

## MODIFICĂRI ENZIMATICE CORELATE CU VARIANTA CONDIȚIILOR DE MEDIU:

Modificarea activităților colinesterazice la lilieci, în hibernare.

HORST KOLASSOVITS

Lumea animală prezintă un tablou extrem de variat al modificărilor adaptive pe care le suferă organismul supus unor variații ale condițiilor de mediu. Un interes deosebit prezintă acele modificări, care constituie răspunsuri ale organismului la variații regulate ale parametrilor externi, cum sînt variațiile sezoniere.

Între vertebrate există un mic grup de specii cu un comportament cu totul deosebit din acest punct de vedere: sînt animalele hibernante. Homeoterme în timpul verii și poichiloterme în timpul iernii, aceste animale au două tipuri de metabolism profund diferite în funcție de sezon. Spre deosebire de poichiloterme, care nu „luptă” împotriva frigului, ci-l „suportă”, încetinindu-și în mod corespunzător reacțiile metabolice, în conformitate cu legile termodinamicii chimice, spre deosebire de homeoterme, care-și mențin metabolismul la un nivel constant, prin reglarea activă, între limite largi ale variațiilor temperaturii ambiante, hibernantele (care sînt mamifere, deci derivă din forme homeoterme) devin poichiloterme într-o anumită zonă de temperaturi. Această zonă termică, în care mamiferele hibernante renunță la „lupta” pentru homeotermie, este aceea a temperaturilor obișnuite în timpul iernii, în adăposturile speciilor respective. La aceste temperaturi, animalul își încetinește metabolismul și, scufundat în așa-zisul somn hibernal, devine un poichiloterm. Temperaturile de primăvară îl „trezesc” și-l readuc la homeotermie. Determinismul acestei reveniri este în parte direct, fenomenul depinzînd de temperatura mediului; în parte însă, el este grefat ereditar, constituind un ritm biologic sezonier format prin adaptarea speciilor la mediu.

Modificările metabolice sînt în fond modificări ale activității unor enzime. În ce privește trecerea la și revenirea din hibernare, natura schimbărilor enzimatice nu este bine cunoscută.

Prezenta lucrare constituie o mică contribuție la această problemă a carei elucidare ar constitui un important pas pe linia înțelegerii mecanismelor

prin care organismul se adaptează la variația factorilor de mediu. Am lucrat pe liliac, *Nyctalus noctula*, mamiferul hibernant cel mai ușor accesibil de la noi. Am urmărit activitatea colinesterazică (ChE) din hematii, din creier și din ficat. Colinesterazele sînt enzime cu roluri multiple și adesea recunoscute. Despre enzimele din acest grup se știe că intervin în cel puțin două fenomene de cea mai mare importanță în organism: transmitia impulsului nervos prin sinapse (inclusiv plăcile motorii ale musculaturii somatice) și permeabilitatea membranelor celulare.

#### MATERIAL ȘI TEHNICA

Hematiile au fost obținute prin centrifugarea singelui proaspăt recoltat prin decapitarea animalului. Ele au fost spălate de trei ori cu ser Tyrode și recentrifugate, apoi cîntărite (toate operațiile au fost executate în eprubetele de centrifugă în prealabil cîntărite). Hematiile au fost lăsate să nemolizeze timp de 10 min cu 1 cm<sup>3</sup> de apă distilată. Creierul (encefalul în întregime) a fost izolat imediat după sacrificare, cîntărit și zdrobit într-un mojar de sticlă cu sticlă pisată; s-a omogenizat bine cu 2 cm<sup>3</sup> de ser Tyrode. S-a procedat la fel pentru ficat.

Testarea activității enzimaticice s-a făcut prin metoda biologică a lui Bacq (1935). În principiu, metoda constă în urmărirea dispariției efectelor unei soluții de acetilcolină pusă în contact cu materialul de cercetat. Drept test biologic am folosit mușchiul drept abdominal al broaștei, *Rana esculenta*, mușchi tonic care răspunde prin contractură la administrarea acetilcolinei.

Practic, s-a procedat în felul următor: La extractul apos de țesut s-a adăugat soluție de clorhidrat de acetilcolină 1 : 2 000 astfel, ca să revină 10 mg ACh la un gram de țesut. Amestecul era incubat într-un termostat, la 37°. La diferite intervale, se luau probe de cîte 0,8 cm<sup>3</sup>, ce se adăugau la serul dintr-o baie de 80 cm<sup>3</sup>, în care se găsea mușchiul de broască montat la o instalație de înregistrare grafică a contracției. După fiecare contracție, mușchiul era spălat cu ser pînă la revenirea completă. La începutul și la sfîrșitul fiecărei experiențe, se făcea cîte o probă oarbă pentru testarea reactivității mușchiului: se adăuga în baie 0,8 cm<sup>3</sup> sol. ACh 1 : 2 000; dacă reactivitatea a scăzut mult în cursul probelor, experiența respectivă nu era luată în considerare.

Activitatea ChE a fost exprimată în unități convenționale, prin raportarea la un etalon. (Wittenberger C., Roșca D. I., Kolassovits H., 1960). Drept etalon am ales activitatea ChE din creierul de șobolan. Se știe că în sistemul nervos central al mamiferelor enzima este foarte activă și că această activitate nu depinde practic de variația mediului (temperatură, anotimp). Extractul de creier de șobolan a fost preparat ca și acela din țesuturile de liliac și incubat cu soluție de ACh 1 : 2 000, 10 mg g. Calculul s-a făcut astfel: dacă un gram din țesutul de liliac a inactivat 10 mg de ACh în  $t_1$  minute, iar un gram de creier de șobolan în  $t_2$  minute, atunci raportul  $t_2/t_1$  exprimă valoarea relativă a activității ChE din țesutul cercetat. De exemplu, dacă timpul de inactivare este de 20 de minute cu creierul de șobolan și de 10 minute cu cel de liliac, atunci activitatea ChE a acestuia din urmă raportată

la a celui dintâi este  $20/10 = 2,0$  unități convenționale (se înțelege, că timpul de inactivare este cu atât mai scurt, cu cât activitatea e mai mare).

Experiențele (în număr de 30) au fost efectuate în lunile august—martie, în laboratorul Catedrei de fiziologie animală de la Universitatea din Cluj-Napoca.

REZULTATE

Valorile exprimate sînt redade în tabelul de mai jos. rezultatele au fost grupate în funcție de anotimp și de starea animalului: T = animale treze în mod normal; H = în somn hibernal; HT = trezite în laborator în perioada semnuului hibernal, prin ținere la temperatura de  $12-15^{\circ}$  timp de 4—8 ore. În experiențele făcute primăvara, liliecii erau în perioada ieșirii din hibernare Unii erau „adormiți”, alții „treji”; rezultatele le dăm separat.

Tabelul 1

ACTIVITATEA COLINESTERAZICĂ LA LILIAE, ÎN FUNCȚIE DE ANOTIMP ȘI DE STAREA HIBERNALĂ.

Anotimpul: Starea:	Toamna T	Iarna		Primăvara	
	T	H	HT	H	T
HEMATII					
x	—	1,59	—	2,38	2,86
n	—	6	—	5	5
ES	—	0,23	—	0,35	0,38
P (T față de H)					0,10
P (prim. față de iarnă)				0,05	
CREIER					
x	1,59	0,92	1,14	2,73	1,80
n	5	6	4	7	5
ES	0,25	0,11	0,15	0,28	0,32
P (HT sau T față de T)			0,05		=0,05
P (iarna față de toamnă; prim. față de iarnă)		0,05		0,01	
FICAT					
x	—	0,31	0,14	0,34	0,29
n	—	5	3	7	5
ES	—	0,02	0,02	0,05	0,02
P (HT sau T față de H)			0,01		0,10
P (prim. față de iarnă)				0,10	0,02

x = media valorilor (unități convenționale); n = numărul de indivizi; ES = eroarea standard; P = probabilitatea (pe baza testului „t”); pentru celelalte indicații, vezi textul.

DISCUȚII

Rezultatele noastre arată, că în activitatea ChE la liliae se produc modificări în cursul unui ciclu anual, unele fiind corelate cu starea de veghe sau de hibernare, altele cu anotimpul. Tesuturile se comportă diferit sub acest aspect, unele față de altele.

Activitatea ChE a hematiilor este mai mare primăvara decât iarna, chiar dacă se iau în considerare, la seria din primăvară, numai animalele în hibernare. Același lucru se observă la creier, dar nu și la ficat. Se știe că sistemul nervos și hematiile posedă altă enzimă decât ficatul: acetil-ChE în primul caz, pseudo-ChE în al doilea. Se pare deci că numai acetil-ChE posedă un adevărat ritm sezonier: spre primăvară, activitatea ei crește, pregătind organismul pentru o activitate mai intensă, atât pe plan metabolic (hematiile) cât și pe acela al funcțiilor de relație (creierul).

În cazul creierului, experiențele făcute toamna arată că activitatea scade la intrarea în hibernare. Interesantă este situația din primăvară, în perioada ieșirii din hibernare: activitatea crește net înainte de „trezirea” animalelor, întrecând valoarea pe care a avut-o toamna, înaintea intrării în hibernare; după ce animalele „s-au trezit”, valoarea scade la nivelul celei din toamnă. Presupunem că accentuarea pronunțată a activității ChE cerebrale înaintea revenirii animalelor la starea normală de homeotermie și de activitate constituie un indice al faptului că exacerbarea funcționării centrilor nervoși pregătește organismul pentru „trezire”.

La ficat, situația se prezintă altfel. Atât timp cât animalul se găsește în condițiile sale naturale, activitatea ChE se menține constantă (valorile din tabel sînt 0,31; 0,34; 0,29). Dacă însă animalul este „trezit” artificial, activitatea scade puternic. Scăderea aceasta, deși nu-i putem da o interpretare amănunțită, reflectă evident o profundă perturbare metabolică provocată de scoaterea „cu forță” a animalului din hibernare.

Un fenomen asemănător a mai fost descris la creierul de broască: iarna, activitatea ChE scade și, pe acest fond „parabiotic”, o excitație puternică produce efecte deosebit de grave. (Jitariu P., Jitariu M., Brînzei P., Topală N., Agrigoroaie St., 1959).

În concluzie activitatea colinesterazică a țesuturilor constituie, la animalele hibernante, un test sensibil al adaptării la cerințele mediului, test în măsură să scoată în evidență deosebirile de la un țesut la altul în ce privește natura factorilor ecologici la care acestea sînt sensibile.

#### BIBLIOGRAFIE

- Bacq, Z. M., 1935, *La cholinestérase chez la Invertébrés*, C. r. Soc. Biol. Paris, vol. 120, p. 247—248.
- Jitariu P., Jitariu M., Brînzei P., Topală N., Agrigoroaie St., 1959, *Les variations des effets produits par des excitations électriques puissantes sur les poissons marins, en fonction de l'état préalable de leur système nerveux*. Lucr. Ses. șt., Staț. zool. mar. „Prof. Ioan Borcea” Agiza (1956), p. 35—70.
- Roșca D. I., Kolassovits H., Wittenberger C., 1957, *Cercetări asupra rezervei colinesterazei la câteva nevertebrate din Marea Neagră*. Studii Cerc. Biol. Cluj-Napoca, vol. 8, p. 403—407.
- Wittenberger C., Roșca D. I., Kolassovits H., 1960, *Cercetări asupra activității colinesterazice la nevertebrate*, II. *Intensitatea comparată a activității colinesterazice la clișiva crustacei marine și salmaștri*. Studii Cerc. Biol. Cluj-Napoca, vol. 11, p. 161—166.

## ENZYMATISCHE VERÄNDERUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT SCHWANKUNGEN DER UMWELTBEDINGUNGEN:

Veränderungen der Cholinesteraseaktivität bei Fledermäusen im Winterschlaf.

### Zusammenfassung

Die kleine Artengruppe der hibernanten Wirbeltiere weist im Verlaufe eines Jahres zwei saisonbedingte Stoffwechselformen auf: sie sind homootherm im Sommer und werden poikilotherm im Winter, in einer bestimmten Temperaturzone. Das Erwachen aus dem Winterschlaf ist durch den Temperaturanstieg im Frühjahr bedingt, jedoch teilweise auch durch einen jahreszeitlichen Biorhythmus, der erblich verankert ist. Stoffwechselveränderungen sind im Grunde genommen Veränderungen der Enzymtätigkeiten.

Die Art der enzymatischen Veränderungen bei Eintreten in den Winterschlaf und beim Erwachen daraus ist erst unvollständig bekannt.

Die vorliegende Arbeit stellt einen kleinen Beitrag zur Klärung dieses Problems dar. Es wurde die Cholinesteraseaktivität (ChE) der roten Blutkörperchen, des Gehirnes und der Leber untersucht. Die Enzyme dieser Gruppe haben eine grosse Bedeutung bei der synaptischen Übertragung der nervösen Reizleitung und bei der Membranpermeabilität.

Die Messung der ChE wurde nach der biologischen Methode von Bacq durchgeführt, wobei der gerade Bauchmuskel von *Rana esculenta* als biologischer Test verwendet wurde. Um den jahreszeitlichen Reaktionsschwankungen der Froschmuskulatur Rechnung zu tragen, wurde als Vergleichstest Homogenat des Rattengehirns benützt. Die konventionellen Masseinheiten wurden durch Verhältnisgleichungen errechnet. Die Werte sind in Abb. 1 angeführt. T = wache Tiere; H = im Winterschlaf; HT = während des Winterschlafes im Laboratorium aufgeweckt (4—8 St. bei 12°—15°C).

Interessant sind einige Feststellungen: die ChE-Aktivität der roten Blutkörperchen und des Gehirns sind im Frühjahr grösser als im Winter, was bei der Leber nicht zutrifft. Dieses ist erklärlich, da im Gehirn und den roten Blutkörperchen Acetyl-ChE vorhanden ist, während in der Leber Pseudo-ChE. Nur die Acetyl-ChE weist also einen echten saisonären Biorhythmus auf.

Die ChE-Aktivität des Gehirns zeigt ein Absinken beim Eintritt in den Winterschlaf und was beachtenswert ist, ein klares Ansteigen vor dem „Erwachen“ im Frühling, was darauf hindeutet, dass das Nervensystem den Organismus auf das „Erwachen“ vorbereitet.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die ChE-Aktivität der Gewebe von hibernanten Wirbeltieren einen sensiblen Test der Anpassungsfähigkeit an die Umweltbedingungen darstellt.

So kann die unterschiedliche Ansprechbarkeit verschiedener Gewebe auf ökologische Reizfaktoren für welche sie empfindlich sind, festgestellt werden.

HORST KOLASSOVITS

Liceul teoretic nr. 2 Sibiu 2400