

ZUZANNA KRAŚNICKA, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

ZAGADNIENIE ZMIENNOŚCI MORFOLOGICZNEJ  
TKANKI GLEJOWEJ HODOWANEJ *IN VITRO* \*

Z Zakładu Neuropatologii PAN w Warszawie

Kierownik: prof. dr med. E. Osetowska

Badania nad morfologią gleju w hodowli tkankowej prowadzili liczni autorzy, wśród nich Hogue (1947, 1950), Lumsden i Pomerat (1951), Pomerat (1951, 1952), Borghese i Pomerat (1953), Borghese (1954), Pomerat i Costero (1956), Wolfgram i Rose (1957), Lumsden (1958), Berg i Källén (1959), Nakazawa i wsp. (1961), Nakai (1961), Murray i Borstein (1963). W piśmiennictwie polskim zagadnieniem tym zajmowała się Wiechowa-Stefanicka (1962).

Podstawowym zagadnieniem metodycznym tych prac był problem różnicowania w hodowli tkankowej poszczególnych typów komórek glejowych. Istotnych czynników różnicujących dostarcza badanie hodowli przy pomocy kontrastu fazowego z równoczesnym zastosowaniem mikrokineematografii. Technika ta pozwala na spostrzeganie typowych dla poszczególnych rodzajów gleju ruchów komórkowych (Bland, Russell i Canti 1936, 1937, Lumsden i Pomerat i in.). Mimo istniejących różnic co do diagnostycznej wartości ruchów pulsacyjnych i ich swoistości dla gleju skąpodrzewiastego (Wolfgram i Rose, Berg i Källén), jest rzeczą niewątpliwą, że technika ta zapewnia największe i najpewniejsze możliwości różnicowania poszczególnych typów komórek glejowych. Jest to szczególnie ważne wobec zmienności form morfologicznych żywego gleju.

Zastosowanie modelu hodowli tkanki do badań histochemicznych (Yonezawa i wsp. 1962, Friede 1964, Mossakowski i wsp. 1965) stawia wobec konieczności różnicowania komórek glejowych na materiale utrwalonym, stwarzając potrzebę posługiwania się kryteriami czysto morfologicznymi. Istotne jest również ustalenie, czy istnieje i jak się kształ-

\* Praca wykonana w oparciu o pomoc finansową P.L. 480. Program U.S. Public Health Service. Agreement 227704.



tuje zmienność morfologiczną komórek glejowych w czasie oraz w zależności od stosowanego materiału zwierzęcego.

Wymienione zagadnienia stanowią przedmiot obecnego doniesienia.

## MATERIAŁ I METODA

Obserwacje prowadzono na materiale hodowli mózdzku 1—2-dniowych noworodków szczurzych i mysich oraz 11-dniowych zarodków kurzych. Materiał obejmuje ponad 100 hodowli wykonanych w Pracowni Hodowli Tkanek Zakładu Neuropatologii PAN w Warszawie w latach 1963/64.

Technika hodowli. Hodowlę prowadzono dwiema metodami: we flaszkach Carrela i metodą Maximowa (double cover slip). Hodowle we flaszkach, a po części i w komorach Maximowa prowadzono na żelifikowanym kolagenie przygotowanym sposobem opisanym przez Borsteina (1957). Środowisko płynne hodowli stanowił roztwór, w skład którego wchodziła inaktywowana surowica ludzka, 10% wyciąg zarodków kurzych w roztworze Earle i 5% glukoza, w stosunku 5:4:1. Zmianę środowiska płynnego przeprowadzano co 2—3 dni. Część hodowli w komorach Maximowa prowadzono ponadto na skrzepie plazmy koagucyj. W skład fazy stałej wchodziła plazma, 10% wyciąg zarodków, płyn Earle oraz 5% glukoza w stosunku jak 3:3:20:1. Fazę płynną hodowli stanowiły inaktywowana surowica, wyciąg zarodków kurzych, zbuforowany roztwór soli mineralnych i 5% glukoza. Zmianę środowiska płynnego w hodowlach tej grupy przeprowadzano co 3 dni. W dwóch kolejnych zmianach podawano jedynie środowisko płynne, a w co trzeciej skład jego uzupełniano plazmą. Okres przeżycia hodowli 1—58 dni. Hodowle prowadzono w termostacie w temperaturze 37°C. Obserwacje prowadzono w zwykłym mikroskopie świetlnym i w mikroskopie fazowo-kontrastowym.

Technika histologiczna. Hodowle utrwalano przez okres 24 godzin w płynie stanowiącym modyfikację roztworu Carnoya (pozbawiony dodatku chloroformu), a następnie barwiono błękitem toluidyny lub zielenią metylową z pyroniną, w pojedynczych przypadkach metodą Klüvera i hematoksyliną i eozyną.

## WYNIKI

Czasokres obserwacji dla uproszczenia można podzielić na trzy fazy:

Okres I: najwcześniejszy, trwający od 1 do 4 dnia wzrostu.

Okres II: różnicowania się komórek, trwający mniej więcej do końca drugiego tygodnia wzrostu hodowli.

Okres III: wzrostu zróżnicowanej hodowli.

Jedynie okres pierwszy daje się dość ostro wyodrębnić od pozostałych, natomiast przejście między okresem II i III jest płynne, a ponadto elementy, charakterystyczne dla obu, wielokrotnie współlistnieją ze sobą w różnych okresach rozwoju hodowli.

Okres I. Najwcześniejsze objawy wzrostu mogliśmy obserwować już przed upływem pierwszej doby. Widoczne są wówczas pojedyncze



wywędrawujące z eksplantatu komórki, ułożone zazwyczaj bezładnie, w sposób nieuporządkowany (ryc. 1 i ryc. 2). Niekiedy tylko, komórki te układają się w pasma, leżące wzdłuż wyrastających z eksplantatu włókien nerwowych. Obrazy te są jednak raczej typowe dla następnych dni wzrostu. W rzadkich przypadkach, przy szczególnie sprzyjających warunkach, wzrost komórek już w pierwszej dobie jest tak obfity, że wytwarza promienisty wieniec wzrostowy wokół eksplantatu. Obserwowane najwcześniej komórki nie mają cech zróżnicowanego gleju i nie udaje się zaszeregować ich do znanych kategorii komórek glejowych. Charakteryzuje je jasna, dość obfita protoplazma z nielicznymi wypustkami i dużym na ogół drobnoziarnistym jądrem, ze zmienną zawartością chromatyny. Krótkie protoplazmatyczne wypustki komórek odchodzą szeroką podstawą od ciała komórkowego. Rzadko spotyka się ich wtórne rozgałęzienia. Ilość wypustek na ogół nie przekracza czterech, a częściej spotyka się komórki dwu- i jednobiegunowe.

W drugim dniu wzrostu hodowli obserwuje się zwiększenie ilości komórek oraz pojawienie się w strefie wzrostu dość licznych mitoz. Komórki znajdują się w różnych fazach podziałów mitotycznych. Przeważają komórki w stadium profazy. Wskaźnik mitotyczny w tym okresie wynosi do 30%. Na okres podziału wypustki komórek ulegają retrakcji. Komórki dzielące się są przeważnie komórkami bezwypustkowymi. Zdarzają się jednak podziały z częściowo zachowanymi, a nawet całkowicie niezmiennymi wypustkami. W okresie 2—4 doby obok dalszego przyrostu komórek obserwuje się pojawianie zmian zwyrodnieniowych w komórkach i ich rozpad. Obok dobrze zachowanych komórek pojawiają się liczne z oznakami zwyrodnienia tłuszczowego. Zmienne komórki tracą wypustki, a w ich protoplazmie gromadzą się liczne ziarna ciał sudanofilnych. Pojawiają się też olbrzymie komórki wielojądrzaste o wymiarach dochodzących do 80—100  $\mu$ . Część obwodziwa ich protoplazmy ma piankową strukturę, stając się bardziej jednorodna ku środkowi komórki. Jej mnogie jądra ułożone są bezładnie w części centralnej komórki lub na granicy piankowatego obrębka protoplazmy (ryc. 3). Twory te przypominają zmiany określane w neuropatologii nazwą „trawniczków glejowych”. Stosunkowo duża część hodowli ginie w tym okresie, który, jak się wydaje, jest przełomowy dla ich dalszego rozwoju.

Okres II. Hodowle, które przetrwały „okres adaptacyjny” kontynuują dalszy wzrost, wykazując ponadto cechy różnicowania się komórek (ryc. 4a i b). Już w ostatnich godzinach pierwszego okresu stwierdza się, że pewna część komórek glejowych ma nieco mniejsze rozmiary od innych oraz mniejsze silniej barwiące się, wskutek większego zagęszczenia chromatyny jądra. W 5—6 dniu hodowli obserwuje



się już komórki, które odpowiadają morfologicznym kryteriom gleju skąpowypustkowego. Oligodendrocyty przedstawiają się jako drobne komórki o średnicy 8—10  $\mu$ , z niewielką ilością dobrze barwiących się wypustek (ryc. 5). Wypustki, występujące zwykle w liczbie 2—4, słabo rozgałęzione, odchodzą od ciała komórkowego pod kątem prostym, bez stożka wypustkowego. Na zakończeniu wypustek widoczne jest ich rozszerzenie w postaci stopki końcowej. Jądra gleju skąpodrzewiastego są małe, okrągłe lub owalne i zawierają znaczną ilość ciemno barwiących się ziarnistości chromatynowych, wśród których wyróżnia się wyraźnie ostro obrysowane jąderko. Jądro otoczone jest skąpym rąbkiem jasnej protoplazmy, zajmując w stosunku do niej położenie mimośrodkowe. W kontraście fazowym w protoplazmie widoczne są mitochondria. Na przebiegu wypustek niekiedy spostrzega się wyraźne odcinkowe zgrubienia, które, jak się wydaje, mogą odpowiadać gliosomom.

Niekiedy obserwowaliśmy ponadto komórki zawierające jądra o opisanych wyżej cechach, różniące się jednak od oligodendrocytów brakiem wypustek. Wydaje się, że komórki te mogą odpowiadać tzw. „bezwypustkowym oligodendrocytom”, chociaż ze względu na niepełność elementów rozpoznawczych zaszeregowaliśmy je do grupy komórek niezaklasyfikowanych.

Równocześnie z pojawieniem się morfologicznie zdefiniowanych oligodendrocytów występuje drugi rodzaj komórek, które można zaszeregować do grupy astrocytów (ryc. 6). W hodowlach przedstawiają się one jako komórki duże, z obfitą jasną protoplazmą. Zawierają one duże, okrągłe, a częściej owalne jądra o wymiarach 10—15  $\mu$ . Jądra te charakteryzuje obecność dobrze obrysowanej błony jądrowej, drobnoziarnistej, pyłkowatej chromatyny oraz jednego lub dwóch jąderek. Protoplazma komórek przechodzi stożkowato w grube wypustki, które, ciągnąc się na znacznej niekiedy długości, zwężają się stopniowo w miarę oddalania się od ciała komórkowego. Dają one obfite rozgałęzienia, tworzące gęstą i spletaną sieć włókien. Oprócz opisanych komórek występują również pewne inne postaci komórkowe, które można zaliczyć do astrocytów. Są to przede wszystkim małe, drobne komórki odpowiadające rozmiarami oligodendrocytom, ale różniące się od nich zarówno charakterem jądra jak i sposobem odchodzenia wypustek. Odpowiadają one tworom określanym jako małe astrocyty. Drugą odmianą są postaci komórkowe odpowiadające obrazowi astrocytów tucznych, z charakterystyczną płatowatą protoplazmą i mimośrodkowo położonym jądrem lub jądrami (ryc. 7). Ten rodzaj komórek występuje w typowych zagęszczeniach komórkowych. Przy obfitym wzroście i ich znacznym zagęszczeniu spostrzega się tu liczne zespólnie komórkowe oraz liczne



formy pośrednie odpowiadające fazom tworzenia się zespólni (ryc. 8). Wśród takich pól szczególnie obficie występują podziały komórkowe, dość liczne zresztą i w innych obszarach pasa wzrostu (ryc. 9).

Ogólnie okres drugi cechuje wzrost ilości zróżnicowanych komórek glejowych, z równoczesnym zmniejszaniem się liczby komórek niezróżnicowanych, dominujących w okresie pierwszym. Wskaźniki mitotyczne tego okresu zamykają się w granicach do 48%. Spektrum mitoz jest pełniejsze niż w okresie wstępnym, w którym przeważało stadium profazy. Równocześnie daje się spostrzegać zjawisko, które przybiera swoje największe natężenie w okresie trzecim, a mianowicie swojego rodzaju naturalna segregacja poszczególnych rodzajów komórek. W obszarze wzrostu hodowli można bowiem wyróżnić nie tylko odrębne pola z przewagą oligodendrocytów lub astrocytów, lecz również i pola zajęte przeważnie przez jeden tylko typ komórek np. astrocytów tucznych lub małych.

Okres III stanowiący płynne przejście z okresu II charakteryzuje przewaga zróżnicowanych postaci komórek glejowych z wyraźną regionalnością utkania komórkowego pola wzrostu (ryc. 10 i 11). Występują tu obfite tuczne postaci astrocytów, liczne są także zespólnie glejowe (ryc. 12). Występowanie pól niezróżnicowanych komórek, typowych dla okresu I, położonych wśród obszarów wysoko zróżnicowanych komórek, pogłębia mozaikowaty obraz preparatu. Przy czym części położone bliżej eksplantatu wykazują wybitne zagęszczenie komórkowe oraz bardziej zaawansowany proces różnicowania się, a nawet starzenia się. Wskaźniki mitotyczne tego okresu maleją, zamykając się w granicach od 14—25%.

Na marginesie chcielibyśmy zasygnalizować zjawisko, z którym zetknęliśmy się w jednym z przypadków 21-dniowej hodowli. Występowały tu monstrialne postaci jąder, przeważnie bardzo bogatych w chromatynę. Zarówno ich wymiary, barwliwość, kształty jak i bogactwo chromatyny sugerują, że mamy tu do czynienia z zahamowaniem procesu podziałowego mimo znacznego przyrostu kwasów nukleinowych w jądrach komórek glejowych. Podziałów bezpośrednich komórek nie obserwowaliśmy.

Elementy pozaglejowe. Eksplantowane skrawki mózdzku obok elementów glejowych zawierają również komórki nerwowe, komórki mikroglejowe oraz różnego rodzaju komórki pochodzenia mezodermalnego, których nie sposób oddzielić w czasie zakładania hodowli. W związku z tym spotykaliśmy różną, w różnych hodowlach domieszkę tych elementów komórkowych. Najpospoliciej występowały komórki mikroglejowe pod postacią komórek żernych. Obok nich w niektórych hodowlach (8-dniowych) spotykaliśmy nieliczne komórki o pałeczkowato



wydłużonych jądrach, mogących odpowiadać przerośniętym komórkom Hortegi. Czasami podobnie jak Wolfgram i Rose obserwowaliśmy biegunowy układ bogato rozgałęzionych ich wypustek, analogiczny do obrazu komórek pałeczkowatych.

Ponadto w części hodowli, przede wszystkim z mózdków zarodków kurzych spostrzegaliśmy występowanie komórek nerwowych. Tak na przykład w 18-dniowej hodowli mózdku zarodka szczurzego i 16-dniowej hodowli z zarodka kurzego obserwowaliśmy skupienia komórek warstwy ziarnistej kory mózdku, otoczonych komórkami glejowymi, które obrazem swoim przypominały komórki glejowe typu Bergmana. W innym przypadku w 23-dniowej hodowli spostrzegaliśmy wieloboczne komórki z grubymi zasadochłonnymi ziarnistościami, odpowiadającymi ziarnistościom Nissla (ryc. 13).

Dodatkowym elementem komórkowym spostrzeganym zwłaszcza w hodowlach starszych były fibroblasty. Komórki te o charakterystycznych wrzecionowatych kształtach, jasnych wydłużonych jądrach i jasnej jednorodnej a niekiedy drobno ziarnistej protoplazmie rosły rozlanymi kobiercami, zajmującymi w niektórych przypadkach rozległe obszary hodowli. Charakteryzowała je poza tym wybitna aktywność mitotyczna i rozlany charakter rozrostu.

W hodowlach mózdku noworodków szczurzych i mysich nie obserwowaliśmy istotnych różnic dotyczących obrazu morfologicznego komórek glejowych, kierunków ich różnicowania się jak i czasokresu różnicowania.

Co się tyczy hodowli mózdków zarodków kurzych, to podstawową różnicą były mniejsze rozmiary wszystkich elementów komórkowych, przy zachowanym wspólnym wzorcu strukturalnym, większa dynamika wzrostowa I fazy hodowli oraz mniej wyraźna granica pomiędzy fazami I i II. Ilość nieodróżnicowanych postaci komórkowych w fazie różnicowania się była większa, a sam proces różnicowania się wydłużony.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Reasumując, wydaje się, że istnieją pewne morfologiczne kryteria rozróżniania poszczególnych typów komórek glejowych w utrwalonych preparatach hodowli tkanki glejowej. Składają się na nie cechy morfologiczne jąder, protoplazmy oraz wypustek komórkowych. Trzeba jednak podkreślić znacznie trudniejsze różnicowanie tego typu, gdy odpada element kinetycznej aktywności komórek od różnicowania żywych komórek. Zmienność morfologiczna komórki utrwalonej w pewnej fazie jej życiowej działalności i jej różnorodność uwarunkowana właśnie



określonym momentem tej aktywności powodują, że wśród elementów komórkowych, spostrzeganych w preparacie, pewna ilość pozostaje „nierozszyfrowana”, nie na zasadzie jej morfologicznego nieodróżnicowania, lecz niemożności jej zakwalifikowania w oparciu o ich cechy morfologiczne. W oparciu o własne doświadczenia nie jesteśmy w stanie ocenić przydatności metod srebrowych w różnicowaniu poszczególnych odmian komórek glejowych w hodowli tkankowej. Liczni autorzy (Wolfgram i Rose, Liss 1962) podkreślają ich wysoką użyteczność dla oceny morfologicznego charakteru komórek. Jednakże już sama technika immunocyjna wyłącza możliwość jej wykorzystania dla celów histochemicznych. Na podstawie naszych własnych obserwacji większą wartość przypisywalibyśmy natomiast badaniom enzymatycznym (Mossakowski i wsp.).

Co się tyczy zmienności komórkowej, w czasie wzrostu zwracają uwagę następujące momenty. Po pierwsze występowanie wczesnej fazy nieodróżnicowanego wzrostu, którą charakteryzuje obecność morfologicznie niezdefiniowanych komórek o dużej aktywności wzrostowej stanowiących źródło dla różnicujących się komórek glejowych. Komórki tego typu występują również w późniejszych fazach rozwoju, w postaci mniejszych lub większych skupień komórkowych. Są one jednak wyraźnie zmajoryzowane przez zróżnicowane postaci gleju. Późniejsze okresy cechuje natomiast narastanie ilości gemistocytopodobnych astrocytów oraz pojawianie się zespołni komórkowych. Pochodzenie tych ostatnich, jak wydaje się, jest złożone. Prawdopodobnie w rozwoju ich istotną rolę odgrywają mechanizmy szeroko omówionych w pracy Nakaia, których istota sprowadza się do niepełnych mitotycznych i amitotycznych podziałów komórek. Wydaje się, że te formy komórkowe różnią się w sposób istotny od komórek wielojądrowych występujących w końcowym okresie I fazy wzrostowej. Te ostatnie są bowiem produktem zwyrodnienia komórek wczesnej fazy wzrostowej, a wydaje się, że przede wszystkim komórek ulegającego rozpuszczeniu eksplantatu. O takim ich charakterze może świadczyć rozległość stłuszczeń ich protoplazmy i występowanie w obszarach, gdzie większość komórek uległa zwyrodnieniu.

W naszym materiale na podkreślenie zasługuje wczesne pojawienie się migracji komórek z eksplantatu. Berg i Källén obserwowali pierwsze komórki poza eksplantatem dopiero w 4—5 dniu po założeniu hodowli, podczas gdy w naszych hodowlach pojawiały się one już po dwunastu godzinach i to zarówno w grupie hodowli prowadzonych we flaszkach jak i w komorach Maximowa. Natomiast obserwowane przez nas załamanie wzrostu hodowli przypadające na 4—5 dzień stanowi zapewne analogię do opisanego przez Berga i Källéna zaniku wczesnych dwu-



biegunowych oligodendrocytów. W naszym materiale ten okres krytyczny wzrostu był bardzo ciężki, prowadząc nierzadko do śmierci całej hodowli. Nie obserwowaliśmy natomiast opisywanego przez tych samych autorów wtórnego zmniejszania się ilości komórek oligodendroglejowych. Być może stoi to w związku z faktem krótszego prowadzenia hodowli w naszym materiale.

Na osobną uwagę w naszych obserwacjach zasługuje zagadnienie rozmnażania się komórek glejowych w hodowli. Lumsden, Pomerat i Costero, Wolfgram i Rose, Nakai i inni obserwowali obecność mitoz w astrocytach w hodowli. W przeciwieństwie do nich Berg i Källén nie spostrzegali w ogóle mitoz w materiale hodowlanym. W naszych hodowlach podziały mitotyczne stanowiły zasadniczą postać podziałów komórkowych. Wskaźnik mitotyczny określony dla różnych faz wzrostu wykazywał charakterystyczne przesunięcia, z wyraźną narastającą tendencją wzrostową aż do zakończenia II fazy wzrostu. Fazę III charakteryzują najniższe wskaźniki mitotyczne. Mitozy występowały zarówno w oligodendrocytach jak i w astrocytach. Stwierdzone już w drugiej dobie wzrostu hodowli liczne podziały wskazują na dużą rolę rozplemu komórkowego w procesie rozmnażania się komórek w hodowli i wysoką ekspansywność wzrostową tkanki glejowej. Wydaje się, że migracja komórek glejowych eksplantatu ma istotne znaczenie jedynie w bardzo wczesnej fazie wzrostu hodowli, ustępując szybko miejsca rozplemowi komórek w obrębie pasa wzrostowego tkanki. Świadczy o tym zarówno mnogość podziałów mitotycznych jak i wzrost hodowli pozbawionych eksplantatu w 2—3 dniu wzrostu.

З. Красницка, М. И. Моссаковски

## К ВОПРОСУ О МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЛИОЗНОЙ ТКАНИ КУЛЬТИВИРОВАННОЙ *IN VITRO*

### Содержание

Представлены результаты морфологических наблюдений проводимых на культуре глиозной ткани новорожденных крыс и мышей и курьинных эмбрионов.

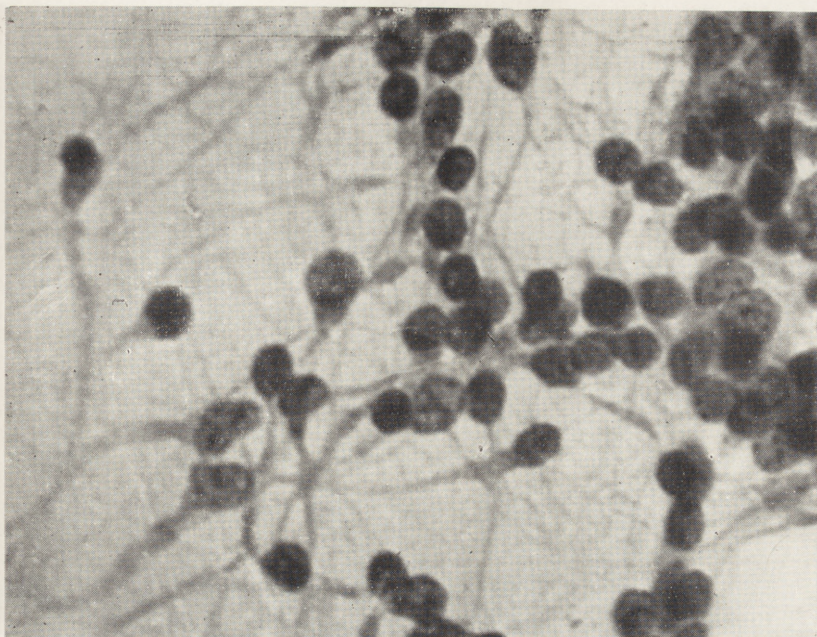
Культивация велась в сосудар Каррела и по методу Максимова. Наблюдения велись на фиксированных культурах, которых срок прожития составлял 1—58 дней.

Различаются 3 фазы роста культуры, которые отличаются по типу преобладающих клеток, по степени их зрелости, по величине митозных показателей и по распределению клеточных популяций.

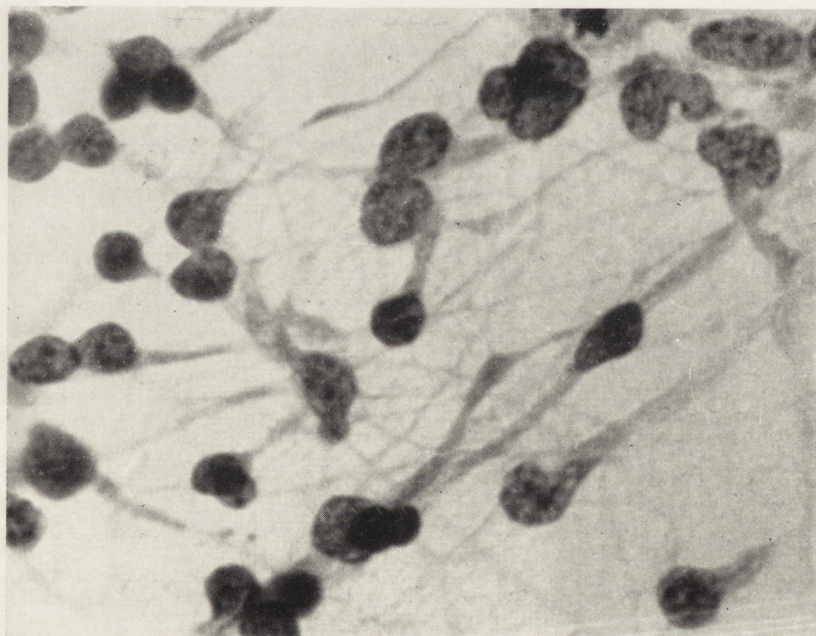
I фаза — период роста недифференцированных клеток;

II фаза — период дифференцирования клеток (продолжающийся в среднем до 14 дня);



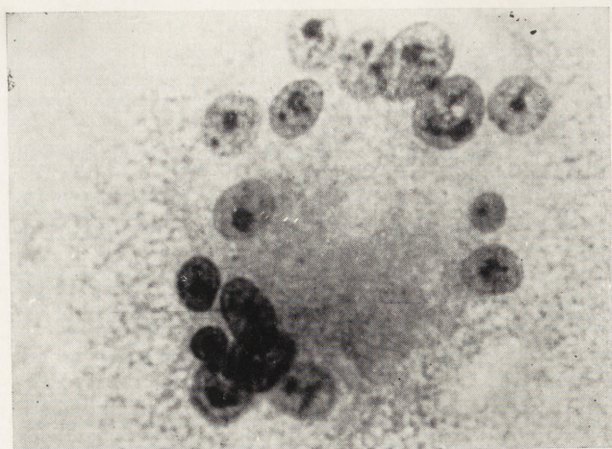


Ryc. 1.

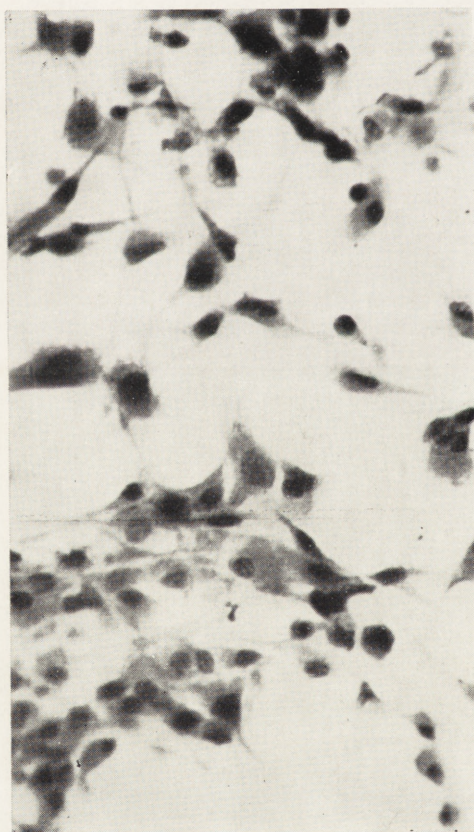


Ryc. 2.

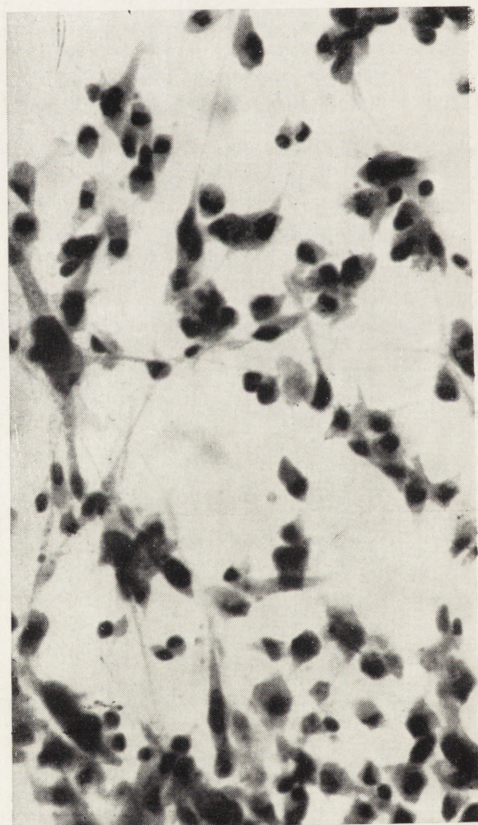




Ryc. 3.

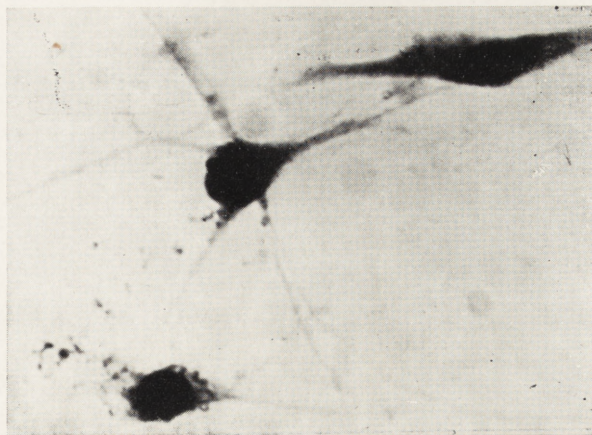


Ryc. 4a.

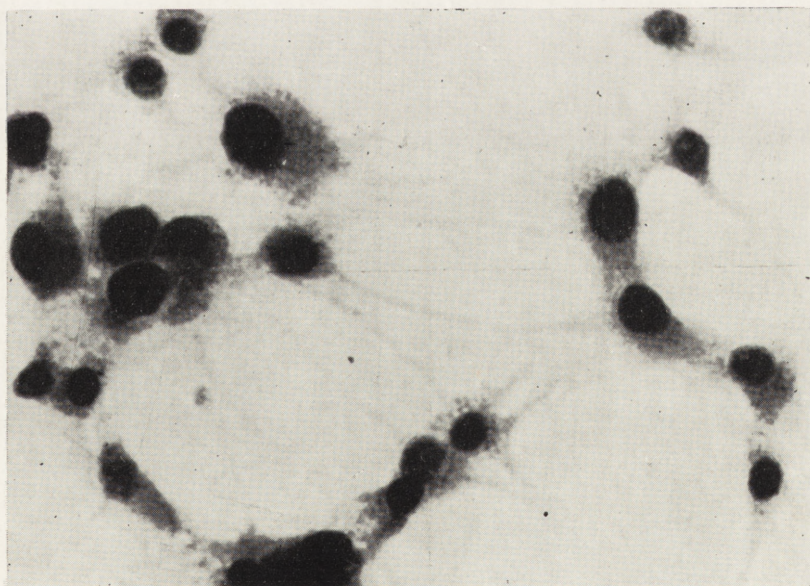


Ryc. 4b.



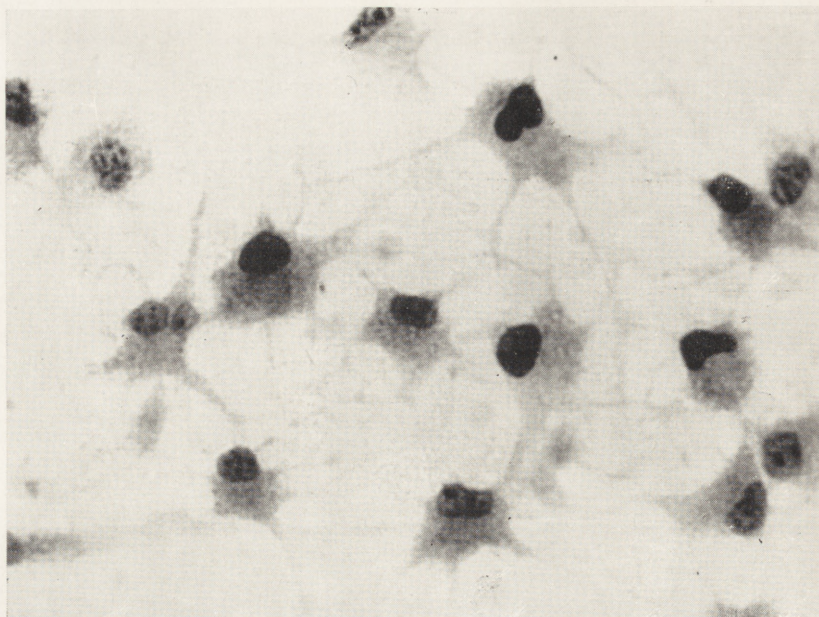


Ryc. 5.

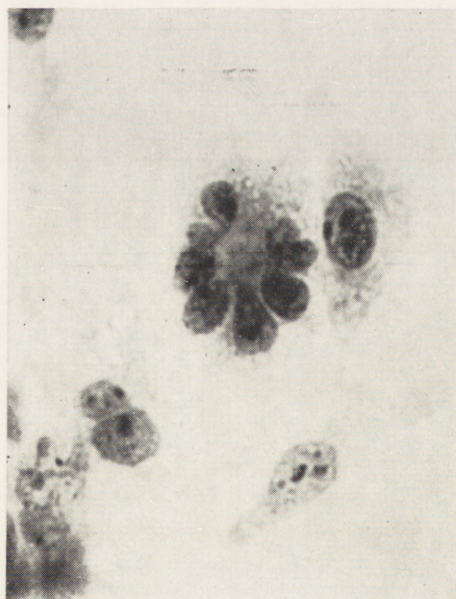


Ryc. 6.

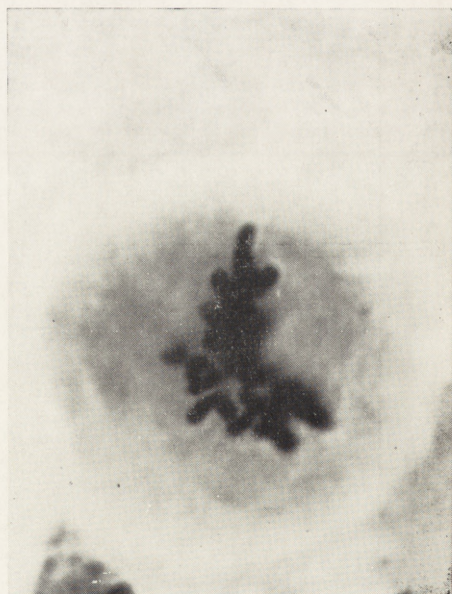




Ryc. 7.

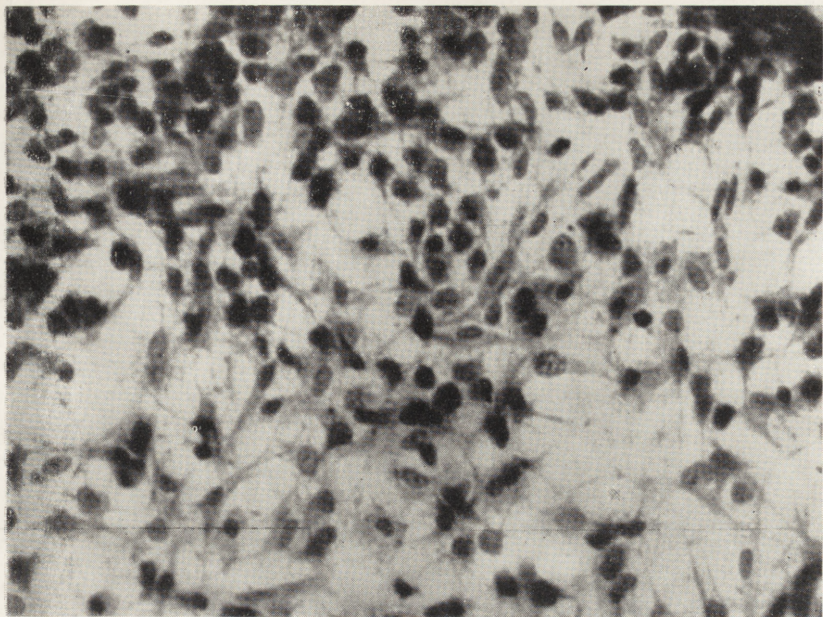


Ryc. 8.

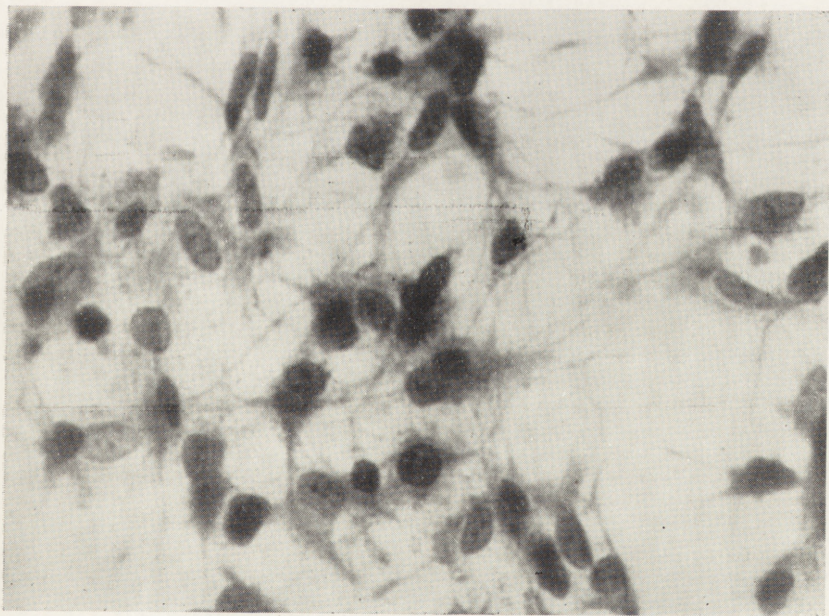


Ryc. 9.



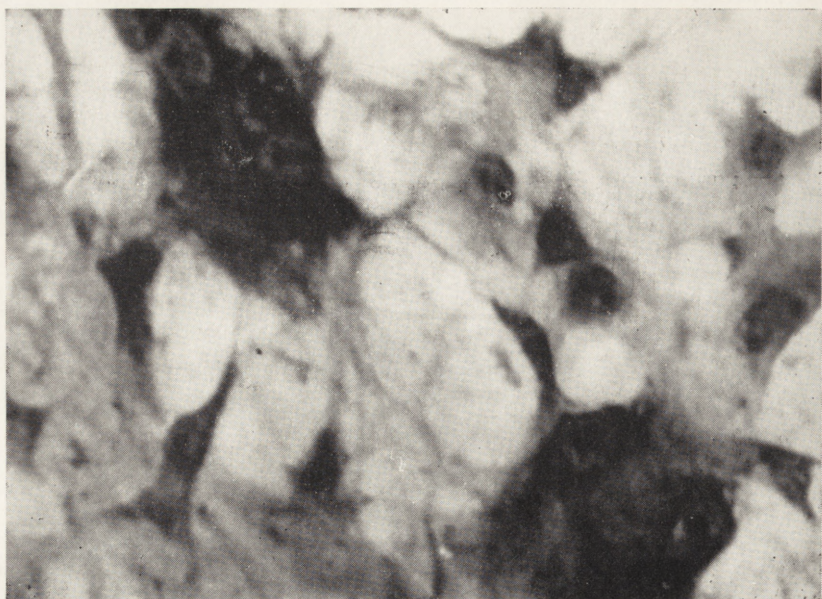


Ryc. 10.

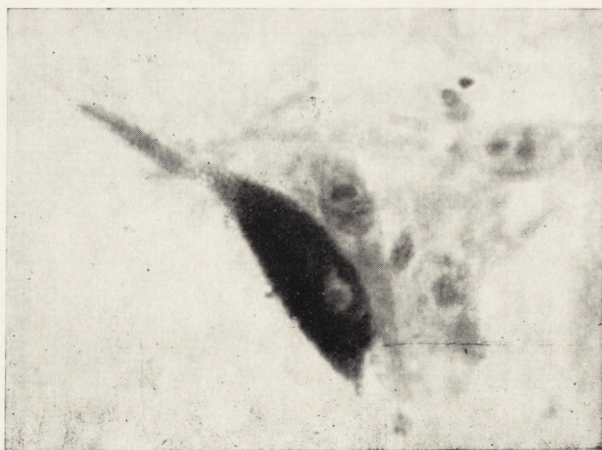


Ryc. 11.





Ryc. 12.



Ryc. 13.



III фаза — период роста дифференцированной культуры (свыше второй недели).

Представлены морфологические критерии дифференциации глиевых клеток на фиксированных окрашенных препаратах. Необходимость такой дифференциации следует из употребления культуры для гистохимических исследований. Признаки которые отличают астроглию от олигодендроцитов — это величина, форма и степень окраски ядер, характер протоплазмы и степень и способ ответвления отростков.

Рассматривается морфология различных видов глиевых клеток в культуре, в том числе различные виды гигантских клеток. Основной формой клеточных делений в культуре являются митозы, которые появляются уже в самых ранних периодах роста культуры. Они, кроме миграции клеток из эксплантата и играют основную роль в увеличении клеточной популяции в раннем периоде роста. Темп развития культуры выражается величиной митотических показателей и был разным в разных периодах развития культуры, причем самым высоким он оказался в фазе дифференциации клеток, а самым малым в фазе роста дифференцированной культуры.

Авторы обращают внимание на значительную морфологическую изменчивость клеток одного типа, обусловленную повидимому их различными функциональными фазами.

Эта изменчивость является причиной того, что часть клеток в фиксированном и окрашенном препарате культуры остается невалифицированными.

Z. Kraśnicka, M. J. Mossakowski

#### THE PROBLEM OF MORPHOLOGIC VARIATION OF GLIAL TISSUE GROWN IN VITRO

##### Summary

*The* Results of morphologic observations *were carried out* on cultures of glial tissue from neonate rats and mice and chick embryos are reported. The cultures were grown in Carrel flasks and on the double cover slips by the method of Maximow. Observations were made on fixed cultures, which had survived for 1—58 days.

Three phases in the growth of the cultures were distinguished, differing with respect to type of prevailing cells, their maturity, mitotic indexes, and distribution of the cell population. The phases were as follows:

I — growth of undifferentiated cells (1—4 days),

II — differentiation of the cells (up to the 14th day),

III — growth of the differentiated culture (after the second week).

The morphologic criteria of differentiation of glial cells in fixed stained preparations are discussed. The need of this differentiation arises from the use of cultures in histochemical studies. The features differentiating astroglia from oligodendroglia include dimensions, shape and stainability of the nucleus, character of the protoplasm and manner of formation of processes. The morphology of different types of glial cells observed in cultures is discussed, including the various types of giant cells which were encountered. The basic type of cell division observed in cultures was indirect division, which occurs in very early stages of the growth of cultures. This type of division, beside emigration of cells



from the explantate, plays the main role in the multiplication of the cell population in the early stages of growth. The tempo of development of the culture expressed in terms of mitotic indexes varies in different stages of development of the culture, being highest during the stage of differentiation of the cells, and lowest during growth of the differentiated culture.]

The marked morphologic variation of cells of the same type, presumably due to different functional phases, is emphasized. As a result of this variation, part of the cells in fixed stained preparations cannot be classified.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bland J. O. W., Russell D. S., Canti R. G.: Tissue culture of gliomas. Cinematographic demonstration. International Cancer Research Cong. Brussels. 1936, 19, 37, 2, 250.
2. Berg O., Källen B.: Studies on rat neuroglia cells in tissue culture. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1959, 18, 458—467.
3. Borghese E.: Mammalian hypothalamic nuclei cultivated in vitro. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1954, 12, 215—223.
4. Borghese E., Pomerat C. M.: Activité des cellules hypothalamiques de mammifères cultivées in vitro. *C. R. Assoc.* 1953, 81, 757—765.
5. Borstein M. B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue culture on coverslip in Maximow slides and roller tubes. *Lab. Invest.* 1953, 7, 134—137.
6. Friede R. L.: The enzymatic response of astrocytes to various ions in vitro. *J. Cell Biology.* 1964, 20, 5—15.
7. Hogue M. J.: Human fetal brain cells in tissue culture: their identifications and motility. *J. Exp. Zool.* 1947, 106, 85—98.
8. Hogue M. J.: Brain cells from human fetuses and infants cultured in vitro after death of the individuals. *Anat. Rec.* 1950, 10, 457—472.
9. Liss L.: Morphology of nervous system tumors in vitro. IV International Congress of Neuropathology. Proceedings. Thieme, Stuttgart, 1963, 247—254.
10. Lumsden C. E.: Structural features of astrocytes in cultures. *Biology of Neuroglia*. Thomas Ch. Springfield. 1958.
11. Lumsden C. E., Pomerat C. M.: Normal oligodendrocytes in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 1951, 2, 103—114.
12. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: Aktywność enzymów oksydacyjnych w tkance glejowej hodowanej in vitro. *Neuropatologia Polska.* 1965, 3, 245—258.
13. Murray M. R., Bornstein M. B.: Morphological development of cultured mouse cerebral neocortex. *Transaction of the American Neurological Association.* 1963.
14. Nakai J.: Transformation and multiplication of neuroglia in tissue culture. Proceedings of the IV International Congress of Neuropathology. Thieme, Stuttgart. 1963, 241—246.
15. Nakazawa T., Taninaga J., Yamauchi K.: Morphological concepts of astrocyte based on tissue culture. Proceedings of the IV International Congress of Neuropathology. Thieme, Stuttgart, 1963, 246—247.
16. Pomerat C. M.: Pulsative activity of cells from the human brain in tissue culture. *J. Nerv. Ment. Diseases.* 1951, 114, 430—450.



17. Pomerat C. M.: Rhythmic pulsative activity in cells from the central nervous system. *Anat. Rec.* 1952, 112, 473—487.
18. Pomerat C. M., Costero I.: Tissue culture of rat cerebellum. *Americ. J. Anat.* 1956, 99, 211—247.
19. Yonezawa T., Bornstein M. B., Peterson E. R., Murray M. R.: A histochemical study of oxidative enzymes in myelinating cultures of central and peripheral nervous tissue. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1962, 21, 479—487.
20. Wiechowa-Stefanicka A.: Wstępne spostrzeżenia nad morfologią gleju normalnego i nowotworowego. *Neuropatologia Polska.* 1964, 2, 239—247.
21. Wolfgram F., Rose A. S.: The morphology of neuroglia in tissue culture with comparison to histological preparations. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1957, 16, 514—531.

Nadesłano: 21.XII.1964.

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

*Ryc. 1.* Dwudniowa hodowla mózdzku szczurzego. W pasie wzrostu przeważają niezróżnicowane komórki glejowe z dużym okrągłym jądrem, skąpą protoplazmą, zazwyczaj jednowypustkowe. Hematoksylina-eozyna. Pow. obj. 20 X, ok. 15.

*Fig. 1.* Two-day culture of rat cerebellum. In the growth zone, large undifferentiated glial cells with large, round nucleus, scanty protoplasm and usually one process, predominate. H.E. Magn. obj. X 20, oc. X 15.

*Ryc. 2.* Dwudniowa hodowla mózdzku szczura. W preparacie przeważają jednolite dwubiegunowe komórki glejowe. Hematoksylina-eozyna. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 2.* Two-day culture of rat cerebellum. Uni- and bipolar glial cells predominate in the preparation. H.E. Magn. obj. X 40, oc. X 15.

*Ryc. 3.* Czterodniowa hodowla mózdzku szczurzego. Wyrodnijająca komórka glejowa przypominająca trawniczek glejowy. Wianuszkowaty układ jąder, rozrzedzona, piankowata, źle ograniczona protoplazma. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 3.* Four-day culture of rat cerebellum. Degenerating glial cell resembling a glial lawn. Wreath-like arrangement of nuclei, rarefied, foamy, poorly demarcated protoplasm. Toluidine blue. Magn. obj. X 40, oc. X 15.

*Ryc. 4a i b.* Fragmenty strefy wzrostu 7-dniowej hodowli mózdzku szczura. Na *ryc. a* przeważają komórki o cechach astrocytów, na *ryc. b* — oligodendrocyty. Obie ryciny pochodzą z tej samej hodowli. Błękit toluidyny. Pow. obj. 20 X, ok. 15.

*Fig. 4 a and b.* Fragments of the growth zone of a 7-day culture of rat cerebellum. *Fig. a:* predominance of cells of the character of astrocytes. *Fig. b:* oligodendrocytes. Both figures are from the same culture. Toluidine blue. Magn. obj. X 20, oc. X 15.

*Ryc. 5.* Oligodendrocyty z hodowli 9-dniowej. Ciemne jądro komórki zajmuje położenie mimośrodkowe w stosunku do skąpej protoplazmy. Wypustki komórkowe skąpe, cienkie. Błękit toluidyny. Pow. 40 X, ok. 15.

*Fig. 5.* Oligodendrocytes in a 9-day culture. The dark nucleus is situated exceptionally in relation to the scanty protoplasm. The cell processes are few in number, thin. Toluidine blue. Magn. obj. X 40, oc. X 15.

*Ryc. 6.* Astrocyty z 14-dniowej hodowli tkanki glejowej. Protoplazma komórek obfita, odejście wypustek stożkowate. Obok typowych astrocytów widoczne są również tak zwane astrocyty małe. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 6.* Astrocytes in a 14-day culture of glial tissue. Abundant protoplasm of the cells. Conical beginning of the processes. Besides typical astrocytes, so-called small astrocytes may be seen. Toluidine blue. Magn. obj. X 40, oc. 15.



*Ryc. 7.* Astrocyty z hodowli 10-dniowej. Widoczna jest obfita płatowata protoplazma i obficie rozgałęzione krótkie wypustki. Typ komórek przypominających gemistocyty. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 7.* Astrocytes from a 10-day culture. Abundant lobulated protoplasm and short branching processes. The type of cells resembles gemistocytes. Toluidine blue. Magn. obj. X<sub>40</sub>, oc. X 15.

*Ryc. 8.* Wielojądrzysta komórka glejowa z charakterystycznym wianuszkowatym układem jąder. Słabo widoczne wypustki komórkowe. Hodowla 10-dniowa. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 8.* Polynucleated glial cell with characteristic wreath-like arrangement of the nuclei. Poorly visible processes. Ten-day culture. Toluidine blue. Magn. obj. X 40, oc. X 15.

*Ryc. 9.* Mitoza w stadium gwiazdy macierzystej w komórce glejowej. Hodowla 6-dniowa. Błękit toluidyny. Pow. obj. 80 X, ok. 15.

*Fig. 9.* Mitosis in the aster phase (metaphase) in a glial cell. Six-day culture. Toluidine blue. Magn. obj. X 80, oc. X 15.

*Ryc. 10.* Fragment hodowli 3-tygodniowej. Widok ogólny. Widoczne są oba typy komórek glejowych z przewagą astrocytów. Błękit toluidyny. Pow. obj. X 20, ok. 15.

*Fig. 10.* Fragment of a 3-week culture. General view. Both types of glial cells are present, with predominance of astrocytes. Toluidine blue. Magn. obj. X<sub>20</sub>, oc. X 15.

*Ryc. 11.* Fragment tej samej hodowli co na ryc. poprzedniej. Hodowla prawie wyłącznie astrocytarna. Zwraca uwagę różnokształtność komórek i obfita, spleciona sieć wypustek komórkowych. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 11.* Fragment of the same culture as in the preceding figure. Almost exclusively astrocytic culture. The variable shape of the cells and abundant, tangled network of cell processes are striking features. Toluidine blue. Magn. obj. X<sub>40</sub>, oc. X 15.

*Ryc. 12.* Fragment hodowli 6-tygodniowej. Zwracają uwagę duże, wielojądrzaste komórki glejowe przypominające komórki odczynowe w mózgu. Hematoksylina-eozyna. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 12.* Fragment of a 6-week culture. Note the large, polynucleated glial cells resembling reactive cells in the brain. H.E. Magn. obj. X<sub>40</sub>, oc. X 15.

*Ryc. 13.* Komórka nerwowa w hodowli 3-tygodniowej. Zwraca uwagę wypełnienie protoplazmy silnie zasadochłonnymi ziarnistościami. W części środkowej jądra widoczne jest duże jąderko. Błękit toluidyny. Pow. obj. 40 X, ok. 15.

*Fig. 13.* Neurocyte in a 3-week culture. Note the strongly basophilic granulations filling the protoplasm. A nucleolus may be seen in the central part of the nucleus. Toluidine blue. Magn. obj. X<sub>40</sub>, oc. X 15.