
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LUISA ANNA IERADI, EMILIA CATALDI, NICOLETTA DEL
GROSSO

Attività dell'acetilcolinesterasi nei gangli spinali di ratto coltivati in vitro

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.6, p. 717-719.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_6_717_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_6_717_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. — *Attività dell'acetilcolinesterasi nei gangli spinali di ratto coltivati in vitro.* Nota (*) di LUISA ANNA IERADI, EMILIA CATALDI e NICOLETTA DEL GROSSO, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — In this research the localisation of acetylcholinesterase has been described by Koelle's method, in the spinal ganglia neurons cultivated *in vitro*. The enzyme is localised in the cytoplasm of nerve cells both in the explant and in the migration area, with a localisation similar to that in ganglia neurons *in vivo*.

In un nostro precedente lavoro (Stefanelli, Ieradi e Cataldi) [1] abbiamo studiato la localizzazione della colinesterasi e della fosfatasi acida in retine di embrioni di pollo, trapiantate in allanto-corion, e abbiamo osservato come, in condizioni di isolamento, all'autodifferenziamento morfologico si accompagna un differenziamento istochimico (per quanto concerne questi due enzimi) corrispondente a quello normale.

Allo scopo di confermare questa osservazione anche in condizioni di isolamento a livello cellulare, abbiamo ora studiato l'attività dell'acetilcolinesterasi in neuroni di gangli spinali di ratto coltivati *in vitro*.

Essendo questo enzima strettamente legato all'attività funzionale della cellula nervosa si poteva presumere che nelle cellule completamente isolate la sua attività mostrasse variazioni sensibili.

Geiger e Stone [2] hanno osservato la presenza di acetilcolinesterasi in neuroni cerebrali di mammiferi coltivati *in vitro*, nel pericarion, nelle fibre e specialmente nelle terminazioni presinaptiche; la butirrilcolinesterasi è invece localizzata nella glia.

Nei gangli simpatici in coltura l'acetilcolinesterasi è stata messa in evidenza da Hermetet e coll. [3] in neuroni isolati da più di due giorni, solo se nel mezzo di coltura era presente il « nerve growth factor ».

La localizzazione della colinesterasi nei gangli spinali dei mammiferi è stata descritta da molti Autori [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11] e tutti sono concordi nel ritenere che l'enzima presente nel citoplasma dei neuroni sia acetilcolinesterasi, e che le colinesterasi non specifiche siano localizzate nelle cellule gliali della capsula e nelle cellule di Schwann.

MATERIALE E METODO.

Gangli spinali prelevati da feti di ratto (Wister) di 15-18 giorni, sono stati coltivati, su vetrini rivestiti da un sottile strato di collagene [12], con il sistema del doppio coprioggetto di Maximow. Il mezzo nutriente consiste di uguali

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma con un contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 giugno 1970.

parti di soluzione salina bilanciata (Gey), estratto embrionale di 9 gg. al 50 %, siero bovino ultrafiltrato e siero placentare umano; è stato aggiunto glucosio fino ad ottenere una concentrazione di 300 mg %, e 50 U/ml di penicillina-streptomycin. Le culture sono state incubate a 36° in goccia pendente. Il mezzo nutriente è stato rinnovato due volte alla settimana. Le culture sono state fotografate e studiate in contrasto di fase; poi sono state fissate a varie età in formalina al 10 % e incubate per tre ore a 37° secondo il metodo di Koelle modificato da Gomori [14] per l'acetilcolinesterasi. Sono stati fatti preparati di controllo usando come inibitore delle colinesterasi non specifiche il diisopropilfluorofosfato (DFP) 10^{-7} M.

Parallelamente per un esame morfologico, alcune culture sono state colorate con il bleu di tionina e con il metodo di Bodian.

Inoltre, il metodo di Koelle precedentemente descritto è stato applicato a gangli spinali prelevati da ratti di varie età, da 13 giorni in utero a 20 giorni dopo la nascita.

OSSERVAZIONI.

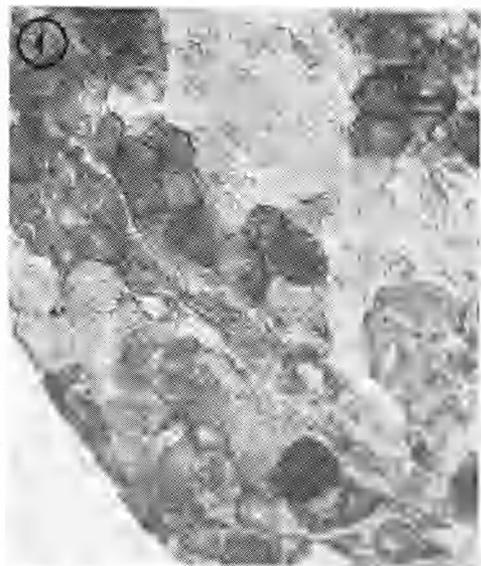
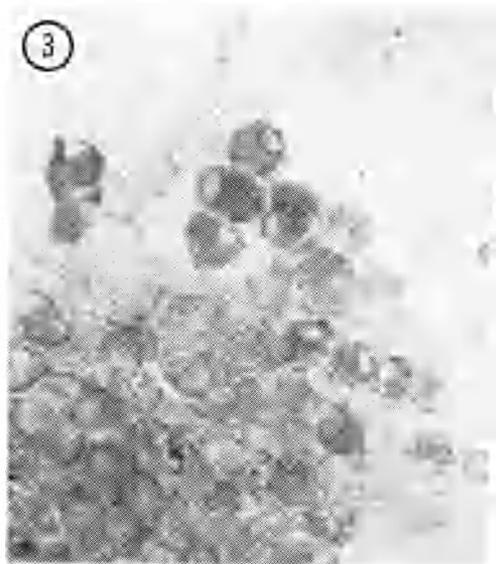
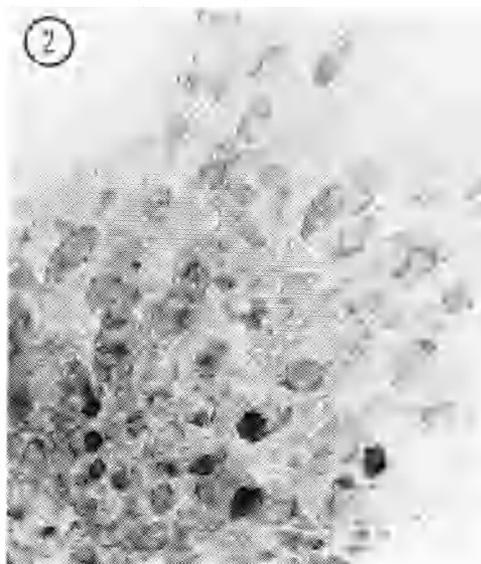
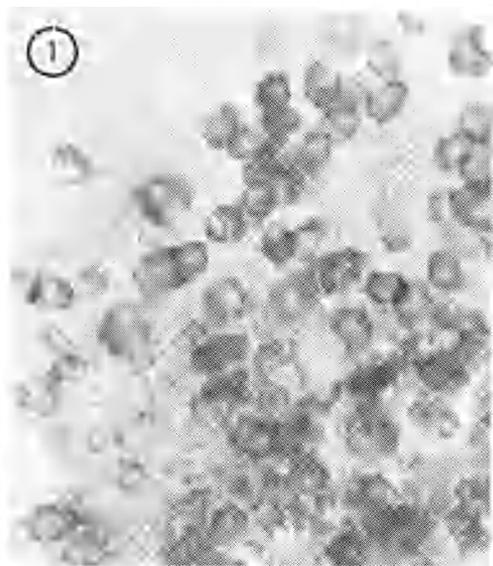
La reazione di Koelle per l'acetilcolinesterasi è risultata positiva in molte cellule nervose, sia nell'espianto che nella zona di migrazione. I controlli eseguiti con il D.F.P. hanno dimostrato che l'enzima presente nelle cellule nervose è acetilcolinesterasi.

Dopo la prima settimana di cultura le cellule nervose positive mostrano una reazione intensa in tutto il citoplasma (fig. 1); dopo 15-20 giorni l'enzima tende a localizzarsi particolarmente nella zona citoplasmatica associata alla membrana cellulare (fig. 2). Nelle cellule nervose più piccole la reazione è uniformemente positiva, mentre tra i neuroni più grandi, alcuni mostrano una reazione negativa, altri debolmente positiva, altri ancora fortemente positiva. Anche in culture più vecchie, di 30-35 giorni (fig. 3), l'attività dell'acetilcolinesterasi rimane immutata.

Il quadro dell'attività enzimatica osservato nei gangli spinali coltivati *in vitro*, è sovrapponibile a quello da noi osservato nei gangli spinali del ratto *in vivo*. Osservazioni da noi eseguite sui gangli spinali del ratto durante lo sviluppo, d'accordo con quelle riportate da Strumia e Baima-Bollone [14] nel pollo, hanno dimostrato che l'attività dell'acetilcolinesterasi aumenta notevolmente durante il differenziamento dei neuroni gangliari, così come abbiamo osservato *in vitro*.

La presenza nei gangli spinali, sia *in vitro* che *in vivo*, di cellule positive e negative può essere spiegata con l'esistenza di due tipi di neuroni (colinergici e non colinergici) oppure con l'esistenza di un ciclo biologico di carica e scarica dell'enzima.

Questi dati dimostrano che anche nelle cellule nervose isolate il differenziamento istochimico dell'acetilcolinesterasi procede parallelamente al differenziamento morfologico; ciò tuttavia, pur essendo questo differenzia-



mento istochimico un presupposto essenziale per un'attività fisiologica, non è sufficiente a dimostrare un'attività in atto.

Siamo svolgendo ulteriori ricerche con l'aiuto dell'elettrofisiologia intracellulare per cercare di chiarire le possibili relazioni esistenti tra contenuto enzimatico e attività funzionale nelle cellule nervose isolate *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. STEFANELLI, L. A. IERADI e E. CATALDI, « Riv. Istoch. Norm. patol. », 8, 119 (1962).
- [2] R. S. GEIGER e W. G. STONE, « Fed. Proc. », 21, 336 (1962).
- [3] J. C. HERMETET, J. TRESKA e P. MANDEL, « C. R. Soc. Biol. », 163, 1661 (1969).
- [4] M. A. GEREBTZOFF, « *Cholinesterases* », Pergamonn Press, p. 53 (1959).
- [5] G. B. KOELLE, « J. Pharmacol. Exptl. Therap. », 103, 153 (1951).
- [6] G. B. KOELLE, « J. Pharmacol. Exptl. Therap. », 114, 167 (1955 a).
- [7] E. GIACOBINI, « Acta Phisiol. Scand. », 45, 238 (1959 b).
- [8] N. CAUNA, N. T. NAIK, « J. Histochem. Cytochem. », 11, 129 (1963).
- [9] H. B. TEWARI e G. H. BOURNE, « J. Histochem. Cytochem. », 10, 42 (1962).
- [10] A. B. NOVIKOFF, N. QUINTANA, H. VILLAVARDE e R. FORSCHIRM, « J. Cell. Biol. », 29, 525 (1966).
- [11] T. R. SHANTA, S. L. MANOCHA e G. H. BOURNE, *The Structure and Function of Nervous Tissue*, G. H. Bourne 2, 184 (1969).
- [12] M. B. BORNSTEIN « Lab. Invest. », 7, 134 (1958).
- [13] G. GOMORI, *Microscopic Histochemistry*, The University of Chicago Press, p. 211 (1952).
- [14] E. STRUMIA e P. L. BAIMA-BOLLONE, « Acta Anat. », 57, 281 (1964).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

Le figure della tavola mostrano la relazione di Koelle per l'acetilcolinesterasi eseguita su espianiti di gangli spinali prelevati da feti di ratto di 17-18 gg. e su gangli *in vivo*.

Fig. 1. - Espianto di ganglio spinale di ratto coltivato *in vitro* per 8 gg. 820×.

Fig. 2. - Espianto di ganglio spinale di ratto coltivato *in vitro* per 22 gg. 780×.

Fig. 3. - Espianto di ganglio spinale di ratto coltivato *in vitro* per 30 gg.

Fig. 4. - Sezione di ganglio spinale di ratto nato da 20 gg. 700×.