

KRYSTYNA RENKAWEK, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW OKSYDACYJNYCH
W TKANCE GLEJOWEJ, HODOWANEJ *IN VITRO* *

CZEŚĆ II. DEHYDROGENAZY ZWIĄZANE Z KOENZYMEM II
ORAZ DEHYDROGENAZA α -GLICEROFOSFORANOWA
I DEHYDROGENAZA KWASU IZO-CYTRYNOWEGO
ZWIĄZANA Z KOENZYMEM I

Zakład Neuropatologii PAN w Warszawie
Kierownik: prof. dr med. E. Osetowska

Doniesienie niniejsze stanowi drugą część obszerniejszego opracowania, dotyczącego aktywności enzymów oksydacyjno-redukcyjnych w tkance glejowej hodowanej *in vitro*. Bezpośrednim celem pracy było prześledzenie zmienności enzymatycznej w tkance glejowej hodowanej w standardowych, uznanych za normalne, warunkach, w procesie jej wzrostu i dojrzewania. Badania licznych autorów prowadzone na tkance glejowej *in situ* i *in vitro* wskazują na znaczną zmienność aktywności dehydrogenaz w różnych typach komórek glejowych uwarunkowaną ich różnymi stanami czynnościowymi, zależnymi od procesów chorobowych zachodzących w tkance nerwowej (Friede 1961 a, b, Rubinstein i wsp., 1962, Chason i wsp., 1963, Mossakowski 1963) oraz od zmiennych warunków hodowlanych (Friede 1964). Meyerowie (1964) wykazali wysoką aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w tkance glejowej, a zwłaszcza w oligodendrogleju w procesie rozwoju tkanki nerwowej. Wysoki poziom aktywności tego właśnie enzymu stanowi, według nich, wskaźnik wysokiej aktywności tlenowej przemiany węglowodanów, związanej z dokonującą się w układzie nerwowym mielinizacją. Wzrost aktywności enzymów oksydacyjnych w gleju w związku z mielinizacją włókien nerwowych wykazali już uprzednio Friede (1961) w warunkach tkanki nerwowej *in situ* oraz Yonezawa i wsp. (1962) w tkance hodowanej *in vitro*. Podobne wnioski wynikają rów-

* Pracę wykonano w oparciu o pomoc finansową PL 480. U. S. Public Health Service, agreement 227704.

nież z naszych obserwacji stanowiących przedmiot pierwszej części pracy (Mossakowski i wsp. 1965).

Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszego doniesienia była aktywność dehydrogenaz związanych z koenzymem II, NADP (dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej, dehydrogenazy kwasu izo-cytrynowego i diaforazy nukleotydu trójfosfopirydynowego, czyli dehydrogenazy koenzymu II) oraz dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej i dehydrogenazy kwasu izo-cytrynowego, związanej z koenzymem I, NAD.

Aktywność wymienionych dehydrogenaz, stanowiących ogniwa enzymatyczne różnych torów i faz śródkomórkowych przemian węglowodanów może, w naszym przekonaniu, stanowić wskaźnik intensywności glejowego metabolizmu glikozy, stanowiącej podstawowe źródło energetyczne rosnącej i dojrzewającej tkanki. Zmienność aktywności enzymatycznej może natomiast być traktowana jako wykładnik zmian procesów metabolicznych zachodzących w trakcie rozwoju tkanki glejowej.

MATERIAŁ I METODA

Badania przeprowadzono na materiale tkanki glejowej z mózdzku noworodków szczurów białych rasy Wistar (6—24 godz. życia), hodowanej w warunkach omówionych dokładnie w pracy Kraśnickiej i Mossakowskiego (1965). Badania histochemiczne prowadzono na hodowlach z 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10—11, 12—13, 14, 15—19, 21, 25, 28, 30-dniowym okresem przeżycia. Badano aktywność następujących dehydrogenaz: dehydrogenazy koenzymu II, dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej, dehydrogenazy kwasu izo-cytrynowego, związanej z NADP oraz dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej i dehydrogenazy kwasu izo-cytrynowego, związanej z koenzymem I. Badania histochemiczne prowadzono w oparciu o prace Pearse'a (1959) i Hessa i wsp. (1958) oraz Nachlasy i wsp. (1958). Dokładne omówienie techniki histochemicznej przedstawiono w pierwszej części pracy (Mossakowski i wsp. 1965).

Jako substratu dla poszczególnych dehydrogenaz używano odpowiednio: zredukowanej postaci nukleotydu trójfosfopirydynowego (Sigma), kwasu izo-cytrynowego (Fluke A. G. Chemische Fabrik Buchs S. G.), glikozo-6-fosforanu (C. F. Boehringer, Mannheim) oraz α -glicero-fosforanu sodu (Sigma).

WYNIKI

W przebadanym materiale stwierdzono istotne różnice w aktywności poszczególnych dehydrogenaz w zależności od wieku hodowli i typu komórek glejowych — astrocytów i oligodendrocytów. Ponadto obserwowano znaczne różnice morfologii ziaren formazanowych stanowią-

cych histochemiczne wykładniki aktywności enzymatycznej, w przypadku poszczególnych dehydrogenaz. Niezależnie od tych różnic, które zostaną omówione przy przedstawianiu wyników badania poszczególnych dehydrogenaz, stwierdzało się pewien wspólny wzorzec rozkładu reakcji enzymatycznych, niezależny od badanego enzymu, a znamienne odrębny dla astrocytów i oligodendrocytów.

W astrocytach dużych i małych, wielo- i ubogowypustkowych, a także w wielojądrowych elementach komórkowych pochodzenia astrocytarnego stwierdzało się charakterystyczny równomierny rozkład ziaren formazanowych zarówno w cytoplazmie komórkowej, jak i w wypustkach. W późniejszym okresie wzrostu hodowli (w trzecim tygodniu wzrostu) obserwowano się niewielkie zagęszczenia ziaren formazanowych w otoczeniu jądra komórki oraz w miejscu odejścia wypustek (ryc. 1). Aktywność enzymatyczna w wypustkach astrocytów przez cały czas wzrostu hodowli i niezależnie od badanej dehydrogenazy odpowiadała jej natężeniu w cytoplazmie komórki.

Obraz aktywności enzymatycznej w oligodendrogleju przedstawia się odmiennie. W okresie pierwszych 7 dni wzrostu aktywność enzymatyczna w protoplazmie oligodendrocytów, bardzo zresztą nielicznych w hodowlach, manifestowała się jedynie w postaci pojedynczych, rozproszonych ziaren formazanowych, niewidocznych w wypustkach komórek. W okresie dalszego wzrostu ziarna formazanowe w cytoplazmie oligodendrogleju zaczynają skupiać się na jednym biegunie jądra komórki, tworząc znamienne dla tego typu gleju „czapeczkę okołojądrową”. Ten charakterystyczny rozkład aktywności enzymatycznej w oligodendrocytach jest na tyle znamienny, że pozwala na ich łatwe różnicowanie z astrocytami (ryc. 2).

Aktywność enzymatyczna w wypustkach oligodendrocytów pojawia się między 8 a 9 dniem hodowli, stopniowo narastając. W okresie między 14 a 19 dniem wzrostu aktywność enzymatyczna w oligodendrocytach, w tym również w ich wypustkach, przewyższa aktywność astrocytów.

Obraz morfologiczny ziaren formazanowych w astrocytach jest różny w zależności od badanego enzymu, podczas gdy w oligodendrogleju, zwłaszcza po upływie dwóch tygodni wzrostu, złoży formazanowe występują w postaci jednolicie zbitych mas, wśród których trudno jest wyróżnić pojedyncze ziarenka i ocenić ich morfologię.

Z kolei omówimy wyniki badań histochemicznych w poszczególnych grupach enzymatycznych.

Diaforaza nukleotydu trójfosfopirydynowego. Aktywność enzymatyczna w astrocytach pojawia się już w pierwszym dniu wzrostu. Jest bardzo słabo wyrażona. Jej natężenie wzrasta znacz-

nie po 6 dniu hodowli, stopniowo osiągając coraz wyższy poziom. Ziarna formazanowe są drobne, pyłkowate, rozłożone równomiernie w całej protoplazmie i wypustkach. Aktywność enzymatyczna w oligodendrogleju pojawia się w drugim tygodniu wzrostu zarówno w protoplazmie, jak i w wypustkach komórkowych (ryc. 3, 4).

Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanu. Aktywność enzymu w astrocytach jest wybitnie wysoka już od pierwszych dni wzrostu hodowli. Gruboziarniste złogi formazanowe wypełniają całą protoplazmę komórek, pozostawiając jedynie wolną przestrzeń zajmowaną przez jądro. Znaczna aktywność enzymatyczna wypustek astrocytarnych od 3 dnia wzrostu odpowiada intensywności aktywności protoplazmatycznej. Aktywność enzymu w oligodendrogleju pojawia się już w 5 dniu, a w wypustkach w 7 dniu wzrostu. Obserwuje się bardzo szybkie narastanie aktywności enzymatycznej w oligodendrocytach do 3 tygodni wzrostu. Później utrzymuje się ona na niezmienionym poziomie, a nawet nieco obniża się (ryc. 5, 6).

Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NADP. Aktywność enzymatyczna wybitnie nasiloną, nieznacznie tylko ustępująca intensywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanu, pojawia się w astrocytach od pierwszych dni wzrostu hodowli, a w oligodendrogleju od 6 dnia wzrostu. Wysoka aktywność utrzymuje się przez cały czas prowadzenia hodowli. Ziarna formazanowe drobne, pyłkowate, rozłożone są równomiernie w protoplazmie i w wypustkach astrocytów i oligodendrocytów. W tym ostatnim z wytwarzaniem typowego biegunowego zagęszczenia okołojądrowego (ryc. 7, 8).

Dehydrogenaza α -glicerofosforanu. Aktywność enzymatyczna narasta równoległe ze wzrostem hodowli. Około 11 dnia osiąga natężenie aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej. Ziarna formazanowe grube, rozłożone równomiernie w protoplazmie astrocytów, wytwarzają niewielkie skupienia dokoła błony jądrowej i w miejscu odejścia wypustek. Aktywność w oligodendrocytach pojawia się w 6 dniu wzrostu wykazując typowy rozkład śródplazmatyczny (ryc. 9, 10).

Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NAD. Natężenie reakcji tetrazolowej umiarkowane, znacznie niższe niż dehydrogenazy kwasu izo-cytrynowego, związanej z NADP. W miarę wzrostu hodowli aktywność enzymatyczna wzrasta, osiągając swoje największe natężenie po upływie 14 dni. Ziarna formazanowe w astrocytach drobne, pyłkowate, równomiernie wypełniają protoplazmę komórki i jej wypustki. W oligodendrogleju aktywność pojawia się w 6 dniu w cytoplazmie i około 11 dnia w wypustkach (ryc. 11, 12).

OMÓWIENIE

W badaniach naszych zwraca uwagę charakterystyczne opóźnienie reakcji enzymatycznej oraz jej charakterystyczny rozkład w oligodendrocytach. Na różnice te, występujące w zasadzie we wszystkich z przebadanych dehydrogenaz, zwracaliśmy uwagę już w pierwszej części pracy. Wydaje się, że stanowią one pewne histochemiczne kryterium różnicowania obu typów hodowanych komórek glejowych.

Natężenie aktywności reakcji enzymatycznych wszystkich dehydrogenaz, z wyjątkiem wybitnej już od początku aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej, narastało w procesie wzrostu hodowli, osiągając w ciągu 2—3 tygodnia swój najwyższy poziom. Zwraca przy tym uwagę fakt, że opóźniona i niższa początkowo aktywność enzymatyczna oligodendrocytów osiąga w szybkim czasie natężenie aktywności astrocytów, a następnie je przewyższa. Wydaje się, że spostrzeżenia nasze, dotyczące aktywności enzymatycznej oligodendrogleju, wskazują wyraźnie na wzmaganie się przemian śródkomórkowych w tej grupie komórek w okresie, na który przypada początek procesu mielinizacyjnego. Przewaga natężenia reakcji enzymatycznych w oligodendrogleju nad astrocytami w tej fazie wzrostu stanowi dodatkowy argument na rzecz poglądu, reprezentowanego na podstawie badań *in vitro* przez Yonezawę i wsp. (1962) i spostrzeżeń dokonanych na tkance *in situ* przez Friedego (1961) i Meyerów (1964).

Najwyższe natężenie reakcji enzymatycznych wykazuje dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa, α -glicerofosforanowa i dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NADP. Znacznie niższa aktywność charakteryzuje dehydrogenazę kwasu izo-cytrynowego, związaną z NAD, a najniższa dehydrogenazę koenzymu II (diaforazę TPN).

Wysoka aktywność enzymatyczna zarówno dehydrogenazy α -glicerofosforanowej, jak i glikozo-6-fosforanowej wskazuje na to, że przemiana cukrów stanowiących główny materiał energetyczny rosnącej komórki glejowej dokonuje się zarówno torem glikolizy fosforylującej, beztlenowej, jak i na drodze tlenowej przemiany glikozy w cyklu pentozo-fosforanowym. Wydaje nam się, że ten ostatni fakt zasługuje na specjalną uwagę, zwłaszcza wobec stwierdzenia przez Hellera i Elliotta (1955) niskiego zużycia tlenu przez komórki glejowe zarówno astrocyty, jak i oligodendrocyty w tkance nerwowej *in situ*. Wzrost tlenowego rozkładu glikozy w gleju zachodzi według Meyerów (1964) w okresie mielinizacji i dotyczy przede wszystkim oligodendrocytów. Podobne obserwacje biochemiczne poczynił Lowry (1955). W naszym materiale stwierdzaliśmy bardzo znaczną aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w obu rodzajach komórek glejowych. Może to wskazywać

na wysokie natężenie tlenowego rozkładu glikozy, idącego torem pentozo-fosforanowym zarówno w astrocytach, jak i w oligodendrogleju i to już w okresie poprzedzającym mielinizację. Stanowiłoby to dość istotną różnicę w porównaniu z tkanką glejową *in situ*. Należy przy tym dodać, że pentozo-fosforanowy tor przemian glikozy jest głównym dostarczycielem rybozo 5-fosforanu, stanowiącego jeden z istotnych elementów syntezy nukleotydów. Wysokie wskaźniki mitotyczne gleju hodowanego *in vitro* mogą z kolei sugerować istnienie znacznego zapotrzebowania na materiał budulcowy nukleotydów.

Morfologia komórek oraz obraz aktywności enzymatycznej przebadanych dehydrogenaz wskazują, że zachowanie tkanki glejowej hodowanej *in vitro* zbliżone jest w znacznej mierze do gleju odczynowego występującego w uformowanej tkance glejowej w przypadkach różnorodnych procesów chorobowych układu nerwowego oraz w przebiegu różnego typu „mobilizacji czynnościowej” gleju w trakcie dojrzewania układu nerwowego. Wskazywałoby to na zbliżony charakter odczynu komórkowego gleju niezależnie od rodzaju czynnika przyczynowego.

Dodatковым zagadnieniem wynikającym z analizy naszego materiału jest sprawa niskiego poziomu aktywności dehydrogenazy koenzymu II (diaforazy nukleotydu trójfosfopirydynowego). Zjawisko to, wydaje się, może znaleźć swoje wytłumaczenie w stosowanej technice histochemicznej. Używane przez nas roztwory inkubacyjne nie zawierały w żadnym przypadku menadionu aktywującego reakcję tzw. diaforaz koenzymów. Bez użycia menadionu, przy stosowanej przez nas technice uzyskuje się jedynie reakcję z diaforazą mitochondrialną (Pearse 1961). Preparaty nasze uwidaczniają więc jedynie mitochondrialną diaforazę koenzymu II, za czym przemawia drobnoziarnisty, a niekiedy pyłkowy charakter ziaren formazanowych otrzymywanych w tej reakcji.

К. Ренкавек, М. Я. Моссаковский

АКТИВНОСТЬ ОКСИДАЦИОННЫХ ЭНЗИМОВ В ГЛИЕВОЙ ТКАНИ КУЛЬТИВИРОВАННОЙ *IN VITRO*

Часть II. Дегидрогеназы связанные с коэнзимом II и α -глицерофосфатная дегидрогеназа и дегидрогеназа изолимонной кислоты

Содержание

Проводились гистохимические исследования активности дегидрогеназ связанных с коэнзимом II (диафораза коэнзима II, дегидрогеназа изолимонной кислоты и глюкозно-6-фосфатная дегидрогеназа), а также связанных с коэнзимом I дегидрогеназ изолимонной кислоты и α -глицерофосфатной в глиевой ткани культивированной *in vitro*. Условия эксперимента и культуры были та-

кими-же как и в первой части работы. Были обнаружены существенные различия в интенсивности энзиматической реакции и ее локализации в зависимости от вида энзима, типа глиевой клетки и возраста культуры.

1. Максимальной интенсивностью энзиматической реакции отличались глюкозно-6-фосфатная дегидрогеназа, α -глицерофосфатная дегидрогеназа и изолимонной кислоты связанная с коэнзимом II, а меньшей активностью — диафораза коэнзима II. В процессе роста культуры увеличивается активность α -глицерофосфатной дегидрогеназы, изолимонной кислоты (связанной с коэнзимом I) и диафоразы коэнзима II. Активность глюкозно-6-фосфатной дегидрогеназы и изолимонной кислоты (зависящей от коэнзима II) высокая с самого начала не изменяется.

2. Существенные различия в распределении активности наблюдаются между отдельными видами глии. Астроциты уже с самых ранних стадий роста культуры характеризуются равномерным распределением формазиновых зерен в цитоплазме и отростках. Энзиматическая активность в олигодендроцитах появляется позже и только в околоядерной части протоплазмы, а на 10—11 день возрастания культуры также в отростках.

Самой ранней в олигодендроглии является активность глюкозно-6-фосфатной дегидрогеназы, а более поздними — всех остальных дегидрогеназ.

3. Особого внимания заслуживает высокая активность глюкозно-6-фосфатной дегидрогеназы репрезентирующей энзиматическую систему катализирующую кислородный вид глюкозного обмена. Авторы это явление, появляющееся уже в весьма раннем периоде роста культуры, в астроцитах и в олигодендроглии объясняют востребованием клеток на рибозо-5-фосфат, являющейся строительным материалом нуклеотидов. Этот эстр образуется в процессе обмена глюкозы по ходу пентозно-фосфатной реакции. Быстрый рост культуры и значительное увеличение клеточной популяции указывают на значительное потребление строительного материала для клеточных структур.

4. Высокая активность исследованных дегидрогеназ, репрезентирующих энзиматические системы, связанные с кислородным и безкислородным процессом обмена глюкозы указывает на высокую активность метаболических процессов в растущей глиевой ткани в отличие от их низкого уровня в зрелой глии *in vivo*.

K. Renkawek, M. J. Mossakowski

ACTIVITY OF THE OXIDATIVE ENZYMES IN GLIAL TISSUE CULTURED IN VITRO

II Dehydrogenases linked with coenzyme II and alpha-glycerophosphate and isocitric dehydrogenase

Summary

A histochemical study was carried out on the activity of the dehydrogenases linked with coenzyme II (diaphorase of coenzyme II, isocitric and glucose-6-phosphate dehydrogenase) and with coenzyme I (isocitric and alpha-glycerophosphate dehydrogenase) in glial tissue cultivated *in vitro*. The experimental conditions and method of culture were the same as in the first part of this study. Significant differences were observed in the intensity of the enzymatic reactions

and their localization related to the type of enzyme, type of glial cells and age of the cultures.

1. Glucose-6-phosphate, alpha-glycerophosphate and isocitric dehydrogenase linked with coenzyme II showed the greatest intensity of the enzymatic reaction; less intensive reactions were obtained with isocitric dehydrogenase linked with coenzyme I; and least intensive with diaphorase of coenzyme II. During growth of the cultures the activity of alpha-glycerophosphate, isocitric (coenzyme I) dehydrogenases and diaphorase of coenzyme II increased. The activity of glucose-6-phosphate and isocitric dehydrogenase linked with coenzyme II was high from the beginning and remained unchanged.

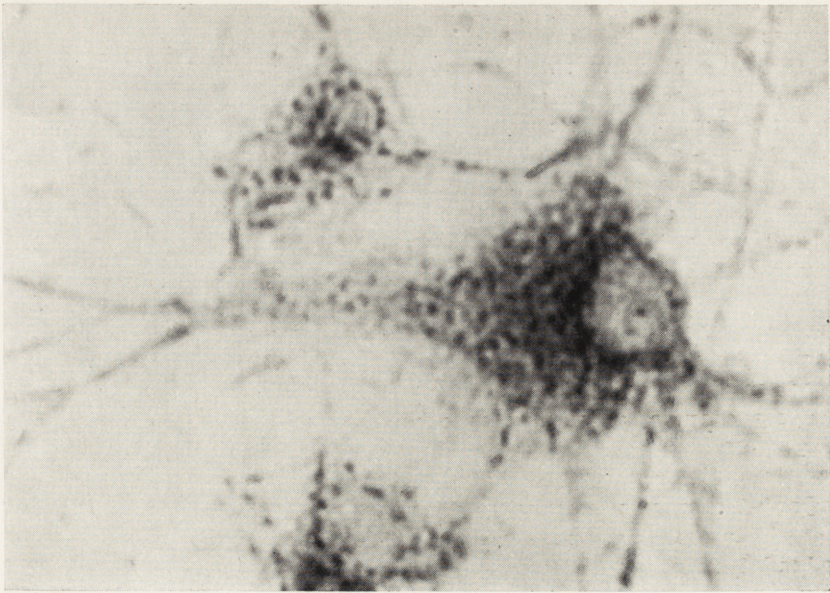
2. Significantly different distribution of the activity was observed in different types of glia. Astrocytes were characterized by uniform distribution of the formazan granules in the cytoplasm and cell processes already in the earliest phases of growth of the cultures. In oligodendrocytes enzymatic activity appeared later and was localized only in the perinuclear zone of protoplasm at first, and after 10—11 days of growth in the processes. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was the first to appear in the oligodendroglia, followed by the remaining dehydrogenase activities.

3. The high activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, representing the enzymatic system catalyzing aerobic glucose metabolism, is noteworthy. In the opinion of the writers, this phenomenon which occurs in very early phase of the growth of the cultures, in astrocytes as well as in oligodendroglia, is related to the requirement of the cells for ribose-5-phosphate as building material for nucleotide production. This ester is produced in the course of the metabolism of glucose in the pentose-phosphate shunt. Rapid growth of the cultures and multiplication of the cell population suggest high requirement for the building materials for cell components.

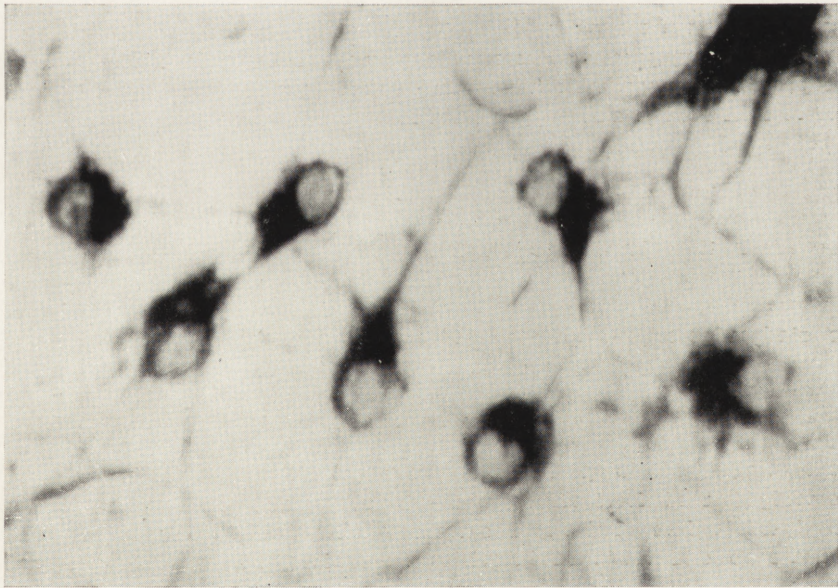
4. The high activities of the studied dehydrogenases, which represent the enzymatic systems involved in the aerobic and anaerobic metabolism of glucose, indicate intensive metabolic processes in growing glial tissue, in contrast to the low level of metabolism in glial tissue *in vivo*.

PIŚMIENNICTWO

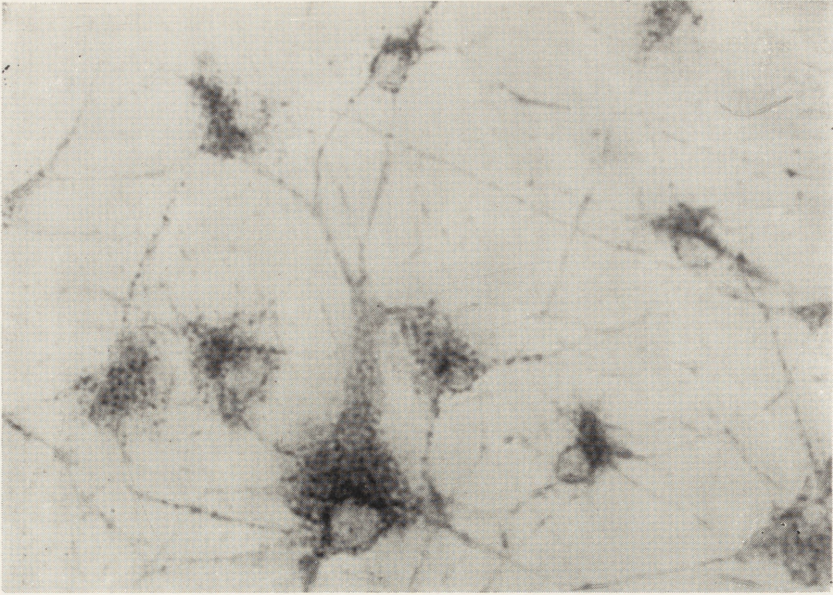
1. Chason I. L., Landers I. W., Gonzales I. E.: Respiratory enzyme activity of human gliomas. A slide histochemical study. *J. Neuropath. Exp. Neurology*, 1963, 22, 471—478.
2. Friede R. L.: A histochemical study of DPN-diaphorase in human white matter with some notes on myelination. *J. Neurochem.*, 1961a, 8, 17—30.
3. Friede R. L.: Enzyme histochemical studies in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.*, 1961b, 5, 433—443.
4. Friede R. L.: A cytochemistry of normal and reactive astrocytes. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1962, 21, 471—478.
5. Friede R. L.: The enzymatic response of astrocytes to various ions *in vitro*. *J. Cell Biology*, 1964, 20, 5—15.
6. Heller I. H., Elliott K. A. C.: The metabolism of normal brain and human gliomas in relation to cell type and density. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1955, 33, 395—403.
7. Hess R., Scarpalli D. G., Pearse A. G. E.: The cytochemical localisation of



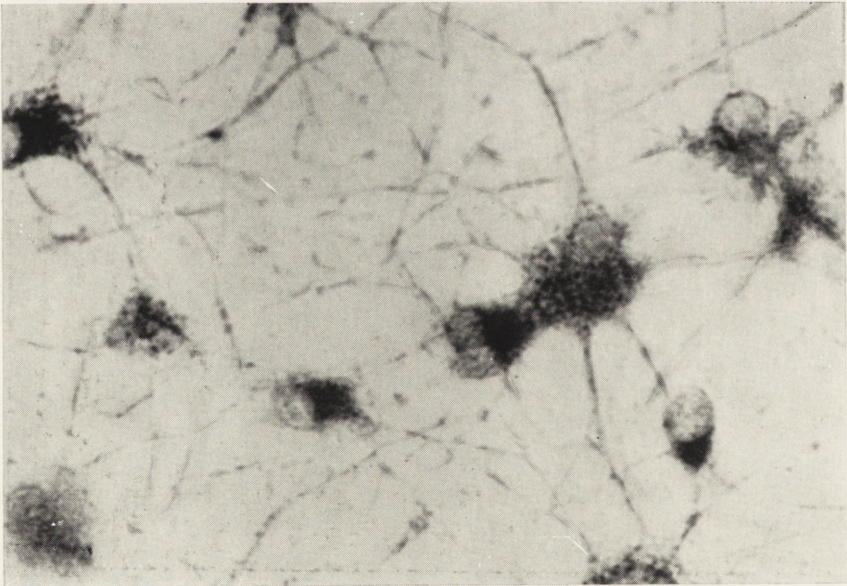
Ryc. 1



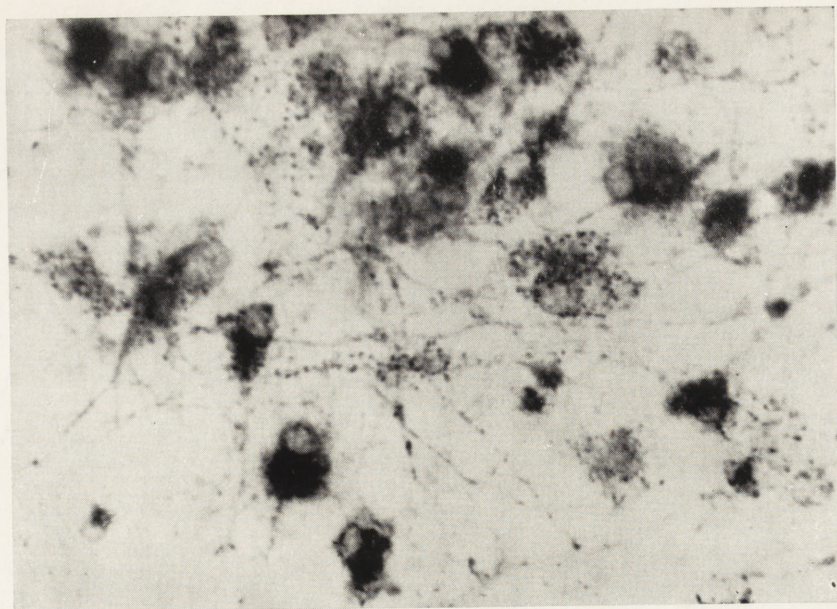
Ryc. 2



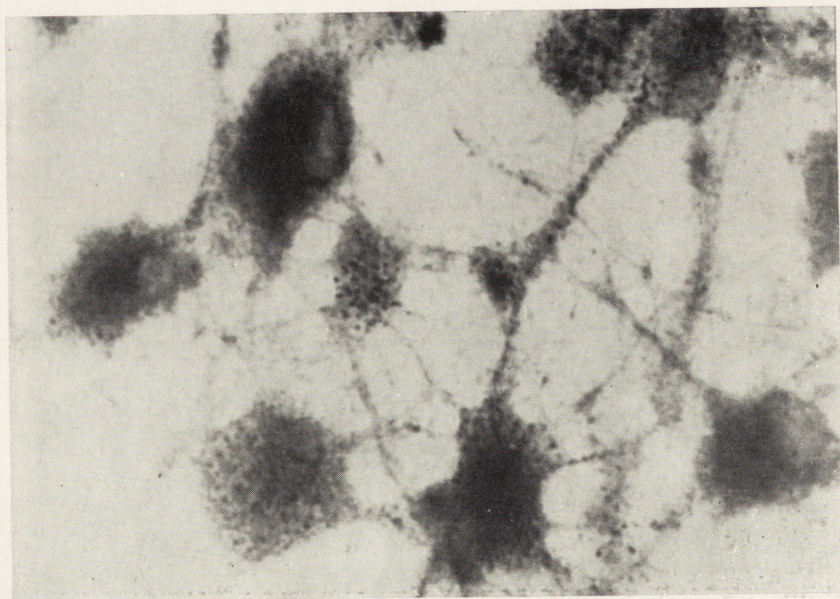
Ryc. 3



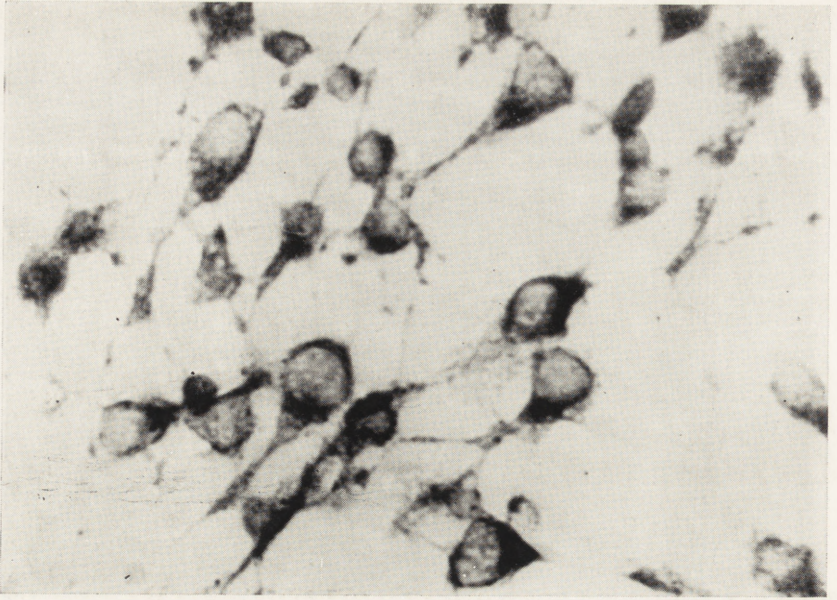
Ryc. 4



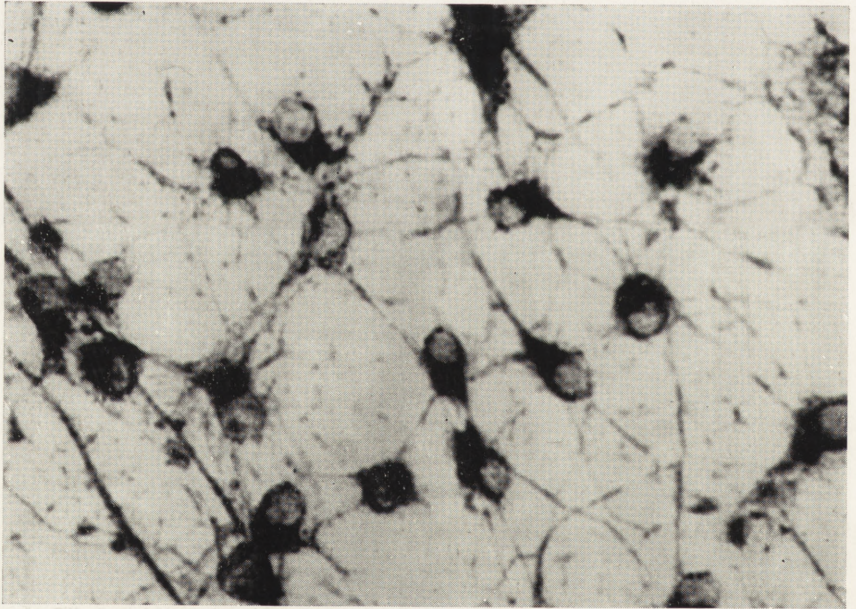
Ryc. 5



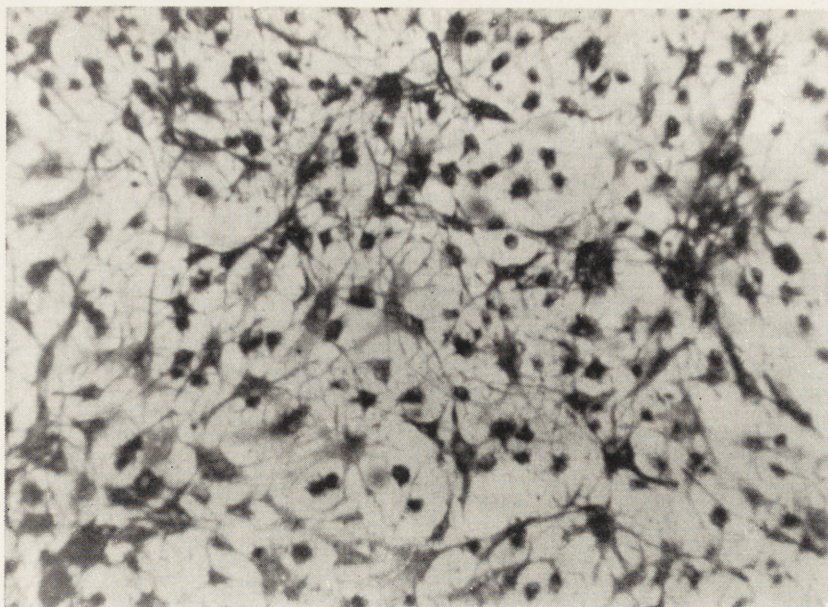
Ryc. 6



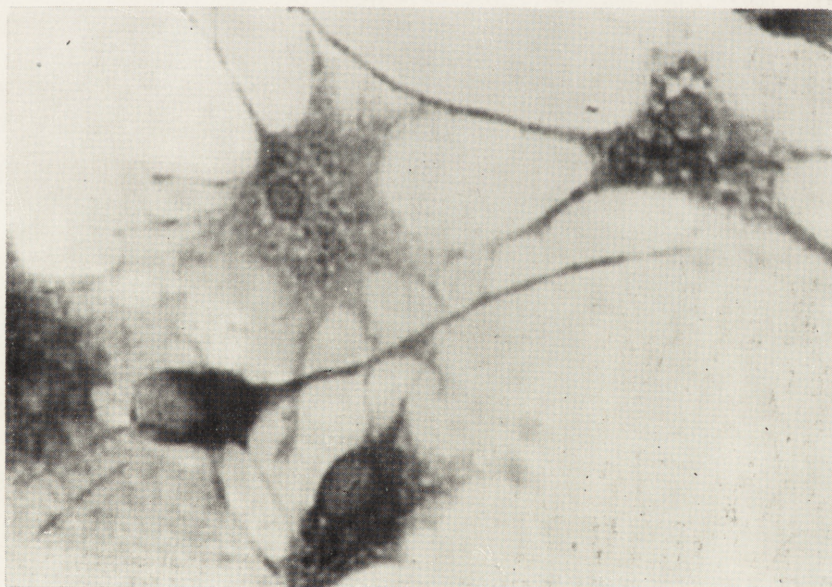
Ryc. 7



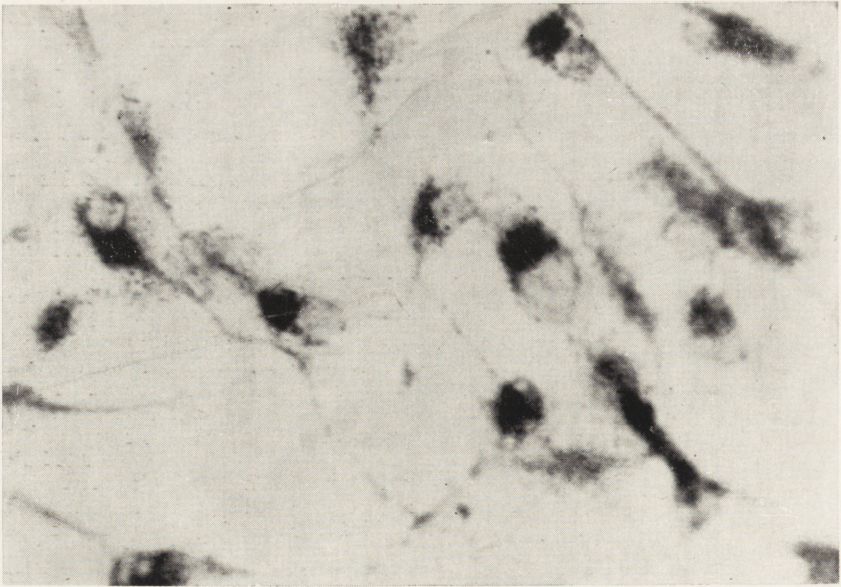
Ryc. 8



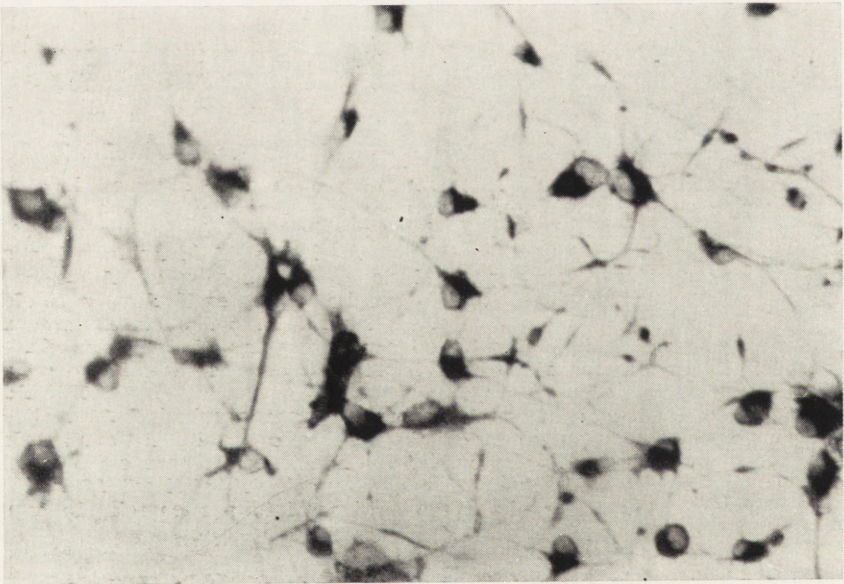
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

- oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 753—760.
8. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zmienność obrazu morfologicznego gleju w hodowli tkanek. *Neuropatologia Polska*, 1965, 3.
 9. Lowry O. H.: A study of nervous system with quantitative histochemical methods. *Biochemistry of developing nervous system*. red. Waelsch H. New York Academic Press, 1955, 350—357.
 10. Meyer I., Meyer P.: Enzyme histochemistry of growing and adult oligodendroglia. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1964, 40, 89—90.
 11. Mossakowski M. J.: The activity of succinic dehydrogenase in the reactive glia. *Acta Neuropath.*, 1963, 2, 282—290.
 12. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Aktywność enzymów oksydacyjnych w tkance glejowej hodowanej *in vitro*. Część I. Dehydrogenazy związane z koenzymem I i dehydrogenaza bursztynowa. *Neuropatologia Polska*, 1965, 3, 245—258.
 13. Nachlas M. M., Walker D. G., Seligman A. M.: The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytology*, 1958, 4, 467—473.
 14. Pearse A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill, London, 1959.
 15. Pearse A. G. E.: Properties of tetrazolium salt and alternative electron acceptor as factors in dehydrogenase histochemistry. *Biochem. J.*, 1961, 78, 14p.
 16. Rubinstein L. J., Smith B.: Triphosphopyridine nucleotide (TPN) diaphorase and TPN-dependent dehydrogenase activity of reactive macrophages in tissue necrosis. *Nature*, 1962, 193, 895—896.
 17. Yonezawa T., Borstein M. B., Murray M.: A histochemical study of oxidative enzymes in cultures of central nervous tissue. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1962, 21, 479—487.

Nadesłano: 15.IV.1965 r.

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

Ryc. 1. Typowy dla astrocytów rozkład ziaren formazanowych, wyznaczających miejsca aktywności enzymatycznej. Ziarna formazanowe rozłożone równomiernie w protoplazmie i w wypustkach komórkowych wytwarzają niewielkie zagęszczenie okołojądrowe. Pow. ok. 15 X, ob. 40 X.

Fig. 1. Distribution of formazan grains marking the sites of enzymatic activity characteristic of astrocytes. The formazan grains are scattered uniformly in the protoplasm and in the cell processes and slightly more concentrated in the perinuclear zones. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 2. Typowy dla oligodendrogleju rozkład ziaren formazanowych. Złogi formazanowe ułożone w zbitej masie wytwarzają charakterystyczną czapeczkę okołojądrową. Pow. ok. 15 X, ob. 20 X.

Fig. 2. Distribution of formazan grains typical of oligodendroglia. Compact masses of formazan grains form characteristic perinuclear caps. Magn. oc. X15, obj. X20.

Ryc. 3. Dehydrogenaza koenzymu II. Czwarty dzień hodowli. Widoczne liczne astrocyty z typowym dla nich rozkładem aktywności enzymatycznej. Aktywność niska. Pow. ok. 15 X, ob. 40 X.

Fig. 3. Dehydrogenase of coenzyme II. Four-day culture. Numerous astrocytes with typical distribution of enzymatic activity. Low activity. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 4. Dehydrogenaza koenzymu II. Trzydziesty dzień hodowli. Widoczne astrocyty i oligodendrocyty z typowymi układami aktywności enzymatycznej. W porównaniu z ryc. 3 stwierdza się znaczny wzrost aktywności enzymatycznej. Pow. ok. 15X, ob. 40X.

Fig. 4. Dehydrogenase of coenzyme II. Thirty-day culture. Astrocytes and oligodendrocytes with typical distribution of enzymatic activity. Compared with the preceding figure, enzymatic activity is much stronger. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 5. Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanu. Siódmy dzień wzrostu. Wysoka aktywność enzymatyczna w astro- i oligodendrocytach zarówno w protoplazmie, jak i w wypustkach komórek. Pow. ok. 15X, ob. 20X.

Fig. 5. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Seven-day growth. High enzymatic activity in astrocytes and oligodendrocytes, both in the protoplasm and in the cell processes. Magn. oc. X15, ob. X20.

Ryc. 6. Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanu. Dwudziesty ósmy dzień hodowli. Wszystkie komórki widoczne w preparacie wykazują wysoką aktywność enzymatyczną w cytoplazmie i w wypustkach. Złogi cytoplazmatyczne przesłaniają jądro komórki. Pow. ok. 15X, ob. 40X.

Fig. 6. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Culture on the 28th day. All the cells visible in the preparation exhibit high enzymatic activity in the cytoplasm and processes. Cytoplasmatic deposits obscure the cell nucleus. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 7. Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NADP. Drugi dzień hodowli. Przeważają nieodróżnicowane komórki glejowe wykazujące wysoką aktywność enzymatyczną. Pow. ok. 15X, ob. 20X.

Fig. 7. Isocitric dehydrogenase bound with NADP. Two-day culture. Predominance of undifferentiated glial cells with high enzymatic activity. Magn. oc. X15, obj. X20.

Ryc. 8. Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NADP. Dwudziesty ósmy dzień hodowli. Wysoka aktywność enzymatyczna w astrocytach i w oligodendrocytach. Pow. ok. 15X, ob. 20X.

Fig. 8. Isocitric dehydrogenase bound with NADP. Culture on the 28th day. High enzymatic activity in astrocytes and oligodendrocytes. Magn. oc. X15, obj. X20.

Ryc. 9. Dehydrogenaza α -glicerofosforanowa. Dwudziesty pierwszy dzień hodowli. Ogólny widok hodowli zawierającej różne rodzaje komórek glejowych. Zwracają uwagę różnice w natężeniu reakcji formazanowej w poszczególnych komórkach, przy ogólnie wysokiej aktywności enzymatycznej. Pow. ok. 10X, obj. 10X.

Fig. 9. α -Glycerophosphate dehydrogenase. Twenty-one-day culture. General view of the culture which contains various types of glial cells. Differences in the intensity of the formazan reaction in different cells, with a generally high level of enzymatic activity. Magn. oc. X10, obj. X10.

Ryc. 10. Dehydrogenaza α -glicerofosforanowa. Dwudziesty ósmy dzień hodowli. Zwraca uwagę różnica w natężeniu i rozkładzie aktywności enzymatycznej w astrocytach i komórce oligodendroglejowej. Pow. ok. 15X, ob. 40X.

Fig. 10. α -Glycerophosphate dehydrogenase. Twenty-eight-day culture. Various intensity and distribution of enzymatic activity in astrocytes and oligodendroglial cells. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 11. Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NAD. Dziesiąty dzień hodowli. Przeważają oligodendrocyty ze stosunkowo wysoką aktywnością enzymatyczną. Pow. ok. 15X, ob. 40X.

Fig. 11. Isocitric dehydrogenase bound with NAD. Ten-day culture. Predominance of oligodendrocytes with relatively high enzymatic activity. Magn. oc. X15, obj. X40.

Ryc. 12. Dehydrogenaza kwasu izo-cytrynowego, związana z NAD. Trzydziesty dzień hodowli. Widoczne różne typy komórek glejowych, wykazujących wysoką aktywność enzymatyczną. Pow. ok. 15X, ob. 10X.

Fig. 12. Isocitric dehydrogenase bound with NAD. Thirty-day culture. Various types of glial cells exhibiting high enzymatic activity. Magn. oc. X15, obj. X10.