

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ZBIGNIEW SREBRO

## Alcune osservazioni sullo sviluppo delle sinapsi e dell'attività colinesterasica nel midollo spinale rigenerante del Tritone (*Triturus cristatus* L.)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 33 (1962), n.6, p. 505-509.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1962\\_8\\_33\\_6\\_505\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_33_6_505_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



**Biologia.** — *Alcune osservazioni sullo sviluppo delle sinapsi e dell'attività colinesterasica nel midollo spinale rigenerante del Tritone (Triturus cristatus L.).* Nota <sup>(\*)</sup> di ZBIGNIEW SREBRO, presentata <sup>(\*\*)</sup> dal Corrisp. A. STEFANELLI.

La comparsa dell'attività funzionale degli organi nella embriogenesi o nella rigenerazione è legata a un differenziamento morfologico e biochimico dei suoi elementi cellulari. Il differenziamento dei neuroni del midollo spinale rigenerante del Tritone coincide con la comparsa del movimento attivo della coda rigenerata. Dettagliati studi delle strutture nervose specializzate come sono le sinapsi, sono stati resi possibili solo con l'uso del microscopio elettronico. La comparsa dell'attività colinesterasica durante la embriogenesi degli elementi nervosi coincide con la formazione delle sinapsi e con l'inizio della attività funzionale del sistema nervoso (Sawyer [1]; Boell e Shen [2]; Boell, Greenfield e Shen [3]). Con l'impiego delle attuali tecniche istochimiche si può ottenere sia una precisa localizzazione dell'attività della colinesterasi non specifica sia quella dell'acetilcolinesterasi che è situata tanto nella membrana postsinaptica che in altri luoghi (Gerebtzoff [4]).

Il midollo spinale della coda del Tritone adulto rigenera perfettamente dopo la sezione della coda (Stefanelli [5]) e presenta perciò una condizione favorevole per lo studio dello sviluppo delle sinapsi e dell'attività della colinesterasi (CE) del tessuto nervoso rigenerante. È noto che durante la prima fase della rigenerazione, la parte prossimale del midollo spinale rigenerato presenta strutture nervose morfologicamente ben differenziate, mentre la parte apicale è formata da cellule endodermali che costituiscono la così detta « ampolla apicale ». Pertanto, dato che nel midollo spinale rigenerante vi è un gradiente nel differenziamento delle strutture nervose, è particolarmente interessante fare uno studio morfologico sullo sviluppo delle sinapsi e delle fasi evolutive dell'attività CE del midollo spinale.

Per le osservazioni al microscopio elettronico <sup>(1)</sup>, brevissimi tratti di midollo spinale normale o rigenerante sono stati fissati in OsO<sub>4</sub> 2 %, sciolto in tampone veronal-acetato (Palade [6]) o fosfato (Millonig [7]) a pH 7,2-7,4, inclusi in metacrilato, sezionati con l'Ultratome LKB e fotografati con il microscopio elettronico Hitachi HU-11, a 75 kV di accelerazione.

(\*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » della Università di Roma e nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R. con una borsa del Ministero della Sanità della Repubblica Popolare Polacca. Attuale indirizzo: Zaklad Biologii i Embriologii A.M. Kopernik 7. Kraków.

(\*\*) Nella seduta del 15 dicembre 1962.

(1) Sono vivamente riconoscente e ringrazio il dott. Bruno Bertolini per l'aiuto datomi nelle ricerche fatte con il microscopio elettronico.

Per lo studio dell'attività CE del midollo spinale rigenerante o normale del Tritone adulto sono state usate code rigenerate, prelevate, in tempi successivi a partire dal giorno dell'operazione. L'amputazione della coda è stata effettuata a metà della sua lunghezza. I pezzi di midollo normale o rigenerato sono stati fissati in formalina salata per 12 ore. Dopo il lavaggio i pezzi sono stati portati nello sciroppo concentrato di saccarosio e gomma arabica per 1-2 giorni e quindi con il criostato sono stati tagliati trasversalmente in sezioni di 20  $\mu$  di spessore. La reazione di Koelle (Gomori [8]) è stata eseguita sulle sezioni per dimostrare la localizzazione della CE nel midollo spinale.

La struttura delle sinapsi asso-dendritiche che si trovano nel neuropilo del midollo spinale normale (vedi Tavola I, fot. 1) è molto semplice e corrisponde a quella descritta per la maggior parte delle sinapsi (De Robertis [9], Palay [10]). Le membrane pre- e post-sinaptiche possono presentare una superficie piana, oppure la presinaptica può essere concava e la postsinaptica convessa. In qualche caso la porzione postsinaptica può addirittura essere avvolta da una coppa formata da quella presinaptica. Numerose vesicole sinaptiche (De Robertis e Bennet [11], Palay [12]) sono affollate nel citoplasma della parte presinaptica, nel tratto in cui la sua membrana è in relazione con la membrana postsinaptica; tra le due membrane a volte è riconoscibile un materiale di modica densità, mentre un materiale molto denso è quasi sempre presente al di sotto della membrana postsinaptica. Ambedue i prolungamenti cellulari contengono dei mitocondri e scarsi profili di reticolo endoplasmico liscio; questi ultimi sono più frequenti nella porzione postsinaptica.

Nel midollo rigenerante, la parte distale è formata da cellule indifferenziate (ampolla apicale) e da sottili fibre non ancora mielinizzate; le strutture sinaptiche non si sono ancora formate.

Nella parte intermedia i neuroblasti sono già in parte differenziati, alcune fibre sono in via di mielinizzazione, ma la loro guaina è formata da solo pochi strati. Tra i prolungamenti cellulari sono già presenti dei contatti sinaptici (vedi Tav. II, fot. 3 e 4), che sono pressoché uguali a quelli del midollo completamente differenziato. Solo in qualche caso, si osserva una maggiore distanza tra le membrane ed una minore estensione del contatto, un minore affollamento delle vesicole sinaptiche ed una minore densità del materiale addossato alla membrana postsinaptica; caratteri questi che potrebbero indicare una sinapsi in via di costituzione.

La parte prossimale del rigenerato ha dei caratteri di completa differenziazione e si distingue dal midollo normale soltanto per la mielinizzazione ancora piuttosto scarsa. Le sinapsi (vedi Tav. I, fot. 2) sono più frequenti e nelle fibre sono già presenti i neurofilamenti.

Per quanto riguarda lo studio dell'attività CE dei midolli spinali rigeneranti e di quelli dei controlli, eseguito con il metodo di Koelle, nella Tavola III sono rappresentati sia una sezione trasversale del midollo spinale normale sia le sezioni dei midolli rigenerati prelevati in diversi tempi dopo l'asportazione della coda.

La figura 6 mostra una sezione trasversale del midollo spinale rigenerante di due mesi e mezzo dopo l'asportazione della coda. La parte rigenerata della coda si muoveva attivamente e ciò fa pensare che fosse innervata dal midollo spinale rigenerato. L'attività della CE è localizzata tanto nella sostanza bianca che in quella grigia. Dal confronto fra il midollo spinale rigenerante e quello normale risulta che l'attività della CE è più intensa nel midollo spinale neoformato, sia nella sostanza bianca che in quella grigia. Il midollo spinale normale è rappresentato nella fotografia 5 della Tavola III.

La fotografia 7 rappresenta una sezione trasversale del midollo spinale rigenerante durante la IV settimana dopo l'operazione di asportazione della metà distale della coda. L'attività della CE è fortissima nei funicoli ventrali già abbastanza ben rigenerati mentre è meno evidente nei funicoli laterali ancora poco ispessiti. Nella sostanza grigia l'attività della CE è praticamente assente tranne che in pochi neuroni che si differenziano alla periferia della sostanza grigia nella regione ventrale del midollo spinale rigenerante.

La fotografia 8 mostra una sezione trasversale del midollo spinale durante la VI settimana di rigenerazione. Oltre ad una intensa attività della CE presente nella sostanza bianca e nei neuroni differenziati, situati nella parte ventrale del midollo spinale, si nota nella parte dorsale una grande cellula nervosa, di 30  $\mu$  di diametro, che rivela una attività della CE molto rilevante.

I risultati ottenuti con l'uso del microscopio elettronico dimostrano che nella parte intermedia del midollo spinale rigenerante, cioè quella dove i processi del differenziamento sono nella prima fase di sviluppo, si osserva già la presenza delle strutture che costituiscono la sinapsi normale. La parte prossimale del midollo rigenerante contiene un maggior numero delle sinapsi di quella intermedia e si distingue anche per un più alto livello del differenziamento delle strutture subcellulari dei suoi neuroni. Lo studio con il microscopio elettronico conferma così i risultati ottenuti con il microscopio ottico che hanno rivelato un graduale differenziamento degli elementi nervosi andando dalla parte prossimale verso la parte distale del midollo rigenerante e rivela anche che la formazione delle sinapsi procede dalla parte prossimale verso la parte distale del rigenerato.

I risultati dello studio dello sviluppo dell'attività della CE nel midollo spinale rigenerante del Tritone dimostrano che alcune strutture del midollo rigenerante presentano precocemente una notevole attività della CE. Infatti nei primi stadi della rigenerazione questa attività è limitata quasi completamente alla fibre rigeneranti dei funicoli ventrali e laterali e solo in uno stadio più avanzato della rigenerazione questa attività si rivela chiaramente anche nelle cellule nervose della sostanza grigia. Si constata infatti che l'attività della CE delle cellule nervose aumenta progressivamente con il loro differenziamento. Si può dedurre quindi che l'aumento dell'attività della CE nelle cellule nervose del sistema nervoso rigenerante è una delle espressioni del loro differenziamento biochimico che si svolge durante le fasi del loro sviluppo morfogenetico.

Il più alto livello della attività della CE osservata nella sostanza bianca del midollo spinale rigenerante rispetto a quello della sostanza bianca del midollo spinale normale, può essere dovuta tanto all'aumento della CE nelle fibre nervose rigeneranti quanto ai differenti rapporti spaziali esistenti fra le fibre nervose nel sistema nervoso rigenerante e tra le fibre nervose nel sistema nervoso normale. Infatti l'aumento dell'attività della CE nelle fibre del midollo spinale rigenerante può essere dovuto oltre che ad un reale aumento della CE nelle fibre nervose anche al maggior numero di fibre nervose per unità di superficie, in quanto queste nella prima fase della rigenerazione sono praticamente prive della guaina mielinica, come si può osservare al microscopio elettronico, e quindi di conseguenza risultano poco distanziate fra di loro.

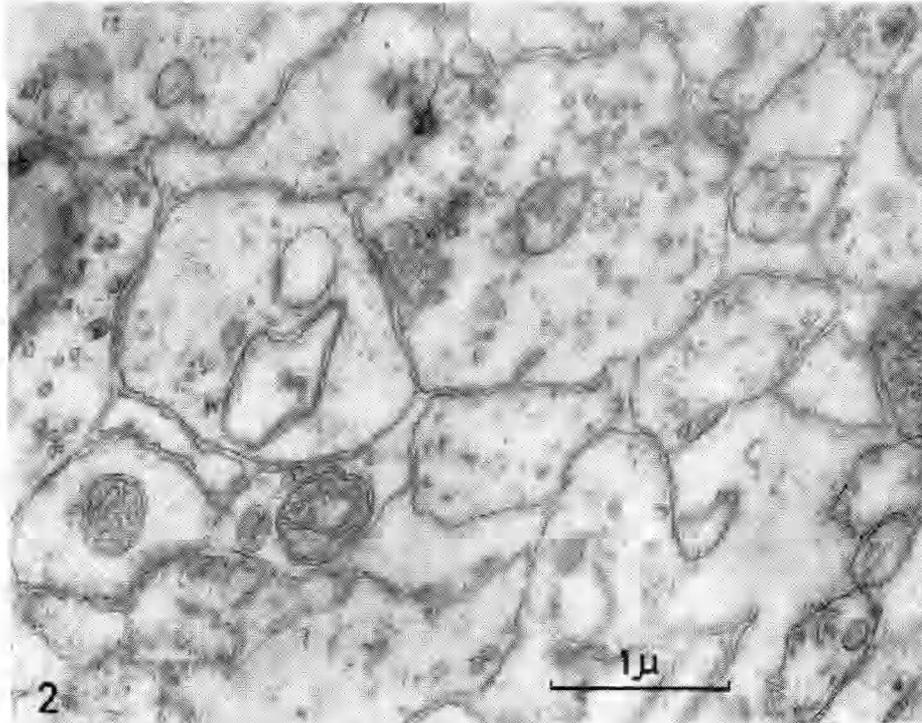
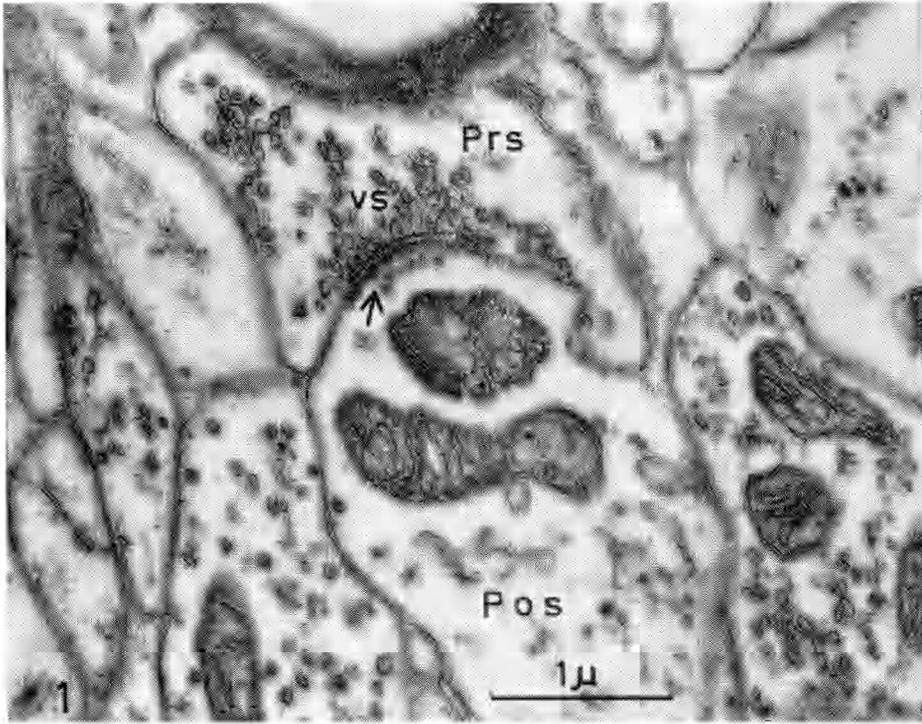
Le grandi cellule dorsali che rivelano una rilevante attività della CE corrispondono per posizione e per grandezza alle cellule di Rohon-Beard. Sebbene negli Anuri queste cellule subiscano alla fine del periodo larvale una involuzione, evidentemente esse rimangono fino alla vita adulta nel midollo spinale della coda del Tritone; la loro forte attività della CE suggerisce che esse hanno una peculiare differenziazione biochimica.

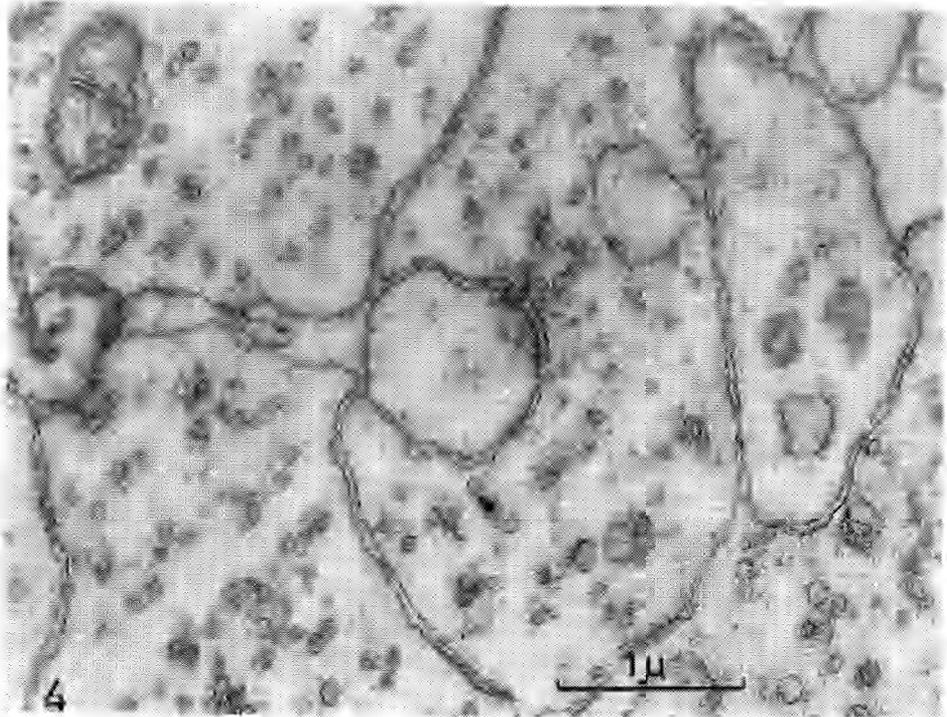
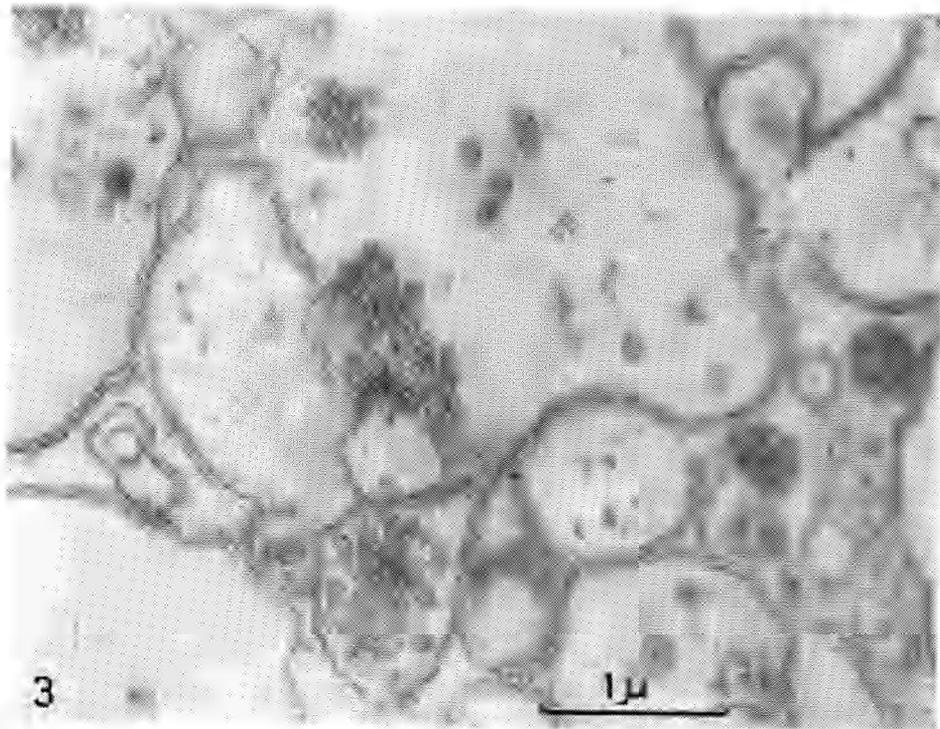
CONCLUSIONI. - La struttura delle sinapsi che si formano nel midollo spinale rigenerante di Tritone adulto è simile a quella di un midollo spinale normale di Tritone e a quella delle sinapsi del sistema nervoso di altre specie. Durante la rigenerazione, le sinapsi si formano prima nella parte prossimale e solo più tardi nelle parti più distali del midollo spinale rigenerante. L'attività colinesterasica del midollo spinale rigenerante è molto forte già durante la IV settimana di rigenerazione e si mantiene così anche negli stadi più avanzati della rigenerazione. Nel midollo spinale rigenerante l'attività colinesterasica compare prima nelle fibre nervose della sostanza bianca e solo più tardi nei neuroni che si differenziano nella sostanza grigia. Le grandi cellule dorsali (Rohon-Beard) presentano una attività della colinesterasi molto rilevante.

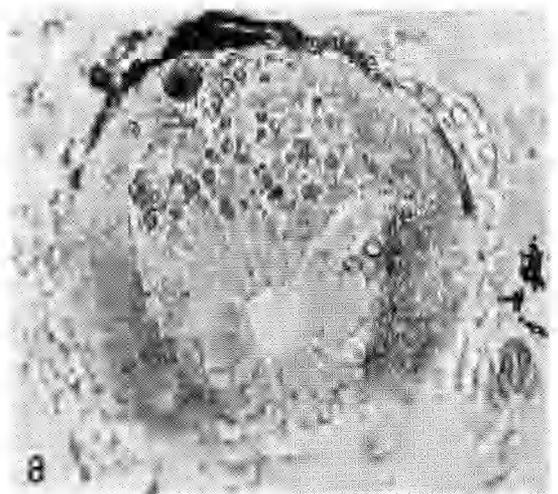
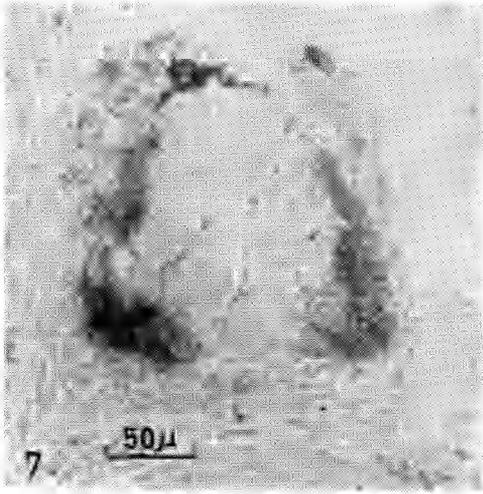
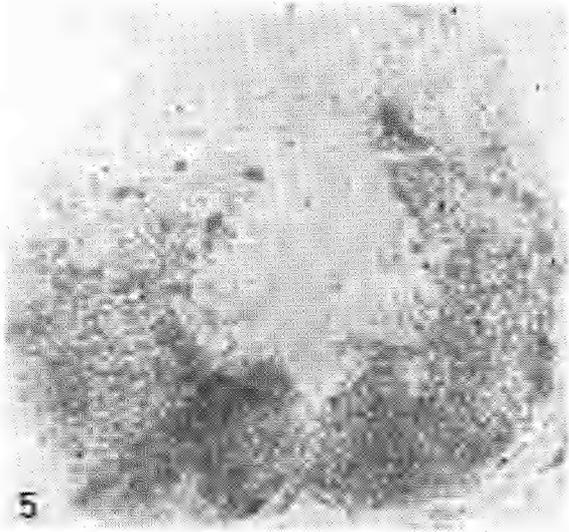
Ringrazio vivamente il prof. Alberto Stefanelli per l'ospitalità datami nell'Istituto di Anatomia Comparata da Lui diretto, nei sei mesi di permanenza in Italia e per il tema affidatomi sullo sviluppo dei sistemi sinaptici nel midollo spinale rigenerante del Tritone, nell'ambito delle ricerche di neurogenesi che si stanno svolgendo nell'Istituto.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. H. SAWYER, *Cholinesterase and the behaviour problem in Amblystoma*. - I. *The relationship between the development of the enzyme and early motility*, « J. Exp. Zool. », 92, 1 (1943).
- [2] E. J. BOELL, S. C. SHEN, *Development of cholinesterase in the central nervous system of Amblystoma punctatum*, « J. Exp. Zool. », 113, 583 (1950).
- [3] E. J. BOELL, P. GREENFIELD, S. C. SHEN, *Development of cholinesterase in the optic lobes of the frog (Rana pipiens)*, « J. Exp. Zool. », 129, 415 (1955).









- [4] M. A. GEREBTZOFF, *Cholinesterases*, Pergamon Press, London, p. 76 (1959).
- [5] A. STEFANELLI, *Osservazioni sull'istogenesi del midollo spinale della coda dei Tritoni*, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 19, fasc. 10-12 (1944).
- [6] G. E. PALADE, *A study of fixation for electron microscopy*, « J. Exp. Med. », 95, 285 (1952).
- [7] G. MILLONIG, *Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation*, in *Electron Microscopy*, vol. 2, P-8 (1962). Ed. S. S. Breese, Jr., Academic Press, New York-London.
- [8] G. GOMORI, *Microscopic Histochemistry*, p. 210 (1952), University Chicago Press.
- [9] E. DE ROBERTIS, *Submicroscopic morphology and function of the synapse*, « Exp. Cell. Res. », Suppl. 5, 347 (1958).
- [10] S. L. PALAY, *The morphology of synapses in the central nervous system*, « Exp. Cell. Res. », Suppl. 5, 275 (1958).
- [11] E. DE ROBERTIS, H. S. BENNET, *Submicroscopic vesicular component in the synapses*, « Fed. Proc. », 13, 35 (1954).
- [12] S. L. PALAY, *Synapses in the central nervous system*, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 2 (suppl.), 193 (1956).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

### TAVOLA I.

- Fot. 1. - Sinapsi nel midollo spinale normale di Tritone adulto; *Prs* = parte presinaptica, *Pos* = parte postsinaptica, *vs* = vesicole sinaptiche. La freccia indica il materiale denso addossato alla membrana postsinaptica.
- Fot. 2. - Sinapsi nella parte prossimale del midollo spinale rigenerante di Tritone adulto.

### TAVOLA II.

- Fot. 3 e 4. - Sinapsi nella parte intermedia del midollo rigenerante.

### TAVOLA III.

- Fot. 5. - Sezione trasversale del midollo spinale normale di Tritone adulto circa a metà lunghezza della coda. Metodo acetiltiocolinico di Koelle.
- Fot. 6. - Sezione trasversale del midollo spinale rigenerante di Tritone adulto due mesi e mezzo dopo l'asportazione della metà distale della coda. Metodo acetiltiocolinico di Koelle.
- Fot. 7. - Sezione trasversale del midollo spinale rigenerante durante la IV settimana di rigenerazione. Metodo acetiltiocolinico di Koelle.
- Fot. 8. - Sezione trasversale del midollo spinale rigenerante durante la VI settimana di rigenerazione. Nella parte dorsale del midollo in una posizione marginale si osserva una grande cellula nervosa con una rilevante attività della colinesterasi. Metodo acetiltiocolinico di Koelle.