
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, EMILIA
CATALDI, LUISA ANNA IERADI

Effetto del substrato sulla modalità di accrescimento delle fibre nervose in coltura (gangli spinali di embrione di pollo)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.4, p. 446–450.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_4_446_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. — *Effetto del substrato sulla modalità di accrescimento delle fibre nervose in coltura (gangli spinali di embrione di pollo)* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Già da tempo nel nostro Istituto ci occupiamo dei processi di accrescimento e di orientamento delle fibre nervose *in vivo* e *in vitro*. Rimandiamo al recente lavoro di Stefanelli [1] sull'argomento per la impostazione generale del problema.

Con il metodo delle colture è possibile mettere in evidenza l'azione di particolari fattori che nel vivente sarebbero mascherati. D'altra parte in coltura le cellule si vengono a trovare in condizione anormale e pertanto nella valutazione del loro comportamento va considerato innanzi tutto questo stato di fatto.

L'applicazione del metodo delle colture *in vitro* per lo studio di questo specifico argomento non è affatto nuovo, anzi è da ricordare che il metodo stesso è sorto per opera di Harrison proprio per lo studio dell'accrescimento delle fibre nervose (1907). Molti altri Autori lo hanno poi impiegato in questo senso e basti qui ricordare le ricerche di P. Weiss [2], di Levi [3] e la sua scuola (Olivo, Esaky, Meyer, Godina, Levi-Montalcini) e quelle di Nakai [4].

Ci è sembrato tuttavia che questo metodo possa dare ancora utili indicazioni soprattutto se applicato sulle cellule isolate per disgregazione di frammenti di tessuti.

Colture di cellule isolate con proteinasi sono state studiate da Nakai (1956), ma incorporate nel coagulo di plasma. Questo autore ha seguita la genesi dell'assone e sono stati studiati i movimenti del nucleo, dei vacuoli e dei granuli. Per quanto riguarda il problema dell'orientamento delle fibre egli ritiene che esistano complesse reazioni tigmotattiche con le cellule di varia specie e con i frustoli di varia natura; con la fotografia a tempo rimette in luce le ben note osservazioni sulle attività di « assaggio » (*probing*) dei prolungamenti nervosi.

In questa nostra Nota intendiamo illustrare alcuni processi di accrescimento e orientamento nettamente differenziali delle fibre di cellule di gangli spinali di embrione di pollo « seminate » in mezzo liquido su substrati di diversa natura.

(*) Ricerche eseguite nel « Centro di Neuroembriologia » presso l'Istituto di Anatomia comparata della Università di Roma con il contributo dei fondi concessi dal C.N.R. al « Gruppo di Embriologia ».

(**) Nella seduta dell'11 aprile 1964.

Le colture sono state allestite ponendo una goccia di sospensione di cellule (disgregate da embrioni di 13 gg. in mezzo nutritivo liquido: Eagle + 10 % di siero di vitello + 50 unità penicillina e streptomycin per cm³) tra vetrino coprioggetti e portaoggetti distanziati da un anello metallico di 3/10 di mm di spessore e con foro di 17 mm (la goccia così compresa assumeva diametri da 6 a 10 mm).

È stato innanzi tutto constatato come abbia importanza la modalità di disgregazione con la distruzione più o meno grande di cellule e l'entità del successivo lavaggio. Infatti le sospensioni di cellule ottenute con una più prolungata azione della tripsina (al 3/10.000) e successivamente poco lavate fanno depositare sul vetrino su cui sono poste le gocce una sottile pellicola proteica. Questa pellicola non si forma quando le cellule sono lavate a sufficienza.

Si sono pertanto osservate le modalità di accrescimento e di orientamento delle fibre in quattro tipi di coltura: 1° su vetro comune pulito; 2° su pellicola proteica di deposito; 3° su collagene di coda di ratto ⁽¹⁾; 4° su plasma di pollo.

Del tipo 1° (su vetro) si sono avute tre condizioni:

- a) senza migrazione di fibrociti;
- b) con notevole migrazione di fibrociti precedente l'accrescimento delle fibre;
- c) con notevole migrazione di fibrociti contemporaneamente alla migrazione delle fibre.

Le figure delle Tavole I e II di singole cellule gangliari isolate mostrano come le differenze siano soprattutto notevoli tra le fibre coltivate su vetro pulito e quelle su substrato proteico (deposito, collagene o plasma).

Su vetro, come è stato già descritto (Stefanelli [5], Stefanelli e Zacchei [6]) su questi « Rendiconti », si accrescono grosse, rettilinee e con poche diramazioni tipicamente dicotomiche.

Le estremità sono dilatate in ampi coni di accrescimento, spesso biforcati, muniti di sottili e lunghi filamenti terminali (figg. A e B, Tav. I).

Su plasma, collagene o deposito del disgregato le fibre assai più numerose appaiono con andamento irregolare, ondulato; sono spesso sottilissime e moniliformi e presentano diramazioni più numerose e irregolari senza manifestare, se non saltuariamente, quella dicotomia che è tipica nelle fibre su vetro pulito, cioè in mezzo liquido (fig. C, Tav. I; fig. E, Tav. II).

L'aspetto di queste fibre presenta una certa differenza nei preparati osservati *in vivo* in contrasto di fase (Tav. I) e in quelli fissati e colorati (met. Bodian) (Tav. II). La disidratazione, l'idratazione successiva, ecc. delle manipolazioni tecniche allentano e deviano queste fibre che sono assai limitatamente aderenti al vetro. Le cellule inoltre mantengono per la poca adesione al vetro l'aspetto più tipicamente globoso. La fig. B (Tav. I) mostra un aspetto pressoché simile a quello della fig. E (Tav. II) in cui si notano queste ondulazioni « artificiali » delle fibre. Ma questi preparati fissati e colorati sono molto utili per un più preciso dettaglio dei particolari delle fibre

(1) Il collagene è stato preparato seguendo la tecnica di Ehrmann e Gey.

e dei loro contatti con altre fibre o cellule fibrocitiche ⁽²⁾ della coltura. I sottili prolungamenti dei coni di accrescimento, solo intravedibili nelle figure in contrasto di fase, appaiono, nei preparati argenticci, molto più evidenti.

La fig. C (Tav. I) si riferisce al comportamento delle fibre sul tenue velo proteico derivante dal disgregato cellulare. L'andamento è ondulato con una certa frequenza di diramazioni dicotomiche.

La fig. F (Tav. II) mostra il comportamento su plasma. La irregolarità del decorso è molto notevole e il numero delle diramazioni sottili e moniliformi è elevato. A volte si notano filuzzi sottilissimi e lunghissimi che si estendono nel plasma con andamento tortuoso e su vari piani; lo spessore di questi substrati è infatti apprezzabile anche avendoli stesi per quanto possibile sottili. È da ritenere che l'adesione delle fibre al supporto favorisca la emissione stessa dei prolungamenti da parte della cellula.

È evidente in queste differenze l'importanza della natura e della organizzazione del substrato. Le esperienze di P. Weiss hanno messo in evidenza una relazione tra la organizzazione delle fibre in coltura e la organizzazione submicroscopica del substrato, al livello molecolare.

Il comportamento delle fibre nei preparati in cui vi è stata una notevole proliferazione di fibrociti è diverso se è una coltura in mezzo liquido su vetro o su un qualunque substrato proteico. Infatti nel primo caso le fibre che casualmente vengono ad aderire alle cellule modificano al loro contatto il decorso con brusche angolature. Ciò è ben visibile nelle figg. B, D (Tav. I) ed E (Tav. II). Se le fibre e le cellule sono molto affollate (figg. G, H, Tav. II) si ha un accrescimento tortuoso delle fibre sulle cellule così da crearvi sopra una sorta di groviglio più o meno complesso. Nel secondo caso l'influenza delle cellule sul comportamento delle fibre non è rilevabile con altrettanta evidenza.

È evidente che nelle colture su vetro la rettilinearità delle fibre è dovuta alla mancanza di una completa adesione delle fibre al vetro e che l'andamento irregolare su supporto proteico è dato dalla adesione delle fibre al substrato e quindi al legame tra queste e quello e alla necessità delle fibre di seguire le irregolarità della struttura del supporto. Le brusche deviazioni, le curvature ricorrenti, ecc. non si verificano mai nelle colture su vetro e sono invece particolarmente numerose su supporto di plasma coagulato. Pertanto la fibra nervosa si manifesta vincolata al supporto con cui aderisce per coalescenza, sia esso costituito da cellule o da materiale proteico.

Secondo le osservazioni di Levi i neuroni sono incapaci di movimenti attivi. Questo concetto è valido se si considerano come movimenti attivi quelli di spostamento per ameboidismo, ma è certo che le cellule nervose delle nostre colture in mezzo liquido su vetro subiscono degli spostamenti attivi per effetto della retrazione delle fibre che, lanciate nelle varie dire-

(2) Intendiamo con il termine « fibrocitico » le cellule con aspetto fibroblasto-simile senza discutere la loro natura, poiché tale aspetto è assunto, in queste condizioni di coltura, sia da tipici elementi connettivali come da elementi gliali. Levi (1941) le indica col termine generale di « fibrociti », termine che possiamo anche noi usare in questo senso.

zioni, dopo essersi fissate si tendono e le cellule si spostano lungo la loro traiettoria, riaggregandosi. In coltura di 6 giorni (in capsula di Petri di vetro di Jena e in atmosfera di CO_2) si è potuto constatare un progressivo raggruppamento delle cellule gangliari in piccole sferule che sono rimaste unite dalle fibre nervose tese tra loro.

Nei casi di notevole proliferazione di fibrociti vi è una fondamentale differenza tra quelli in cui le fibre si accrescono *assieme* alla migrazione dei fibrociti e quelli in cui si accrescono *dopo*, sopra di essi.

Il comportamento è diverso se tali colture sono su vetro o su un coagulo proteico. Infatti in questo secondo caso le differenze, nelle due condizioni, sono meno apprezzabili mentre sono sensibili nelle colture su vetro.

Se l'accrescimento delle fibre *si accompagna* alla moltiplicazione di fibrociti, le fibre che vengono ad aderire alle cellule crescono su di esse, spesso tortuosamente, passando, se le cellule si moltiplicano a tappeto, da cellula a cellula dimostrando una certa incapacità ad abbandonarle aderendo per coalescenza ad esse.

Questo fenomeno è molto evidente nelle colture giovani, quando la proliferazione fibrocitica è veloce. Nelle colture più vecchie questa intimità di rapporto tra fibre e cellule è minore, cioè la coalescenza è meno intensa, e spesso la fibra riesce a separarsi e a proseguire l'accrescimento indipendentemente.

Se l'accrescimento di fibrociti *precede* quello delle fibre, si può constatare con assoluta evidenza che le fibre non sono attratte dalle cellule (possono sfiorarle nel loro tragitto senza minimamente deviare); ma se fortuitamente la fibra incontra una cellula si fissa a questa e viene deviata sia per il movimento attivo del fibrocita, sia perché accrescendosi sulla cellula con quei fenomeni di coalescenza suddescritti, si aggira sul corpo cellulare tortuosamente prima di poterlo abbandonare.

Non c'è citotropismo, ma c'è coalescenza tra le fibre nervose e i fibrociti. Nel caso di colture su supporto proteico le fibre, aderenti al supporto, passano sulle cellule e le abbandonano con maggiore facilità, dimostrando una coalescenza molto simile con le cellule e con il supporto proteico.

Vedremo in una prossima comunicazione gli aspetti e il significato di questi rapporti tra fibre e cellule di varia natura.

Altro fenomeno, del resto già descritto da P. Weiss, che spesso si è ripresentato nei nostri preparati, è quello della fascicolazione lungo una fibra pilota di altre fibre che si accrescono utilizzando come punto di appoggio la prima; anche questo fenomeno è in gran parte spiegabile con la coalescenza tra fibre nervose.

In conclusione, il comportamento e quindi l'aspetto morfologico delle fibre nervose proliferate da cellule gangliari spinali di pollo è condizionato dalla natura del supporto. Quando non vi è coalescenza, come nel caso delle colture in mezzo liquido su vetro, le fibre sono poco numerose, grosse, rettilinee e si dividono dicotomicamente; quando vi è un supporto proteico con cui le fibre hanno affinità di coalescenza sono assai più numerose e il loro aspetto è irregolare, tortuoso, determinato da condizioni fisiche, mec-

caniche, del substrato. Vi sono differenze tra un supporto di collagene, di plasma o di deposito proteico. Le cellule fibrocitiche non esercitano citotropismo, ma le fibre, per incontro casuale, aderiscono alle cellule per coalescenza e si accrescono su di esse dimostrando, soprattutto nelle colture su vetro, grande difficoltà ad abbandonarle. Diverso è l'aspetto delle fibre nervose che si accrescono contemporaneamente alla proliferazione di fibrociti con cui sono in più stretto rapporto o che si accrescono su un tappeto di fibrociti già preformato.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. STEFANELLI, *Accrescimento e orientamento delle fibre nervose in vivo e in vitro*, « Rend. Ist. Sci. Univ. Camerino », 3, 113-137 (1962).
- [2] P. WEISS, *In vitro experimentes on the factors determining the course of the outgrowing nerve fibers*, « J. Exp. Zool. », 68, 393-448 (1934).
- [3] G. LEVI, *Nouvelles recherches sur le tissu nerveux cultivé in vitro*, « Arch. Biol. », 52, 133-278 (1941).
- [4] J. NAKAI, *Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture*, « Am. J. Anat. », 99, 81-130 (1956); *On the bundle formation of nerve fibers observed in vivo and in vitro*, « Acta Anat. Nipp. », 33, 123 (1958); J. NAKAI e Y. KAWASAKI, *Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. I*, « Z. f. Zellf. », 51, 108-122 (1959); J. NAKAI, *Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. II*, « Z. f. Zellf. », 52, 427-449 (1960).
- [5] A. STEFANELLI, *Le modalità di connessione nervosa nelle colture di cellule disgregate in mezzo liquido*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 27, 189-192 (1959); *Il problema dell'orientamento delle fibre nervose in vitro studiato in colture disgregate di midollo spinale di embrioni di Gallus e Coturnix*, « Acta Embr. Morph. Exp. », 3, 159-179 (1960).
- [6] A. STEFANELLI e A. M. ZACCHEI, *Orientamento delle fibre nervose di cellule spinali embrionali in coltura e rapporti neuro-muscolari*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 26, 753-756 (1959).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I E II

TAVOLA I.

Aspetti delle cellule gangliari spinali di pollo (embrioni di 13 gg.) coltivate su differente supporto (osservazioni in contrasto di fase). A, B, su vetro, in mezzo liquido (24 e 30 ore di coltura; notare la rettilinearità delle fibre e la loro tendenza alla divisione dicotomica); C, su collagene (20 ore di coltura; notare la irregolarità del decorso delle fibre più numerose); D, su coltura di fibroblasti (24 ore di coltura; notare le deviazioni angolari che le fibre compiono a contatto con le cellule con cui vengono in intima coalescenza).

Ogni tratto delle scale in calce = 10 μ .

TAVOLA II.

Aspetti di cellule gangliari spinali di pollo (embrione di 13 gg.) coltivate su differente supporto (osservazioni su preparati allestiti con il metodo di Bodian). E, su vetro e mezzo liquido (dopo 30 ore di coltura; notare il comportamento simile a quello della fig. B, ma con le deviazioni dopo il contatto con i fibrociti); F, su plasma coagulato (dopo 30 ore di coltura; notare la ricchezza e la irregolarità di decorso e la sottigliezza dei prolungamenti); G, H, cellule gangliari coltivate con fibrociti su vetro (dopo 48 ore di coltura; le fibre decorrono in grande prevalenza a contatto delle cellule).

Ogni divisione delle scale = 10 μ .



