

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ZUZANNA KRAŚNICKA, KRYSZYNA  
RENKAWEK

## AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW OKSYDACYJNYCH W TKANCE GLEJO- WEJ HODOWANEJ *IN VITRO* \*

### I. DEHYDROGENAZY ZWIĄZANE Z KOENZYMEM I I DEHYDROGENAZA BURSZTYNOWA

Z Zakładu Neuropatologii PAN w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. E. Osetowska

Doniesienie niniejsze stanowi pierwszą część obszerniejszego opracowania, którego przedmiotem jest zmienność reakcji enzymatycznych związanych ze śródkomórkowymi procesami utleniania w gleju hodowanym *in vitro* w zmieniających się warunkach środowiskowych (niedobór tlenu lub jego brak, zmienne pH *medium* hodowanego oraz działanie różnorodnych czynników chemicznych zmieniających przepuszczalność błon komórkowych). Tematem przedstawianej części pracy było badanie aktywności niektórych enzymów oksydacyjno-redukcyjnych, z grupy beztlenowych dehydrogenaz w normalnej hodowli tkanki glejowej.

Aktywność enzymatyczna dehydrogenaz związanych z koenzymem I i II w tkance glejowej stanowiła przedmiot stosunkowo licznych doniesień, które ukazały się w ciągu lat ostatnich (Friede 1958, 1961, 1962, Friede, Fleming i Knoller 1963, Rubinstein, Klatzo i Miquel 1962, Smith i Rubinstein 1962, Osterberg i Wattenberg 1962, Adams, Davison i Gregson 1963, Ibrahim i Adams 1963, Mossakowski 1963, Chason, Gonzalez i Landers 1963, Meyer i Meyer 1964). Mimo różnic wyników uzyskiwanych w odniesieniu do aktywności poszczególnych dehydrogenaz, powszechnie przyjął się pogląd, że stosunkowo niska aktywność enzymatyczna prawidłowego gleju wzrasta bardzo znacznie w przypadkach odczynowego rozplemu i przerostu gleju, związanego z takimi procesami jak demielinizacja (Friede 1961, Ibrahim i Adams 1963), uszkodzenia na-

\* Praca wykonana w oparciu o pomoc finansową PL 480 Program US Public Health Service, agreement 227704.



czyniopochodne (Friede 1961, Osterberg i Wattenberg 1962, Chason, Landers i Gonzalez 1963), obrzęk mózgu (Rubinstein, Klatzo i Miquel 1962) lub gojenie się mechanicznych czy termicznych uszkodzeń tkanki nerwowej (Osterberg i Wattenberg 1962, Mossakowski 1963). Istotne zmiany w natężeniu reakcji enzymatycznych w gleju obserwowano również w przebiegu dojrzewania układu nerwowego (Meyer i Meyer 1964), a przede wszystkim w trakcie procesu mielinizacji (Friede 1961). Yonezawa, Borstein, Peterson i Murray (1962) prowadzili badania nad aktywnością enzymów oksydacyjnych w tkance nerwowej hodowanej *in vitro*.

Model hodowli tkanki glejowej wydawał się nam szczególnie korzystny, jeśli chodzi o możliwość prześledzenia zmienności aktywności enzymatycznej w procesie wzrastania tkanki i jej dojrzewania. Stwarza on możliwości dobierania różnorodnych warunków doświadczalnych trudnych do osiągnięcia *in vivo*. Ponadto pozwala on na wykonywanie badań histochemicznych na tkance żywej, nie poprzedzonych jej utrwaleniem czy zamrażaniem prowadzącym do jej mniejszych lub większych uszkodzeń. Wydawało nam się również celowe porównanie wyników badań histochemicznych prowadzonych na gleju w hodowli tkanek z danymi uzyskanymi przez różnych autorów na materiale uformowanej tkanki.

#### MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na hodowli tkanki glejowej z mózdzku 6–24 godzinnych noworodków szczurzych (szczury białe rasy Wistar).

Technika hodowli tkanek. Dokładne dane techniczne hodowli tkanki glejowej stosowane w Pracowni Hodowli Tkanek Zakładu omówione są szczegółowo w odrębnym doniesieniu (Kraśnicka i Mossakowski, 1965).

W tym miejscu podajemy jedynie podstawowe dane techniczne. Hodowle prowadzono we flaszkach Carrela na wąskich szkiełkach nakrywkowych. Fazę stałą hodowli stanowił żelifikowany kolagen, przygotowany sposobem Borsteina (1958). W skład fazy płynnej wchodziły: inaktywowana surowica ludzka, 10% wyciąg 9-dniowych zarodków kurzych w płynie Earle'a oraz 5% glukoza, w proporcjach jak 5 : 4 : 1. Badania histochemiczne prowadzono na hodowlach, których wiek przeżycia wynosił 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15-19, 21, 25, 28 i 30 dni. Badanie obejmowało następujące enzymy z grupy enzymów oksydacyjno-redukcyjnych: dehydrogenazę bursztynową, dehydrogenazę koenzymu I oraz związane koenzymem I (NAD) dehydrogenazy: kwasu mlekowego (LDH), jabłkowego (MDH), glutaminowego (GDH) i alkoholu etylowego (ADH).

Technika histochemiczna. Świeże, nieutrwalone hodowle na szkiełku przenoszono bezpośrednio z medium hodowlanego do roztworu inkubacyjnego. Czas inkubacji w termostacie o temperaturze 37° wynosił 1 godzinę 30 minut dla dehydrogenazy koenzymu I oraz 2 godziny dla pozostałych enzymów. Po inkubacji preparaty podbarwiano 3% wodnym roztworem eoizyny, odwadniano w alkoholach, prześwietlano w ksylenie i zamykano w Permount. Roztwory inkubacyjne dla poszczególnych dehydrogenaz przygotowywano w następujący sposób: dehydrogenaza



kwasu bursztynowego (wg Potanos, Wolf i Cowen 1959), roztwór wodny bursztynianu sodu, 0,2 M. 0,25 ml, bufor fosforanowy, 0,2 M, pH 7,4...0,25 ml oraz wodny roztwór Nitro BT (1mg/ml) 0,5 ml.

Dehydrogenaza koenzymu I (wg Farbera 1958): roztwór wodny zredukowanego nikotynamidoadenino-dwunukleotydu (NADH) (10 mg 1 ml)... 0,3 ml, bufor fosforanowy 0,2 M. pH 7,4... 0,3 ml oraz roztwór wodny Nitro BT (1mg/ml)... 0,3 ml. Dehydrogenazy związane z koenzymem I NAD (wg zmodyfikowanego sposobu Hessa, Scarpelli i Pearsea 1958): substrat w roztworze wodnym (0,1—1,0 M)..... 0,1 ml, wodny roztwór nikotynamidoadenino-dwunukleotydu NAD (0,1 M).... 0,1 ml, bufor fosforanowy 0,2 M, pH 7,4... 0,25 ml, cyanek potasu (0,1 M) 0,1 ml, wodny roztwór Nitro BT (1 mg/1 ml).... 0,25 ml.

Jako substratu dla poszczególnych dehydrogenaz używano odpowiednio: mleczanu sodu (PPH Polskie Odczynniki Chemiczne), glutaminianu sodu (Xenon, Łódź), kwasu l-jabłkowego (Light, London) zobojętnianego KOH do pH 7,4 oraz 1,0 M roztwór alkoholu etylowego. Stężenie jonów wodorowych wszystkich roztworów inkubacyjnych doprowadzano do standardowego pH 7,2 przy pomocy roztworu buforowego.

#### WYNIKI

Zasadniczy wzorec rozkładu aktywności enzymatycznej był wspólny dla wszystkich badanych dehydrogenaz. Występowały natomiast między nimi wyraźne różnice natężenia reakcji. Dlatego też przy omówieniu poszczególnych enzymów zasadnicze cechy wspólne dla wszystkich zostaną szczegółowo omówione w grupie pierwszej. Do niej też będą odnieszone opisy kolejnych grup, z podkreśleniami przede wszystkim zachodzących między nimi różnic.

Aktywność dehydrogenazy koenzymu I (diaforazy dwufosfonukleotydu pirydynowego). Komórki glejowe we wszystkich badanych hodowlach wykazują wysoką aktywność enzymatyczną, reprezentowaną przez obfite ciemnoniebieskie złogi formazanów. Spostrzega się istotne różnice w rozkładzie i rozmieszczeniu aktywności enzymatycznej — w zależności od typu komórek glejowych i wieku hodowli. Rozkład aktywności enzymatycznej w astrocytach jest praktycznie stały. Ziarna formazanu wypełniają jednolicie zarówno protoplazmę komórek, jak i ich wypustki, aż do najdalszych rozgałęzień. Nagromadzenie ziaren formazanowych w protoplazmie komórek jest niekiedy tak duże, że przesłaniają one wolne od aktywności enzymatycznej jądro. Nie obserwuje się różnic natężenia reakcji w poszczególnych częściach komórki. Ten typ rozkładu aktywności wykazują zarówno typowe wielowypustkowe astrocyty, jak również ich formy niżej zróżnicowane — spongioblasty. W hodowlach starszych (25—30 dni) pojawiają się przerosłe, niekiedy kilkujądrowe postacie astrocytów. Te również cechuje wysoka aktywność enzymatyczna, przewyższająca nawet prawidłowe astrocyty.



Stosunkowo wysoką aktywność obserwowano nawet w komórkach ulegających stłuszczeniu. Protoplazmatyczne złogi formazanowe układają się w nich w siateczkę, której oka tworzą negatywne pod względem enzymatycznym skupienia ciał tłuszczowych. Nie obserwuje się zasadniczych różnic rozkładu aktywności enzymu i jej natężenia w astrocytach w zależności od wieku hodowli. Istotne natomiast różnice pod tym względem spostrzega się w oligodendrocytach. W hodowlach młodych (2—7 dni) ilość oligodendrocytów jest mała, z zasady mniejsza niż astrocytów.

Część z nich układa się wzdłuż cienkich lśniących włókien, odpowiadających wyrastającym z eksplantatu włóknom osiowym komórek nerwowych. Aktywność enzymatyczna oligodendrocytów jest w tym czasie bardzo niska, reprezentują ją nikłe okołojądrowe nagromadzenia ziaren formazanu. W innych komórkach oligodendrogleju obserwuje się nieco obfitsze skupienia formazanu położone w jednym biegunie komórki, tworzące okołojądrową „czapeczkę enzymatyczną”. Nie obserwuje się natomiast żadnej aktywności enzymu w wypustkach oligodendrocytów. Jej nikłe przejawy w wypustkach pojawiają się około 6—7 dnia hodowli. Towarzyszy temu wzrost aktywności enzymatycznej w protoplazmie, przez cały czas jednak umiejscowionej przede wszystkim okołojądrowo. Z wiekiem hodowli narasta natężenie reakcji enzymatycznej w protoplazmie i wypustkach komórek, osiągając najwyższe natężenie około 21 dnia wzrostu, utrzymujące się później na tym samym poziomie. Zwracają uwagę indywidualne różnice w aktywności enzymu w poszczególnych komórkach. Dotyczy to zarówno astrocytów jak i oligodendrogleju. Najwyraźniej występują one w gleju skąpodrzewiastym. W hodowlach 2 i 3 tygodniowych obok dużych komórek skąpowypustkowych z obfitymi złogami śródplazmatycznymi i śródwypustkowymi spotyka się liczne skupienia oligodendrogleju z wąskim okołojądrowym rąbkim aktywności enzymatycznej. Odpowiadają one wczesnym formom aktywności młodego oligodendrogleju.

Aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Natężenie aktywności dehydrogenazy bursztynowej przez cały czas obserwowanego wzrostu hodowli było znacznie niższe niż dehydrogenazy koenzymu I. Aktywność enzymatyczna w astrocytach, identyczna pod względem rozkładu z obrazami obserwowanymi przy badaniu aktywności reduktazy tetrazolowej, różni się od niej tym, że w procesie wzrostu hodowli spostrzega się jej narastanie, manifestujące się zwiększaniem ilości ziaren formazanowych w protoplazmie i w wypustkach komórek gwiazdistych. Proces ten jest procesem ciągłym, bez uchwytne go ostrego początku nasilenia reakcji. Zachowanie aktywności enzymatycznej oligodendrocytów nie różni się zasadniczo od obrazów uzyskanych przy bada-



niu poprzedniej grupy, z tym, że jest ona znacznie niższa. Podobnie jak tam obserwuje się dwa typy rozkładu aktywności enzymatycznej, zależne od wieku hodowli. Hodowle młode charakteryzuje wąski rąbek aktywności enzymu w bezpośrednim otoczeniu jądra komórki skąpowypustkowej, bez aktywności w wypustkach, podczas gdy w hodowlach późnych obserwuje się wzrost aktywności enzymatycznej z równoczesnym pojawianiem się jej w całej protoplazmie komórki i w jej wypustkach. Opisane poprzednio zjawisko różnic indywidualnych natężenia aktywności enzymu w poszczególnych komórkach, zachowanie się jej w przerosłych komórkach glejowych lub w zwyrodniałych i wyrodnijających elementach komórkowych są identyczne z obrazami typowymi dla diaforazy NAD przy znacznie niższym natężeniu aktywności.

Aktywność dehydrogenaz związanych z koenzymem I (dehydrogenaza kwasu mlekowego, kwasu jabłkowego, kwasu glutaminowego i alkoholu). Zasadniczy wzorzec reakcji enzymatycznej w astrocytach i oligodendrocytach nie różni się w tej grupie istotnie od obrazu opisanego powyżej jako typowego dla reduktazy tetrazolowej i dehydrogenazy bursztynowej. Różnice dotyczą jedynie natężenia reakcji, tempa narastania zmian aktywności i morfologicznego obrazu ziaren formazanowych. Wszystkie enzymy charakteryzuje równomierny rozkład aktywności w protoplazmie i wypustkach astrocytów i okołojądrowe nasilenie reakcji enzymatycznej w oligodendrocytach, często z jej biegunowym układem oraz późniejszym pojawieniem się aktywności w ich wypustkach. Najwyższą aktywność w tej grupie wykazuje dehydrogenaza kwasu mlekowego, której natężenie jest niższe jedynie od dehydrogenazy koenzymu I. Aktywność dehydrogenazy kwasu glutaminowego zajmuje drugie miejsce pod względem natężenia reakcji. Niższą aktywność wykazuje dehydrogenaza kwasu jabłkowego, a najniższą dehydrogenaza alkoholowa. We wczesnych hodowlach (do 5 dnia) aktywność dehydrogenazy alkoholowej reprezentowana jest jedynie przez pojedyncze ziarenka formazanowe, położone w bezpośrednim otoczeniu jąder, zarówno w astrocytach jak i oligodendrogleju. W hodowli powyżej 25 dnia aktywność dehydrogenazy alkoholowej wzrasta, osiągając poziom dehydrogenazy bursztynowej. Aktywność wszystkich dehydrogenaz tej grupy wzrasta z wiekiem hodowli. Istotny wzrost obserwuje się w drugim tygodniu rozwoju hodowli. W tym samym czasie obserwuje się pojawienie się aktywności enzymatycznej w wypustkach oligodendrogleju i jej wzrost w protoplazmie komórek skąpowypustkowych. Pojawienie się aktywności wypustkowej w oligodendrogleju przypada zwykle na 7 dzień hodowli. Pewne opróżnienie w tym względzie wykazują dehydrogenaza kwasu jabłkowego i glutaminowego; pierwsze oznaki ich aktywności w wypustkach oligodendrocytów obserwuje się po



10 dniu hodowli. Aktywność enzymatyczna wszystkich dehydrogenaz wykazuje dość znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi komórkami. Jest duża w przerosłych komórkach, maleje w komórkach wyrodnających.

Na podkreślenie zasługują różnice morfologiczne w obrazie ziaren formazanowych, wyznaczających miejsce aktywności poszczególnych dehydrogenaz. Formazan w przypadku dehydrogenazy kwasu jabłkowego i kwasu glutaminowego leży w postaci gruboziarnistych luźno rozrzuconych ziaren, w przeciwieństwie do delikatnych drobnoziarnistych złogów formazanowych dehydrogenazy bursztynowej i alkoholowej i drobno-pałeczkowatych w przypadku dehydrogenazy kwasu mlekowego.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W materiale naszym zwraca uwagę różnica w zachowaniu się aktywności enzymatycznej astrocytów i oligodendrocytów. Różnica ta w mniejszym stopniu dotyczy natężenia reakcji enzymatycznej, a w znacznie większej mierze jej przestrzennego rozmieszczenia. Astrocyty charakteryzuje równomierny rozkład reakcji enzymatycznej w protoplazmie komórek i w ich wypustkach, wykazujący jedynie nieznaczne odchylenia przez cały okres obserwacji. W procesie wzrastania hodowli dochodzi do nasilenia reakcji enzymatycznej wszystkich badanych dehydrogenaz — z wyjątkiem dehydrogenazy koenzymu I, której aktywność od pierwszych godzin wzrostu jest bardzo wysoka. W gleju skąpodrzewiastym obserwuje się dwufazowość aktywności enzymów. Okres wczesny charakteryzuje niska aktywność enzymatyczna, występująca jedynie w otoczeniu jądra, przy zupełnie niewidocznych wypustkach. W okresie późniejszym rozpoczynającym się między 7 i 10 dniem rozwoju hodowli obserwuje się narastanie aktywności enzymatycznej w protoplazmie oligodendrocytów oraz pojawianie się w wypustkach komórkowych. W dalszym okresie rozwoju hodowli aktywność enzymatyczna w oligodendrocytach narasta w okresie mniej więcej do 3 tygodni, ustalając się na tym samym poziomie co w astrocytach a nawet wyższym. Przez cały jednak okres, w sposób typowy, najwyższą aktywność w oligodendrogleju obserwowano w okolicy okołojądrowej lub też w postaci charakterystycznych jednobiegunowych skupień, „czapczek okołojądrowych”. Dwufazowość aktywności enzymatycznej i typowy rozkład aktywności w komórce są zjawiskiem tak stałym i powtarzalnym we wszystkich hodowlach i w przypadku wszystkich dehydrogenaz, że mogą one być uznane za jedną z cech różnicujących astrocyty i oligodendrocyty. Różnice w zachowaniu się aktywności enzymatycznej w astrocytach i w gleju skąpo-



drzewiastym obserwowali Yonezawa i wsp. (1962). Aktywizację enzymatyczną oligodendrogleju w drugim tygodniu wzrostu hodowli wiązali oni z rozpoczynającym się procesem mielinizacji włókien nerwowych. Spostrzeżenia te potwierdzają obserwacje Friedego (1961) i Meyerów (1964). Spostrzegane przez nas obrazy potwierdzają również interpretację Yonezawy i wsp. Dodatkowym argumentem na rzecz tej koncepcji było występowanie pól świeżego wzrostu hodowli, z licznymi młodymi oligodendrocytami, układającymi się wzdłuż wyrastających wypustek komórek nerwowych, podczas gdy w pozostałych obszarach hodowli starych dominowały oligodendrocyty o wysokiej aktywności enzymatycznej. Zjawisko to występowało tylko w tych „starych hodowlach”, w których utrzymywały się kolonie komórek nerwowych. Wzrost aktywności enzymatycznej dehydrogenaz w oligodendrogleju w okresie mielinizacji jest według Yonezawy i wsp. (1962) wskaźnikiem ich współdziałania w tym procesie. Nie obserwowaliśmy natomiast istotnych różnic pod względem natężenia aktywności poszczególnych dehydrogenaz pomiędzy obu typami komórek glejowych.

Najwyższą aktywność wykazywała dehydrogenaza koenzymu I (diapforaza dwufosfonukleotydu pirydynowego) oraz dehydrogenaza kwasu mlekowego. Dehydrogenazy glutaminowa, bursztynowa i jabłkowa wykazywały aktywność mniejszą. Najniższą aktywność charakteryzowała dehydrogenaza alkoholową. Jej obecność w komórkach glejowych w hodowli różni nasze spostrzeżenia od danych Chasona i wsp. (1963), którzy w materiale tkankowym *in vivo* nie obserwowali w ogóle jej aktywności zarówno w gleju prawidłowym jak i odczynowym oraz nowotworowym. Znamienne jest również jej zachowanie w naszym materiale. W najwcześniejszym okresie hodowlanym jej aktywność jest bardzo niska. Wzrasta ona wyraźnie w późniejszych stadiach rozwoju hodowli, przybierając najwyższe natężenie w hodowlach późnych. Jej obecność świadczy o istnieniu w komórkach glejowych przemian prowadzących do powstawania alkoholi. W wyniku ich utleniania dochodzi do powstawania aldehydów, które z kolei mogą wywierać uszkadzający wpływ na komórkę glejową. Proces ten wyraźnie narasta w toku starzenia się hodowli.

Wysoka aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego, zgodna zresztą ze spostrzeżeniami innych autorów (Chason i wsp. 1963, Osterberg i Wattenberg 1962), poczynionymi na materiale tkankowym *in vivo*, przy wysokiej aktywności dehydrogenaz, katalizujących przemiany w cyklu Krebsa, wskazuje na współistnienie w komórkach glejowych zarówno tlenowego jak i beztlenowego toru glikolizy. Wszystkie dehydrogenazy, z wyjątkiem reduktazy tetrazolowej, wykazywały narastanie aktywności enzymatycznej w toku rozwoju hodowli, osiągając najwyższe natężenie po upływie trzech tygodni wzrostu. Dehydrogenaza koenzymu I wykazy-



wała od początku tak wysokie natężenie, że trudno było ocenić jej ewentualne narastanie w toku wzrastania hodowli.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w porównaniu z glejem tkankowym *in vivo*, glej w hodowli tkanek zachowuje się pod względem enzymatycznym tak jak glej odczynowy. Jak już wspominaliśmy, większość autorów podkreśla niską aktywność enzymatyczną dehydrogenaz w gleju prawidłowym, a zwłaszcza w astrogleju (Friede 1961, 1962, Rubinstein i wsp. 1962, Osterberg i Wattenberg 1962, Chason i wsp. 1963, Mossakowski 1963). Aktywność ta wzrasta w procesach reakcji glejowej. W naszym materiale intensywność reakcji enzymatycznej w astrocytach w hodowli jest rzędu aktywności gleju odczynowego, a nawet aktywność dehydrogenazy bursztynowej w astrocytach hodowanych *in vitro* przewyższa jej aktywność w gleju odczynowym obserwowaną przez Osterberga i Wattenberga (1962). Należy jednak pamiętać, że ich spostrzeżenia nie znajdują potwierdzenia w obserwacjach Rubinsteina i wsp. 1962, Chasona i wsp. (1963) i Mossakowskiego (1963), którzy opisywali stosunkowo wysoką aktywność dehydrogenazy bursztynowej gleju odczynowego.

W materiale naszym ponadto zwracają uwagę znaczne różnice indywidualne w natężeniu reakcji enzymatycznych w poszczególnych komórkach tego samego rodzaju gleju, w tej samej hodowli. Różnice te, zależne zapewne od różnych stanów czynnościowych komórek, nie znajdują swojego pokrycia w różnicach morfologii komórkowej. Komórki o tym samym obrazie morfologicznym wykazują różne stopnie aktywności enzymatycznej i *vice versa*: komórki o różnej morfologii charakteryzuje jednakowa aktywność reakcji enzymatycznych.

М. Я. Моссаковский, З. Красницка, К. Ренкавек

#### АКТИВНОСТЬ ОКСИДАЦИОННЫХ ЭНЗИМОВ В ГЛИЕВОЙ ТКАНИ КУЛЬТИВИРОВАННОЙ *IN VITRO*

##### I. Дегидрогеназы связанные с коэнзимом I и янтарная дегидрогеназа

##### Содержание

Гистохимические исследования проводились на культуре глиевой ткани новорожденных крыс породы Вистар. Культура проводилась на желефицированном коллагене крыс в жидкой среде состоящей из сыворотки человека, экстракта куриным эмбрионов, жидкости Ирла и 5% раствора глюкоза. Гистохимические исследования проводились на культурах на 1,2,3,4,5,6,7,10,11,13,14,15—19,21,25,28, 30 — день жизни. Исследовалась активность следующих энзимов: дегидрогеназы коэнзима I, дегидрогеназы янтарной, молочной, глютаминовой, яблочной кислот и этилового алкоголя.



Перед авторами предстояли следующие вопросы:

1. Какова энзиматическая активность дегидрогеназ в зависимости от возраста культуры.
2. Какова энзиматическая активность и разложение в зависимости от типа глиевых клеток.
3. Каковы различия в энзиматической активности дегидрогеназ между отдельными дегидрогеназами.

На основании проведенных исследований авторы приходят к следующим заключениям:

Активность всех исследованных дегидрогеназ, за исключением дегидрогеназы коэнзима I была более низкой в раннем периоде культуры (1—10 дней) чем в позднем периоде. Отличающаяся самой высокой активностью тетраэлозная редуктоза не проявляла заметных различий в зависимости от возраста культуры.

Были обнаружены существенные различия разложения энзиматической активности в зависимости от типа глиевых клеток и возраста культуры. Разложение энзиматической активности в астроцитах характеризуется равномерностью в протоплазме и ее отростках и не изменяется в зависимости от возраста культуры. В олигодендроглии наблюдается двухфазность энзиматической активности. Раннюю фазу до 10 дня характеризует околонуклеарное разложение активности и ее отсутствие в отростках. В более поздней фазе наблюдается повышение активности, ее появление в отростках во весь период самой высокой околонуклеарной активности.

Согласуясь с положениями Ионезавы и сотр. (1962) повышение энзиматической активности олигодендроглии следует объяснять участием олигодендроцитов в процессе миелинизации.

Самой высокой активностью отличается дегидрогеназа коэнзима I и яблочной кислоты. Более низкая активность характеризует дегидрогеназу глютаминовой, янтарной и яблочной кислот. Самая низкая активность относится к алкогольевой дегидрогеназе, которая усиливается в более поздних культурах.

Были обнаружены значительные различия интенсивности энзиматической активности отдельной клетки одного и того-же типа. Эти различия повидимому зависят от функционального состояния клетки.

Клетки подлежащие дегенерации иногда сохраняют высокую энзиматическую активность.

Интенсивность энзиматической активности в глиевых клетках *in vitro* не отличается от активности в реактивной глии *in vivo*.

M. J. Mossakowski, Z. Kraśnicka, K. Renkawek

## ACTIVITY OF OXIDATIVE ENZYMES IN GLIAL TISSUE GROWN IN VITRO

### I. Dehydrogenases linked with coenzyme I and succinic dehydrogenase

#### Summary

Histochemical studies were carried out with tissue cultures of glia from newborn rats on gellified rat collagen in liquid medium composed of human serum, extracts of chick embryos, Earl's buffered solution and 5% glucose. Cultures aged



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15—19, 21, 25, 28 and 30 days were studied. Activity of the following enzymes was investigated: dehydrogenase of coenzyme I, succinic, lactic, glutamic, malic and ethyl alcohol dehydrogenases. The authors sought answers to the following questions:

1. Behavior of activities of the enzymes in relation to age of the culture.
2. Enzymatic activity and its distribution in relation to the type of glial cells.
3. Differences in activity between the different dehydrogenases.

On the basis of the findings, it was concluded that:

1) Activity of all the studied enzymes, with the exception of the dehydrogenase of coenzyme I, was lower in the early stages of growth (1—10 days) than in later stages. Tetrazolium reductase, which exhibited the highest activity, was not affected by the age of the culture.

2) Significant differences in the distribution of enzymatic activity were found in relation to the type of glial cells and age of the culture. Distribution of enzymatic activity in astrocytes was uniform in the protoplasm and its processes and was not significantly changed in relation to age of the cultures. In the case of oligodendroglia, biphasic enzymatic activity was observed. The early phase up to the tenth day was characterized by perinuclear distribution of activity and absence of activity in the processes. In later phases activity increased, and was present in the cell processes although in all periods of culturing the enzymic activity in oligodendroglia was the highest in the perinuclear regions.

3) According to Yonezawa et al (1962), increased enzymatic activity in oligodendroglia is related with to the participation of oligodendroglia in the process of myelinization.

4) The dehydrogenase of coenzyme I and lactic dehydrogenase showed the highest activity. Glutamic, succinic and malic dehydrogenases showed lower activity, and alcohol dehydrogenase the lowest activity, which increased in older cultures.

5) Marked individual differences in intensity of enzymatic activity of different cells of the same type were noted, presumably in connection with the functional state of the cells.

6) Cells undergoing fatty degeneration sometimes exhibited persisting high enzymatic activity.

7) The intensity of enzymatic activity in glial cells *in vitro* is similar to that in reactive glia *in vivo*.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Adams C. W. M., Davison A. N., Gregson N. A.: Enzyme inactivity of myelin. *J. Neurochemistry* 1963, 10, 383—395.
2. Borstein M. B.: Reconstituted rat tail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab. Inv.* 1958, 7, 134—137.
3. Chason J. L., Gonzales J. E., Landers J. W.: Respiratory enzymes activity and distribution in the postmortem central nervous system. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1963, 22, 248—254.
4. Chason J. L., Landers J. W., Gonzales J. E., Bruechner G.: Respiratory enzyme activity of human gliomas, a slide histochemical study. *J. Neuropathology. Exp. Neurol.* 1963, 22, 471—478.
5. Farber E.: cyt. wg Rosnowskiego W.: Dehydrogenazy w skrypcie Metod Histochemicznych. Krygier A. i Godlewski H. PTH i C. 1963. Warszawa.



6. Friede R. L.: Histochemischer Nachweis von Succinodehydrogenase in Biopsien von menschlichen Hirngewebe. *Virchows Arch. Path. Anat.* 1958, 332, 316—223.
7. Friede R. L.: A histochemical study of DPN — diaphorase in human white matter with some notes on myelination. *J. Neurochem.* 1961, 8, 17—30.
8. Friede R. L.: Enzyme histochemical studies in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 1961, 5, 433—443.
9. Friede R. L.: Enzymes d'oxydation du système nerveux central. *World. Neurol.* 1961, 2, 1096—1107.
10. Friede R. L.: The cytochemistry of normal and reactive astrocytes. *J. Neuro-path. Exp. Neurol.* 1962, 21, 471—478.
11. Friede R. L., Fleming L. M., Knoller M.: A quantitative appraisal of enzyme histochemical methods in brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 1963, 11, 232—245.
12. Hess R., Scarpelli D. G., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 753—760.
13. Ibrahim M. Z. M., Adams C. W. M.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in plaques of multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosur. Psychiat.* 1963, 26, 101—110.
14. Meyer J., Meyer P.: Enzyme histochemistry of the growing and adult oligodendroglia. *Acta Neurol. Scand.* 1964, 40, 89—90.
15. Mossakowski M. J.: The activity of succinic dehydrogenase in the reactive glia. *Acta Neuropath.* 1963, 2, 282—290.
16. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z.: Zmienność obrazu morfologicznego gleju hodowli tkanek. *Neuropatologia Pol.* 1965.
17. Osterberg K. A., Wattenberg L. W.: Oxidative histochemistry of reactive astrocytes. *Arch. Neurol.* 1962, 7, 211—218.
18. Rubinstein L. J., Klatzo J., Miquel J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity of glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1962, 21, 116—136.
19. Potanos J. N., Wolf A., Cowen D.: Cytochemical localization of oxidative enzymes in human nerve cells and neuroglia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1959, 18, 627—635.
20. Yonezawa T., Bornstein M. B., Peterson, Murray M.: A histochemical study of oxidative enzymes in cultures of central nervous tissue. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1962, 21, 479—487.

Otrzymano: 14. IX. 1964 r.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii PAN. Warszawa, ul. Pasteura 3.



*Ryc. 1.* Hodowla 14-dniowa. Aktywność dehydrogenazy koenzymu I. Widoczna wysoka aktywność enzymatyczna zarówno w astrocytach jak i w oligodendrocytach. W oligodendrogleju typowy biegunowy rozkład aktywności enzymu. Nitro-BT. Pow. ok. 15 × obj. 40.

*Fig. 1.* Fourteen-day culture. Activity of dehydrogenase of coenzyme I. High enzymatic activity in astrocytes and oligodendrocytes. Typical polar distribution of enzymatic activity in the oligodendroglia. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 2.* Hodowla 14-dniowa. Aktywność dehydrogenazy koenzymu I. Ziarna formazanu wypełniają protoplazmę i wypustki astrocytów. W oligodendrogleju wysoka aktywność enzymatyczna w protoplazmie, w większości komórek nadal nie widoczne wypustki. Nitro-BT. Pow. ok. 15 × obj. 40.

*Fig. 2.* Fourteen-day culture. Activity of dehydrogenase of coenzyme I. Formazan grains fill the protoplasm and processes of the astrocytes. High enzymatic activity in the protoplasm of oligodendroglia; cell processes still absent in most of the cells. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 3.* Hodowla 25-dniowa. Aktywność dehydrogenazy koenzymu I. Grupa astrocytów z wysoką aktywnością cytoplazmatyczną i wypustkową. Nitro-BT. Pow. ok. 15 × obj. 40.

*Fig. 3.* Twenty-five day culture. Activity of dehydrogenase of coenzyme I. Group of astrocytes with activity in the cytoplasm and cell processes. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 4.* Hodowla 7 dniowa. Dehydrogenaza bursztynowa. Niska aktywność enzymatyczna protoplazmatyczna i wypustkowa astrocytów. Okołojądrowe zagęszczenia ziaren formazanu. Nitro-BT. Pow. ok. 15 ×, obj. 40.

*Fig. 4.* Seven-day culture. Succinic dehydrogenase. Low enzymatic activity in the protoplasm and processes of the astrocytes. Perinuclear condensation of formazan grains. Nitro-BT. Magn. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 5.* Hodowla 10 dniowa. Dehydrogenaza bursztynowa. Kolonia astrocytów i oligodendrocytów. Oligodendrocyty wykazują biegunowy układ aktywności. Widoczne krótkie wypustki oligodendrogleju ze złoгами formazanu. Nitro-BT. Pow. ok. 15 ×, obj. 20.

*Fig. 5.* Ten-day culture. Succinic dehydrogenase. Colony of astrocytes and oligodendrocytes. The oligodendrocytes exhibit polar distribution of activity. Short oligodendroglial processes contain formazan deposits. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 20.

*Ryc. 6.* Hodowla 11 dniowa. Dehydrogenaza bursztynowa. Astrocyty z wysoką aktywnością enzymatyczną. Zwracają uwagę indywidualne różnice w aktywności poszczególnych komórek. Nitro-BT. Pow. ok. 15 ×, obj. 40.

*Fig. 6.* Eleven-day culture. Succinic dehydrogenase. Astrocytes with high enzymatic activity. Individual differences in the activity of different cells may be noted. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 7.* Hodowla 25 dniowa. Dehydrogenaza bursztynowa. Kilka astrocytów z wysoką aktywnością enzymatyczną. Nitro-BT. Pow. ok. 15 × obj. 40.

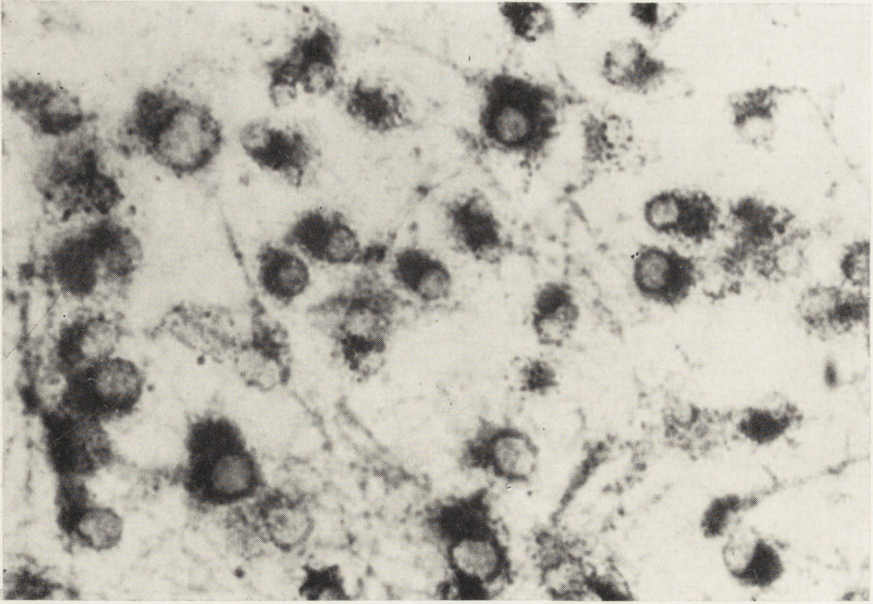
*Fig. 7.* Twenty-five day culture. Succinic dehydrogenase. Several astrocytes with high enzymatic activity. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 40.

*Ryc. 8.* Hodowla 3 dniowa. Dehydrogenaza mlekowa. Grupa komórek glejowych z przewagą oligodendrocytów. Wysoka aktywność enzymatyczna w układach okołojądrowych i biegunowych. Brak aktywności enzymatycznej w wypustkach oligodendrogleju. Nitro-BT. Pow. ok. 15 ×, obj. 20.

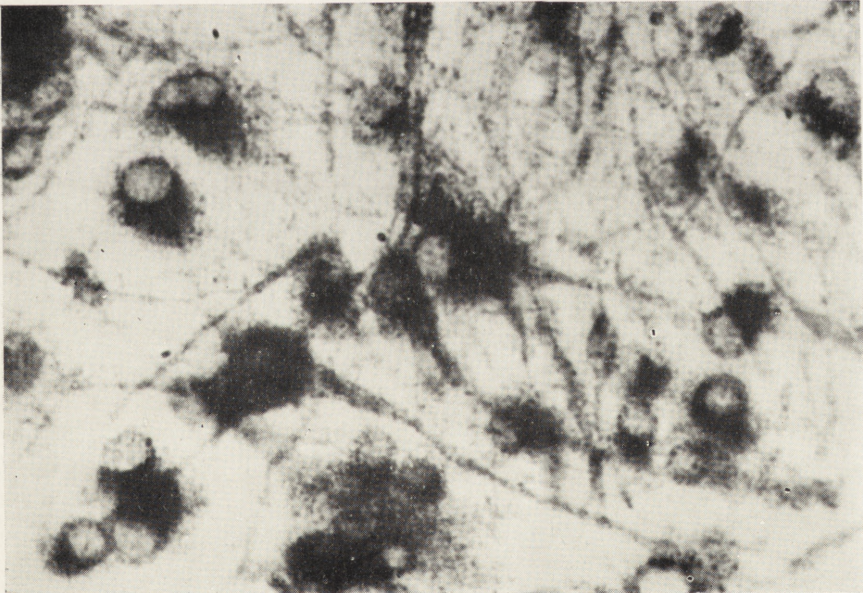
*Fig. 8.* Three-day culture. Lactic dehydrogenase. Group of glial cells with preponderance of oligodendrocytes. High enzymatic activity in the perinuclear and polar systems. Absence of enzymatic activity in the processes of the oligodendroglia. Nitro-BT. Magn. oc. × 15, obj. × 20.

*Ryc. 9.* Hodowla 14 dniowa. Dehydrogenaza mlekowa. Wysoka aktywność enzymatyczna w astrocytach i w oligodendrogleju. Widoczne krótkie wypustki oligodendrocytów. Nitro-BT. Pow. ok. 15 ×, obj. 40.



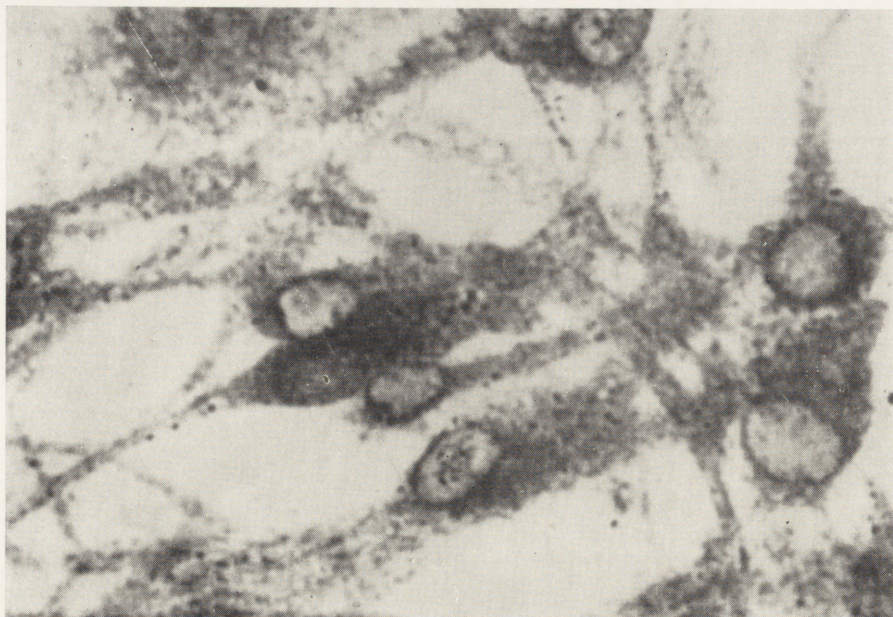


Ryc. 1

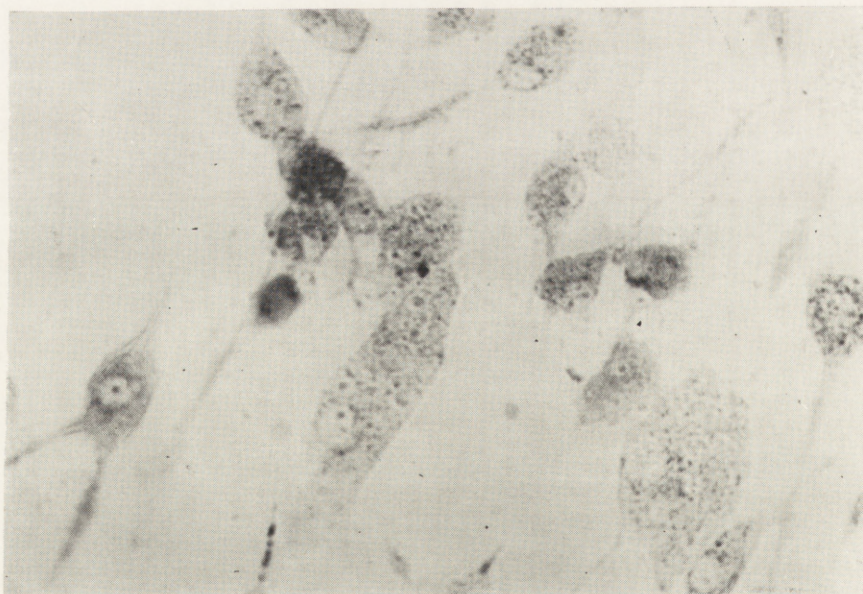


Ryc. 2



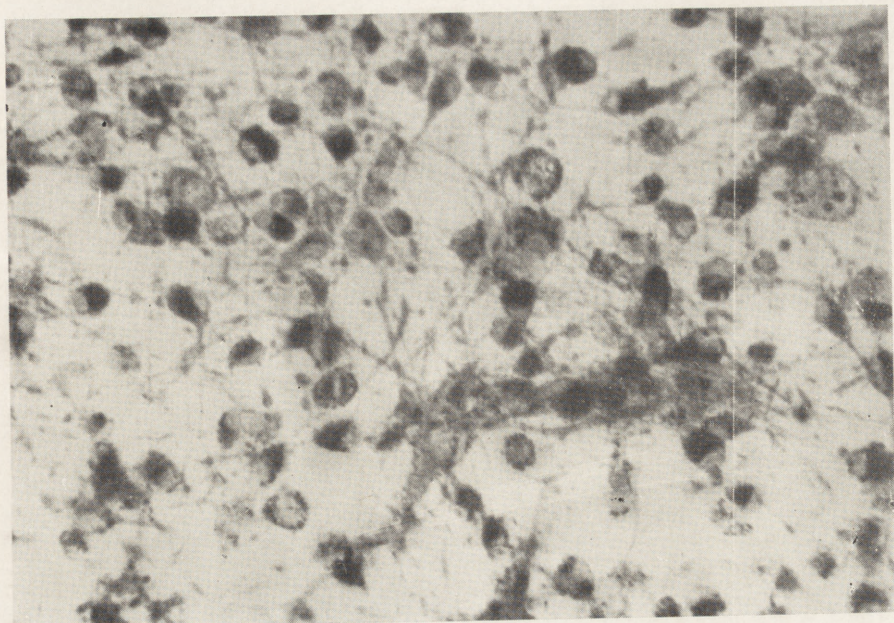


Ryc. 3

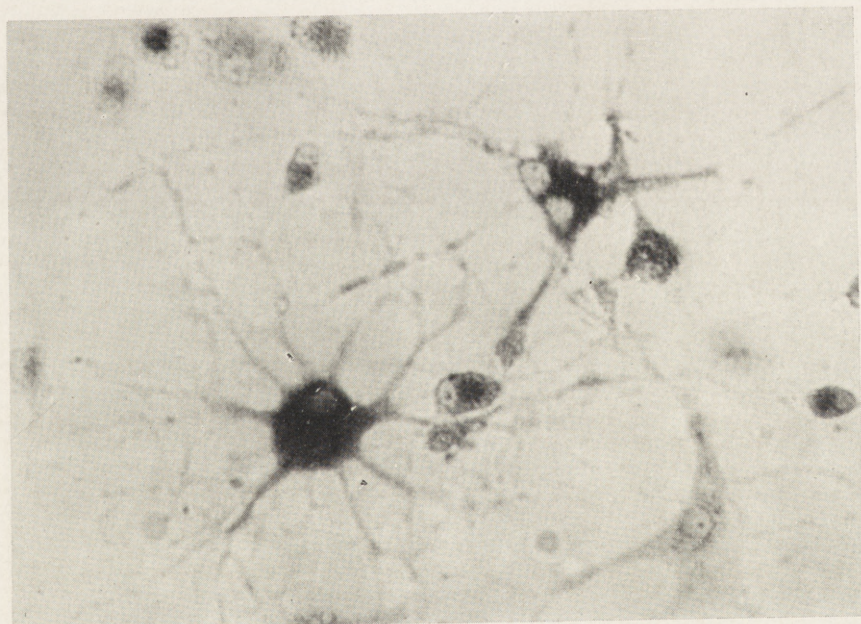


Ryc. 4



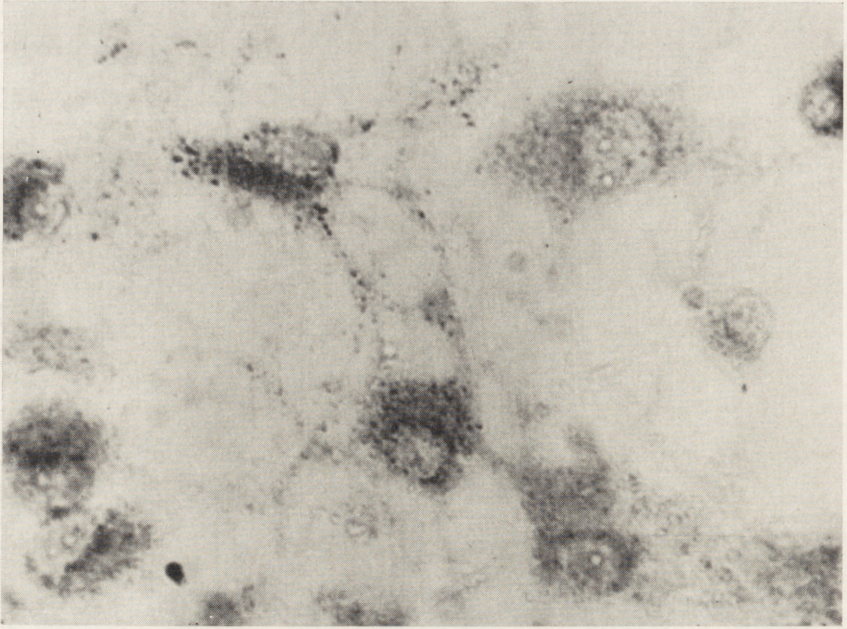


Ryc. 5

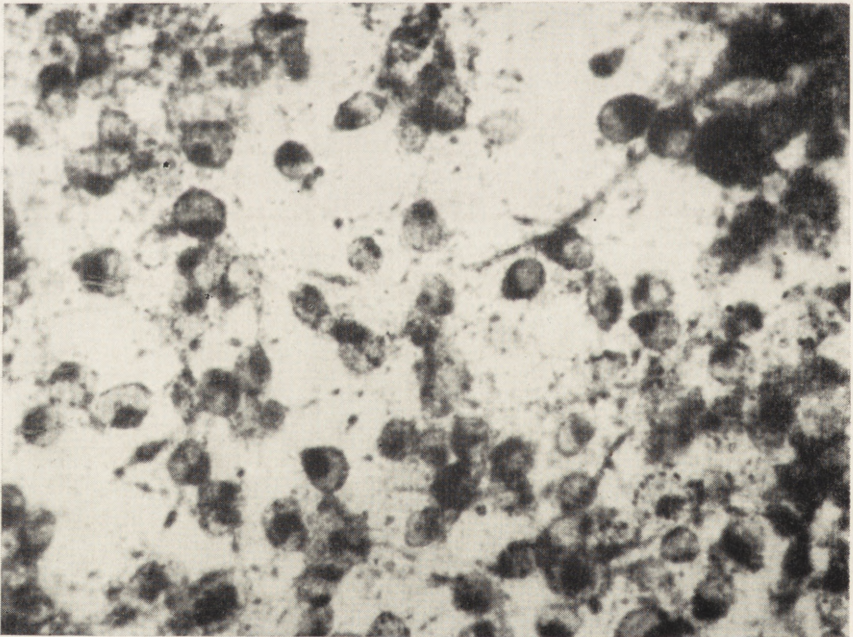


Ryc. 6



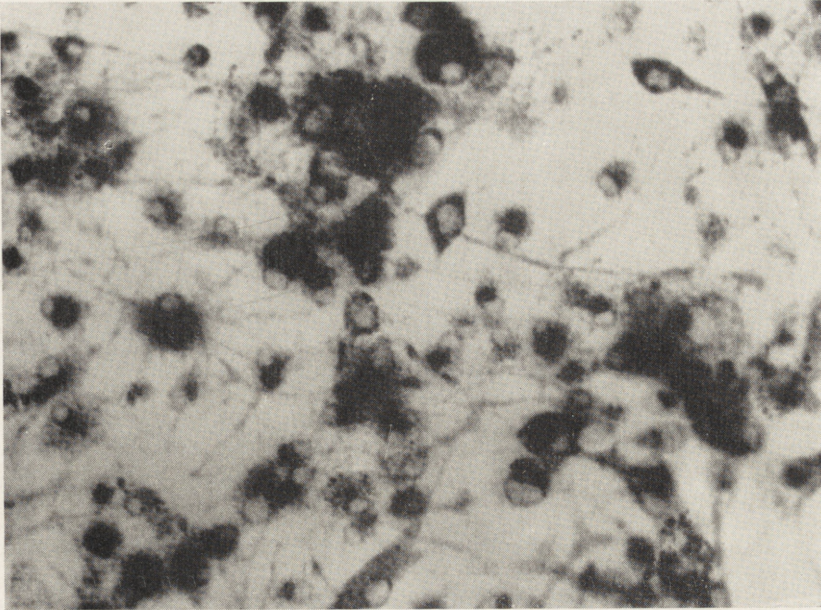


Ryc. 7

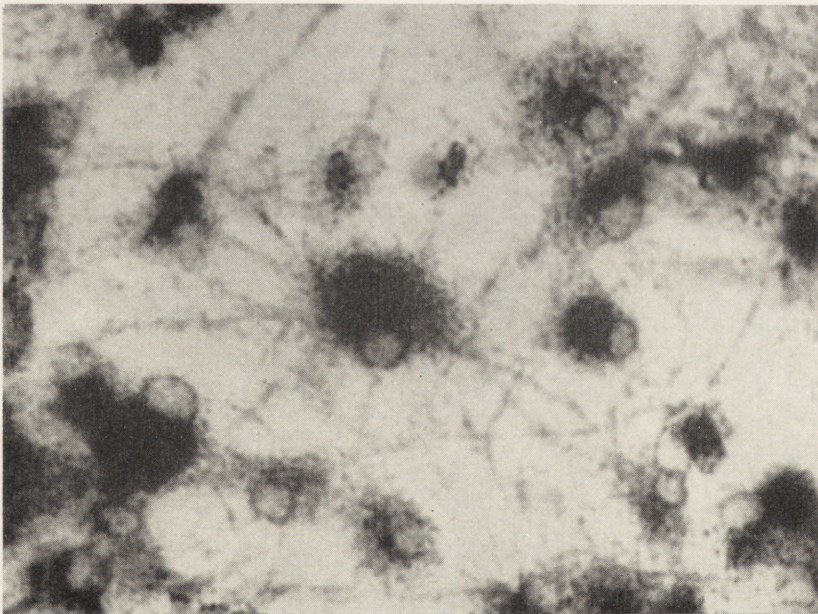


Ryc. 8



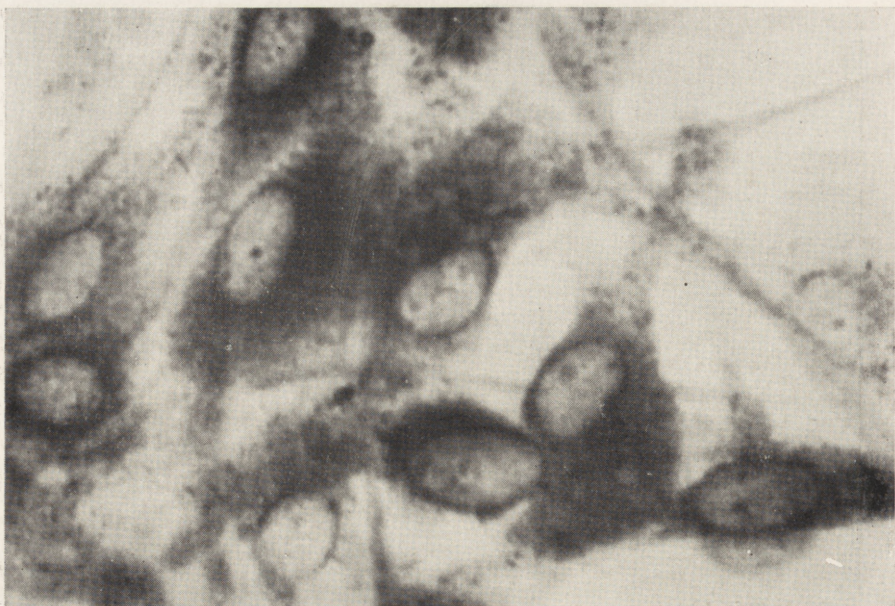


Ryc. 9

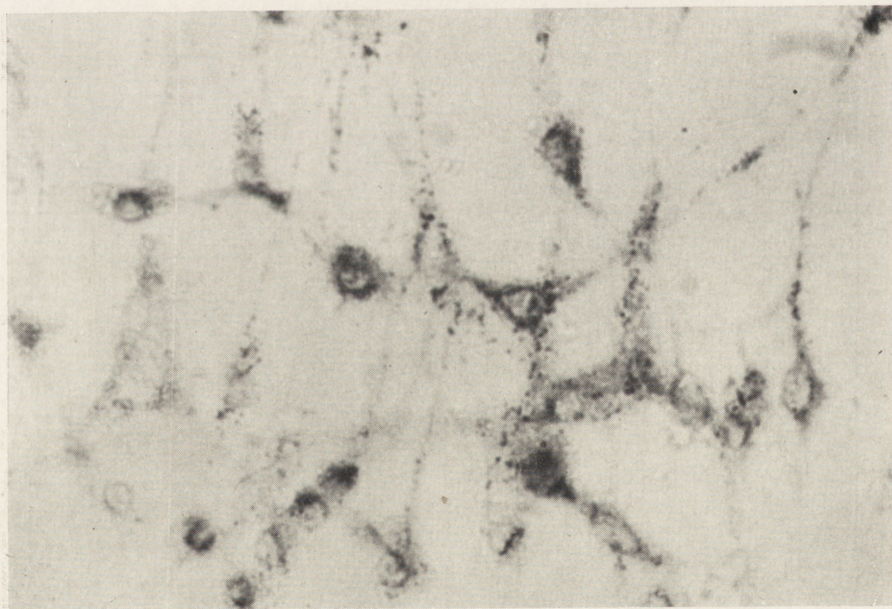


Ryc. 10



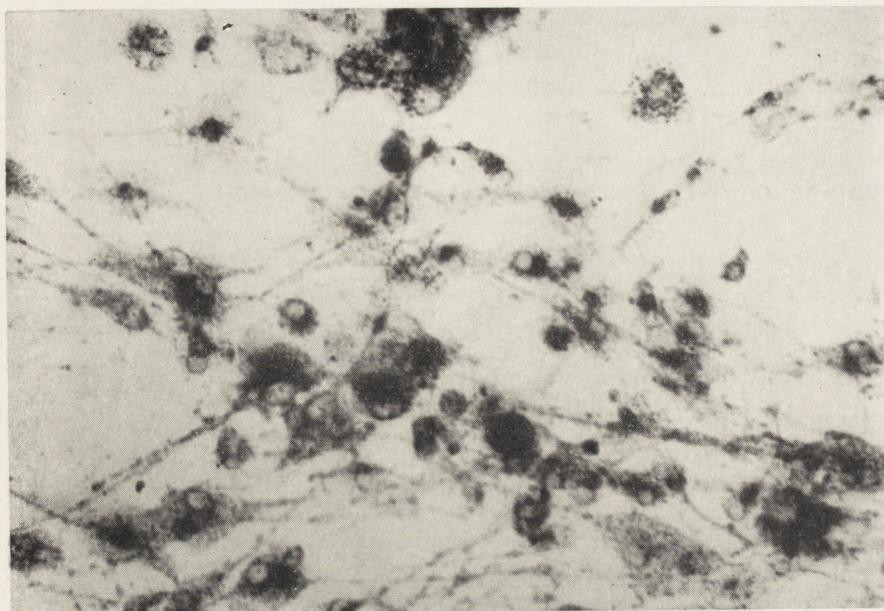


Ryc. 11

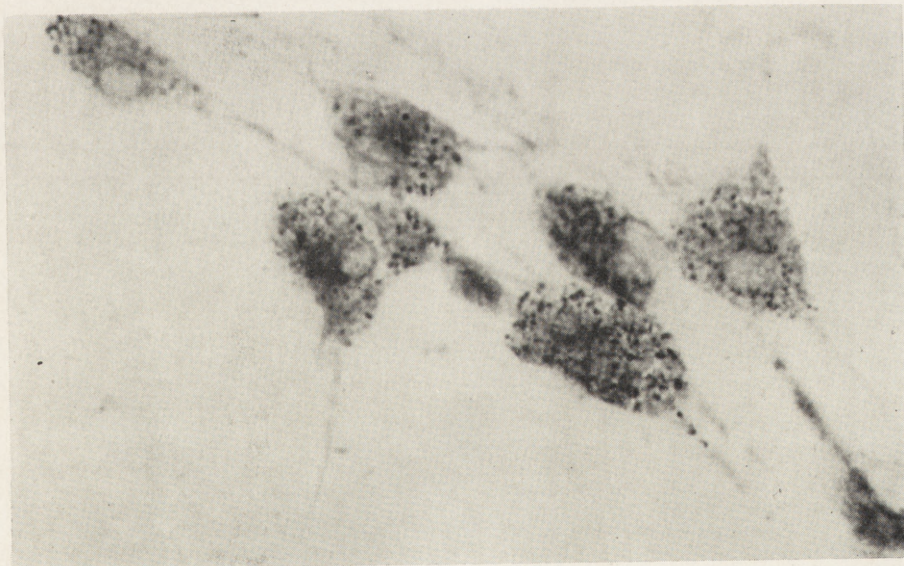


Ryc. 12



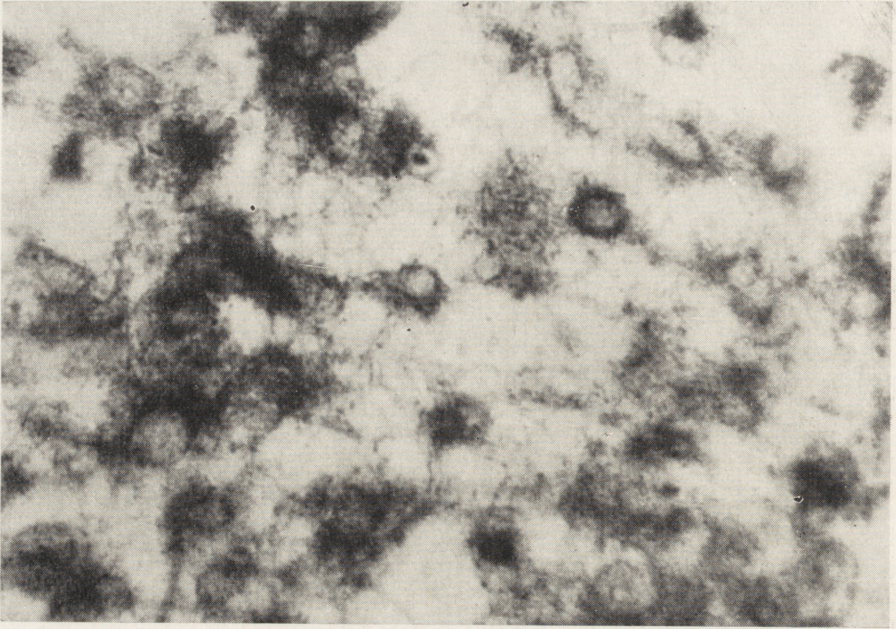


Ryc. 13

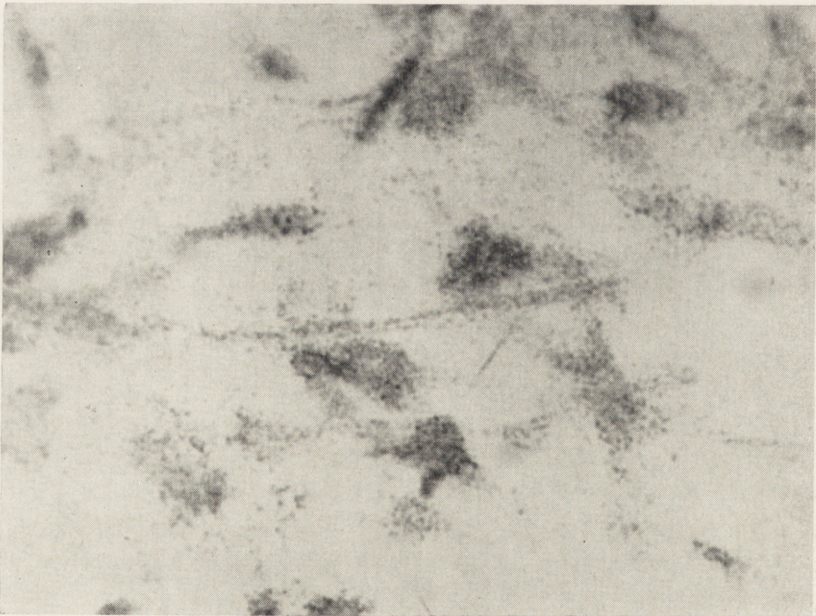


Ryc. 14



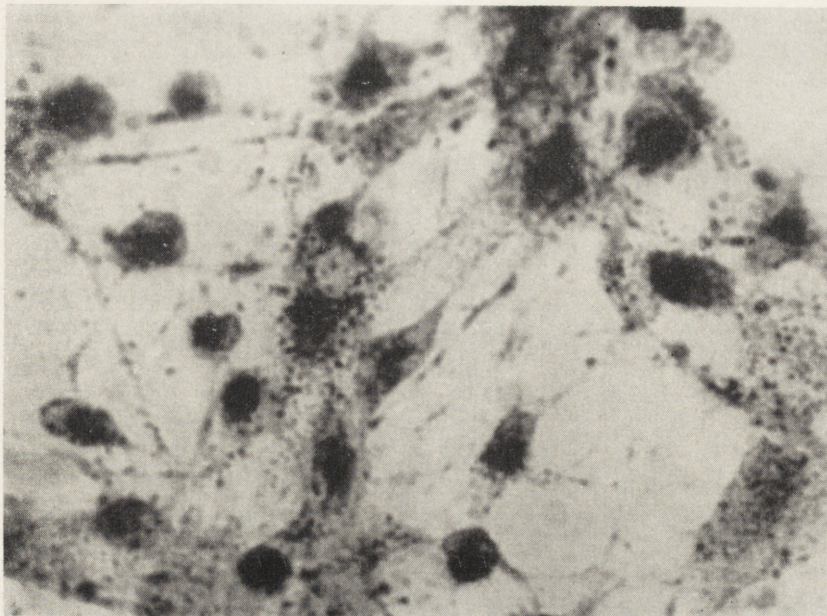


Ryc. 15

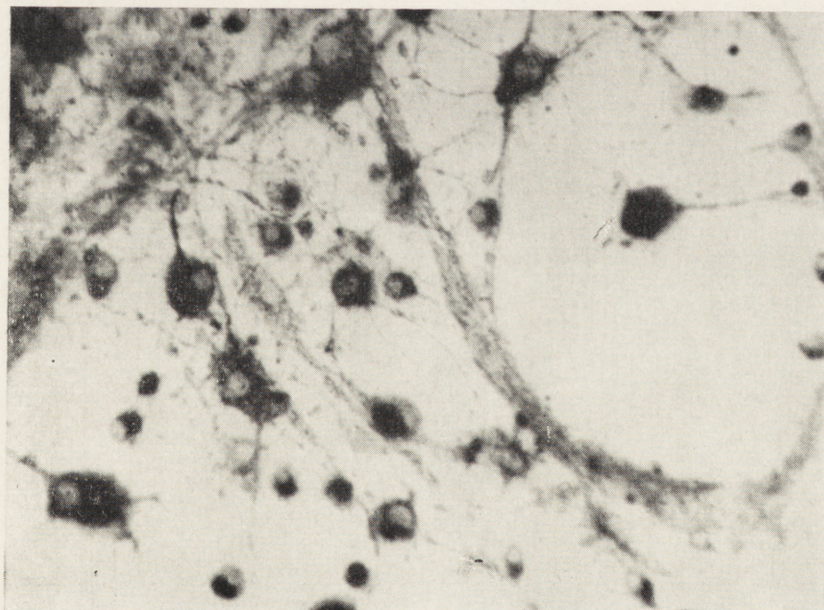


Ryc. 16



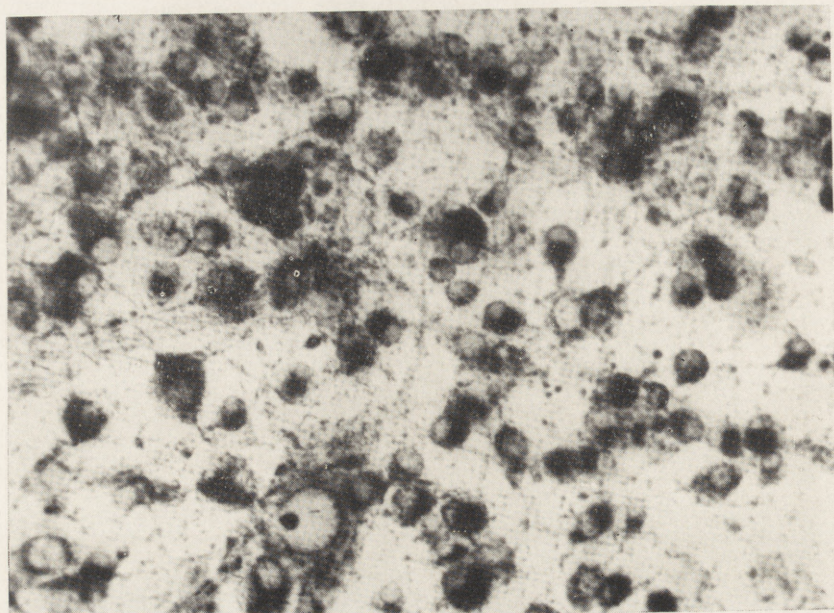


Ryc. 17

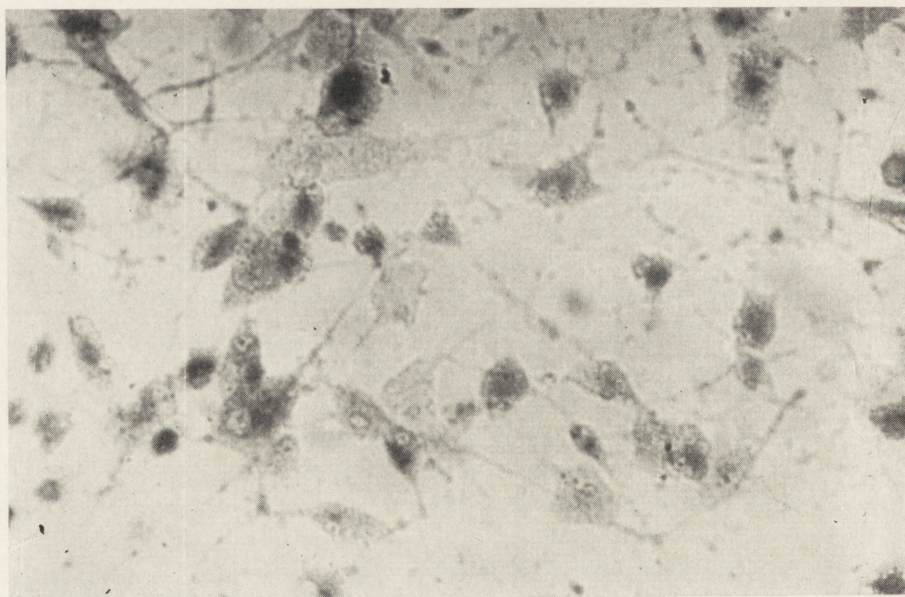


Ryc. 18



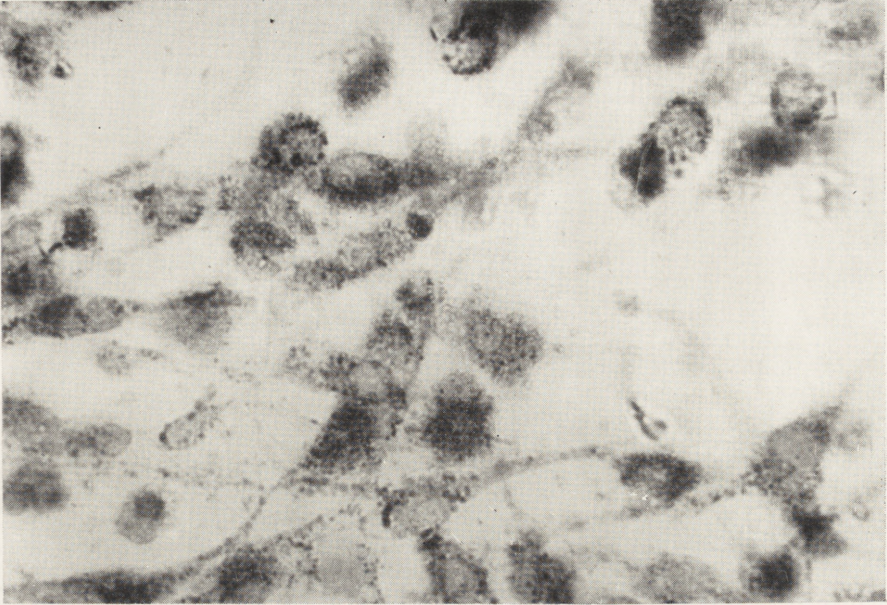


Ryc. 19

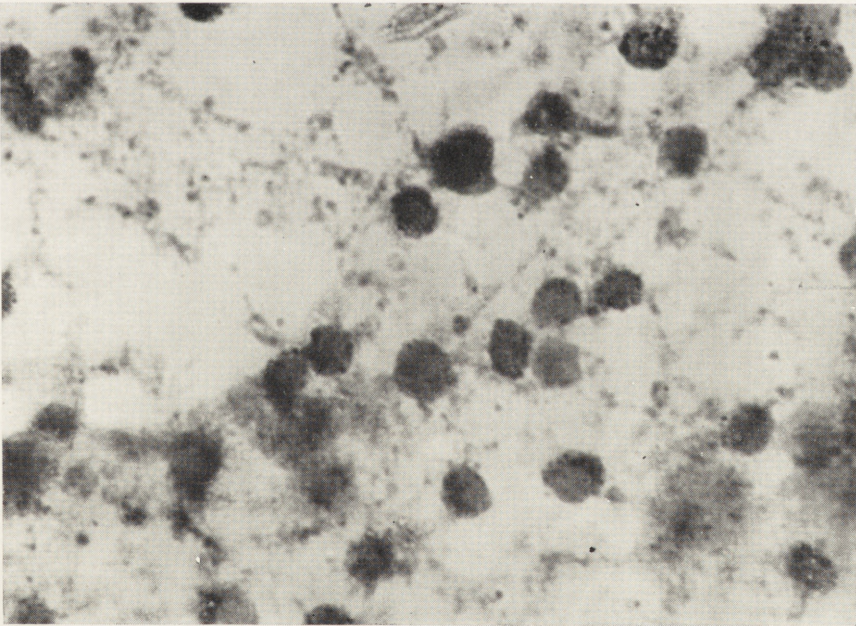


Ryc. 20





Ryc. 21



Ryc. 22



*Fig. 9.* Fourteen-day culture. Lactic dehydrogenase. High enzymatic activity in astrocytes and oligodendroglia. The oligodendrocytes have short processes. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 40$ .

*Ryc. 10.* Hodowla 14 dniowa. Dehydrogenaza mlekowa. Fragment *ryc. 9* w powiększeniu liniowym. Widoczne pojedyncze ziarna formazanu, wyznaczające miejsca aktywności enzymatycznej w protoplazmie i w wypustkach komórek. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 40.

*Fig. 10.* Fourteen-day culture. Lactic dehydrogenase. Fragment of *Fig. 9* in linear enlargement. Isolated formazan grains mark the site of enzymatic activity in the protoplasm and cell processes. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 40$ .

*Ryc. 11.* Dehydrogenaza mlekowa. Hodowla 30 dniowa. Grupa komórek glejowych o wysokiej aktywności enzymatycznej. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 11.* Lactic dehydrogenase. Thirty-day culture. Group of glial cells with high enzymatic activity. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 12.* Dehydrogenaza glutaminowa. Hodowla 2 dniowa. Niska aktywność enzymatyczna młodych astrocytów i oligodendrocytów. Nie widać aktywności enzymatycznej w wypustkach oligodendrogleju. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 12.* Glutamic dehydrogenase. Two-day culture. Low enzymatic activity in young astrocytes and oligodendrocytes. No enzymatic activity in the processes of the oligodendroglia. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 13.* Dehydrogenaza glutaminowa. Hodowla 17 dniowa. Wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej w porównaniu z *ryc. 12* zarówno w astro- jak i oligodendrogleju. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 13.* Glutamic dehydrogenase. Seventeen-day culture. Distinct increase in enzymatic activity compared with *Fig. 12*, both in the astrocytes and in the oligodendroglia. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 14.* Dehydrogenaza glutaminowa. Ten sam preparat co na *ryc. 13*. Grupa astrocytów ze znaczną aktywnością enzymatyczną. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 40.

*Fig. 14.* Glutamic dehydrogenase. The same preparation as in *Fig. 13*. Group of astrocytes with marked enzymatic activity. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 40$ .

*Ryc. 15.* Dehydrogenaza glutaminowa. Hodowla 25 dniowa. Kolonie astrocytar- no-oligodendroglejowe z równomiernym rozkładem aktywności enzymatycznej. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 15.* Glutamic dehydrogenase. Twenty-five-day culture. Astrocytic and oligodendroglial colonies with uniform distribution of enzymatic activity. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 16.* Dehydrogenaza jabłkowa. Hodowla 4 dniowa. Niska aktywność enzymatyczna w protoplazmie i wypustkach astrocytów. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 16.* Malic dehydrogenase. Four-day culture. Low enzymatic activity in the protoplasm and processes of astrocytes. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 17.* Dehydrogenaza jabłkowa. Hodowla 10 dniowa. Wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej, zwłaszcza w oligodendrocytach. Widoczna aktywność enzymatyczna w ich wypustkach. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 17.* Malic dehydrogenase. Ten-day culture. Distinct increase in enzymatic activity, especially in oligodendrocytes. Activity in their processes. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .

*Ryc. 18.* Dehydrogenaza jabłkowa. Hodowla 25 dniowa. Dość wysoka aktywność enzymatyczna astrocytów i oligodendrocytów. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 18.* Malic dehydrogenase. Twenty-five-day culture. Fairly high enzymatic activity in astrocytes and oligodendrocytes. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 40$ .

*Ryc. 19.* Dehydrogenaza jabłkowa. Hodowla 25 dniowa. Pole zawierające kolonię astrocytów i oligodendrocytów o stosunkowo wysokiej aktywności enzymatycznej. Widoczna sieć wypustek komórkowych ze złogami formazanowymi. Nitro-BT. Pow. ok.  $15\times$ , obj. 20.

*Fig. 19.* Malic dehydrogenase activity. Twenty-five-day culture. Colony of astrocytes and oligodendrocytes exhibiting fairly high enzymatic activity. Network of cell processes with formazan deposits. Nitro-BT. Magn. oc.  $\times 15$ , obj.  $\times 20$ .



*Ryc. 20.* Dehydrogenaza alkoholowa. Hodowla 7 dniowa. Bardzo niska aktywność enzymatyczna. Tylko w części komórek widoczne okołojądrowe ziarnistości formazanu. Nitro-BT. Pow. ok. 15X, obj. 20.

*Fig. 20.* Alcohol dehydrogenase. Seven-day culture. Very low enzymatic activity. Only some of the cells contain formazan grains around the nuclei. Nitro-BT. Magn. oc. X15, obj. X20.

*Ryc. 21.* Dehydrogenaza alkoholowa. Hodowla 10 dniowa. Narastanie aktywności enzymatycznej. Widoczne znaczne różnice indywidualne w aktywności enzymatycznej poszczególnych komórek. Nitro-BT. Pow. ok. 15x, obj. 20.

*Fig. 21.* Alcohol dehydrogenase. Ten-day culture. Increasing enzymatic activity. Individual differences in the activity of different cells. Nitro-BT. Magn. oc. X15, obj. X20.

*Ryc. 22.* Dehydrogenaza alkoholowa. Hodowla 21 dniowa. Dalszy wzrost aktywności enzymatycznej. Widoczna grupa oligodendrocytów. Nitro-BT. Pow. ok. 15X, obj. 20.

*Fig. 22.* Alcohol dehydrogenase. Twenty-one-day culture. Further increase in enzymatic activity. Group of oligodendrocytes. Nitro-BT. Magn. oc. X15, obj. X20.