Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Pasquale Graziadei

Osservazioni al microscopio elettronico sulla mucosa olfattiva di rana

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **40** (1966), n.5, p. 907–911.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_5_907_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/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1966.

Zoologia (Anatomia). — *Osservazioni al microscopio elettronico sulla mucosa olfattiva di rana* (*). Nota di PASQUALE GRAZIADEI, presentata (**) dal Socio A. PENSA.

SUMMARY. — Frog's olfactory mucosa has been observed with the electron microscope. Ultrastructure of olfactory neurons has been described and several organelles recognized. The rods of the olfactory receptors bear cilia with the characteristic 9 + 2 pattern of filaments. Supporting cell's do not bear cilia but show an irregular series of microvilli. The supporting cell's show in their cytoplasm a complex arrangement of organelles and their role is likely to be more complex than their name implies. Secretory phenomena, for instance, can be observed. Ultrastructural characteristics of these elements have been compared with the ultrastructure of epithelial cells in the respiratory area.

È noto che la mucosa olfattiva dei vertebrati è costituita da un epitelio batiprismatico a più file di nuclei nel quale si riconoscono le cellule olfattive, tipici neuroni bipolari che inviano il loro neurite, attraverso i *fila olfactoria*, al bulbo olfattivo, le cellule di sostegno e le cellule basali. L'epitelio poggia su una membrana basale molto esile e poco discernibile al microscopio ottico. Nella tonaca propria numerose ghiandole, dette ghiandole del Bowman, inviano il loro dotto escretore attraverso all'epitelio olfattivo fino alla superficie dove riversano il loro secreto prevalentemente mucoso (Gerebtzoff e Shkapenko, 1952).

Fu forse lo Scarpa (1789) ad analizzare per primo, con rigore scientifico, la mucosa olfattiva nelle sue '*Anatomicae disquisitiones de auditu et olfacto*' e successivamente lo Schultze (1856) diede una descrizione istologica della mucosa olfattiva che può ritenersi ancor oggi fondamentalmente esatta. Le ricerche più recenti su questo argomento sono compendiate nei lavori di Allison (1953) e Le Gros Clark (1956) per quanto riguarda la microscopia luce, mentre i dati non abbondanti riguardanti l'ultrastruttura sono dovuti a Bloom (1954), Gasser (1956), De Lorenzo (1957), Reese (1965), Graziadei (1965, 1966). Senza voler analizzare in dettaglio i lavori citati, si può rilevare tuttavia che solo la mucosa olfattiva di pochi animali è stata sinora studiata e questi studi sono stati per lo più ristretti a quella porzione distale dei recettori che contiene le cilia, il cosidetto *olfactory rod* degli autori anglosassoni. Sebbene l'interesse degli studiosi verso questa porzione della cellula olfattiva sembri giustificato dall'essere le cilia ritenute l'elemento morfologico essenziale nella recezione dello stimolo delle sostanze odorose (vedi ad esempio Ottoson, 1963), è indubbio che un più completo esame ultrastrutturale può portare utili contributi alla chiarificazione di problemi anche di ordine fisiologico riguardanti l'organo dell'olfatto.

(*) Centro St. Anat. Sist. nerv., Pavia.
(**) Nella seduta del 14 maggio 1966.

Poiché recentemente la rana è stata usata estesamente in ricerche di carattere fisiologico (vedi ad esempio il recente lavoro di Gesteland, Lettvin e Pitts (1965) mi è parso opportuno riprendere lo studio della mucosa olfattiva proprio nella rana.

Materiale preparato con le comuni tecniche istologiche mi ha servito per un preliminare studio della cavità nasale della rana, ma il metodo di impregnazione argentica di Bodian mi ha fornito risultati soddisfacenti per la localizzazione dei neuroni olfattivi e dei fasci di fibre nervose che da questi originano. Altro materiale è stato preparato per osservazioni al microscopio elettronico. Le modalità per la fissazione, colorazione ed osservazione sono state precedentemente già riferite in altra sede (Graziadei, 1965, 1966).

La Tav. I, fig. 1 rappresenta una microfotografia in contrasto di fase di una sezione di materiale fissato in osmio secondo Millonig ed incluso in araldite. Si riconoscono in basso le ghiandole del Bowman, situate nella tonaca propria che penetrano in seno all'epitelio con elementi secernenti per continuare col condotto escretore. Alla base dell'epitelio è visibile con difficoltà un esile straterello di materiale extracellulare rappresentante la membrana basale. Questa formazione che la microscopia luce riesce a dimostrare con difficoltà è invece nettamente visibile nelle microfotografie elettroniche e riconoscibile per i caratteri tipici che le sono propri dopo fissazione in osmio e colorazione con acetato di uranile. In seno all'epitelio, nel suo terzo medio, si riconoscono i nuclei piuttosto chiari ed ovalari, disposti a vario livello, dei neuroni olfattivi. Più in superficie si notano i nuclei delle cellule di sostegno che appaiono più scuri ed allungati a biscotto. I nuclei delle cellule basali si riconoscono per il loro aspetto irregolare e per una loro maggiore densità. Sulla superficie dell'epitelio è visibile uno strato di muco nel quale sono impigliati i microvilli delle cellule di sostegno disposti obliquamente a direzione omogenea, da destra a sinistra nella presente microfotografia. Già a questo ingrandimento inoltre è possibile riconoscere la struttura vacuolare delle cellule di sostegno mentre le cellule olfattive hanno un citoplasma più chiaro ed omogeneo. Due delle cellule olfattive sono indicate nella Tav. I, fig. 1, (*co*) ed il loro polo distale sporge lievemente con una espansione bottoniforme dalla superficie epiteliale.

Le microfotografie elettroniche precisano molti dati già accennati dall'esame in contrasto di fase. Le cellule olfattive sporgono libere col loro processo distale oltre la superficie dell'epitelio (Tav. II, fig. 2) ed in questa porzione presentano un numero variabile di cilia che in genere non supera il numero di dieci per ciascuna cellula. La struttura delle cilia è analoga a quella delle cilia in elementi cellulari di altri epiteli essendo tipicamente provvedute di 9 + 2 filamenti. Alla base di ciascun cilio sta un corpuscolo basale fornito del cosidetto *basal foot* e di radicole. La presenza delle radicole non è però sempre rilevabile. Mentre nei preparati argentici o in materiale osservato in contrasto di fase le cellule olfattive dimostrano una struttura relativamente omogenea, l'esame ultrastrutturale mette in rilievo notevoli differenze nei vari settori di ciascuna di esse. La porzione libera del prolungamento distale (dendrite ?), sporgente sulla superficie dell'epitelio, contiene, oltre ai corpuscoli basali delle cilia, nume-

rosi neurotubuli di 200 Å di diametro. Talvolta qualche mitocondrio è situato in prossimità dei corpuscoli basali. Nella porzione di questo prolungamento che è compresa fra le cellule di sostegno, i tubuli sono anche molto numerosi ed orientati parallelamente all'asse della cellula e si estendono sin presso il pericarion dove scompaiono quasi completamente. In questa porzione del prolungamento distale sono anche presenti numerosi mitocondri, talvolta così numerosi da riempirlo mascherando persino la presenza delle altre strutture. Nel pericarion, che si trova disposto a varia altezza nell'epitelio determinando quindi con la sua posizione la lunghezza maggiore o minore del processo periferico, la struttura subisce profondi mutamenti. I mitocondri, pur presenti, sono in numero piuttosto scarso ed i tubuli possono mancare del tutto. Compaiono invece i profili sacciformi del reticolo endoplasmatico mentre i granuli di RNA si addensano in rosette libere nel citoplasma o si dispongono lungo le membrane che delimitano il reticolo endoplasmatico. L'apparato di Golgi, con le consuete strutture di sacchi appiattiti e vescicole, è disposto in prossimità del nucleo e più spesso al suo polo distale. Il polo prossimale del neurone dimostra pochi mutamenti di struttura se si eccettua il diradarsi delle maglie del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri. Il neurite prende origine dalla porzione basale del pericarion e rapidamente si assottiglia per raggiungere un diametro di 0,5–0,1 micron. La struttura del neurite è pressoché costante ed è costituita da una serie di neurotubuli orientati secondo il maggior asse del neurite e da scarsi mitocondri.

Le cellule di sostegno sono sprovviste di cilia e la loro superficie libera è invece provveduta di una serie irregolare di microvilli. Il loro citoplasma è infarcito di granuli di circa un micron di diametro che vengono singolarmente espulsi alla superficie libera della cellula. Fra i granuli il citoplasma è occupato da un esteso e compatto reticolo endoplasmatico che si estende a tutta la cellula, fatta eccezione per uno strato di circa un micron di spessore in corrispondenza del margine libero che, solitamente, è completamente privo di organelli. Numerosi mitocondri sono anche presenti specie nella porzione cellulare sovrastante il nucleo.

Interessante è il comportamento delle cellule di sostegno a livello della loro zona di confine con il prolungamento distale della cellula olfattiva e la parte di tale prolungamento che sporge libera alla superficie dell'epitelio. Qui, un regolare addensamento delle cellule di sostegno circostanti forma attorno alla cellula olfattiva un colletto circolare che demarca nettamente la parte del neurone che è inclusa nello strato epiteliale da quella che emerge libera dalla superficie (vedi Tav. II, fig. 2 e Tav. III, fig. 4 in Z).

Le cellule basali non contengono di norma i granuli di secreto che si osservano nelle cellule di sostegno, le maglie del reticolo endoplasmatico sono più rade e disposte in profili allungati a cui aderiscono granuli interpretati come ribosomi ed il loro aspetto generale, nelle microfotografie elettroniche, è piuttosto chiaro. La loro identificazione nei confronti delle cellule di sostegno è pertanto relativamente agevole. Poiché fra le cellule basali decorrono i neuriti delle cellule olfattive, talvolta isolati ma più spesso in fascicoli di dieci o più

unità, non è infrequente il reperto di cellule basali parzialmente avvolgenti questi fascicoli. Tuttavia non è stato sinora notato un rapporto specifico della cellula basale nei riguardi della fibra nervosa che possa essere paragonato a quello che intercorre fra i fasci di fibre nervose e le cellule di Schwann, al di là dell'epitelio.

L'epitelio respiratorio (Tav. II, fig. 4) presenta numerosi ed evidenti caratteri differenziali da quello olfattivo, a prescindere dalla presenza in questo ultimo delle cellule olfattive. Nella porzione respiratoria le cellule epiteliali hanno la superficie libera occupata da una serie di vere cilia fornite di radicola e dei caratteristici 9 + 2 filamenti; però queste cilia, a differenza di quelle dei neuroni olfattivi, sono mobili. Il citoplasma delle cellule epiteliali è provvisto di numerosi micotondri specie nella loro porzione distale ed il reticolo endoplasmatico è disposto in maglie allungate, non abbondanti, alle cui membrane di superficie aderiscono granuli di RNA. Queste cellule inoltre non presentano granuli di secreto.

Le osservazioni preliminari sopra riportate concernenti la mucosa olfattiva di rana consentono alcune brevi considerazioni. Il neurone olfattivo, che la microscopia luce non consente di studiare nei dettagli citologici più fini, dimostra all'esame ultrastrutturale caratteri citologici distinti nelle sue tre porzioni funzionali. Il prolungamento distale, il pericarion e il neurite hanno un corredo di organelli sostanzialmente differente ed ulteriori studi sono in corso per determinare sino a che punto questi caratteri possono essere correlati con la funzione specifica di ciascuna di queste parti del neurone. Le cellule di sostegno sembrano avere, oltre al compito di avvolgere i neuroni (De Lorenzo, 1957) quello secretorio; il loro alto contenuto in organelli conferma che il loro compito è più complesso di quanto la microscopia luce lasciasse sospettare. Ricerche in corso e non ancora pubblicate sulla mucosa olfattiva di varie Classi di Vertebrati confermano la complessità strutturale delle cellule di sostegno, ma dimostrano altresì alcune differenze sostanziali fra gli elementi appartenenti a specie diverse. La apparente omogeneità nella struttura della mucosa olfattiva dimostrata dal microscopio luce in tutti i Vertebrati (Gerebtzoff, 1953) è ora contradetta dallo studio di questa struttura con il mezzo del microscopio elettronico che dimostra, nelle varie specie animali, una sorprendente diversità (Graziadei, 1965, 1966) ed offre alla ricerca un campo che sinora è stato quasi completamente trascurato.

Letteratura.

[1] Allison A. C., *The morphology of the vertebrate olfactory system*, « Biol. Rev. », *28*, 195–244 (1953).

[2] Bloom G., *Studies on the olfactory epithelium of the frog and the toad with the aid of light and electron microscopy*, « Z. Zell. », *41*, 89–100 (1954).

[3] Clark Le Gros W. E., *Inquiries into the anatomical basis of olfactory discrimination*, « Proc. Roy. Soc. », *B 146*, 299–319 (1957).

[4] Gasser H. S., *Olfactory nerve fibres*, « J. Gen. Physiol. », *39*, 473–496 (1956).

[5] Gerebtzoff M. A., *L'olfaction. Structure de l'organe olfactif et mechanisme de l'olfaction*, « J. de Physiol. et Pathol. Gener. », *45*, 247–283 (1953).

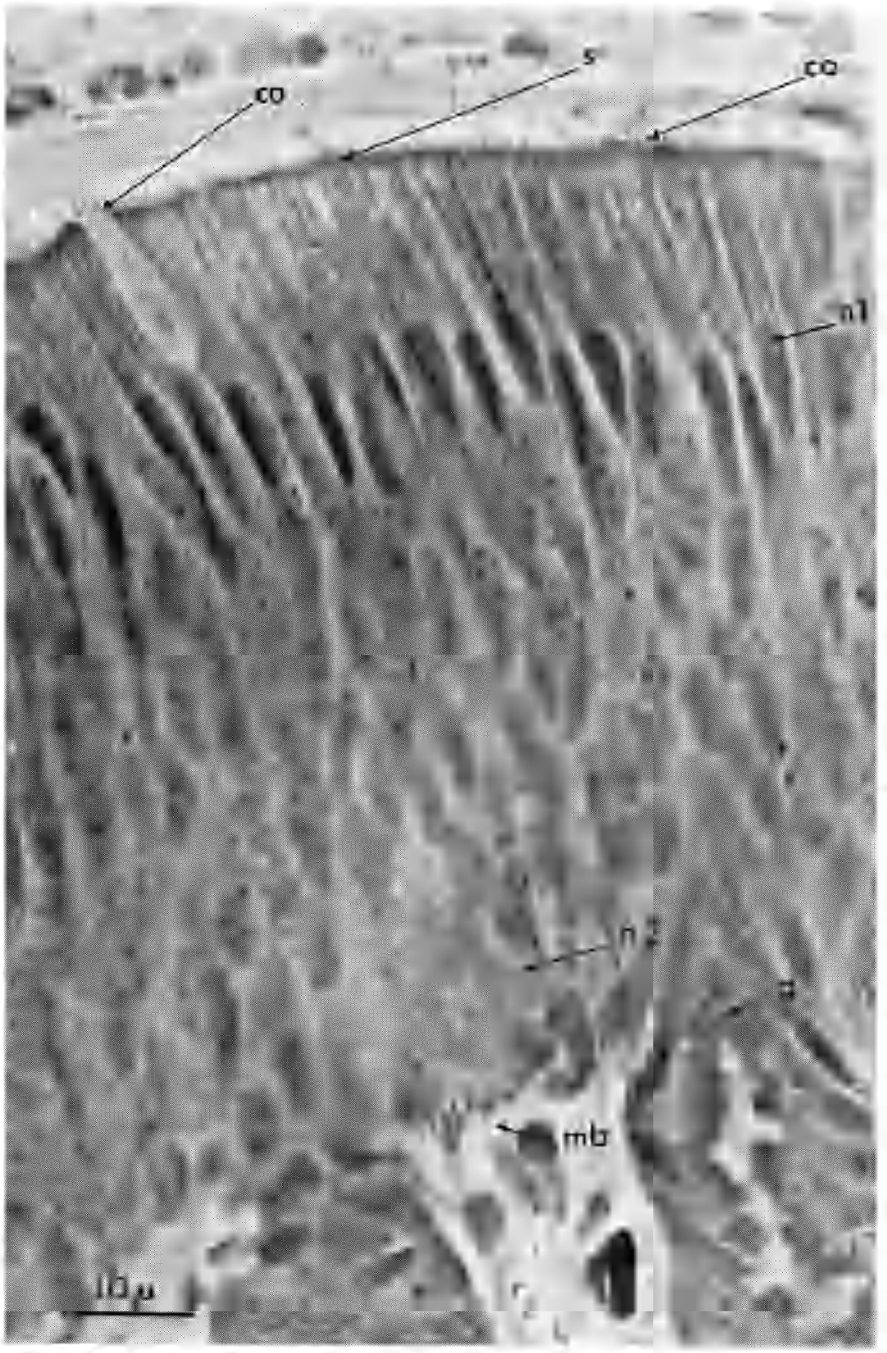

fig. 1

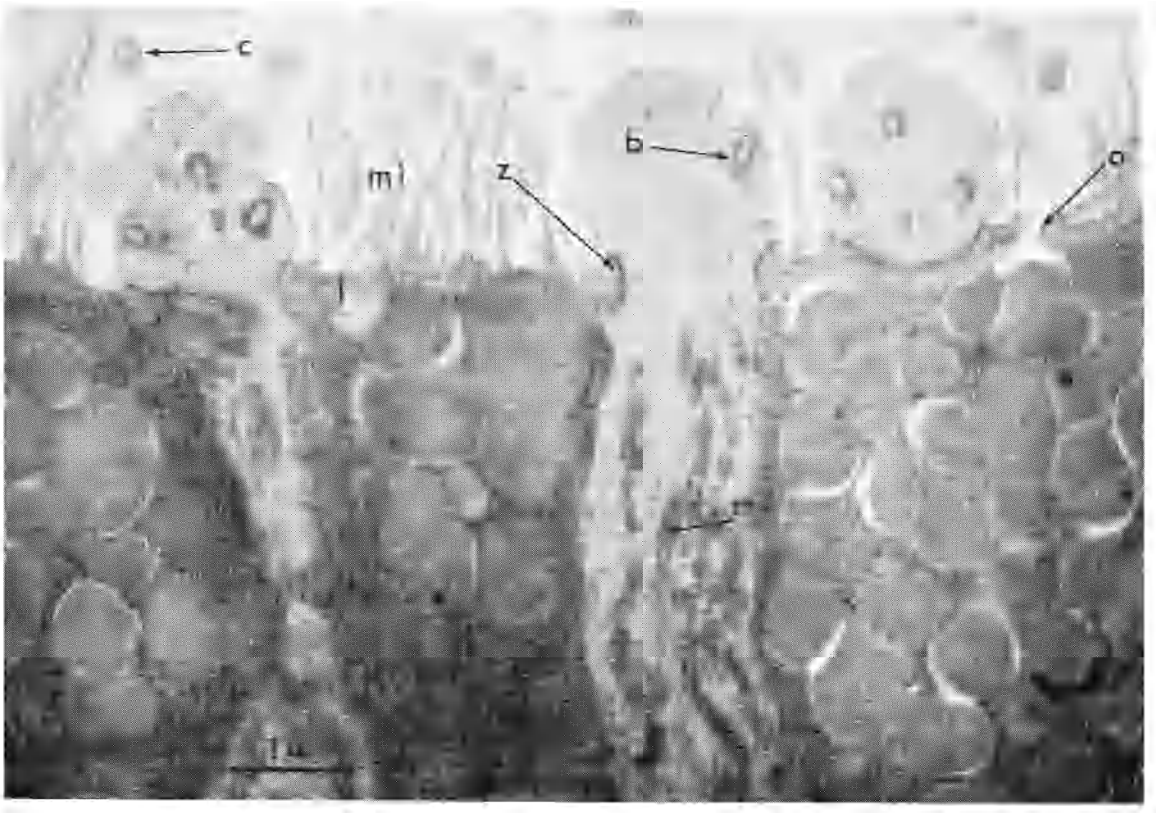

fig. 2

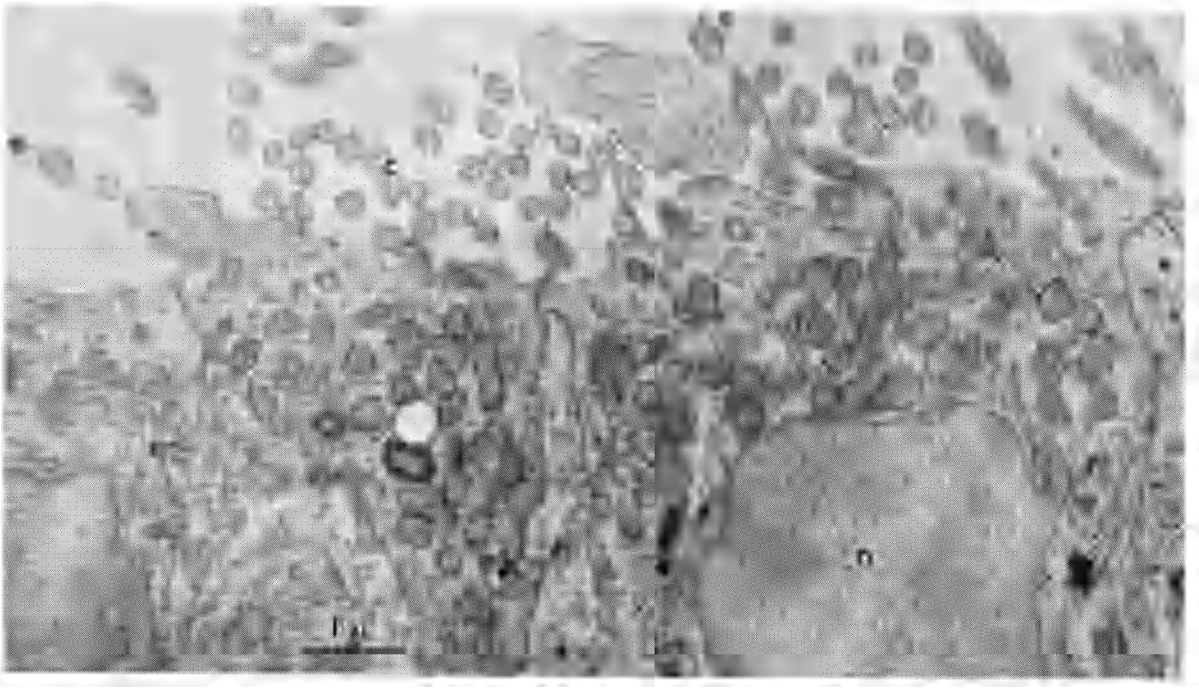

fig. 3

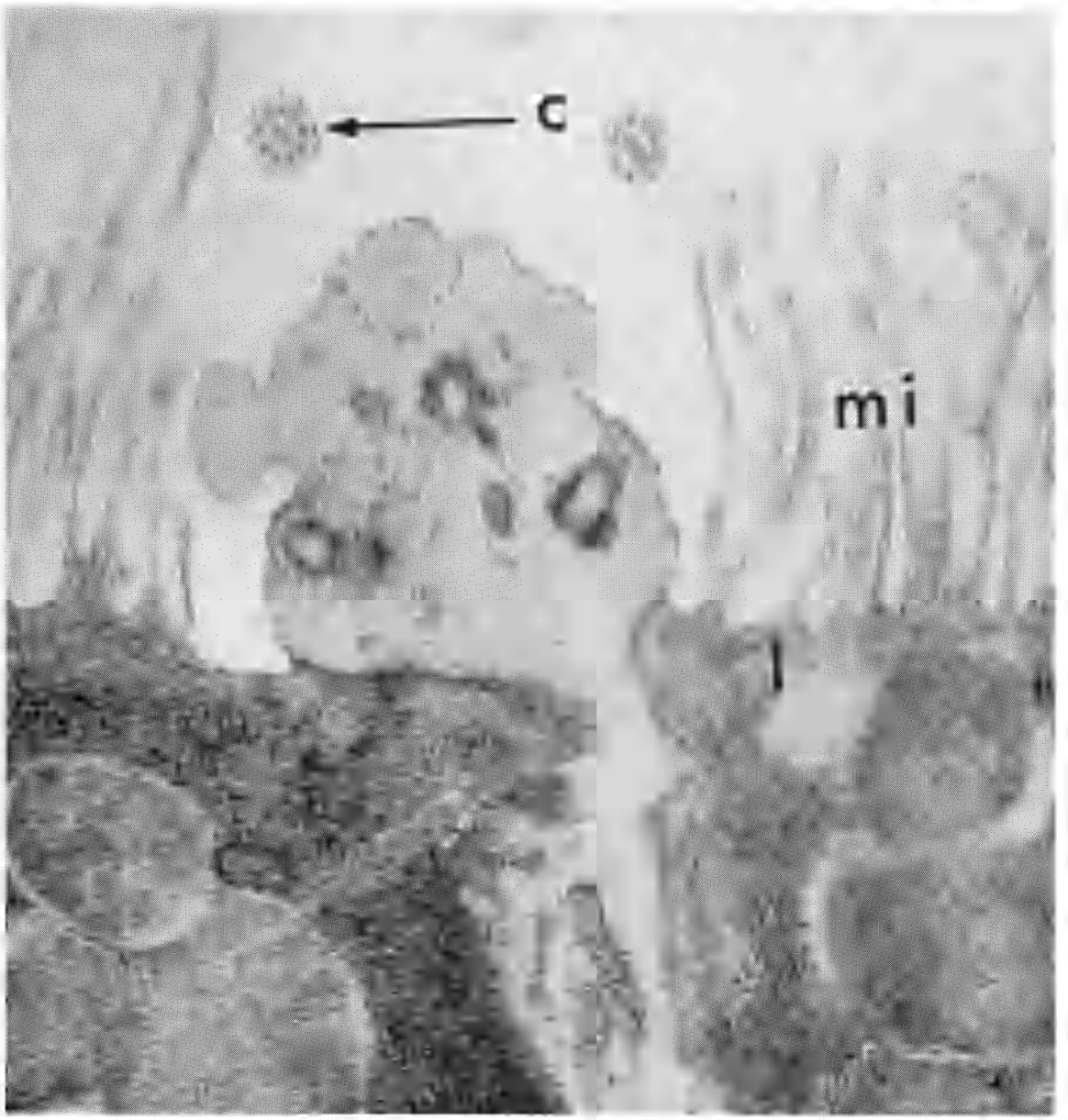

fig. 4

[6] GEREBTZOFF M. A. e SHKAPENKO G., *Recherches sur le pigment de la muqueuse olfactive*, «C. R. Ass. Anat.», *68*, 511–516 (1952).
[7] GESTELAND R. C., LETTVIN J. Y. e PITTS W. H., *Chemical transmission in the nose of the frog.*, « J. Physiol.», *181*, 525–559 (1965).
[8] GRAZIADEI P., *Electron microscopic observations on the olfactory mucosa of the cat*, « Experientia», *21*, 274–275 (1965).
[9] GRAZIADEI P., *Electron microscopic observations of the olfactory mucosa of the mole*, « J. of Zool.» (in corso di stampa).
[10] LORENZO DE A. J., *Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve*, « J. Bioph. Biochem. Cytol.», *3*, 839–850 (1957).
[11] OTTOSON D., *Some aspects of the function of the olfactory system*, « Pharmacol. Rev.», *15*, 1–42 (1963).
[12] REESE T. S., *Olfactory cilia in the frog*, « J. Cell. Biol.», *25*, 209–230 (1965).
[13] SCARPA A., *Anatomicae disquisitiones de auditu et olfacto* (1789).
[14] SCHULTZE M., *Ueber die Endigungsweise des Geruchsnerven und die Epitelgebilde des Nasenschleimhaut*, «Monatsber. Akad. Wiss. Berlin», *21*, 504–514 (1956).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I–III

TAVOLA I.

Fig. 1. – Epitelio olfattivo di rana da una sezione di materiale incluso in araldite ed osservato in contrasto di fase. La superficie dell'epitelio è ricoperta da uno strato di muco nel quale si riconoscono inclusi i microvilli delle cellule di sostegno orientati regolarmente, in questo materiale, da destra a sinistra. Le cellule di sostegno hanno un citoplasma vacuolato e la loro superficie libera è provveduta di microvilli (*s*). Il nucleo (*n* 1) è a biscotto e più denso di quello delle cellule olfattive (*n* 2). Due di queste sono riconoscibili con la loro porzione periferica sporgente alla superficie epiteliale (*co*). Alla base dell'epitelio la membrana basale (*mb*) non è chiaramente visibile. Le ghiandole del Bowman penetrano in seno all'epitelio (*g*) con i loro elementi secernenti e condotto escretore.

TAVOLA II.

Fig. 2. – Dallo stesso materiale fissato in osmio secondo Millonig (1963) ed incluso in araldite è stata dedotta la sezione di cui è qui riprodotta la fotografia ottenuta col microscopio elettronico. I neuroni olfattivi risultano distinti dalle cellule di sostegno per il loro citoplasma più chiaro, la presenza di cilia e corpuscoli basali (*b*). Numerosi mitocondri (*m*) sono presenti nel processo distale dove si riconoscono anche numerosi neurotubuli. In (*z*) è indicata la zona di contatto specializzato fra il neurone e la cellula di sostegno; (*c*) rappresenta la sezione trasversale di un cilio. Le cellule di sostegno presentano un citoplasma più denso infarcito di granuli che si riversano talvolta alla superficie (*o*). La loro superficie libera è provveduta di microvilli (*mi*).

Fig. 3. – Sezione della porzione superficiale dell'epitelio respiratorio di rana. Le cellule presentano alla loro superficie una serie quasi continua di cilia ed in (*c*) sono indicate queste strutture in sezione trasversale. Nel citoplasma di questi elementi il numero di micotondri (*m*) è cospicuo specie nella regione soprastante il nucleo (*n*). Le maglie del reticolo endoplasmatico (*er*) dimostrano numerosi ribosomi aderenti alla loro membrana di superficie.

TAVOLA III.

Fig. 4. – Particolare ingrandito della fig. 2: rapporti di neurone olfativo con cellule di sostegno; in (*c*) sezione di ciglia; (*mi*) microvilli.

Tutte le microfotografie sono tratte da materiale fissato in 2% tetrossido di osmio in tampone fosfato, incluso in araldite e colorato con piombo acetato secondo Reynolds (1964).