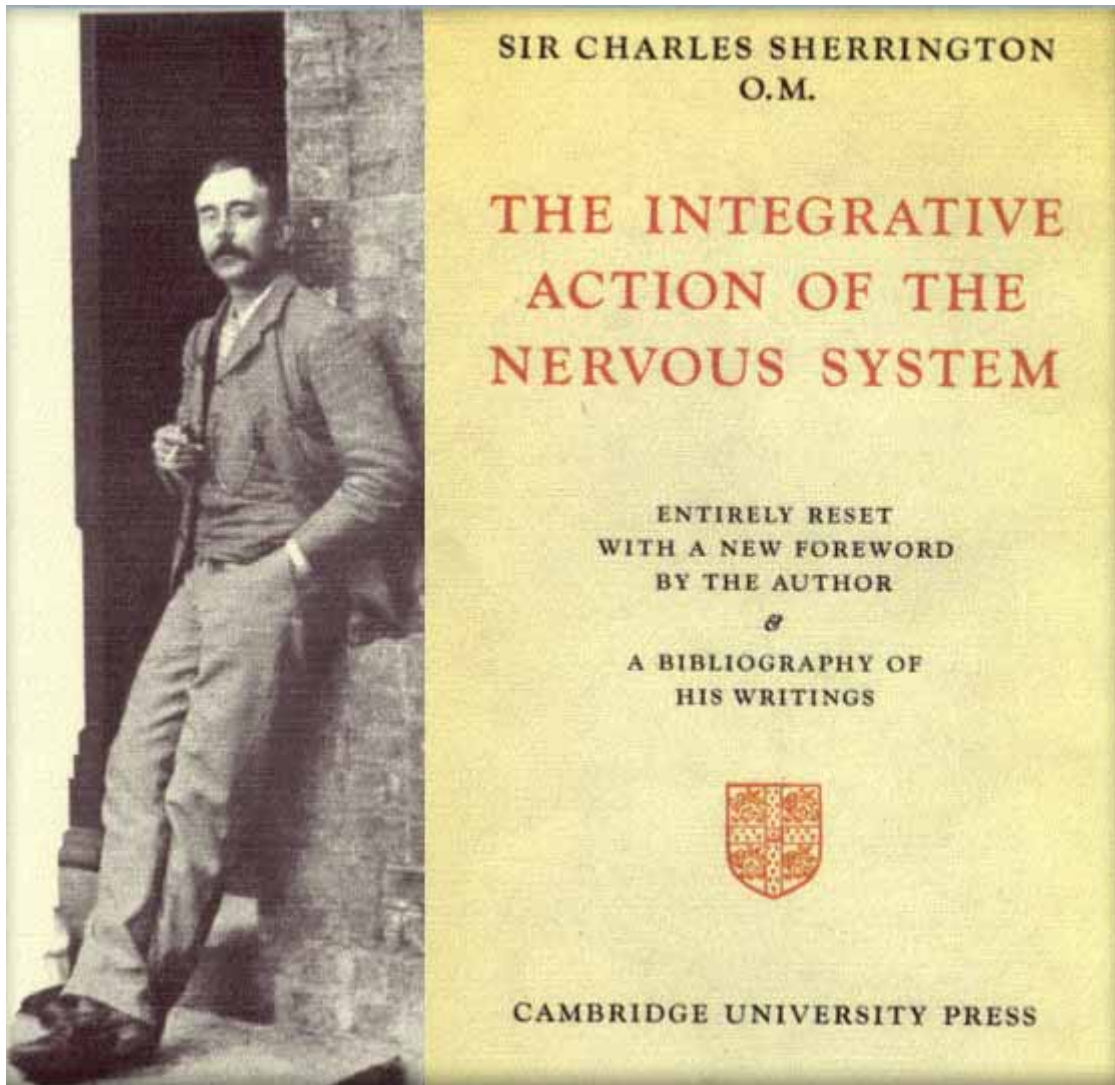
L’evoluzione delle conoscenze sulla neurotrasmissione

Premessa

- La storia della neurotrasmissione è il risultato di un insieme di accostamenti teorici, la risposta a una serie di questioni emergenti nella comprensione della trasmissione dell'impulso nervoso rispetto all'emergere di evidenze microanatomiche e neurofisiologiche.
- Fondamentali in questa storia il contributo dello sviluppo di nuove frontiere di indagine come la farmacologia, la biochimica e l'evoluzione degli strumenti di indagine.
- E' evidente il ruolo euristico di concetti importati da altri settori delle scienze biomediche, come l'idea di recettore.

Sherrington, i riflessi motori e la sinapsi

- I riflessi motori del midollo spinale potevano essere spiegati con la presenza di un substrato anatomico di catene discontinue di neuroni.



Sherrington, i riflessi motori e la sinapsi

- Riteneva che la sinapsi fosse la sede di stati di eccitazione modulabili e latenti sino al raggiungimento di un certo grado di attivazione superato il quale questa partecipava all'emissione di un impulso elettrico.
- Per spiegare il movimento reciproco dei muscoli antagonisti egli introduce il termine "innervazione reciproca" e a livello sinaptico associa agli ipotetici stati di eccitazione i loro contrari stati di inibizione.

Sherrington, i riflessi motori e la sinapsi

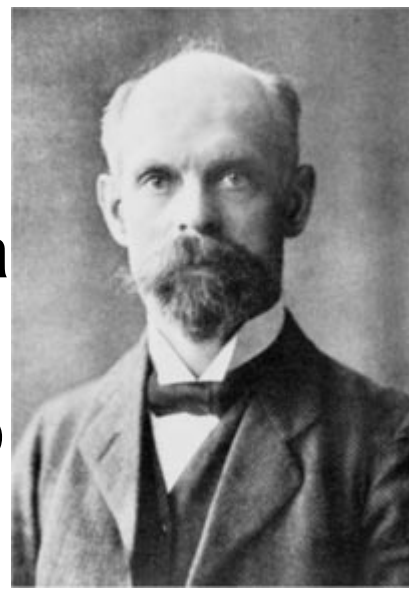
- Secondo Sherrington, i circuiti nervosi coinvolti nei riflessi motori funzionavano in base al risultato della somma algebrica degli stati di eccitazione e di inibizione delle sinapsi dei circuiti interessati.
- Dato che Sherrington vedeva tutto il comportamento come la risultante dell'integrazione nervosa dell'organismo mediata a partire dai riflessi, allora la sinapsi acquista un'importanza centrale e con essa la spiegazione della neurotrasmissione a livello sinaptico.

Il ruolo della biochimica

- L'idea che l'impulso nervoso costituisse la semplice propagazione di una corrente induttiva, permetteva, come fatto da Cajal, di spiegare la propagazione da neurone a neurone in termini di induzione elettrica.
- In assenza di spiegazioni e dati biochimici, l'origine dell'elettricità animale continuava a restare misteriosa.

Il ruolo della biochimica

- In Germania, nel 1895, F.S. Locke accerta che gli ioni calcio sono necessari alla trasmissione neuromuscolare.
- Nel 1902, Ernest Overton dimostra che oltre al calcio, anche il sodio extracellulare è alla base dell'eccitabilità delle fibre nervose e ipotizza che lo scambio tra sodio e potassio è coinvolto nella conduzione del segnale.



Il ruolo della biochimica

- Nel 1902, Julius Bernstein propone una teoria basata sulla permeabilità selettiva agli ioni potassio della membrana nervosa, che diffondono dall'interno all'esterno e generano così il potenziale di riposo.

Il ruolo della biochimica

- Il concetto chimico dell'attività nervosa venne avanzato nel 1906 da William Howell, noto per i suoi studi sulla fisiologia della circolazione. Howell nota la somiglianza tra gli effetti della deplezione di potassio e della stimolazione del nervo vago nel rallentare il battito cardiaco e ipotizza che fibre nervose terminino in una sostanza inibitrice. Questa sotto l'influenza dell'impulso nervoso si dissocia e libera potassio da cui il fenomeno di inibizione.

L’impatto della prima farmacologia

- Da considerare il ruolo dei primi studi farmacologici, iniziati in Francia con le indagini di Magendie e di Bernard sugli effetti degli alcaloidi sui processi fisiologici in animali sottoposti a vivisezione.
- Anche lo sviluppo dell’industria chimica farmacologica della seconda metà dell’800 è premessa tecnica ma anche concettuale all’emergere dell’idea di una mediazione chimica dell’impulso nervoso.
- Fondamentali a questo proposito i metodi messi a punto da Bernard la sua idea di utilizzare le sostanze farmacologiche come strumenti di indagine fisiologica e i suoi studi sugli effetti del curaro sulla contrazione muscolare, i primi a mostrare esemplarmente gli effetti di un agente farmacologico su un processo in cui era coinvolta la trasmissione nervosa.

Avvento e ruolo dell’endrocrinologia

- Ai primi del ‘900, la definizione dell'endocrinologia doveva fare i conti con un potente ostacolo concettuale: l'idea che le regolazioni funzionali e la trasmissione di messaggi tra organi che essa implica si realizzassero esclusivamente per via nervosa. Per ironia, nondimeno, la scoperta che rivoluzionava la teoria delle secrezioni interne, mutandola nel moderno sistema concettuale dell'endocrinologia, si deve ancora a ricerche sulle funzione regolatrici del sistema nervoso. Che a loro volta, quando imposero il concetto di ormone come messaggero, costituirono un passaggio importante nella costruzione della teoria della mediazione chimica dell’impulso nervoso.

Avvento e ruolo dell'endrocrinologia

- Il concetto di ormone come messaggero, cioè vettore chimico di una informazione e capace di indurre un processo biologico è servito a far accettare l'idea di una mediazione chimica del segnale.
- Non è un caso che i neurotrasmettitori siano a lungo stati definiti ormoni locali.

Avvento e ruolo dell’endrocrinologia

William Bayliss (1860-1924) e Ernest Starling (1866-1927), lavorando nel 1901 all'identificazione delle vie nervose implicate nel rilascio del succo pancreatico, si rendevano conto che in tale processo era in gioco uno stimolo chimico piuttosto che un riflesso nervoso. Estirpando le fibre nervose i due dimostravano nel 1902 che la secrezione pancreatica può essere indotta da una somministrazione di estratto di mucosa duodenale, sostanza attiva che denominarono "secretina". Era la prima chiara dimostrazione dell'esistenza di effettori chimici endogeni in grado di innescare e regolare risposte fisiologiche organizzate.

Avvento e ruolo dell’endrocrinologia

La scoperta e l’interpretazione che ad essa davano Bayliss e Starling ponevano i presupposti della moderna endocrinologia. Mentre il termine e il concetto di ormone che Starling introduceva nel 1905 rappresentavano la codificazione di un programma di ricerca sperimentale finalmente indipendente dalla clinica, dalla sua metodologia empirica. La caratterizzazione di Starling dell'ormone (dal greco *òrmao*, io eccito) come messaggero ed effettore chimico «trasportato dagli organi dove esso viene prodotto agli organi su cui agisce per mezzo del sangue», inoltre, delineava la problematica fondamentale della comunicazione e dell'integrazione cellulare su cui opera la ricerca endocrinologica contemporanea ma permetteva anche di ipotizzare la possibilità che i neuroni comunicassero attraverso le sinapsi proprio per mezzo di ormoni locali.

Avvento e ruolo dell’endrocrinologia

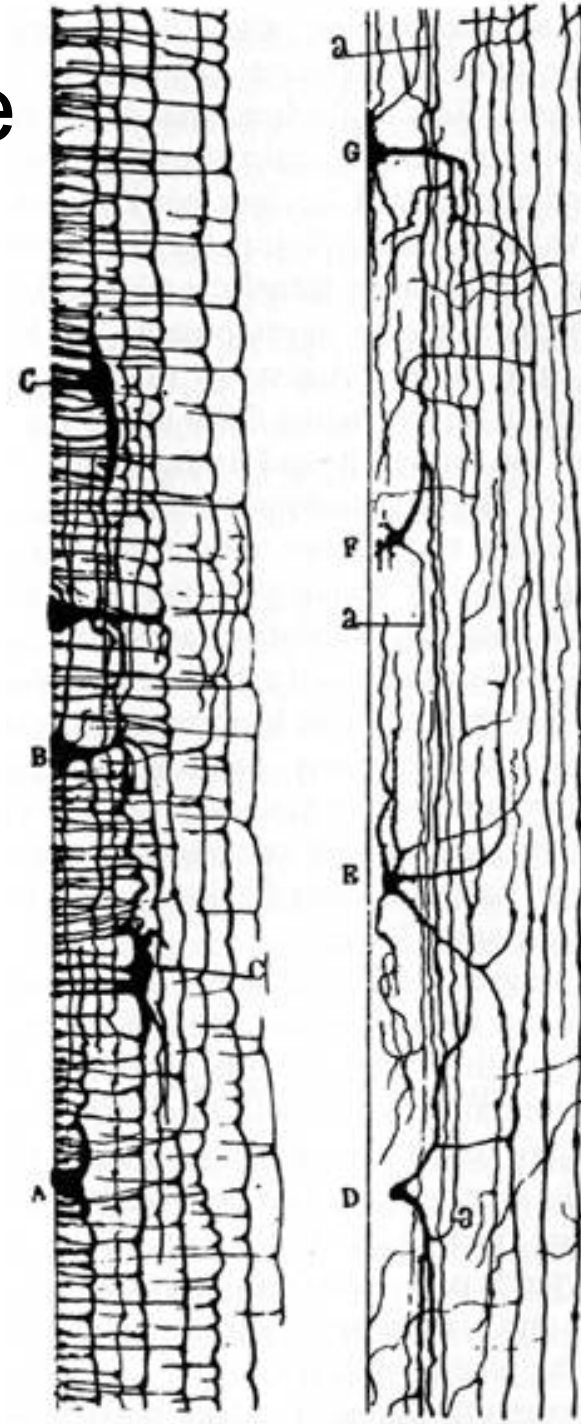
La prima ipotesi sulla mediazione chimica nell'impulso nervoso è legata alle ricerche sui meccanismi endocrini delle regolazioni cardiovascolari, in particolare alla scoperta dell'azione dell'estratto di ghiandola surrenale sul sistema cardiovascolare fatta da George Oliver (1841-1915) e Edward Sharpey-Schafer (1850-1935), nel 1894.

Avvento e ruolo dell'endrocrinologia

Inoltre furono proprio gli studi sulla farmacologia dell'adrenalina, primo ormone ad essere isolato, cristallizato e sintetizzato (rispettivamente: Takamine, 1901, Aldrich, Stolz, 1903) a permettere John Newport Langley di accertare negli stessi anni la larga sovrapponibilità degli effetti dell'adrenalina a quelli del sistema nervoso simpatico e a profilare così l'epopea della prima neurofarmacologia.

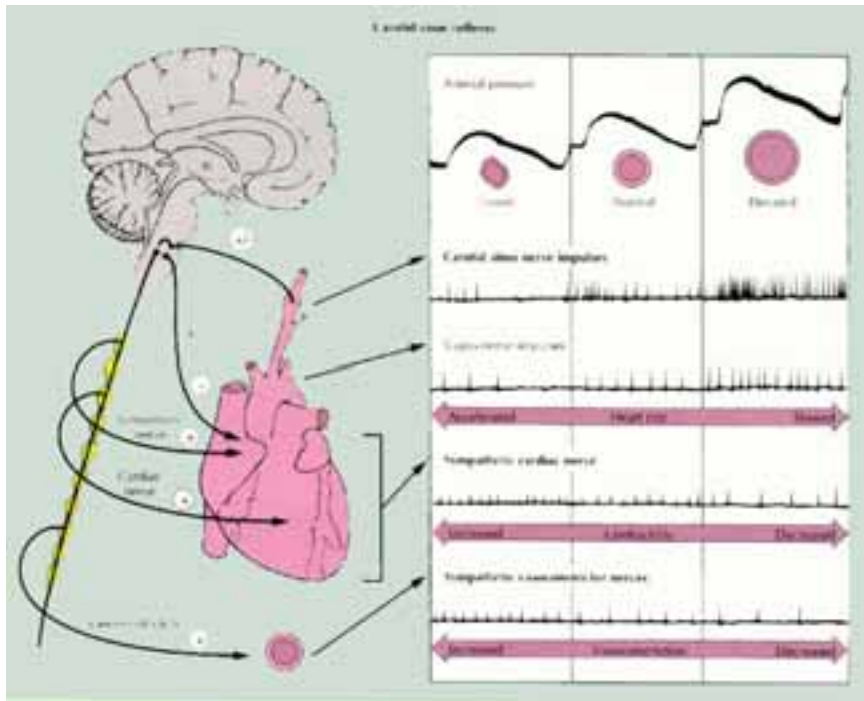
Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell'impulso nervoso

Nel tentativo di interpretare i meccanismi fisiologici dei fenomeni osservati da Oliver Sharpey-Schafer e Langley, il fisiologo inglese Thomas Renton Elliot (1877-1961), ipotizzava nel 1904 che i nervi del sistema nervoso simpatico potessero agire liberando adrenalina.



Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell'impulso nervoso

Walter Dixon (1871-1931) fu invece il primo ricercatore a tentare la ricerca sulla farmacologia del sistema nervoso parasimpatico, con un originale esperimento sull'innervazione vagale del cuore realizzato nel 1906.



Era noto all'epoca che la stimolazione del nervo vago produceva una inibizione del ritmo cardiaco. Dixon raccolse il perfusato di un cuore di cane dopo aver stimolato il nervo vago per 30 minuti, Applicando successivamente il perfusato su un cuore di rana isolato, Dixon rilevava il rallentamento del battito e riportava l'effetto antagonizzante della muscarina. Dixon concludeva che i due fenomeni erano imputabili ad uno stesso meccanismo farmacologico, ma erroneamente attribuiva al cuore stesso l'origine di questa sostanza attiva sulle terminazioni nervose.[1] Le evidenze necessarie non erano così state sufficienti alla scoperta della mediazione chimica della trasmissione vagale, troppo isolato il riscontro e ancora remota l'ipotesi di una dimensione famacologica del segnale nervoso.

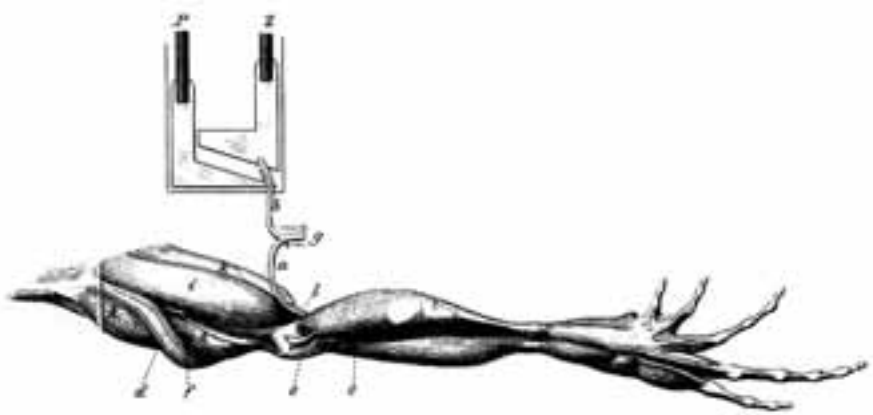
[1] W.E. Dixon, «On the mode of action of drug», *Med. Mag*., 1907, 16, pp. 454-57.

Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell'impulso nervoso

Nei primi anni del '900, John Newport Langley (1852-1925), fisiologo di Cambridge e direttore del *Journal of Physiology*, elaborava un complesso modello teorico di trasmissione nervosa chimicamente mediata.

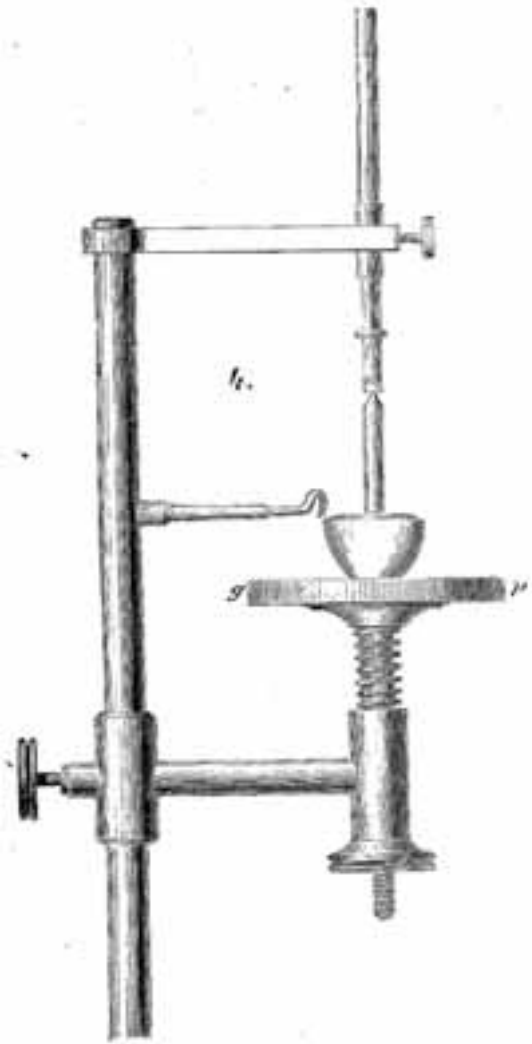
Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell'impulso nervoso

Nei suoi studi sull'antagonismo fra nicotina e curaro nelle terminazioni nervose del muscolo di rana, Langley aveva potuto osservare che l'effetto stimolante della nicotina persisteva anche dopo la denervazione. Questo fatto costituiva una notevole anomalia per la teoria elettrica della trasmissione nervosa e dell'eccitazione muscolare.



Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell’impulso nervoso

Langley interpretava il fenomeno ipotizzando che la mediazione chimica dell'impulso nervoso si realizzerebbe attraverso l'azione di una "sostanza recettiva" che reagisce ai farmaci secondo le leggi della chimica.



Prime ipotesi sulla mediazione chimica dell'impulso nervoso

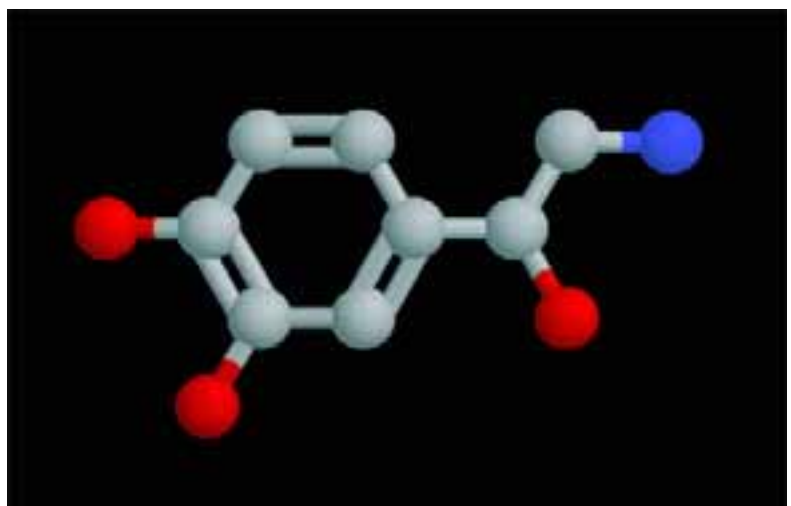
Il concetto elaborato da Langley fu fondamentale per la definizione della nozione di recettore sviluppata successivamente dall'immunologo tedesco Paul Ehrlich (1854-1915) e posta a base della sua spiegazione della specificità immunologica.

Verso la scoperta della mediazione chimica dell'impulso nervoso

Henry Hallet Dale (1875-1968), allievo di Langley, cominciava in quegli anni ad affrontare il problema della trasmissione neurochimica. Lavorando come ricercatore presso i laboratori dell'industria farmaceutica Burroughs-Wellcome, Dale scopriva nel 1906 che la segale cornuta antagonizzava l'azione dell'adrenalina e l'attivazione simpatica.

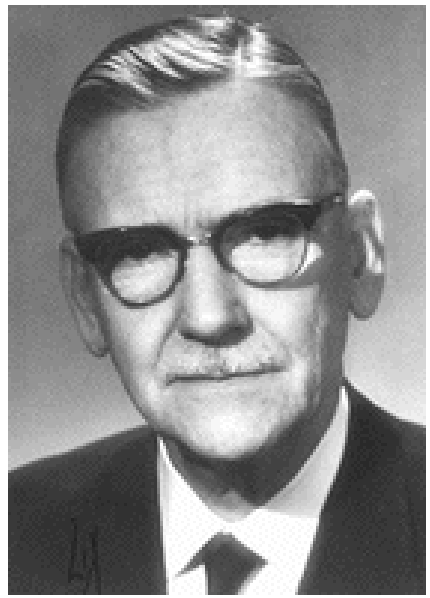
Verso la scoperta della mediazione chimica dell’impulso nervoso

Nel 1910, Dale studiava, con George Barger, l'azione della noradrenalina, rilevando che essa ha un'attività eccitatrice superiore sulle fibre del sistema nervoso simpatico a quella dell'adrenalina. Tali evidenze, nel contesto della nascente idea della trasmissione chimica, suggerivano che, piuttosto dell'adrenalina, il mediatore nervoso fosse la noradrenalina.



Verso la scoperta della mediazione chimica dell'impulso nervoso

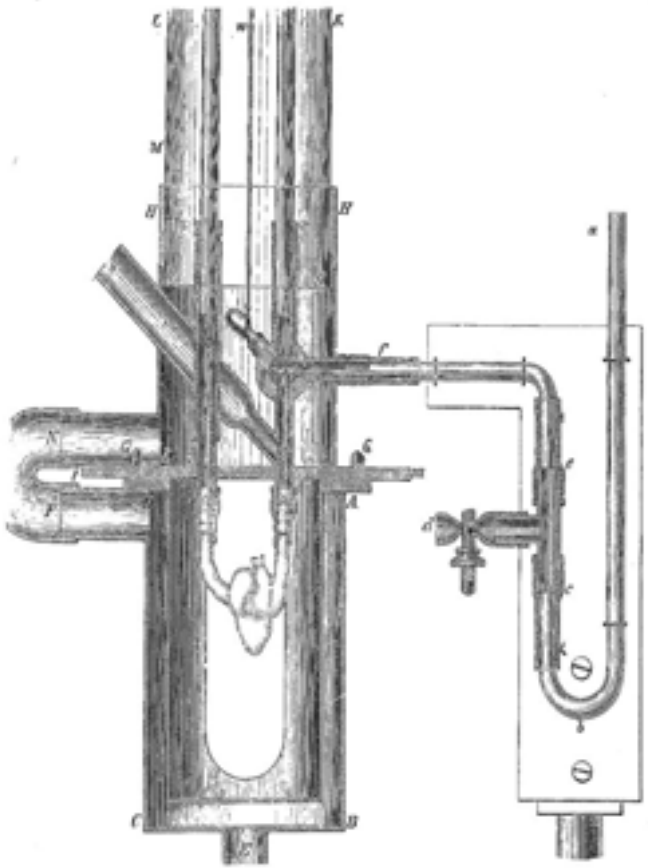
Nel loro resoconto, Berger e Dale discutono, in effetti, una simile possibilità, ma tale ammina, sintetizzata nel 1904, all'epoca era poco più di una curiosità chimica, non essendo mai stata rilevata la sua presenza all'interno del corpo. Soltanto nel 1946, la noradrenalina venne identificata dal farmacologo svedese Ulf Svante von Euler (1905-1983) con il neurotrasmettitore adrenergico.



Euler, Nobel nel 1970

Verso la scoperta della mediazione chimica dell’impulso nervoso

L'acetilcolina era un'altra delle grandi curiosità chimiche del periodo. Sintetizzata nel 1894, la sua azione era stata indagata da Reid Hunt e René Taveau, che avevano scoperto il suo potente effetto ipotensivo, la sua capacità di rallentare il ritmo cardiaco e avevano ipotizzato la sua natura endogena.

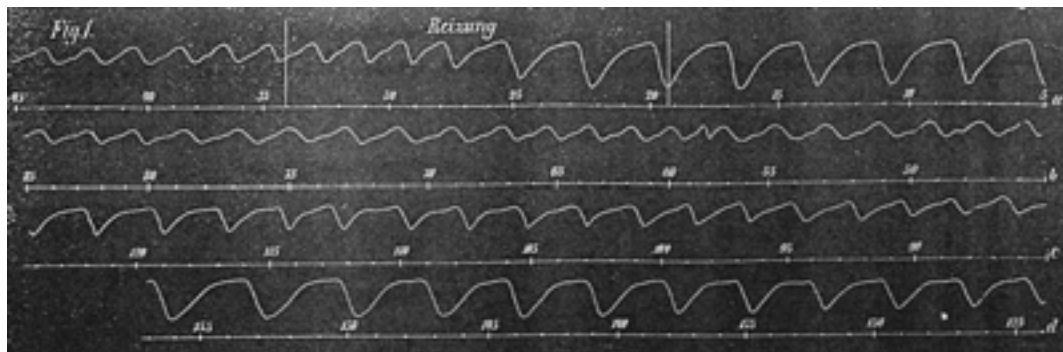


Verso la scoperta della mediazione chimica dell'impulso nervoso

Anche Dale era interessato all'indagine dell'attività farmacologica dell'acetilcolina, da lui ritrovata in estratti di segale cornuta. Nel 1914, Dale descriveva in un resoconto come l'acetilcolina riproducesse in maniera impressionante gli stessi effetti della stimolazione parasimpatica. Abolendo tali reazioni muscariniche con somministrazione di atropina, inoltre, Dale dimostrava l'azione nicotinomimetica dell'acetilcolina sulle cellule gangliari e della midollare surrenale. Dale aveva, quindi, rilevato esattamente la duplicità dell'azione dell'acetilcolina sul sistema nervoso autonomo.

Verso la scoperta della mediazione chimica dell'impulso nervoso

Come per la noradrenalina, mancava tuttavia la prova che l'acetilcolina fosse un prodotto endogeno, pertanto Dale si limitò soltanto ad ammettere l'importanza di tale sostanza per la comprensione del funzionamento del sistema nervoso autonomo, senza speculare su una possibile mediazione chimica. Come raccontava egli stesso, peraltro, «il clima generale delle opinioni dei fisiologi rimaneva ancora scettico ed esistante [...] l'idea della trasmissione nervosa mediata chimicamente era come una signora che i neurofisiologi frequentavano in privato ma con cui erano riluttanti a farsi vedere in pubblico».



La dimostrazione della mediazione chimica dell'impulso nervoso

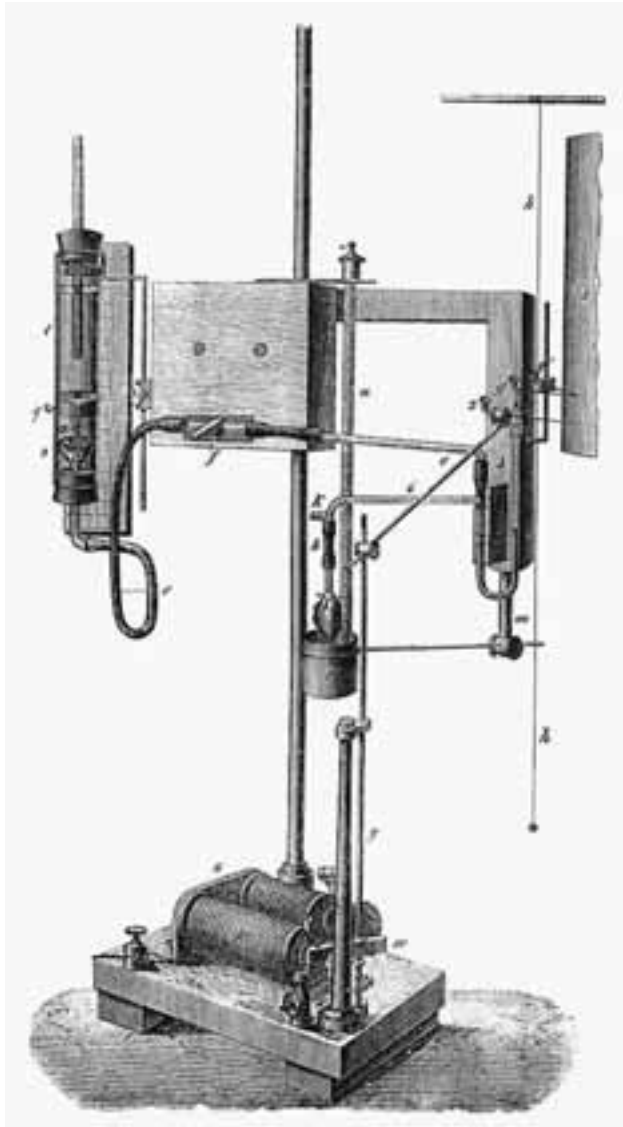
Le evidenze necessarie a dimostrare la fondatezza dell'ipotesi della mediazione chimica della neurotrasmissione furono fornite nel dopoguerra da Otto Loewi (1873-1961), professore di farmacologia a all'università di Graz, in Austria. Loewi mise a punto un protocollo sperimentale che ricalcava quello usato da Dixon. Stimolando le fibre vagali del cuore di una rana, Loewi isolava una sostanza che, applicata ad un secondo cuore di rana, sembrava riprodurre l'inibizione vagale e perciò fu chiamata *Vagusstoff (sostanza vagale).*

La dimostrazione della mediazione chimica dell’impulso nervoso

Con la somministrazione di atropina, poi, Loewi dimostrò che si impediscono gli effetti della stimolazione vagale sul cuore donatore ma non la liberazione della sostanza vagale. Trasferendo il perfusato ottenuto con la stimolazione vagale del cuore atropinizzato su un secondo cuore, infatti, egli riusciva ad indurre comunque l'inibizione. L'interpretazione di questi dati fatta da Loewi era corretta: la trasmissione nervosa è un fenomeno neuroumorale mediato a livello delle terminazioni nervose da sostanze con azione farmacologica potente e specifica.

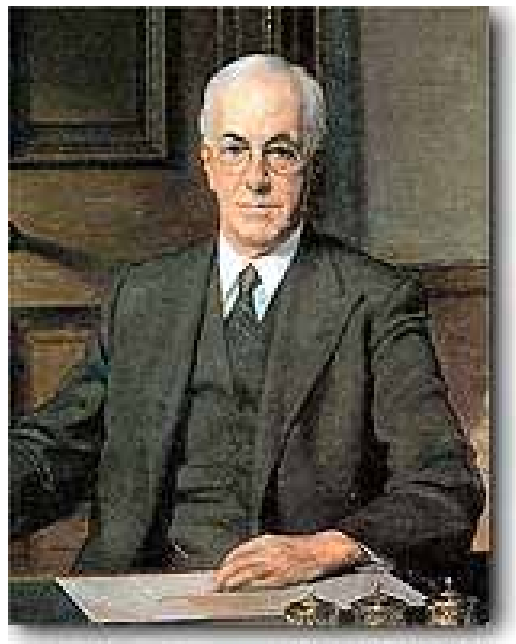
La dimostrazione della mediazione chimica dell’impulso nervoso

Loewi, peraltro, aveva dimostrato che la sostanza vagale viene inattivata per incubazione con muscolo cardiaco triturato. Tale inattivazione è prevenuta dall'eserina, un alcaloide che potenzia la stimolazione vagale. Erano evidenze decisive per la successiva scoperta della colinesterasi, l'enzima che inattiva l'acetilcolina negli spazi intersinaptici.



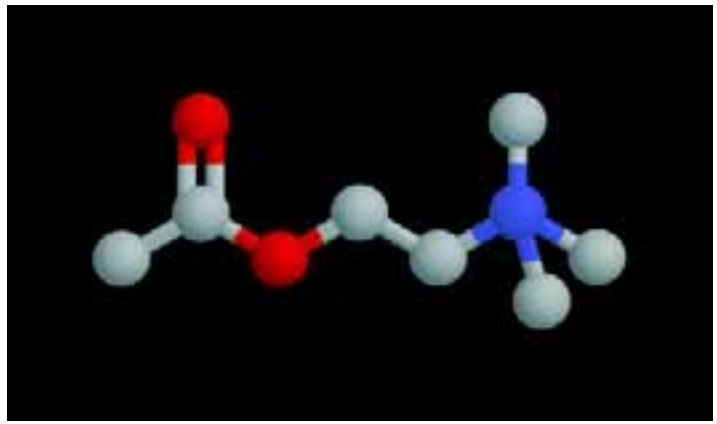
La dimostrazione della mediazione chimica dell’impulso nervoso

Nel 1929, Henry Dale ed Harold Dudley rilevavano la presenza di istamina e acetilcolina nella milza del bue e del cavallo, dimostrando finalmente che l’acetilcolina non era soltanto un prodotto di sintesi ma anche una sostanza organica. In tal modo, veniva a cadere, definitivamente, l'obiezione più forte all'idea che l'acetilcolina fosse un mediatore chimico degli impulsi nervosi.

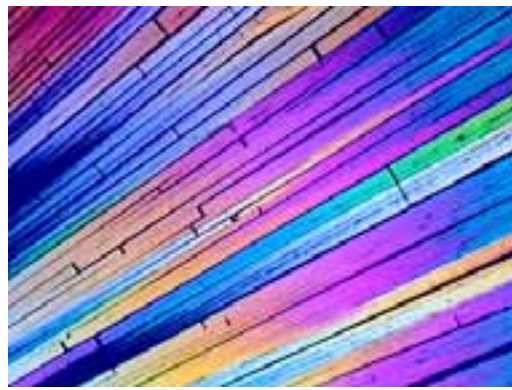


La dimostrazione della mediazione chimica dell’impulso nervoso

Una serie di studi condotti da Dale sui muscoli denervati, ad esempio, dimostravano che l'iniezione o l'applicazione di acetilcolina riproducono esattamente la stimolazione naturale operata per via nervosa. Altri studi evidenziavano l'azione vasodilatatrice dell'acetilcolina su vasi denervati. In base a questi nuovi riscontri, Dale propose che l'acetilcolina potesse costituire il mediatore chimico del sistema parasimpatico e che tutti i fenomeni di trasmissione del segnale nervoso avvenissero attraverso mediazione chimica.



La dimostrazione della mediazione chimica dell’impulso nervoso



L'ipotesi di Dale tuttavia stentava ad imporsi nella comunità scientifica. Per accettare definitivamente la "rivoluzione" nella teoria della trasmissione nervosa, i fisiologi chiedevano un'evidenza conclusiva, l'esperimento cruciale della dimostrazione del rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni nervose. Le difficoltà tuttavia rimanevano enormi. La presenza dell'acetilcolina era infatti, difficile da rilevare con gli strumenti dell’epoca, perché nel processo di trasmissione nervosa essa è ovviamente liberata in quantità minuscole e perché tali quantità, in aggiunta, sono rapidamente scisse ed inattivate dalla colinesterasi.

La dimostrazione della mediazione chimica dell'impulso nervoso

Un metodo efficace per determinare la presenza di acetilcolina durante la stimolazione nervosa venne messo a punto nel 1933 da Wilhelm Feldberg (1900-1993), un farmacologo tedesco chiamato da Dale al National Institute for Medical Research di Hampstead. Applicando il suo nuovo metodo, Feldberg, in collaborazione con John Gaddum (1900-1965), dimostrò, nel 1934, il rilascio di acetilcolina a livello delle sinapsi gangliari simpatiche. Il lavoro di Feldberg e Gaddum era inoltre particolarmente significativo in quanto dimostrava per la prima volta che un neurotrasmettitore aveva come bersaglio un altro neurone e non soltanto una fibra della muscolatura liscia o una ghiandola.