
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

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

Sinapsi in vitro da cellule disgregate di retina di embrione di pollo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.5, p. 758–762.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_5_758_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. — *Sinapsi in vitro da cellule disgregate di retina di embrione di pollo* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, SILVIA CARAVITA, EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (**) dal Corrip. A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The cells of the optic cup of chick embryo at the fourth day of incubation were isolated by the trypsin disgregation technique.

The cells were then reaggregated and cultivated *in vitro* as long as 25 days. By electron microscopical observations the formation of a thick neuropile with many typical synapses was put into evidence.

The presence of synapses peculiar of the retinal receptors, firstly described by Sjöstrand, and referred as "synaptic ribbons", is particularly important. The results obtained represent the first accertained evidence of synapses formed *in vitro ex novo* from a new association of cells.

Besides, it comes out that the specific structure of the synapsis is independent from the specific functional activity.

Sin dalle prime ricerche di Harrison (1907) di coltivazione di neuroblasti *in vitro* è apparsa l'importanza di stabilire se i rapporti apparentemente visibili tra le fibre nervose in accrescimento possano essere considerati delle articolazioni sinaptiche.

In passate esperienze di alcuni di noi (Stefanelli e Zacchei, 1959) avevamo constatata la presenza di contatti tra fibre nervose e altre cellule in cultura. Questi contatti sono stati interpretati allora come semplici aspetti di adesione intercellulare, ed infatti ricerche successive, condotte con il microscopio elettronico (Stefanelli ed altri, 1964*a*, 1964*b*), hanno rivelato come aspetti simili osservati tra fibre e cellule nervose siano rappresentati solamente da modesti ispessimenti delle membrane cellulari lungo i punti di contatto, non aventi nemmeno la struttura, già più complessa, di un desmosoma tipico. Si trattava tuttavia, nelle culture così prese in esame, di unioni eterotipiche di cellule che in condizioni normali non avrebbero dovuto mettersi in rapporto sinaptico.

Negli ultimi tempi molti ricercatori hanno studiato i rapporti sinaptici in condizioni di cultura (Crain, 1956; Hild e Tasaki, 1962; Crain e Peterson, 1963, 1964; Callas e Hild, 1964; Wolf, 1964; Bunge ed altri, 1965; Peterson ed altri, 1965; Hild, 1966); tutti questi Autori hanno lavorato su espianati di frammenti di tessuto nervoso centrale. Sia le osservazioni ultramicroscopiche che l'applicazione di tecniche elettrofisiologiche hanno rivelato la presenza

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» della Università di Roma e nel Centro di Neuroembriologia, con i contributi del Gruppo di Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 14 maggio 1966.

di tipiche sinapsi, ma gli Autori citati hanno considerato queste sinapsi strutture preformate al momento dell'espianto e che si sono conservate *in vitro* o che hanno proseguito il loro differenziamento nell'espianto. Bunge ed altri (1965) hanno potuto constatare che al momento del prelievo del frammento le strutture sinaptiche erano estremamente rare e che dopo venti giorni di cultura erano divenute molto numerose anche nel neuropilo che si forma *ex novo* dalla superficie tagliata del frammento. Concludono quindi che il differenziamento di strutture sinaptiche può avvenire in grado elevato anche in cultura. Si tratta però di strutture che si sono differenziate su un substrato già organizzato precedentemente al momento dell'inizio della cultura. Anche i prolungamenti rigenerati e che costituiscono il neuropilo periferico, derivano da cellule espantate con una organizzazione e con una associazione già preformata con rapporti secondo un piano di differenziamento normale.

Le ricerche fatte per mettere in evidenza attività bioelettrica di queste culture (Crain, 1956; Crain e Peterson, 1963, 1964; Hild e Tasaki, 1962; Peterson ed altri, 1965) hanno portato ad alcune contrastanti conclusioni. Alcuni Autori (Hild e Tasaki, 1962; Hild, 1966) hanno potuto registrare scariche spontanee ripetitive in neuroni cerebellari, ma non le interazioni neurali caratteristiche del sistema nervoso centrale *in situ* e pertanto concludono che « un neurone *in vivo* è sempre parte di una rete nervosa, mentre in cultura non ha più connessioni sinaptiche con altri neuroni ».

Altri Autori, invece (Wolf, 1964; Crain e Peterson, 1964; Peterson ed altri, 1965) ritengono che le sinapsi presenti *in vitro* e riconoscibili morfologicamente siano anche fisiologicamente attive e ritengono che la differenza dei risultati sia da attribuirsi allo studio, nel caso sopra citato, di culture estremamente sottili e sparse sul vetrino, cioè praticamente neuroni isolati. La discussione se l'attività registrata in cultura abbia un significato fisiologico non ha senso in quanto condizioni fisiologiche predeterminate hanno *in vitro* sempre una possibilità di manifestazione.

Il fenomeno particolarmente preso in esame da Hild (1966) nelle sue considerazioni, della persistenza di strutture sinaptiche in condizioni di inattività funzionale e di profonda alterazione morfologica (fibre isolate dal perikarion) non è nuovo. È noto infatti da ricerche anatomo-comparate come in circuiti nervosi, che fisiologicamente degenerano durante lo sviluppo, i sistemi sinaptici possono persistere anche lungamente dopo la degenerazione dei neuroni a cui questi sistemi sono collegati. Tipica è la conservazione della fibra e di tutto l'apparato sinaptico mauthneriano per lunghissimo tempo dopo la degenerazione della cellula in quegli Ittiopsidi in cui questo si verifica, come uno di noi (Stefanelli, 1953) ha potuto ampiamente dimostrare.

È evidente la grande importanza di poter decidere in modo inoppugnabile se neuroni individualmente isolati *in vitro* possano non solo conservare una propria attività bioelettrica ma, articolandosi tra di loro, costituire nuove sinapsi e circuiti nervosi attivi in cultura, cioè dei veri microsistemi nervosi di neoformazione.

La possibilità di addivenire alla creazione di questi microsistemi con opportuna scelta delle cellule da interconnettere è di grandissimo valore per le ricerche morfologiche sulla organizzazione dei « circuiti » nervosi, e fisiologiche sulla attività dei neuroni tra loro concatenati.

Con questo programma di lavoro abbiamo affrontato il problema con diverse metodiche; quella che ci è sembrata più significativa e opportuna è stata la tecnica della aggregazione di cellule nervose precedentemente disgregate in singoli elementi discreti.

Le osservazioni che qui vogliamo illustrare si riferiscono alla disgregazione di retina di embrione di pollo di 4 giorni successivamente riaggregata *in vitro* e mantenuta in cultura sino a 25 giorni; la tecnica usata è stata quella descritta in lavori precedenti di alcuni di noi (Stefanelli e Zacchei, 1958a, 1958 b); dopo 6 giorni di cultura a goccia pendente gli aggregati sono stati posti in cultura rotante usando il mezzo descritto da Moscona (1961).

Questo materiale è stato scelto perché appunto in precedenti ricerche (Stefanelli, Zacchei e Ceccherini, 1961) avevamo ottenuto aggregati con una configurazione strutturale di un certo interesse, pur non essendo mai riusciti ad avere una ristrutturazione della retina simile a quella ottenuta da Del Pianto già nel 1942, nel nostro Istituto, disgregando abbozzi oculari di rana ed iniettando il disgregato nella regione vitellina di un embrione ospite.

Gli aggregati da noi coltivati *in vitro* sono stati studiati otticamente e con il microscopio elettronico; sono in corso ricerche istochimiche per saggiarne alcune attività enzimatiche.

Le figure che noi presentiamo si riferiscono ad aggregati tenuti in cultura per 25 giorni; esse mostrano, secondo noi in modo del tutto evidente, che pur nella modesta riaggregazione retinica ottenuta si sono costituiti dei neuropili frammisti a cellule gliali ed in cui sono chiaramente visibili numerosi contatti sinaptici tipici, costituiti da ispessimenti delle membrane affacciate e dalla presenza di vescicole sinaptiche da una sola delle due parti impegnate nel contatto (Tav. I). È interessante notare come nel caso di più sinapsi su una stessa fibra (Tav. II D), esse hanno tutte un identico orientamento polare. Nella maggioranza delle sinapsi osservate l'ispessimento delle membrane pre- e post-sinaptiche appare uguale; solo in qualche caso si trova del materiale opaco associato alla membrana presinaptica. Del resto queste sono le caratteristiche di sinapsi in corso di sviluppo e l'ineguale ispessimento delle due membrane si verifica solamente al termine di questo (Glees e Sheppard, 1964).

Un dato degno di attenzione è la presenza da noi riscontrata di una particolare struttura sinaptica, descritta per la prima volta da Sjöstrand (1958) nella retina di mammiferi, caratteristica delle sinapsi tra recettori e cellule bipolari, e da lui chiamate *synaptic ribbon*. Recentemente (Meller, 1964), in uno studio sullo sviluppo della retina dell'embrione di pollo, la stessa struttura è stata vista comparire nei processi citoplasmatici presinaptici delle cellule recettrici in embrioni a 17 giorni di incubazione. La presenza dei *synaptic ribbons* nei nostri aggregati non solo può permettere di riconoscere

le cellule recettrici e i loro prolungamenti dagli altri elementi cellulari, ma stà a dimostrare come il differenziamento di queste cellule sia proseguito fino ad un grado elevato di organizzazione e specializzazione morfologica e come veramente si sia neofornato in cultura l'apparato sinaptico peculiare delle cellule retiniche. Dall'osservazione di aggregati tenuti in cultura solamente 8 giorni, infatti, risulta come le cellule siano in maggioranza ad uno stadio indifferenziato e come qualunque prolungamento nervoso sia assente.

Queste osservazioni rappresentano secondo noi un importante punto di partenza per ulteriori ricerche, sia sull'attività bioelettrica di queste culture, sia sul significato che una tale attività può avere in questa condizione di isolamento funzionale dal resto del sistema nervoso.

Si potrà obiettare che le condizioni che si stabiliscono in un aggregato sono morfologicamente molto migliori di quelle di una cultura classica o di una coltura *monolayer*, in quanto si ottiene una riorganizzazione strutturale molto più vicina a quella tipica. Ma dal punto di vista del problema generale del ristabilimento di sinapsi da cellule prima individualmente isolate, non toglie nessun valore che le cellule si distribuiscano su un solo piano o formino un ammasso; possiamo solo dire che l'aggregazione mette le cellule in condizioni migliori per poter manifestare le loro proprietà intrinseche.

Con queste esperienze abbiamo potuto dare la dimostrazione che la formazione di sinapsi è intrinsecamente acquisita al momento della determinazione istogenica dei neuroblasti e che, se le condizioni lo permettono, come in un riaggregato, le sinapsi si formano indipendentemente da una necessità funzionale generale, che in condizioni di cultura viene evidentemente a mancare.

Una opportuna scelta di neuroblasti specifici e una opportuna mescolanza con altre cellule potranno chiarire molti punti del meccanismo morfologico e fisiologico della organizzazione nervosa al livello cellulare.

BIBLIOGRAFIA.

- BUNGE R. P., BUNGE M. B. e PETERSON E. R., *An electron microscope study of cultured rat spinal cord*, « J. Cell. Biol. », 24, 163-191 (1965).
- CALLAS G. e HILD W., *Electron microscopic observations of synaptic endings in cultures of mammalian central nervous tissue*, « Zeitschr. f. Zellf. », 63, 686-691 (1964).
- CRAIN S. M., *Resting and action potentials of cultured chick embryo spinal ganglion cells*. « J. Comp. Neur. », 104, 285-330 (1956).
- CRAIN S. M. e PETERSON E. R., *Bioelectric activity in long term cultures of spinal cord tissues*, « Science », 141, 427-429 (1963).
- CRAIN S. M. e PETERSON E. R., *Complex bioelectric activity in organized tissue cultures of spinal cord (human, rat and chick)*, « J. cell. comp. Physiol. », 64, 1-13 (1964).
- DEL PIANTO E., *Ricerche sulla ricostituzione dell'abbozzo dell'occhio di Rana esculenta, dissociato nei suoi elementi*, « Arch. Zool. ital. », 30, 229-256 (1942).
- GLEES P. e SHEPPARD B. L., *Electron microscopical studies of the synapse in the developing chick spinal cord*, « Zeitschr. f. Zellf. », 62, 356-362 (1964).
- HARRISON R. G., *Observations on living, developing nerve fibers*, « Proc. Soc. Exp. Biol. an Med. », 4, 140-143, 1907.

- HILD W., *Cell types and neuronal connections in cultures of mammalian central nervous tissue*, «Zeitschr. f. Zellf.», 69, 155-189 (1966).
- HILD W. e TASAKI I., *Morphological and physiological properties of neurons and glial cells in tissue culture*, «J. Neurophysiol.», 25, 277-304 (1962).
- MELLER K., *Elektronenmikroskopische befunde zur differenzierung der rezepto-zellen und bipolarzellen der retina und ihr synaptischen verbindungen*, «Zeitschr. f. Zellf.», 64, 733-750 (1964).
- MOSCONA A., *Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro*, «Exp. Cell. Res.», 22, 455-475 (1961).
- PETERSON E. R., CRAIN S. M. e MURRAY M. R., *Differentiation and prolonged maintenance of bioelectrically active spinal cord cultures (Rat, Chick and Human)*, «Zeitschr. f. Zellf.», 66, 130-154 (1965).
- STEFANELLI A., *Il neurone di Mauthner negli Ittiopsidi (Pisces, Amphibia)*, «Experientia (Basel)», 9, 277-285 (1953).
- STEFANELLI A. e ZACCHEI A. M., *Sulle modalità di aggregazione di cellule embrionali di pollo disgregate con tripsina*, «Acta Emb. Morph. Exp.», 2, 1-12 (1958 a).
- STEFANELLI A. e ZACCHEI A. M., *Comportamento delle cellule di abbozzo oculare di embrione di pollo dissociate con tripsina in vitro*, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 25, 617-621 (1958 b).
- STEFANELLI A. e ZACCHEI A. M., *Orientamento delle fibre nervose di cellule spinali embrionali in cultura e rapporti neuromuscolari (in Gallus e Coturnix)*, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 26, 753-756 (1959).
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M. e CECCHERINI V., *Ricostituzioni retiniche in vitro dopo disgregazione dell'abbozzo oculare di embrione di pollo*, «Acta Emb. Morph. exp.», 4, 47-55 (1961).
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. e CECCHERINI V., *Organizzazioni isotipiche nelle riaggregazioni in vitro di abbozzi disgregati di retina di embrioni di pollo*, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 30, 818-822 (1961).
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M. e CARAVITA S., *Sui contatti intercellulari in cultura di tessuto nervoso embrionale di pollo*, «Rend. Ist. Univ. Camerino», 5, 141-150 (1964 a).
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. A., *Orientamento e connessioni di fibre gangliari di pollo in vitro*, «Boll. Zool.», 31, 837-858 (1964 b).
- SJÖSTRAND F. S., *The ultrastructure of retinal receptors of the vertebrate eye*, «Ergebn. Biol.», 21, 128-160 (1959).
- WOLF M. K., *Differentiation of neuronal types and synapses in myelinating cultures of mouse cerebellum*, «J. Cell Biol.», 22, 259-279 (1964).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

Sezioni al microscopio elettronico di riaggregato di retina di embrione di pollo di 4 giorni di incubazione dopo 25 giorni di cultura. A) Tipico neuropilo con numerose sinapsi (alcune contrassegnate con la freccia); B, C) Due sinapsi a maggior ingrandimento (glia con gliofilamenti, *cn* cellula nervosa).

TAVOLA II.

Sezioni come nella tavola precedente. D) Neuropilo con numerose sinapsi (↑); con * è indicata una tripla sinapsi; E, F) *synaptic ribbons* (↑) circondati da vescicole presinaptiche caratteristiche delle cellule sensorie della retina. Con *ncs* è indicato il nucleo di cellula sensoria.

Il segmento al piede dei fotogramma indica 1 μ .



