

A. ALBANESE

M. MOLINARI

M. BENTIVOGLIO

**PROSPETTIVE NELLO STUDIO DELLE PROIEZIONI NEURONALI:
L'USO COMBINATO DI TRACCIANTI RETROGRADI
CON METODICHE ISTOCHIMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE
DEI NEUROTRASMETTITORI**



Estratto da

«Archivio di Psicologia Neurologia e Psichiatria»

Anno XL (1979), fasc. IV

Redazione e Amministrazione: Largo A. Gemelli, 1 - 20123 Milano

A. ALBANESE

M. MOLINARI

M. BENTIVOGLIO

**PROSPETTIVE NELLO STUDIO DELLE PROIEZIONI NEURONALI:
L'USO COMBINATO DI TRACCIANTI RETROGRADI
CON METODICHE ISTOCHIMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE
DEI NEUROTRASMETTITORI**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DELL'UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE - ROMA
ISTITUTO DI NEUROLOGIA

Direttore: prof. G. MACCHI

A. ALBANESE

M. MOLINARI

M. BENTIVOGLIO

PROSPETTIVE NELLO STUDIO DELLE PROIEZIONI NEURONALI:
L'USO COMBINATO DI TRACCIANTI RETROGRADI CON METODICHE
ISTOCHEMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI NEUOTRASMETTITORI

INTRODUZIONE

I recenti progressi nelle metodiche sperimentali in neurobiologia favoriscono continui sviluppi di ricerche interdisciplinari. In particolare, si sono aperte nuove prospettive negli studi dell'organizzazione anatomica e farmacologica dei circuiti neuronali.

Alcune metodiche di indagine messe a punto nell'ultimo decennio, le tecniche di trasporto assonale, forniscono un efficace strumento per lo studio sperimentale delle connessioni neuronali. D'altra parte, i metodi neurofarmacologici attualmente disponibili consentono di identificare nei neuroni alcuni trasmettitori, o alcune sostanze implicate nel metabolismo dei neurotrasmettitori che quindi ne evidenziano indirettamente la presenza. Lo studio delle popolazioni neuronali e delle loro connessioni in relazione ad un determinato trasmettitore si basa su: a) la possibilità di visualizzare selettivamente la sostanza nei corpi neuronali e nelle fibre da essi efferenti; ciò viene attuato, ad esempio, nell'istofluorescenza e nell'immunoistofluorescenza; b) la somministrazione esogena del neurotrasmettitore marcato con isotopo radioattivo, che viene assunto selettivamente nei neuroni che utilizzano l'analogo endogeno; la localizzazione dei composti marcati nel tessuto nervoso viene studiata mediante l'autoradiografia (cfr. HÖKFELT e LJUNGDAHL, 1975, per una revisione di tale problema; inoltre STREIT e coll., 1979).

Lo studio delle vie neuronali mediante tecniche anatomiche e

mediante tecniche farmacologiche fornisce dei dati concernenti rispettivamente l'origine e la terminazione delle connessioni, e la presenza o meno di un determinato neurotrasmettitore in una o più stazioni del circuito. Negli ultimi anni, sono state intraprese in molti laboratori delle ricerche volte a correlare il più strettamente possibile questi due tipi di indagine. In particolare, sono stati dedicati molti studi all'allestimento di metodi che possano rispondere al seguente quesito: nei casi in cui lo studio neurochimico evidenzia in un gruppo di neuroni dei corpi cellulari contenenti un determinato trasmettitore, e lo studio anatomico rivela che le cellule di origine di una via sono localizzate nel medesimo gruppo di neuroni, si tratta delle stesse cellule o di corpi cellulari diversi? In altre parole: è il trasmettitore coinvolto in quel determinato circuito, oppure è implicato in altre vie efferenti da quel gruppo di neuroni? Dati quantitativi, studi morfologici, comparazioni della distribuzione topografica delle cellule possono fornire delle indicazioni indirette su tale problema, ma non danno una risposta definitiva. Tuttavia, in questo campo di indagine si stanno aprendo nuove possibilità di « doppia marcatura », odologica e chimica, dei neuroni di origine delle proiezioni assonali. È scopo di questa esposizione offrire una breve revisione di tale problema. Verranno quindi esposte sinteticamente le principali metodiche attualmente in uso negli studi di neuroanatomia sperimentale, le principali tecniche neuroistochimiche e le possibilità di uso combinato di tali metodi.

I - LO STUDIO SPERIMENTALE DELLE CONNESSIONI NEURONALI MEDIANTE IL TRASPORTO ASSONALE RETROGRADO

Alcune sostanze esogene, captate dai terminali dell'assone, vengono trasportate in via retrograda lungo gli assoni e si localizzano nel corpo cellulare. Come è stato precedentemente accennato, il fenomeno del trasporto assonale viene utilizzato sperimentalmente per lo studio delle connessioni neuronali (cfr. MOLINARI e coll., 1980, per un'ampia revisione di tale problema). L'uso di sostanze traccianti in via retrograda consente di attuare una mappa dettagliata dei corpi cellulari di origine delle proiezioni assonali. L'enzima *horseradish peroxidase* (HRP; KRISTENSSON e OLSSON, 1971; LAVAIL e LA VAIL, 1972) è il tracciante retrogrado più largamente diffuso negli studi di neuroanatomia sperimentale. La presenza dell'HRP viene comunemente identificata mediante un metodo istochimico specifico nelle aree in cui viene

iniettata e nei corpi cellulari in cui si localizza in seguito a trasporto retrogrado lungo l'assone (fig. 1). Il metodo istochimico consiste nell'incubare le sezioni con un cromogeno come substrato e con H_2O_2 ; la localizzazione dell'HRP viene rivelata dal prodotto di reazione, che ha un colore scuro, facilmente identificabile all'osservazione al microscopio. Secondo la metodica di GRAHAM e KARNOVSKY (1966) il substrato è rappresentato dalla diaminobenzidina; tuttavia, sono state recentemente messe a punto molte varianti della metodica di incubazione, al fine di migliorarne la sensibilità (cfr. MESULAM e ROSENE, 1979). Le principali tecniche di incubazione finora proposte sono elencate nella tabella I.

TABELLA I

Principali substrati proposti per la reazione istochimica della HRP

Substrato	Colore del prodotto di reazione	Autori
Diaminobenzidina (DAB)	Marrone chiaro	GRAHAM e KARNOVSKY (1966)
DAB con preincubazione in $CoCl_2$	Nero	ADAMS (1977)
Benzidina diidrocloreuro (BDHC)	Blu	MESULAM (1976); DE OLMOS e HEIMER (1977)
Tetrametilbenzidina (TMB)	Blu	MESULAM (1978); DE OLMOS e coll. (1978)
Orto-dianisidina	Verde	DE OLMOS (1977)
Para-fenilendiamina e pirocatecolo (PPD-PC)	Marrone scuro	HANKER e coll. (1977)

La semplicità d'uso del metodo del trasporto retrogrado, e la sua efficacia nel rivelare i corpi di origine delle proiezioni neuronali, ne fanno attualmente un potente strumento di indagine sull'organizza-

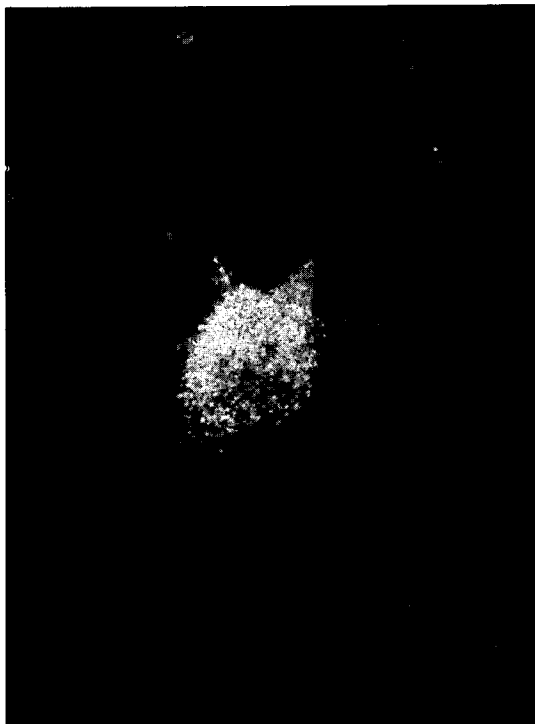


FIG. 1 - Cellula marcata in via retrograda nel talamo di gatto dopo iniezione di HRP nella corteccia cerebrale. La presenza di HRP viene indicata dalla caratteristica reazione granulare nel citoplasma. Incubazione con DAB (tab. I). Osservazione in campo oscuro (X 250).

zione anatomica delle connessioni del sistema nervoso ed hanno stimolato la ricerca di nuove sostanze trasportate in via retrograda lungo gli assoni. Nel corso di tali studi è stato recentemente identificato un gruppo di traccianti fluorescenti (KUYPERS e coll., 1977; BENTIVOGLIO e coll., 1979b; fig. 2). Nella tabella II vengono elencate alcune caratteristiche di tali traccianti, relative al colore ed alla loro localizzazione subcellulare nei corpi neuronali marcati in via retrograda. Le caratteristiche di questi traccianti sono diverse anche per quanto riguarda la loro efficacia nel trasporto retrogrado a lunga distanza e la diffusione alle cellule gliali intorno ai neuroni marcati in via retrograda (cfr. KUYPERS e coll., 1979). Negli studi di neuroanatomia sperimentale l'uso simultaneo di due traccianti fluorescenti, di colore diverso o con diverse caratteristiche di localizzazione subcellulare, ha consentito l'allestimento di metodi di « doppia marcatura retrograda » dei corpi neuronali. Tali metodi vengono utilizzati per lo studio delle proiezioni assionali collaterali, dovute cioè a ramificazioni dell'assone efferente

TABELLA II

Sostanze fluorescenti trasportate in via retrograda lungo gli assoni

Sostanza fluorescente	Lunghezza d'onda della luce di eccitazione	Colore	Caratteristiche delle cellule marcate in via retrograda	Autori
Evans Blue	550 nm	Rosso	Marcatura diffusa del corpo neuronale	KUYPERS e coll. (1977)
DAPI	360 nm	Blu	Intensa marcatura del nucleo, alcuni granuli nel citoplasma	KUYPERS e coll. (1977)
Primuline	360 nm	Giallo-blu	Granuli nel citoplasma	KUYPERS e coll. (1977)
Bisbenzimidide	360-390 nm	Giallo-verde	Intensa marcatura del nucleo, granuli nel citoplasma	KUYPERS e coll. (1979)
Propidium Iodide	550 nm	Arancione	Intensa marcatura del nucleo, granuli nel citoplasma	KUYPERS e coll. (1979)
True Blue	360 nm	Blu	Intensa marcatura del nucleo e del citoplasma	BENTIVOGLIO e coll. (1979b)
Granular Blue	360 nm	Blu	Granuli nel citoplasma	BENTIVOGLIO e coll. (1979b)

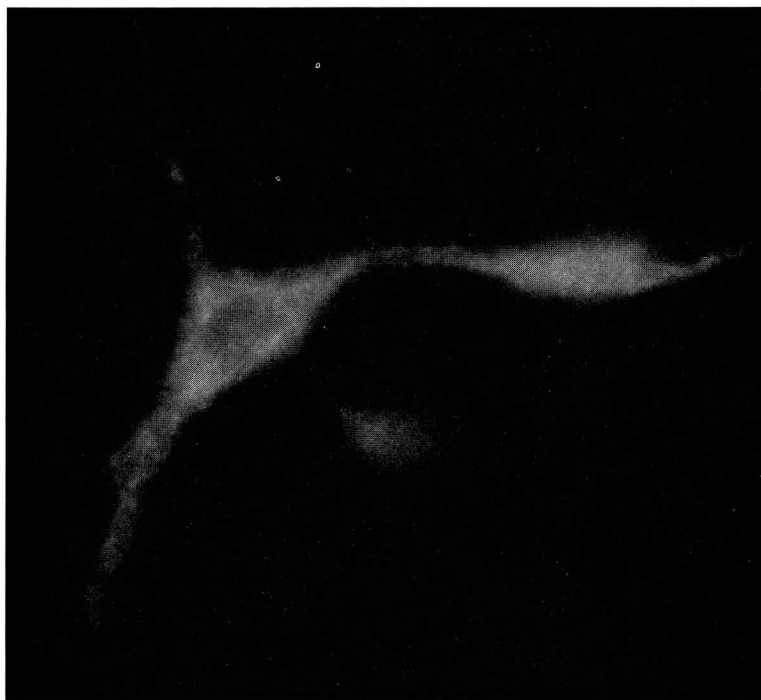


FIG. 2 - Cellula marcata in via retrograda nella sostanza reticolare del tronco cerebrale di ratto dopo iniezione di Granular Blue nel midollo spinale. Osservazione in fluorescenza (X 250).

da una stessa cellula di origine a due diverse aree di terminazione (VAN DER KOOY e coll., 1978; KUYPERS e coll., 1979; BENTIVOGLIO e coll., 1979a).

II - LO STUDIO SPERIMENTALE DELLE POPOLAZIONI NEURONALI MEDIANTE METODICHE ISTOCHIMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI POSSIBILI NEUROTRASMETTITORI

Lo studio istochimico dei neurotrasmettitori centrali ha avuto un largo sviluppo ed una rapida diffusione, grazie al recente allestimento di nuove metodiche sperimentali. Infatti, oltre ai metodi istochimici di meno recente introduzione, quali quello per l'acetilcolinesterasi (AChE) e per le monoamine (noradrenalina, NA; dopamina, DA; serotonina, 5-HT), sono oggi disponibili i metodi immunoistochimici,

che consentono di identificare sostanze dotate di un potere antigenico specifico, quali, ad esempio, gli enzimi e i peptidi.

Le principali tecniche istochimiche verranno brevemente discusse qui di seguito, nel tentativo di riassumerne le caratteristiche e di valutare in che modo esse possano venire utilizzate per uno studio combinato con le metodiche in uso negli studi di neuroanatomia sperimentale.

1) *L'identificazione istochimica dell'AChE*

L'identificazione dell'AChE, l'enzima che inattiva l'acetilcolina (ACh), viene comunemente utilizzata nello studio dei sistemi colinergici. È tuttavia necessario precisare che l'AChE non è contenuta soltanto nei neuroni che utilizzano l'ACh come trasmettitore. D'altro canto, l'AChE non è ubiquitaria nel SNC, ed il significato della sua localizzazione in neuroni non colinergici è tuttora poco chiaro (cfr. BUTCHER, 1977, per una revisione del problema). È pertanto necessario valutare anche altri parametri al fine di determinare se le cellule contenenti AChE utilizzino effettivamente l'ACh come trasmettitore. A



FIG. 3 - Cellula contenente AChE localizzata nel tronco encefalico di ratto, visualizzata secondo la metodica di BUTCHER e BILEZIKJIAN (1975). Osservazione in campo chiaro (X 250).

tale scopo viene, ad esempio, identificata nei corpi cellulari anche la colina-acetiltransferasi (CAT, l'enzima che sintetizza l'ACh), e vengono studiate *in vivo* le caratteristiche farmacologiche delle stesse cellule.

Per quanto riguarda la rivelazione dell'AChE nei tessuti, KOELLE e FRIEDENWALD (1949) hanno per primi messo a punto un metodo istochimico. Successivamente, tale tecnica è stata più volte modificata allo scopo di ottenere una maggiore specificità di substrato. Un metodo molto sensibile per lo studio dell'AChE nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) è quello descritto da KARNOVSKY e ROOTS (1964), che utilizza come substrato l'acetilcolina e conferisce al prodotto di reazione un caratteristico colore rosso bruno in microscopia ottica. Tuttavia, un limite della tecnica è rappresentato dal fatto che l'AChE è presente, oltre che nei neuroni, anche nella sostanza intercellulare e che, pertanto, in aree ad alta densità cellulare non è possibile ottenere una buona definizione morfologica delle cellule nervose in esame (ALBANESE e BUTCHER, 1979). BUTCHER e BILEZIKJIAN (1975) hanno messo a punto una metodica che ovvia a tali inconvenienti e consente di ottenere una dettagliata visualizzazione morfologica del corpo neuronale (fig. 3).

2) *L'istofluorescenza per lo studio delle monoamine*

FALK e coll. (1962) hanno per primi messo a punto un metodo per la visualizzazione delle monoamine contenute nel SNC (NA, DA, 5-HT), per mezzo di una reazione di condensazione dei vapori di formaldeide, che conduce la formazione di prodotti fluorescenti. Tali autori hanno modificato la tecnica allestita da ERÄNKÖ (1955) per lo studio della midollare del surrene, apportando alcune variazioni che ne hanno consentito l'utilizzazione nello studio delle monoamine nei circuiti neuronali. La metodica è stata ulteriormente perfezionata da HÖKFELT e LJUNGDAHL (1972).

Nel metodo dell'istofluorescenza, il colore del prodotto di reazione consente di distinguere nelle cellule nervose del SNC le catecolamine (NA, DA) dalla 5-HT: le prime, infatti, emettono una luce verde nello spettro di 510 nm, mentre la 5-HT dà luogo ad una emissione gialla (circa 540 nm). Gli spettri di emissione delle diverse catecolamine sono troppo simili tra loro perché possano essere distinti solo sulla base della lunghezza d'onda; altri fattori, tuttavia, consentono di differenziarle (cfr. GEFFEN, 1975).

La metodica dell'istofluorescenza ha consentito di attuare uno studio dettagliato dei circuiti monoaminergici nel SNC e di localizzare i corpi cellulari contenenti NA, DA e 5-HT (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; UNGERSTEDT, 1971).

3) *L'immunoistochimica*

L'immunoistochimica si basa sulla possibilità di rivelare nei tessuti, mediante tecniche immunitarie, la presenza di sostanze dotate di proprietà antigeniche. Il primo esempio di tecnica istochimica si deve a COONS e coll. (1942) che hanno utilizzato anticorpi fluorescenti per localizzare gli antigeni dello pneumococco. Gli anticorpi possono essere utilizzati come reagenti istochimici per localizzare sostanze contenute all'interno delle cellule in quanto essi possono essere coniugati con molecole rivelatrici senza perdere la loro specificità anticorpale. Le sostanze rivelatrici sono rappresentate da molecole fluorescenti (COONS, 1956), radioisotopi (BERENBAUM, 1959), la ferritina (SINGER, 1959) ed enzimi quali la perossidasi (AVRAMEAS, 1970). I due metodi più largamente utilizzati sono l'istofluorescenza e l'immunoistochimica enzimatica.

Nell'istofluorescenza gli anticorpi vengono coniugati con sostanze fluorescenti, soprattutto i derivati della fluorescina (di colore verde) e della rodamina (di colore rosso). Gli anticorpi coniugati possono essere specifici per la molecola da rivelare (fluorescenza diretta), oppure sensibilizzati verso gli antigeni comuni di una specie animale, ad esempio, il coniglio) con cui vengono prodotti gli anticorpi specifici per la molecola da rivelare (fluorescenza indiretta). La teorica indiretta, più sensibile ed anche più economica di quella diretta, è la più diffusa. Un aspetto metodologico di notevole rilievo è rappresentato dalla necessità di ottenere anticorpi monospecifici. Quest'ultimo problema, ad esempio, si è rivelato particolarmente delicato nello studio con l'immunofluorescenza della CAT, per la quale non è stato fino ad oggi ottenuto un anticorpo sufficientemente specifico (KAN e coll., 1978).

Nel caso dell'immunoistochimica enzimatica, l'anticorpo viene coniugato ad un enzima la cui attività possa essere rivelata con metodi istochimici. L'enzima più utilizzato a questo scopo è l'HRP (lo stesso che viene impiegato come tracciante retrogrado in neuroanatomia sperimentale) che può essere osservato sia in microscopia ottica che elettronica (AVRAMEAS, 1970). La specificità e l'efficacia del metodo sono state ulteriormente perfezionate nella tecnica « perossidasi-anti-

perossidasi », in cui l'HRP viene legata all'anticorpo mediante un legame immunitario (STEINBERGER, 1973; PICKEL e coll., 1975).

III - LO STUDIO COMBINATO DELL'ODOLOGIA E DEI NEUROTRASMETTITORI

1) *Il metodo del trasporto retrogrado dell'HRP combinato con metodiche per lo studio dei neurotrasmettitori*

L'introduzione del metodo del trasporto assonale dell'HRP nelle ricerche di neuroanatomia sperimentale ha aperto la possibilità di studi combinati, anatomici e chimici, delle proiezioni neuronali. Ovviamente, è necessario a tale scopo che le due metodiche, quella dell'HRP e quella per l'identificazione del neurotrasmettitore, siano tecnicamente compatibili. È questo il caso, ad esempio, dei metodi di rivelazione dell'HRP e dell'AChE. La visualizzazione simultanea, nel medesimo corpo cellulare, dell'HRP trasportata in via retrograda e dell'AChE eventualmente presente in esso, si basa sul riconoscimento, all'osservazione al microscopio in campo chiaro, dei prodotti di reazione dei rispettivi procedimenti istochimici. Sono state allestite a tale scopo delle metodiche combinate, con incubazioni che rendono blu il prodotto di reazione dell'HRP, per distinguerlo dal prodotto di reazione per l'AChE di colore bruno (MESULAM, 1976), oppure che danno una reazione marrone per l'HRP e nera, invece, per l'AChE (HARDY e coll., 1976).

Con la metodica combinata per l'HRP e l'AChE sono state studiate alcune proiezioni afferenti alla corteccia cerebrale. In tale modo è stato infatti osservato che molte delle cellule marcate in via retrograda nel telencefalo basale, dopo iniezione di HRP nella corteccia motoria della scimmia, sono intensamente AChE-positive (MESULAM e VAN HOESEN, 1976). Questo studio ha così messo in evidenza che alcune cellule di origine di proiezioni corticali afferenti in via monosinaptica, al di fuori del talamo, hanno mediazione verosimilmente colinergica.

La visualizzazione simultanea, cioè in un unico tempo di osservazione al microscopio, non è invece possibile nel caso degli studi con l'HRP combinati con le metodiche istochimiche che comportano l'osservazione al microscopio in fluorescenza. In tal caso infatti, poiché nelle tecniche più comunemente adottate il prodotto di reazione non è fluorescente (cfr. tab. II), le ricerche devono essere attuate in tempi

successivi di studio al microscopio. Tale problema si pone sia per l'istofluorescenza che per l'immunoistofluorescenza. D'altra parte gli studi immunoistochimici non possono essere attuati con la tecnica enzimatica, che richiede l'uso dell'HRP ed è quindi ovviamente incompatibile con l'istochimica per l'HRP utilizzata come tracciante retrogrado.

Le ricerche sulla possibilità di combinare il metodo del trasporto assonale retrogrado dell'HRP con l'istofluorescenza sono state attuate prevalentemente sul sistema nigro-striatale e sulle cellule di origine nel tronco encefalico di proiezioni discendenti al midollo spinale (BERGER e coll., 1978; BLESSING e coll., 1978; SMOLEN e coll., 1979). Le sezioni sono state dapprima trattate con la tecnica dell'istofluorescenza, ed avviate quindi, in un secondo tempo, al procedimento istochimico per la visualizzazione dell'HRP e all'osservazione in campo chiaro e scuro. La singola o doppia marcatura (anatomica e/o farmacologica) dei corpi cellulari è stata dedotta dal confronto su microfotografie delle stesse cellule, prese nei due successivi tempi di osservazione, oppure su mappe cellulari ottenute con un X-Y plotter. Ovviamente, le tecniche in due tempi sono più laboriose di un'osservazione simultanea, soprattutto se si considera che il confronto su microfotografie rende arduo uno studio dettagliato di popolazioni cellulari numerose. È comunque necessario sottolineare che, nonostante tutti i limiti precedentemente accennati, questi studi hanno fornito dati di estremo interesse, e, soprattutto, hanno aperto un capitolo del tutto nuovo nello studio dell'organizzazione del sistema nervoso.

2) *L'uso di traccianti retrogradi fluorescenti combinato con metodiche per lo studio dei neurotrasmettitori*

La recente identificazione di traccianti retrogradi fluorescenti per lo studio delle proiezioni neuronali ha consentito un ulteriore sviluppo delle metodiche di « doppia marcatura », odologica e chimica. Si è infatti aperta la possibilità di combinare efficacemente lo studio neuroanatomico con i molteplici metodi neurochimici che implicano l'osservazione in fluorescenza.

BJÖRKLUND e SKAGERBERG (1979a) hanno messo a punto una tecnica che consente la visualizzazione simultanea, e quindi in un unico tempo di osservazione, dei traccianti fluorescenti e delle monoamine contenute nei corpi neuronali. Sono stati utilizzati a tale scopo una modifica della tecnica dell'istofluorescenza e vari traccianti fluorescenti, che possono essere facilmente identificati insieme alle monoamine eventualmente presenti nel medesimo corpo cellulare. Le due sostanze, cioè il tracciante ed il neurotrasmettitore, vengono distinte l'una dal-

l'altra sulla base dei diversi spettri di emissione o di eccitazione, e quindi di un diverso colore, oppure sulla base di una differente localizzazione nel corpo cellulare.

HÖKFELT e coll. (1979a) hanno applicato un principio simile per combinare l'uso di traccianti fluorescenti con la tecnica dell'immuno-fluorescenza indiretta. Tali autori hanno valutato, soprattutto sui sistemi discendenti al midollo spinale, la possibilità di combinare lo studio di varie sostanze, quali, ad esempio, gli enzimi di sintesi delle catecolamine, le encefaline e la sostanza P, con l'uso di traccianti fluorescenti. Sono stati così ottenuti dei risultati estremamente incoraggianti, soprattutto utilizzando la Primuline (cfr. tab. II) come tracciante retrogrado.

I primi studi finora comparsi nella letteratura offrono importanti chiarimenti su alcune vie discendenti al midollo spinale, la cui organizzazione farmacologica è molto poco conosciuta. È stato infatti determinato, nel ratto, che le vie bulbo-spinali hanno in parte origine da neuroni contenenti metionin-encefalina (HÖKFELT e coll., 1979b), e che il midollo spinale riceve proiezioni dopaminergiche da un gruppo di cellule situate a livello diencefalico, nell'ipotalamo e nel grigio periventricolare (BJÖRKLUND e SKAGERBERG, 1979b).

Tutte queste ricerche, per lo più ancora in fase preliminare, aprono una vasta gamma di possibilità nello studio neurochimico dei circuiti neuronali, anche in considerazione della possibilità di individuare altri traccianti fluorescenti e di estendere il campo di applicazione della immunofluorescenza allo studio di nuove sostanze chimiche implicate nei meccanismi della neurotrasmissione sinaptica.

CONCLUSIONI

Ciascuna delle neuroscienze rappresenta un diverso tipo di approccio agli stessi problemi, e il fine ultimo delle ricerche in neurobiologia, la conoscenza della struttura e del funzionamento del sistema nervoso, può essere raggiunto solo integrando i dati che vengono forniti dalle diverse discipline. L'esempio che è stato brevemente trattato si inserisce nel campo delle ricerche a carattere interdisciplinare, poiché riguarda la possibilità di correlare lo studio dell'organizzazione odologica di un circuito neuronale con quello dei neurotrasmettitori che in esso sono implicati. Ciò viene al momento attuale consentito dallo sviluppo delle indagini di neuroanatomia e neuroistochimica. Prima dell'introduzione in neuroanatomia dei traccianti trasportati lungo gli assoni, gli studi odologici venivano attuati mediante i metodi

di degenerazione, anterograda e retrograda, basati sulle modificazioni patologiche indotte nella cellula nervosa per lesioni del corpo cellulare o delle sue fibre.

L'uso del trasporto assonale, un fenomeno fisiologico della cellula nervosa, consente ora di studiare, oltre alle connessioni, anche la morfologia ed il normale corredo chimico del neurone. D'altra parte, le possibilità attuali offerte dallo studio dei neurotrasmettitori, la continua identificazione di possibili neurotrasmettitori e comunque di sostanze ad essi correlati, ha ampliato consistentemente le problematiche della neurochimica e della neurofarmacologia. Nel campo delle ricerche interdisciplinari, lo studio odologico con il tracciante retrogrado HRP può essere combinato con tecniche istochimiche in luce diretta, quale quella per l'AChE, mentre lo studio odologico con traccianti retrogradi fluorescenti può essere combinato con l'istofluorescenza e con l'immunoistofluorescenza. Al momento attuale, l'aspetto più interessante di questo settore di ricerca è rappresentato dalle possibilità di sviluppo futuro, di tracciare, cioè, una nuova « mappa » delle connessioni neuronali in relazione ai neurotrasmettitori. La conoscenza dei mediatori implicati in un circuito neuronale rappresenta, inoltre, una tappa importante per chiarire il funzionamento del circuito stesso in condizioni normali e patologiche.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS J. C., *Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker*, « Neuroscience », 2, 141-146 (1977).
- ALBANESE A. - BUTCHER L. L., *Locus ceruleus somata contain both acetylcholinesterase and norepinephrine: direct histochemical demonstration on the same tissue section*, « Neurosci. Lett. », 14, 101-104 (1979).
- AVRAMEAS S., *Immunoenzyme techniques: enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies*, « Int. Rev. Cytol. », 27, 349-385 (1970).
- BENTIVOGLIO M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E. - KUYPERS H. G. J. M., *New combination of fluorescent retrograde tracers for demonstrating the existence of divergent axon collaterals*, « Neurosci. Lett. », suppl. 3, 131 (1979a).
- BENTIVOGLIO M. - KUYPERS H. G. J. M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E. - DANN O., *Fluorescent retrograde labeling in rat by means of substances binding specifically to adenine-thymine rich DNA*, « Neurosci. Lett. », 12, 235-240 (1979b).
- BERENBAUM M. C., *The autoradiographic localization of intracellular antibodies*, « Immunology », 2, 71-83 (1959).
- BERGER B. - NGUYEN-LEGROS J. - THIERRY A. M., *Demonstration of horseradish peroxidase and fluorescent catecholamines in the same neuron*, « Neurosci. Lett. », 9, 297-302 (1978).

- BJÖRKLUND A. - SKAGERBERG G., *Simultaneous use of retrograde fluorescence histochemistry for convenient and precise mapping of monoaminergic projections and collateral arrangements in the CNS*, « J. Neurosci. Methods », 1, 261-277 (1979a).
- BJÖRKLUND A. - SKAGERBERG G., *Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing*, « Brain Res. », 177, 170-175 (1979b).
- BLESSING W. W. - FURNESS J. B. - COSTA M. - CHALMERS J. P., *Localization of catecholamine fluorescence and retrogradely transported horseradish peroxidase within the same nerve cell*, « Neurosci. Lett. », 9, 311-315 (1978).
- BUTCHER L. L., *Nature and mechanisms of cholinergic-monoaminergic interactions in the brain*, « Life Sci. », 21, 1207-1226 (1977).
- BUTCHER L. L. - BILEZIKJIAN L., *Acetylcholinesterase-containing neurons in the neostriatum and substantia nigra revealed after punctate intracerebral injection of d-isopropylfluorophosphate*, « Europ. J. Pharmacol. », 34, 115-125 (1975).
- COONS A. H., *Histochemistry with labelled antibody*, « Int. Rev. Cytol. », 5, 1-23 (1956).
- COONS A. H. - CREECH H. J. - JONES R. N. - BERLINER R., *The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody*, « J. Immunol. », 45, 159-170 (1942).
- DAHLSTRÖM A. - FUXE K., *Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I, Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons*, « Acta Physiol. Scand. », suppl. 232, 1-55 (1964).
- DE OLMOS J. S., *An improved HRP method for the study of central nervous system connections*, « Experiment. Brain Res. », 29, 541-551 (1977).
- DE OLMOS J. S. - HARDY H. - HEIMER L., *The efferent connections of the main and accessory bulb formations in the rat: an experimental HRP study*, « J. Comp. Neurol. », 181, 213-244 (1978).
- DE OLMOS J. S. - HEIMER L., *Mapping of collateral projections with the HRP method*, « Neurosci. Lett. », 6, 107-114 (1977).
- ERÄNKÖ O., *The histochemical demonstration of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice*, « J. Histochem. Cytochem. », 4, 11-19 (1955).
- FALK B. - HILLARP N. A. - THIEME G. - THORPE A., *Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde*, « J. Histochem. Cytochem. », 10, 348-354 (1962).
- GEFFEN L., *Biochemical and histochemical methods of tracing transmitter-specific neuronal molecules*, in COWAN W. M. - CUÉNOD M. (eds.), *The use of axonal transport for studies of neuronal connectivity*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1975, pp. 307-335.
- GRAHAM R. C. - KARNOVSKY M. J., *The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney in ultrastructural cytochemistry by a new technique*, « J. Histochem. Cytochem. », 14, 291-302 (1966).
- HANKER J. S. - YATES P. E. - METZ C. B. - RUSTIONI A., *A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase*, « Histochem. J. », 9, 789-792 (1977).
- HARDY H. - HEIMER L. - SWITZER R. - WATKINS D., *Simultaneous demonstration of horseradish peroxidase and acetylcholinesterase*, « Neurosci. Lett. », 3, 1-5 (1976).
- HÖKFELT T. - LJUNGDAHL A., *Modification of the Falk-Hillarp formaldehyde fluorescence method using the Vibratome: simple, rapid and sensitive localization of catecholamines in sections of unfixed or formaline fixed brain tissue*, « Histochemie », 29, 325-339 (1972).
- HÖKFELT T. - LJUNGDAHL A., *Uptake mechanisms as a basis for the histochemical identification and tracing of transmitter-specific neuron populations*, in COWAN W. M. - CUÉNOD M. (eds.), cit., pp. 249-305.
- HÖKFELT T. - PHILIPSON O. - KUYPERS H. G. J. M. - BENTIVOGLIO M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E. - DANN O., *Tracing of transmitter histochemically identified neuron projections: immunohistochemistry combined with fluorescent retrograde labeling*, « Neurosci. Lett. », suppl. 3, 342 (1979a).

- HÖKFELT T. - TERENIUS L. - KUYPERS H. G. J. M. - DANN O., *Evidence for enkephalin immunoreactive neurons in the medulla oblongata projecting to the spinal cord*, *Neurosci. Lett.* *, 14, 55-60 (1979b).
- KAN K. S. K. - CHAO L. P. - ENG L. F., *Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit spinal cord and cerebellum*, *Brain Res.* *, 146, 221-229 (1978).
- KARNOVSKY M. J. - ROOTS L., *A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase*, *J. Histochem. Cytochem.* *, 12, 219-221 (1964).
- KOELLE G. B. - FRIEDENWALD J. S., *A histochemical method for localizing cholinesterase activity*, *Proc. Soc. Exptl. Biol.* *, 70, 617-622 (1949).
- KRISTENSSON K. - OLSSON Y., *Retrograde axonal transport of protein*, *Brain Res.* *, 29, 363-365 (1971).
- KUYPERS H. G. J. M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E. - PADT R. E., *Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain*, *Neurosci. Lett.* *, 6, 127-133 (1977).
- KUYPERS H. G. J. M. - VAN DER KOOY D. - BENTIVOGLIO M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E., *Retrograde transport of bisbenzimidazole and propidium iodide through axons to their parent cell bodies*, *Neurosci. Lett.* *, 12, 1-7 (1979).
- LA VAIL J. M. - LA VAIL M. M., *Retrograde axonal transport in the central nervous system*, *Science* *, 176, 1416-1417 (1972).
- MESULAM M. M., *A horseradish peroxidase method for the identification of the efferents of acetylcholinesterase containing neurons*, *J. Histochem. Cytochem.* *, 24, 1281-1284 (1976).
- MESULAM M. M., *Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry, a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents*, *J. Histochem. Cytochem.* *, 26, 106-117 (1978).
- MESULAM M. M. - ROSENE D. L., *Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: a comparative and quantitative study of nine methods*, *J. Histochem. Cytochem.* *, 27, 763-773 (1979).
- MESULAM M. M. - VAN HOESSEN G. W., *Acetylcholinesterase-rich projections from the basal forebrain of the rhesus monkey to neocortex*, *Brain Res.* *, 109, 152-157 (1976).
- MOLINARI M. - BENTIVOGLIO M. - MINCIACCHI D. - MACCHI G., *Le metodiche di trasporto assonale nello studio sperimentale delle connessioni del sistema nervoso*, *Arch. Psicol. Neurol. Psichiat.* *, 1980, (in corso di stampa).
- PICKEL V. M. - JOH T. H. - REIS D. J., *Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in brain by light and electron microscopy*, *Brain Res.* *, 85, 295-300 (1975).
- SINGER S. J., *Preparation of an electron dense antibody conjugate*, *Nature* *, 183, 1523-1524 (1959).
- SMOLEN A. J. - GLAZE E. J. - ROSS L. L., *Horseradish peroxidase histochemistry combined with glyoxylic acid-induced fluorescence used to identify brain stem catecholaminergic neurons which project to the chick thoracic spinal cord*, *Brain Res.* *, 160, 353-357 (1979).
- STEINBERGER L. A., *Enzyme immunocytochemistry*, in MAYATT M. A. (ed.), *Electron microscopy of enzymes: principle and methods*, vol. I, Van Nostrand Reinhold, New York 1973, pp. 150-191.
- STREIT P. - KNECHT E. - CUÉNOD E., *Transmitter-specific retrograde labeling in the striato-nigral and raphe-nigral pathways*, *Science* *, 205, 306-308 (1979).
- UNGERSTEDT U., *Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain*, *Acta Physiol. Scand.* *, suppl. 367, 95-122 (1971).
- VAN DER KOOY D. - KUYPERS H. G. J. M. - CATSMAN-BERREVOETS C. E., *Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple, fluorescent retrograde double labeling technique in the rat*, *Brain Res.* *, 158, 189-196 (1978).

RIASSUNTO

La presente ricerca si è proposta di valutare i problemi metodologici legati ad uno studio combinato, anatomico e farmacologico, delle cellule nervose volto a chiarire sia la identità chimica delle stesse che le loro connessioni anatomiche. I recenti sviluppi delle metodiche di trasporto assonale retrogrado e la realizzazione di nuove tecniche istochimiche per lo studio dei neurotrasmettitori aprono oggi nuove prospettive in questo campo.

Il presente articolo discute, valutandole singolarmente, sia le metodiche anatomiche che quelle farmacologiche per analizzare poi la possibilità di uno studio combinato, alla luce dei risultati sperimentali presenti in letteratura.

RÉSUMÉ

La présente recherche s'est proposé d'évaluer les problèmes méthodologiques se rattachant à une étude combinée (anatomique et pharmacologique) des cellules nerveuses, en vue de préciser l'identité chimique de ces cellules et leurs connexions anatomiques. L'évolution récente des méthodes de transport axonal rétrograde et la réalisation de plusieurs techniques histochimiques nouvelles pour l'étude des neurotransmetteurs ouvrent aujourd'hui des perspectives nouvelles dans ce domaine.

L'article décrit en les évaluant séparément, les méthodes anatomiques et pharmacologiques; il analyse ensuite la possibilité d'une étude combinée, compte tenu des résultats expérimentaux présents dans la littérature.

SUMMARY

The methodological problems connected with an anatomo-pharmacological study of nervous cells are examined here, in order to precise the chemical nature of these cells and their anatomical connections. The recent progress of retrograde axonal transport methods and the new histochemical techniques for the study of neurotransmitters allow to foresee many opportunities in this field.

Consideration is given to anatomical and pharmacological methods, examined separately from one another; a possible combined study of them is also analysed, taking into account the experimental results mentioned in literature.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Untersuchung war die Bewertung der methodologischen Probleme, die mit einer kombinierten, anatomischen und pharmakologischen Studie der Nervenzellen zusammenhängen, um sowohl deren chemische Identität als auch die anatomischen Beziehungen zu klären. Durch die neuesten Entwicklungen der Methodiken von retrogradem Axonaltransport sowie die Realisierung von neuen chemisch-histologischen Techniken für die Studie von Neurosendern werden heutzutage neue Perspektiven auf diesem Gebiet erschlossen.

In diesem Beitrag werden sowohl die anatomischen als auch die pharmakologischen Methodiken diskutiert und einzeln bewertet; ferner wird die Möglichkeit einer kombinierten Studie im Lichte der in der Literatur vorliegenden Versuchangaben analysiert.