOF W. W., GORBMAN A., Gen. Comp. Endocrinol., 49: 97–113, 1983.
16. SCOTT T., GLICK B., Gen. Comp. Endocrinol., 67: 270–276, 1987.
17. WILSON D. B., BEERMANN D. H., Anim. Sci., 57: 1449–1452, 1983.

Primit în redacție la 18 mai 1993

Institutul de cercetări biologice  
Cluj-Napoca, str. Republicii nr. 48 și  
Universitatea „Babeș-Bolyai”  
Cluj-Napoca, str. Kogălniceanu nr. 1

#### MODIFICĂRI METABOLICE CAUZATE DE INTOXICAREA CU ALCOOL ALILIC ȘI ROLUL HEPATOPROTECTOR AL TRATAMENTULUI CU ULEI DE OENOTHERA BIENNIS

D.C. OPREAN, RODICA GIURGEA, DINA COPREAN,  
GABRIELA PINTILIE și V. MIHAILĂ

Female Wistar rats weighing  $175 \pm 10$  g were used in our experiment that lasted for three weeks. The following experimental groups were set: a group intoxicated with allyl alcohol (A); the animals received 0.5 ml allyl alcohol 1%/100 g b.w. for three days (the days 6th, 7th and 8th of the experiment); a group intoxicated with allyl alcohol and treated with Hepabionta (Cascan GmbH & Co KG, Wiesbaden – Germany) (AHb); the animals were intoxicated with allyl alcohol as group A and received daily, for all period of the experiment, 16 mg/100 g b.w. Hepabionta (a water fine powder suspension), a group intoxicated with allyl alcohol and treated with Oenothera biennis oil (AOb); intoxication was made as in group A and the animals received daily for all period of the experiment 1 ml of *Oenothera biennis* oil/100 g b.w.; a control group (C): the animals received daily for all period of the experiment 1 ml water/100 g b.w. Allyl alcohol intoxication caused an increase of glycemia (+51.65%;  $p < 0.001$ ), a decrease of liver glycogen content (-64.52%;  $p < 0.001$ ), as well as decreases in glucose-6-phosphatase (-53.53%;  $p < 0.001$ ) and glycogen phosphorylase  $\alpha$  (-50.33%;  $p < 0.001$ ) activities. The treatment with *Oenothera biennis* oil counteracted the noxious effect of allyl alcohol. In our opinion this effect may be due to the fact that *Oenothera biennis* oil has many polyunsaturated fatty acids, very important for hepatocyte membrane restoration, that are drastically affected by that intoxication.

În ultimii 10–20 de ani a crescut îngrijorător numărul hepatitelor de diferite etiologii; lucru datorat în bună măsură diversificării substanțelor toxice din mediul ambiant cu care organismul uman vine în contact.

Modelele experimentale, pe animale, de intoxicare a ficatului, utilizate de cercetători, au drept scop imitarea pe cît este posibil a stării morfofuncționale a ficatului uman care în mod accidental a venit în contact cu un agent toxic (11, 19). Astfel, ficatul şobolanului intoxicațat experimental cu diverse substanțe toxice, printre care:  $CCl_4$ , alcool alilic, amino-fenazonă + nitrit de sodiu etc., prezintă profunde modificări morfo-funcționale: hepatocite distrofice încărcate cu lipide, sau aflate în diferite stadii de necrozare (2, 10) și a căror activitate enzimatică este puternic afectată (11). Cercetările de ultramicroscopie evidențiază profunde modificări structurale hepatocitare la şobolanii intoxicați cu alcool alilic: vacuolizarea matricei mitocondriale, acumularea de particule lipidice intrahepatocitare (9).

În hepatite membrana hepatocitară este una dintre cele mai afectate结构uri (18).

Pă de altă parte este cunoscut faptul că acizii grași nesaturați intră în compozitia lantului molecular al glicerolului. Acesta la rândul său este

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 137–142, București, 1993

component de bază al fosfogliceridelor ce compun în mare măsură membrana plasmatică a hepatocitelor, precum și cea a organitelor interne, cum sunt reticulul endoplasmatic, mitocondriile etc. (4).

În lucrarea de față ne-am propus să testăm posibilul efect benefic al unui tratament cu ulei din semințele de *Oenothera biennis*, bogat în acizi grași nesaturați, aplicat șobolanilor intoxicați experimental cu alcool alilic. Efectele tratamentului cu ulei de *Oenothera biennis* au fost comparate cu cele ale tratamentului cu Hepabionta (hepatoprotector; Casan GmbH Co.&KG, Wiesbaden — Germania).

#### MATERIALE ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolani femeli Wistar de  $175 \pm 10$  g. Animalele au fost hrânite și întreținute în conformitate cu normele zoologice de bază.

Intoxicarea s-a făcut dimineață pe stomacul gol pentru a se asigura o bună absorbție a acestuia.

Experimentul a durat trei săptămâni și modelul experimental a fost următorul: *lotul marior* (M) : animalele au primit, zilnic, prin gavaj, cîte 1 ml apă ; *lotul intoxicației cu alcool alilic* (A) : animalele au primit în zilele 6, 7 și 8 ale experimentului, prin gavaj, cîte 0,5 ml alcool alilic 1% /100g greutate corporală, iar în restul zilelor cît a durat experimentul, cîte 1 ml de apă, tot prin gavaj ; *lotul intoxicației cu alcool alilic și tratat cu Hepabionta* (AHb) : animalele au fost intoxicate cu alcool alilic ca și lotul A și au primit prin gavaj, zilnic, 16 mg/100 g greutate corporală Hepabionta (pulbere fină obținută prin mojararea drajeurilor și sub formă de suspensie în apă) ; *lotul intoxicației cu alcool alilic și tratat cu ulei din semințe de Oenothera biennis* (AOb) : animalele au fost intoxicate cu alcool alilic ca și lotul A și au primit prin gavaj, zilnic cîte 1 ml de ulei de *Oenothera biennis* /100 g greutate corporală.

Mentionăm că în zilele administrării toxicului, animalele din loturile AHb și AOb au primit și doza corespunzătoare de Hepabionta sau ulei de *Oenothera*, dar acestea au fost administrate la o oră după alcoolul alilic, pentru a ne fi asigurat de o bună asimilare a toxicului.

Tratamentele cu Hepabionta și *Oenothera biennis* au fost efectuate în regim preventiv (o săptămînă) și curativ (două săptămîni).

Animalele au fost sacrificiate prin decapitare, în a 22-a zi de la debutul experimentului, după o prealabilă inanitie de 16 ore (apa a fost administrată *ad libitum* și în această perioadă). Au fost determinați următorii parametri metabolici: glicemia (17), conținutul hepatic de glicogen (16), precum și activitatea glucozo-6-fosfatazei (G6Paza; 12) și glicogen fosforilaza  $\alpha$  (GPa; 13) din ficat.

Prelucrarea statistică a datelor experimentale obținute a inclus: calcularea mediei pe loturi, verificarea omogenității acestora cu ajutorul criteriului lui Chauvenet și eliminarea valorilor individuale aberante (23); calcularea erorilor standard; cînd s-au comparat mediile loturilor, diferențele au fost exprimate în procente și apoi testate cu testul „t” al lui Student (20); modificările au fost considerate statistic semnificative la un  $p < 0,05$ .

#### REZULTATE

Intoxicația cu alcool alilic afectează atât structural cît și funcțional hepatocitele. O caracteristică a ficatului intoxicație cu alcool alilic este alternația zonelor necrozate cu cele mai puțin afectate din punct de vedere histologic (19, 22, 1, 5). Tesutul hepatic recoltat în vederea efectuării probelor biochimice au fost prelevat din zonele perinecrotice, mai puțin afectate din punct de vedere histologic.

Așa cum rezultă din tabelul 1, intoxicația cu alcool alilic determină puternice modificări ale parametrilor metabolici studiați. Astfel, glicemia

Tabelul 1

Glicemia (mg%; g), conținutul hepatic de glicogen (mg/g; G), precum și activitatea glucozo-6-fosfatazei (nanomoli de Pa eliberat/mg proteină/minut; G6Paza) și glicogen fosforilază  $\alpha$  (nanomoli de Pa eliberat/mg proteină/minut; GPa) la șobolani marori (M), intoxicați cu alcool alilic (A), intoxicați cu alcool alilic și tratați cu Hepabionta (AHb) ori cu *Oenothera biennis* (AOb)

Lotul experimental		g	G	G6Paza	GPa
M	$\bar{X} \pm ES$	$83,73 \pm 3,48$	$9,95 \pm 0,68$	$14,98 \pm 0,71$	$40,79 \pm 1,55$
A	$\bar{X} \pm ES$ $p < 0,001$ $\pm M\%$	$126,98 \pm 6,96$ +51,65	$3,53 \pm 0,16$ 0,001 -64,52	$6,96 \pm 0,42$ 0,001 -53,53	$20,26 \pm 1,27$ 0,001 -50,33
AHb	$\bar{X} \pm ES$ $p < 0,01$ $\pm M\%$	$102,69 \pm 3,99$ +22,64	$9,33 \pm 0,28$ NS -6,23	$6,58 \pm 0,30$ 0,001 -56,07	$32,66 \pm 2,89$ 0,05 -19,93
	$p < 0,01$ $\pm A\%$	-19,13	0,001 +164,31	NS -5,460	0,01 +61,20
AOb	$\bar{X} \pm ES$ $p < NS$ $\pm M\%$	$89,84 \pm 6,09$ NS +7,30%	$9,65 \pm 0,26$ NS -3,02	$9,76 \pm 0,15$ 0,001 -34,85	$40,21 \pm 1,86$ NS -1,42
	$p < 0,01$ $\pm A\%$	-29,24	0,001 +173,37	0,001 +40,23	0,001 +98,46
	$F < \pm AHb\%$	NS -12,51	NS +3,43	0,001 -48,33	0,05 +23,12

Noți: În tabel  $\bar{X} \pm ES$  = media ± eroarea standard;  $\pm M\%$ ,  $\pm A\%$ ,  $\pm AHb\%$  = diferențe procentuale calculate față de lotul respectiv, NS = modificarea nesemnificativă statistică. Numărul de valori individuale pe lot a fost 8.

cresc semnificativ după administrarea toxicului ( $+51,65\%$ ;  $p < 0,001$ ) în timp ce conținutul de glicogen scade semnificativ ( $-64,52\%$ ;  $p < 0,001$ ). Enzimele hepatice studiate scad de asemenea prin intoxicația cu alcool alilic: glucozo-6-fosfataza cu  $-53,53\%$  ( $p < 0,001$ ), iar glicogen fosforilază  $\alpha$  cu  $-50,33\%$  ( $p < 0,001$ ).

Tratamentul cu Hepabionta nu reușește să contracareze efectul nociv al toxicului privind glicemia, care rămîne crescută ( $+22,64\%$ ;

$p < 0,01$ ), sau enzimele hepatică, a căror activitate rămîne semnificativ scăzută: G6Paza cu  $-56,07\%$  ( $p < 0,001$ ), iar GPa cu  $-19,93\%$  ( $p < 0,05$ ). De remarcat este faptul că stocul de glicogen hepatic se reface după tratamentul cu Hepabionta și diferența față de martor este nesemnificativă statistic ( $-6,23\%$ ).

Tratamentul cu ulei de Oenothera biennis are un efect benefic dacă este aplicat în regim preventiv și curativ la șobolanii intoxicați cu alcool alilic. Astfel, la șobolanii intoxicați și supuși acestui tratament, glicemia, conținutul hepatic de glicogen și activitatea GPa hepatică, se mențin în limite normale. Cu toate acestea însă, activitatea G6Pazei rămîne în continuare scăzută și după tratamentul cu ulei de Oenothera biennis ( $-34,85\%$ ;  $p < 0,001$ ).

#### DISCUȚII

Alcoolul alilic afectează hepatocitele mai ales prin distrucția membranării (21). De fapt creșterea concentrației serice a ALAT (alaninamino-transferaza) după intoxicația cu alcool alilic, semnalată de literatură (6), este o dovedă certă a distrucției membranelor hepatocitare.

Intoxicația cu alcool alilic determină o creștere cu peste 50% a glicemiei. Tot o creștere a glicemiei am obținut și în urma intoxicației șobolanilor cu  $CCl_4$ , care are același mecanism toxic ca și alcoolul alilic, distrucția membranării (11). Conținutul de glicogen, activitatea G6Pazei și GPa în ficatul șobolanilor intoxicați cu alcool alilic sunt puternic scăzute. Cercetările electronmicroscopice, evidențiază o puternică reducere a conținutului hepatocitar de glicogen, după intoxicația șobolanilor cu alcool alilic (9). Cercetările noastre anterioare (7, 8) dar și literatura de specialitate (3, 14, 15), în care toxicul a fost  $CCl_4$ , au evidențiat o scădere a conținutului hepatic de glicogen la șobolan; modificarea fiind interpretată ca o consecință a afectării activității sistemului glicogen sintetasic hepatocitar. Este posibil ca și în cazul intoxicației cu alcool alilic, reducerea depozitului hepatic de glicogen să fie de asemenea o consecință a afectării sistemului glicogen sintetasic, iar nivelul crescut al glicemiei să fie la rîndul ei efectul diminuării acestui proces sintetic.

Scăderea activității G6Pazei hepatică la lotul intoxicație cu alcool alilic se poate datora distrucției membranelor induse de toxic, și tot fiind faptul că enzima este legată de membranele organitelor celulare. Scăderi ale activității unor enzime hepatică inclusiv G6Paza, după distrucția toxică a membranelor hepatocitare este semnalată în literatură (11).

Lotul intoxicație cu alcool alilic, dar care a primit Hepabionta, are glicemia crescută față de martor, dar este mai mică comparativ cu cea a lotului A. La același lot (AHb) conținutul hepatic de glicogen se situează în limite normale ( $-6,23\%$ ; modificare nesemnificativă comparativ cu martorul), pe cind G6Paza și GPa sunt scăzute ca și la lotul care a primit numai alcool alilic. Rezultă că într-o oarecare măsură tratamentul în regim preventiv și curativ cu Hepabionta, contracarea efectele nocive ale toxicului.

Lotul care a fost intoxicație cu alcool alilic și a primit ulei de Oenothera biennis are glicemia, conținutul hepatic de glicogen, precum și activitatea GPa hepatică în limite normale. Activitatea G6Pazei este scă-

zută față de martor ( $-34,85\%$ ;  $p < 0,001$ ), dar modificarea este semnificativ mai mică comparativ cu lotul A. Uleiul de Oenothera biennis este bogat în acizi grași nesaturați, ce sunt precursori esențiali pentru sinteza moleculei de colesterol. Apoi, colesterolul este component indispensabil al membranei plasmatiche a hepatocitelor, precum și a membranelor organitelor intracelulare, cum este reticulul endoplasmatic și mitocondriile (4). Este posibil ca efectul benefic al administrării uleiului de Oenothera biennis în regim preventivo-curativ la șobolanii intoxicați cu alcool alilic, să fie datorat surplusului de acizi grași nesaturați aduși în organismul șobolanilor intoxicați și care constituie practic „cărămizi” pentru refacerea membranelor plasmatiche hepatocitare, dar și a membranelor organitelor celulare, distruse de agentul toxic.

#### CONCLUZII

1. Intoxicația cu alcool alilic produce puternice modificări ale unor parametri metabolici la șobolan.
2. Administrarea hepatoprotectorului Hepabionta, dar mai ales a uleiului de Oenothera biennis în regim preventiv și curativ la șobolanii intoxicați cu alcool alilic, contracarea efectul nociv al toxicului.

#### BIBLIOGRAFIE

1. ABRAHAM A. D., TIMAR M., în Vol. *Pathological models in toxicological studies*, Proceedings of the 6th Symposium on Drug Toxicity, Cluj-Napoca, 1983.
2. ADAMS E. I., THORPE E., BRIT J. Exp. Pathol., 51 : 394, 1970.
3. BELL A. N., MEHENDALE H. N., Toxicol. Lett. 35 : 191–200, 1987.
4. BENGA GH., *Biologie celulară și moleculară*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1985.
5. BORȘA M., ABRAHAM A. D., CRĂCIUN C., Studia Univ. „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca, 29 : 53–58, 1984.
6. CHIȘ L., ABRAHAM A. D., în vol. : *Pathological models in toxicological studies*, Proceedings of the 6th Symposium on Drug Toxicity, Cluj-Napoca, 1983.
7. COPREAN D., RUSU A. M., GIURGEA R., POPESCU H., POLINICENCU C., Clujul Med., 59 : 333–337, 1986.
8. COPREAN D., GIURGEA R., BORȘA M., RUSU A. M., St. cerc. biol., Ser. biol., anim., 42 : 29–33, 1990.
9. CRĂCIUN C., în : *Pathological models in toxicological studies* Proceedings of the 6th Symposium on Drug Toxicity, Cluj-Napoca, 1983.
10. DAVID A., Int. Arch. Occup. Environ. Health., 48 : 49, 1981.
11. DEKKER M., în : *Toxicol injury of the liver* (ed. E. FABER și M. M. FISCHER), Inc. New York, p. 549, 1980.
12. HARPER A. E., în : *Methoden der enzymatischen Analyse* (ed. H.U. BERGMEYER), Verlag Chemie Weinheim, p. 788, 1962.
13. HEDRICK J. L., FISCHER E. H., Biochemistry, 4 : 1337, 1965.
14. HICKEBOTTOM R. S., HORNBROOK K. P., J. Pharmacol. Exp. Ther., 178 : 383–394, 1971.
15. LOCKARD V. G., MEHENDALE H. M., O'NEAL R. M., Exp. Mol. Pathol., 39 : 246–255, 1983.
16. MONTGOMERY R., Arch. Biochem Biophys., 67 : 378, 1957.
17. NELSON N., J. Biol. Chem., 153 : 735, 1944.
18. POPPER H., Falk Symp., 22, M T P Lancaster, 1977.

19. RUSU A. M., *Refacerea ficatului de pasăre și mamifer în toxicoză*, Teză de doctorat, Univ. din Cluj-Napoca, 1986.
20. SNEDECOR G., COCHRAN W., *Statistical methods*, 6th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, 1978.
21. SUCIU A., SCHWARTZ A., LEZEU A., în: A. 3-a Conf. — *Masă Rotundă, Trofopar, Eficacitatea clinică*, Constanța, p. 158—165, 1980.
22. TESSMANN D., K. Nicsovics, HOLTZ M., *Zbl. Pathol., Anat.*, 107: 370—377, 1965.
23. WEBER E., *Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner*, G. Fischer Verlag, Jena, 1980.

## EFFECTELE TRATAMENTULUI CU PENTOXIFILINĂ ASUPRA DEZVOLTĂRII EMBRIONARE LA ȘOBOLANUL ALB

G. PUICĂ, RODICA GIURGEA și D. COPREAN

Embryotoxic effects of pentoxifylline were determined in three successive generations. Males were not treated; females were treated with pentoxifylline for the whole duration of pregnancy in all the three generations. The daily dose of pentoxifylline was 190 mg per kg body weight (10% of the LD<sub>50</sub>). The toxic effects became stronger in every generation. We obtained a gradual reduction of the weight and length of the fetuses, paralleled with a gradual increase of the number of dead implantations and resorbed embryos. Compared to the control group, the fertility of intoxicated females was also reduced.

Cercetările cu privire la efectele pentoxifilinei, un vasodilatator periferic, asupra organismului animal sunt numeroase în ultimii ani și sunt axate în majoritate pe influențele acestuia asupra proprietății eritrocitelor (4, 7, 9) cît și asupra îmbunătățirii circulației sanguine în diferite organe (5, 8). Există de asemenea unele date cu privire la acțiunea acestui medicament asupra greutății ovarelor și a veseiculelor seminale (6), cît și asupra motilității spermatozoizilor (10). Nu am găsit însă date, în literatură de specialitate, referitoare la efectele asupra dezvoltării embrionare. Din această cauză, în această lucrare am urmărit efectele pe care pentoxifilina le are asupra dezvoltării embrionare, în cursul a trei generații de șobolani.

### MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolance Wistar, aflate în perioada de gravideitate și care au fost tratate pe tot parcursul acestei perioade cu pentoxifilină. Pentoxifilina (1-(5-oxohexil)-3,7-dimetil-xantina) produs al Intreprinderii Terapia din Cluj-Napoca, s-a administrat zilnic în doza de 10% din DL<sub>50</sub> oral (DL<sub>50</sub> oral s-a găsit de 1900 mg/kg corp). Animalele au fost crescute în condiții zoogiene corespunzătoare, apă și hrana fiind administrate *ad libitum*. Șobolancele cîte 20 pe fiecare lot (lot martor și lot tratat cu pentoxifilină) au fost puse timp de 24 ore la imperechiat, cu masculi nefratatați, sănătoși. După acest interval de timp masculii au fost scoși de la femele și s-a făcut controlul fecundității, prin urmărire a dopului spermatic. Administrarea pentoxifilinei s-a făcut prin gavaj intragastric. În ziua a 22-a de gestație, o parte din femelele gestante au

fost sacrificiate, recoltindu-se fetușii care au fost supuși studiului embriotoxic. Restul femeilor au fost lăsate să nască normal în vederea studiului embriotoxic la generația următoare de fetuș. Fetușii obținuți prin sacrificarea mamelor au fost cintăriți și urmăriți, ca lungime. S-au urmărit eventualele răsorbții embrionare și implantări moarte, cît și eventualele anomalii teratogene.

Rezultatele privind greutatea și lungimea fetușilor au fost prelucrate statistic prin testul „t” al lui Student. Valorile aberante au fost eliminate după criteriul Chauvenet. S-a calculat diferența procentuală față de martor ( $D\%$ ), iar semnificația statistică a fost considerată de la  $p = 0,05$ .

#### REZULTATE SI DISCUȚII

Datele prezentate în tabelul nr. 1 evidențiază că în urma tratamentului cu pentoxifilină greutatea și lungimea fetușilor, la toate cele trei generații, se situează sub valorile lotului martor. Diferențele dintre loturile

*Tabelul nr. 1*  
Greutatea (g) și lungimea (cm) fetușilor din cele trei generații de řobolance gravide tratate cu pentoxifilină

	Greutate		Lungime	
	sting	drept	sting	drept
<b>Coarne uterine.</b>				
Martor	5,59 ± 1,34	5,05 ± 0,02	4,46 ± 0,009	4,47 ± 0,015
Tratat	4,82 ± 0,02	4,86 ± 0,02	4,13 ± 0,44	4,37 ± 0,032
$D\%$	-13,78	-3,77	-7,4	-2,24
$p < 0,001$	<0,001	<0,001	<0,01	
<b>Generația I-a</b>				
Martor	5,29 ± 0,03	5,51 ± 0,08	4,57 ± 0,01	4,66 ± 0,04
Tratat	3,66 ± 0,40	3,26 < 0,32	3,26 ± 0,19	3,35 ± 0,19
$D\%$	-30,82	-40,84	-28,67	-28,11
$p < 0,001$	<0,001	<0,001	<0,001	
<b>Generația II-a</b>				
Martor	4,92 ± 0,20	5,28 ± 0,05	4,69 ± 0,04	4,45 ± 0,01
Tratat	3,57 ± 0,12	3,31 ± 0,12	3,11 ± 0,11	3,08 ± 0,11
$D\%$	-27,44	-37,32	-33,67	-30,79
$p < 0,001$	<0,001	<0,001	<0,001	
<b>Generația III-a</b>				
Martor	4,92 ± 0,20	5,28 ± 0,05	4,69 ± 0,04	4,45 ± 0,01
Tratat	3,57 ± 0,12	3,31 ± 0,12	3,11 ± 0,11	3,08 ± 0,11
$D\%$	-27,44	-37,32	-33,67	-30,79
$p < 0,001$	<0,001	<0,001	<0,001	

Sunt trebute valorile medii ± eroarea standard la loturile martor și tratate cu pentoxifilină. Alte explicații în text.

tratate și martor, în toate cazurile, sunt semnificative statistic, chiar și la prima generație unde desi diferențele sunt mici, datorită dispersiei reduse a valorilor individuale, semnificația statistică este evidentă. Se poate

constata că pe măsura înaintării în generații reducerea greutății și lungimii fetușilor se accentuează.

Observațiile noastre evidențiază că indicele de fertilitate, în cazul tratamentului cu pentoxifilină, se situează la 50%, în timp ce la lotul martor atinge 85%. Media embrionilor viabili, de pe fiecare corn uterin, a fost de 9 la lotul martor și 6-7 la lotul tratat cu pentoxifilină. La toate femeile, indiferent de generația la care ne referim, au fost găsite implantări moarte, numărul lor crescând odată cu înaintarea în generație. La nici unul din fetușii celor trei generații nu s-au evidențiat efecte teratogene.

Pentru că în literatura de specialitate nu am găsit date cu privire la efectele pentoxifilină asupra glandelor sexuale feminine și nici asupra dezvoltării embrionare, este greu de interpretat rezultatele și de explicat modul în care acest medicament acționează. Așa după cum am arătat mai sus, administrarea de pentoxifilină scade greutatea ovarelor (6), fenomen pe care și noi l-am constatat într-un studiu anterior, în care s-a aplicat un tratament cronnic cu o doză mai mare de pentoxifilină (50% din DL<sub>50</sub> oral), (date nepublicate).

Mecanismul de acțiune al pentoxifilină a fost explicat de Bessler și colab. (1,2) ca datorindu-se metabolismului acestui produs, care are ca rezultat formarea de metilxantine, produși cu acțiune puternică asupra celulei vii. După afirmațiile acestor autori, pentoxifilina ar determina o acumulare în celule de AMP. Pe de altă parte există date care arată că produșii de metabolism a pentoxifilină determină o scădere a AMP. (3). Aceste observații contradictorii îngreunează mult explicațiile mecanismelor de acțiune ale acestui vasodilatator periferic. Sunt necesare cercetări ulterioare pentru a putea clarifica mecanismul de acțiune al acestui medicament asupra organelor reproducătoare și a putea explica efectele embriotoxicice pe care le provoacă.

În concluzie, administrarea de pentoxifilină la řobolancele gravide determină accentuate modificări la nivelul fetușilor, modificări care se accentuează în succesiunea generaților.

#### BIBLIOGRAFIE

1. BESSLER H., GILGAI R., DJALDETTI M., ZAHAVI I., L. Leucocyte Biol., 40 : 747-749, 1986.
2. BESSLER H., GILGAI R., ZAHAVI I., DJALDETTI M., Niomed. Pharmaceth., 41 : 439-441, 1987.
3. FREDHOLM B. B., Trend. Pharmacol. Sci., 1 : 129-132, 1980.
4. GIRAUD F., CLARET M., Scand. Jrl. Clin. Lab. Invest., suppl. 156, 41 : 283-284 1981.
5. HARTMANN A., Eur. Neurol., 22 : 108-115, 1983.
6. HIROSHI M., MIZUHO I., TAKAYOSHI K., KONJI M., SHORVO H., Oyo Yakuri, 16 : 557-568, 1978.
7. LEONHARDT H., GRIGOLEIT H., REINHARDT I., Ric. Clin. Lab., 8 : 65-71, 1978.
8. OTT E., LECHNER H., Jrl. CBF, Metabol., 3 : 530, 1983.
9. PORSCHE L., STEFANOVICH V., Arzneim. Forsch., 31 : 825-828, 1981.
10. YOVICH J., EDIRISINGHE W. R., CUMMINS J. M., YOVICH J. L., Fertil. Steril., 50 : 179-181, 1988.

IMPLICAREA UNOR DEHIDROGENAZE ÎN  
METABOLIZAREA METANOLULUI LA BACTERIA  
METILOTROFĂ *METHYLOMONAS* SP. *M<sub>14.1</sub>*

I. ST. BONTAŞ

In the present paper the authors carried out an investigation of methanoldehydrogenase,  $\alpha$ -cetoglutaratdehydrogenase and malatdehydrogenase of the *Methylomonas* sp. *M<sub>14.1</sub>* producing bacterial proteins (SCP) on methanolic substrates. The enzymes have been investigated from both metabolic and taxonomic standpoints. It is very probable that *Methylomonas* sp. *M<sub>14.1</sub>* should be a new bacteria with an incomplete Krebs cycle and the metabolism of methanol occurs on ribulosomonophosphate pathway.

Este binecunoscut că prima enzimă implicată în metabolizarea metanolului, cel puțin la bacteriile obligat metilotrofe, este metanoldehidrogenaza (1), (5), (7), (10). Sub acțiunea acesteia, metanolul trece în formaldehidă, care în final va fi transformată în diferiți compuși cu carbon ce vor intra în ciclul Krebs. La acest nivel acționează două enzime importante:  $\alpha$ -cetoglutaratdehidrogenaza și malatdehidrogenaza. Ele sunt specifice, însă numai anumitor grupe de bacterii metilotrofe, în special celor care prezintă ciclul Krebs complet. Dar există o serie de bacterii metilotrofe care nu posedă aceste enzime. Ele au ciclul Krebs incomplet și sunt, în general, obligat metilotrofe. Cunoașterea acestor enzime oferă informații privind căile metabolice particolare ale microorganismelor respective (3), (13) și sunt folosite drept criterii la clasificarea lor (1), (6).

Lucrarea de față se referă la metanoldehidrogenază,  $\alpha$ -cetoglutaratdehidrogenază și malatdehidrogenază, identificate la bacteria metilotrofă *Methylomonas* sp. *M<sub>14.1</sub>*, studiindu-le atât din punct de vedere metabolic și din punct de vedere al sistematicii microorganismului.

#### MATERIAL ȘI METODE

Bacteria metilotrofă *Methylomonas* sp. *M<sub>14.1</sub>* a fost cultivată pe un mediul de cultură cu următoarea compoziție chimică:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 3,0%;  $\text{MgSO}_4$ , 0,03%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6,0%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0%;  $\text{NaCl}$ , 0,15%;  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 1,6%. Mediul de cultură a fost repartizat pe flacoane de 500 ml, cîte 100 ml, a fost inoculat cu 10 ml inocul bacterian și a fost supus procesului de creștere și dezvoltare la agitator rotativ cu 220 rpm, la 30°C, timp de 48 ore.

Activitatea dehidrogenazelor s-a determinat în lichidul de cultură, la intervale diferite de timp.

Activitatea metanoldehidrogenazei s-a determinat prin metoda Kocetov (8), care are ca principiu creșterea valorii extincției amestecului

St. cerc. biol., Seria biol. anim., t. 45, nr. 2, p. 147–150, București 1993.

de reacție, la 340 nm, ca o măsură a reducerii NAD<sup>+</sup> din amestecul de reacție. O unitate enzimatică reduce un micromol de NAD<sup>+</sup> într-un minut, la 25°C, în condițiile date mai sus. S-a exprimat în U/ml. NAD<sup>+</sup> a fost procurat prin firma Serva și are gradul de puritate de 99%.

Tabelul nr. 1

Evoluția metanoldehidrogenazei (MeDH) în raport cu producția de biomă și consumul de metanol

Vîrstă culturii (h)	MeDH (U/mg proteină)	Consum de metanol (g/l)	Biomă umedă (g/l)	S.U (g/l)
12	278,22	4,6	18,30	6,42
24	1158,77	15,56	28,31	11,31
36	963,32	9,40	31,11	14,32
48	786,18	6,12	33,14	17,32

Concentrația proteică a probei s-a determinat prin metoda Lowry et al. (9) și s-a exprimat în mg/ml.

Activitatea specifică a enzimei s-a exprimat în unități pe mg de proteină (U/mg).

Activitatea —  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenazei și malatdehidrogenazei s-a evaluat prin metoda cu clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (12). Metoda se bazează pe capacitatea dehidrogenazelor de a transfera hidrogenul de la diferite substrate la clorura de 2,3,5-trifeniltetrazoliu, care se

Tabelul nr. 2

Determinarea activității  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenazei ( $\alpha$  — KGDH) și malatdehidrogenazei (MDH) la bacterie *Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub>

Vîrstă culturii (h)	$\alpha$ — KGDH	MDH
12	absentă	absentă
24	absentă	absentă
36	absentă	absentă
48	absentă	absentă

reduce și trece în trifenilformazan colorat în roșu. Intensitatea culorii este proporțională cu activitatea dehidrogenazelor. Ca donori de hidrogen s-au utilizat  $\alpha$  — cetoglutaratul de sodiu, pentru cetoglutaratdehidrogenază și malatul de sodiu, pentru malatdehidrogenază.

### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele privind activitatea metanoldehidrogenazei în raport cu producția de biomă și consumul de metanol sunt consemnate în tabelul 1. După cum se poate observa cu ușurință, activitatea metanoldehidrogenazei crește pînă la 24 ore de cultivare, cînd atinge valoarea de 1158,77 U/mg proteină, după care scade pînă la 48 ore de cultivare, cînd înregistrează numai 786 U/mg proteină. În raport cu creșterea activității metanoldehidrogenazei, consumul de metanol crește și el, atingind la 24 ore de cultivare valoarea maximă de 15,56 g/l, ca apoi să scadă pînă la 6,12 g/l, la 48 ore de cultivare.

O activitate metanoldehidrogenică ridicată, pe de o parte și un consum de metanol accelerat, pe de altă parte, explică în mod implicit și o acumulare substanțială de biomă. Biomasa crește accelerat pînă la 24 ore de cultivare, cînd atinge valoarea de 28,34 g/l, după care creșterea sa devine din ce în ce mai lentă pînă în finalul procesului.

Din cele relatate mai sus, am putea aprecia că *Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub> biosintetizează o metanoldehidrogenază extrem de activă și cu potential metabolic remarcabil. De fapt, multe bacterii utilizatoare de metanol, cu procese catabolice intense, necesită cantități apreciabile de substrat, metabolizarea lui avind loc pe căi specifice, în prezența unei metanoldehidrogenaze cu activitate superioară. Toate acestea sunt considerate bacterii obligat metilotrofe (2), (3), (10), (13).

Cercetările noastre au urmărit, într-o altă ordine de idei, implicarea  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenazei și malatdehidrogenazei în metabolizarea metanolului la bacterie *Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub>. Enzime binecunoscute ale ciclului Krebs. Aceste enzime pe lîngă rolul lor metabolic, mai au însă și un rol important în clasificarea bacteriilor metilotrofe. Este de altfel cunoscut că bacteriile care nu posedă  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenază sunt bacterii obligat metilotrofe cu membrane interne de tip I (2), (3), (13), (14) și ciclul Krebs incomplet, pe cînd cele care nu posedă  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenază activă, dar posedă malatdehidrogenază sunt tot bacterii obligat metilotrofe, însă cu membrane interne de tip II. La acestea din urmă, catabolizarea metanolului se face prin enzime „malice” (6), (11), (13), ele putînd să utilizeze în mod alternativ calea ribulozomono-fosfatului sau serinei de incorporare a carbonului în materialul celular.

Bacteriile care nu posedă nici  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenază și nici malatdehidrogenază sunt considerate bacterii metilotrofe stricte. Ele utilizează pentru incorporarea carbonului în materialul cellular calea ribulozomono-fosfatului (1), (2), (13), (14).

*Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub>, după cum se poate observa din tabele 1 și 2, prezintă o metanoldehidrogenază foarte activă, dar  $\alpha$  — cetoglutaratdehidrogenaza și malatdehidrogenaza lipsesc. Rezultă, deci, că *Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub> este o bacterie metilotrofă strictă, ce utilizează calea ribulozomono-fosfatului de asimilare a metanolului.

### CONCLUZII

1. *Methylomonas* sp. M<sub>14.1</sub> posedă o metanoldehidrogenază foarte activă a cărei activitate se corelează cu consumul de metanol și acumularea de biomă în lichidul de cultură.

2. Bacteria *Methylomonas* sp. M<sub>14:1</sub> nu posedă  $\alpha$ -cetoglutarat-dehidrogenază și nici malatdehidrogenază ca enzime implicate în metabolizarea metanolului.

3. Absența  $\alpha$ -cetoglutaratdehidrogenazei și malatdehidrogenazei confirmă că *Methylomonas* sp. M<sub>14:1</sub> este o bacterie obligat metilotrofă cu membrane interne de tip I și ciclul Krebs incomplet; metabolizarea metanolului făcindu-se pe calea ribulozomonofosfatului.

#### BIBLIOGRAFIE

1. ANTHONY C., ZATMAN L. J., Biochem. J., 96 : 808, 1965.
2. ANTHONY C., Sci. Prog. Oxford, 62 : 167, 1975.
3. BABEL W., WISS Z., Ernst-Moritz-Arndt-Univ. Greifswald, 1980.
4. BONTAS ST. I., *Cercetări asupra unor bacterii metilotrofe în vederea obținerii de proteine microbiene (SCP) pe metanol*, Teză de doctorat, Univ. „Al.I. Cuza” din Iași, 1986.
5. FAUST U., PRAVE P., *Biotechnology*, vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim Dierfield Beach, Florida, Basel, p. 84, 1983.
6. HACKING A. J., QUAYLE J. R., Biochem. J., 139 : 399, 1974.
7. HARRINGTON A. A., KALLIO R. E., Can. J. Microbiol., 6 : 1, 1960.
8. KOCETOV A. G., *Practiceskoe rukovodstvo po enzymologii*, Moskva, Višaia škola, p. 145, 1980.
9. LOWRY H. O., ROSEBROUGH J. N., FARR L. A., RANDALL J. R., J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951.
10. OHTA S., FUJITA T., TOBARI J., J. Biochem., 90 : 205, 1981.
11. SALEM A. R., HACKING A. J., QUAYLE J. R., Biochem. J., 136, 1 : 89, 1973.
12. SIMON C., Immun. Forsch., 113 : p. 45, 1956.
13. TROTSENKO YU. A., Acta Biotechnol., 3, 3 : 269, 1983.
14. WITTENBURY R., PHILLIPS K. C., WILKINSON J. F., J. Gen. Microbiol., 61 : 205, 1970.

Primit în redacție la 14 februarie 1993

Facultatea de științe industriale  
Iași, Splai Bahui Ștâng nr. 71

#### NOTĂ CĂTRE AUTORI

Revista „Studii și cercetări de biologie, Seria biologie animală” publică articole originale de nivel științific superior din toate domeniile biologiei animale: morfologie, taxonomie, fiziologie, genetică, ecologie, etc. Sumarele revistei sunt completate cu alte rubrici ca:

1. Viață științifică, ce cuprinde unele manifestări științifice din domeniul biologic, ca simpozioane, lucrările unor consfătuiri etc. 2. Recenzii, care cuprind prezentări asupra unor cărți de specialitate apărute în țară și peste hotare.

Autori sunt rugați să înainteze articolele, notele și recenziiile dacitografiate la două rânduri, în două exemplare.

Bibliografia, tabelele și explicația figurilor vor fi dacitografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș pe hârtie de calci. Figurile din planse vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Citarea bibliografiei în text se va face prin numere. În bibliografie se vor cita, alfabetic și cronologic, numele și inițiala autorilor (cu majuscule), titlurile cărților (subliniate) sau al revistelor (prescurtate conform uzanțelor internaționale), volumul urmat, în cazul în care este menționat, de număr (în paranteză), despărțit prin : de pagina și an. Lucrările vor fi însoțite de o prezentare în limba engleză, de maximum 10 rânduri. Textul lucrărilor, inclusiv bibliografia, explicația figurilor și tabelele nu trebuie să depășească 7 pagini dacitografiate.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

La revue „Studii și cercetări de biologie, Seria biologie animală” paraît deux fois par an.

Toute commande de l'étranger sera adressée à ORION SRL,  
Splaiul Independenței 202 A, Bucarest 6, Roumanie, PO BOX 74-19  
Bucarest, Tx 11939 CBT X R, Fax (40) 13122425.

