
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PIETRO PALATRONI

Osservazioni istochimiche sull'anidresi carbonica nello stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.2, p. 249–254.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_2_249_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Biologia. — *Osservazioni istochimiche sull'anidrasi carbonica nello stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo* (*). Nota di PIETRO PALATRONI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Histochemical observations have been made by the Häusler technique, as modified by Hansson, on the localization of carbonic anhydrase activity in the gastric cells during the development of the chick.

The enzyme activity is always present, from the beginning of development until the hatching, both in the epithelial cells lining the lumen and in the cells of the submucosal zymogenic glands, whose function is still a matter of discussion.

Negli Uccelli granivori lo stomaco è costituito da due porzioni che si succedono in senso cefalo-caudale, le quali differiscono profondamente sia dal punto di vista morfologico che fisiologico. La parte craniale — oggetto di questa ricerca — è lo stomaco ghiandolare, caratterizzato dalla presenza, nella propria parete, di un elevato numero di ghiandole composte secernenti enzimi digestivi, che si aprono nel suo lume tramite un canale centrale; la porzione caudale, il ventriglio, è invece provvista di una robustissima tonaca muscolare che consente la triturazione degli alimenti ingeriti.

Nella porzione ghiandolare dal sesto giorno di incubazione inizia, da parte dell'epitelio entodermico del lume gastrico, il processo morfogenetico che conduce alla formazione delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa. Gli elementi ghiandolari originano da evaginazioni che l'epitelio gastrico emana verso il tessuto connettivo circondante il tubo epiteliale.

Le modalità con le quali si sviluppa l'apparato gastrico degli Uccelli sono state estesamente studiate e descritte da Cazin in una monografia del 1888.

Anche se le proprietà acide e proteolitiche del succo gastrico del pollo sono state dimostrate per la prima volta da Spallanzani nel 1783, poco si sa sulla reale concentrazione degli ioni idrogeno. Tuttavia i dati disponibili dalle ricerche di Groebbs (1930), Popov e Kudriavtsef (1932), Farner (1943), Fedorovskii (1951), Van Dobben (1952), fanno ritenere attendibile un valore del pH gastrico compreso tra 1 e 2 (vedi Farner, 1960).

La secrezione acida dello stomaco ghiandolare è determinata dalla presenza nel suo epitelio dell'enzima anidrasi carbonica che catalizza la reazione:



(*) Dall'Istituto di Istologia ed Embriologia, Facoltà di Scienze M.F.N., dell'Università di Camerino.

(**) Nella seduta del 9 febbraio 1974.

che rientra nel sistema metabolico della secrezione dell'acido cloridrico nel lume gastrico.

Il primo metodo per la localizzazione istochimica dell'anidrasi carbonica si deve a Kurata (1953) ma Fand *et al.* (1959) ne hanno criticato la specificità. Häusler (1958) ha modificato il metodo di Kurata: il mezzo di incubazione contiene bicarbonato, cobalto, solfato di sodio ed acido solforico ed il prodotto finale, colorato, è un precipitato di solfuro di cobalto.

Secondo Häusler l'anidride carbonica derivante dalla dissociazione dell'acido carbonico secondo la reazione (1), viene rimossa spostando di conseguenza l'equilibrio della seguente reazione verso destra:



Ciò comporta un aumento del carbonato; gli ioni CO_3^{--} , così prodotti, verrebbero precipitati dagli ioni cobalto Co^{++} del mezzo di incubazione, e il carbonato di cobalto così formato sarebbe infine evidenziato come solfuro di cobalto.

L'acetazolamide, inibitore specifico dell'anidrasi carbonica, blocca completamente la reazione e Korhonen e Korhonen (1965 a, b) confermano la specificità del metodo di Häusler.

La reazione di Häusler è stata successivamente modificata da Hansson (1967), impiegando, nel mezzo di incubazione, fosfato di potassio al posto del solfato di sodio e ottenendo una riduzione del tempo di incubazione.

Muther (1972) ha avanzato riserve sulla specificità di questa reazione: da misurazioni sulla cinetica della reazione non catalizzata risulta infatti che essa impiega un tempo minore di quello occorrente alla formazione del precipitato; l'inibizione da acetazolamide inoltre deriverebbe dalla formazione di complessi con il metallo presente nel mezzo di incubazione. Pertanto egli non ritiene valido per il metodo istochimico la spiegazione data da Häusler, pur convenendo che la reazione di Häusler colora, in qualche modo, l'anidrasi carbonica.

Scopo delle ricerche esposte in questa Nota è di studiare la localizzazione dell'anidrasi carbonica nello stomaco ghiandolare durante lo sviluppo embrionale del pollo con il metodo istochimico di Häusler secondo la modifica apportata da Hansson, nonchè di portare un contributo alla discussione sulla sua specificità.

Ad embrioni di pollo razza «Golden Comet» ⁽¹⁾ è stato tolto lo stomaco ghiandolare a diversi stadi dello sviluppo e fissato in glutaraldeide al 3 % in tampone cacodilato 0,2 M pH 7,4 più 7 % di saccarosio. Il materiale è stato tenuto nel fissativo per tre ore per poi subire tre lavaggi di 20' ognuno in soluzione fisiologica contenente saccarosio al 7 %.

(1) Ringrazio il dott. Claudio Vissani per averli gentilmente forniti.

Le sezioni sono state tagliate al criostato ad uno spessore di 10–12 μ e mantenute flottanti in soluzione fisiologica con saccarosio al 7 %.

Dalla soluzione fisiologica le sezioni sono state trasferite nel mezzo di incubazione di Hansson utilizzando filtri Millipore e mantenute flottanti per circa 10' a temperatura ambiente (circa 22°C).

Dopo un lavaggio in acqua distillata le sezioni, sempre flottanti, hanno subito un processo di annerimento in soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al 0,5 % in H_2O .

Le sezioni sono state infine montate in glicerina dopo averle preventivamente lavate in acqua distillata.

Il mezzo di incubazione è stato così preparato:

Soluzione 1^a: 1 ml di CoSO_4 0,1 M; 6 ml di H_2SO_4 0,5 M; 5 ml di KH_2PO_4 1/15 M; 5 ml H_2O .

Soluzione 2^a: 0,75 gr. di NaHCO_3 in 40 ml di H_2O .

Le soluzioni 1^a e 2^a si mescolano al momento dell'uso e la soluzione risultante ha un pH di 5,8.

Per ogni stadio studiato, sono stati eseguiti preparati di controllo nei quali l'incubazione è stata eseguita in mezzo contenente acetazolamide (2) alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

In tutti gli stadi embrionali considerati (Tav. I, figg. 1, 2, 3, 4, 5 e 6) sia l'epitelio di rivestimento della mucosa gastrica che l'epitelio delle ghiandole zimogeniche multilobulari della sottomucosa risultano intensamente colorati, mentre nessuna positività si rileva a carico di altri tessuti: tessuto connettivo, tessuto muscolare liscio.

Nei preparati incubati in presenza di acetazolamide l'inibizione è stata totale.

Ammettendo la specificità della reazione per l'anidrase carbonica, sia pure con le riserve di Muther, i risultati ottenuti confermano, sul piano morfologico, i dati biochimici rivelati da Clark (1951).

Questo Autore ha determinato, per lo stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo, una attività dell'anidrase carbonica sempre crescente, nel decorso ontogenetico, secondo l'andamento del grafico di fig. 1, dove la attività dell'enzima è espressa in unità enzimatiche per 50 mg di tessuto in funzione dei giorni di incubazione.

I quadri istochimici ottenuti mostrano infatti come, con il progredire dello sviluppo, le cellule epiteliali della mucosa e delle ghiandole della sottomucosa, contenenti l'enzima, siano in continuo aumento rispetto all'unità di volume della parete dello stomaco; in perfetto accordo con i dati di Clark.

Per quanto concerne la positività delle cellule della mucosa i risultati concordano con quelli recentemente ottenuti da Gay e Mueller (1973) i quali, sperimentando con acetazolamide tritiata su pulcini di 10 gg, hanno dimostrato detta positività con la tecnica autoradiografica. Essi hanno però, per

(2) Ringrazio la Società Cyanamid Italia per averla gentilmente fornita.

contro, non rilevato alcuna positività a carico delle cellule delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa.

Sulle cellule delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa vi è una notevole controversia; tuttavia esse sono ritenute funzionalmente omologhe sia alle cellule principali peptiche che alle cellule parietali oxintiche dei Mammiferi (Hill, 1971).

Gay e Mueller, basandosi sul fatto che nelle cellule delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa non hanno ottenuto positività con il processo autoradiografico, ritengono che l'acido cloridrico verrebbe secreto unicamente dalle cellule di rivestimento della mucosa, senza alcun intervento da parte delle ghiandole della sottomucosa.

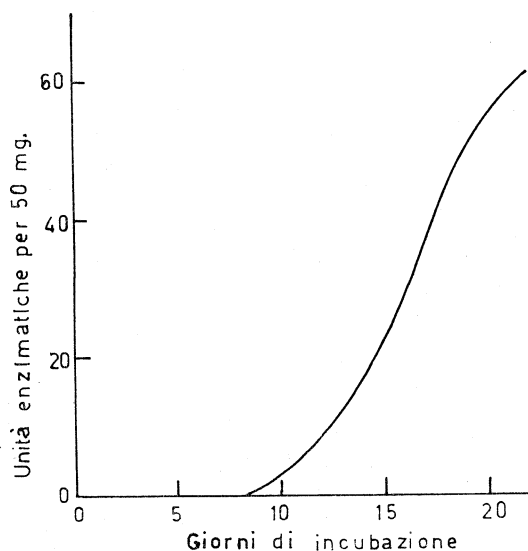


Fig. 1. - Attività della anidraasi carbonica nello stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo, a diversi stadi di sviluppo (da Clark, 1951)

I risultati di questa ricerca, per quanto concerne la positività delle cellule delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa, contrastano con quelli di Gay e Mueller perchè, come si è già detto, una notevole positività è stata osservata anche in queste ghiandole. Inoltre, come si può rilevare dalla fotografia 5 della Tav. I, non tutte le cellule di una stessa ghiandola hanno risposto alla reazione; questo fa supporre che, come per i Mammiferi, alcune cellule sarebbero deputate alla produzione di HCl, altre alla produzione di pepsinogeno.

Ricerche a livello ultrastrutturale sulla mucosa e sulle ghiandole della sottomucosa dello stomaco del pollo, che attualmente vengono condotte nel nostro laboratorio, potrebbero dare una definitiva risposta sulla esatta localizzazione di questo enzima.

In conclusione, le presenti osservazioni istochimiche compiute su embrioni di pollo dall'ottavo giorno di incubazione alla schiusa con il metodo di Häusler

(modificato da Hansson) mostrano una positività della reazione per la anidrase carbonica sia nelle cellule epiteliali della mucosa gastrica che nelle cellule delle ghiandole zimogeniche presenti nella sottomucosa. L'intensità della reazione appare costante; l'aumento di attività è perciò in rapporto al progressivo aumento numerico, per unità di volume della parete gastrica, delle cellule contenenti l'enzima.

I risultati ottenuti, la cui specificità è stata controllata inibendo con acetazolamide l'attività dell'anidrase carbonica, rappresentano un contributo alla conoscenza della funzione delle ghiandole della sottomucosa, tuttora controversa.

BIBLIOGRAFIA

- CAZIN M., *L'appareil gastrique des Oiseaux*, « Ann. Sci. Nat. Zool. », 7 sér., 4, 177 (1888).
 CLARK A. M., *Carbonic anhydrase activity during embryonic development*, « J. Exp. Biol. », 28, 332 (1951).
 FAND S. B., LEVINE H. J. e ERWIN H. L., *A reappraisal of the histochemical method for carbonic anhydrase*, « J. Histochem. Cytochem. », 7, 27 (1959).
 FARNER D. S., *Digestion and the Digestive System*, in « Biology and Comparative Physiology of Birds ». (Edited by A. J. Marshall), Vol. I, Cap. XI, Academic Press, New York 1960.
 GAY C. V. e MUELLER W. J., *Cellular localization of carbonic anhydrase in avian tissues by labeled inhibitor autoradiography*, « J. Histochem. Cytochem. », 21, 693 (1973).
 HANSSON H. P. J., *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity*, « Histochemie », 11, 112 (1967).
 HÄUSLER G., *Zur Technik and Spezifität des histochemischen Carboanhydrasenachweises im Modellversuch und in Gewebsschnitten von Rattennieren*, « Histochemie », 1, 29 (1958).
 HILL K. J., *The structure of the alimentary tract*, in « Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl ». (Edited by D. I. Bell, B. M. Freeman), Vol. I., Academic Press, New York 1971.
 KORHONEN L. K. e KORHONEN E., *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in mast cells*, « Experientia », 21, 628 (1965 a).
 KORHONEN L. K. e KORHONEN E., *Electrophoretic and histochemical studies of carbonic anhydrase activity*, « Histochemie », 5, 279 (1965 b).
 KURATA Y., *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity*, « Stain Technol. », 28, 231 (1953).
 MÜTHER T. F., *A critical evaluation of the histochemical methods for carbonic anhydrase*, « J. Histochem. Cytochem. », 20, 319 (1972).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Sezioni al criostato dello stomaco ghiandolare di embrioni di pollo fissato in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0.2 M pH 7,4 più 7% di saccarosio; attività dell'anidrase carbonica rivelata con il metodo di Häusler, secondo la modifica apportata da Hansson, a pH 5,8. Tempo di incubazione: 10'. (Altre spiegazioni nel testo).

Fig. 1. — Stomaco ghiandolare di embrione all'8° giorno; è già iniziato lo sviluppo delle ghiandole zimogeniche della sottomucosa, che originano da evaginazioni dell'epitelio gastrico. Intensa positività della reazione nelle cellule epiteliali; nessuna colorazione specifica si rileva a carico del tessuto connettivo. 120×.

- Fig. 2. - Stomaco ghiandolare di embrione al 12° giorno; lo sviluppo delle ghiandole della sottomucosa è più esteso ed il grado di differenziamento più avanzato rispetto allo stadio precedente; sempre intensa la positività delle cellule epiteliali; nessuna colorazione specifica a carico del connettivo e del tessuto muscolare. 30×.
- Fig. 3. - Stomaco ghiandolare di embrione al 15° giorno; lo sviluppo delle ghiandole della sottomucosa è molto avanzato; la sottomucosa viene sempre più occupata dalle ghiandole zimogeniche in accrescimento. Sempre intensa la positività delle cellule epiteliali; nessuna colorazione specifica a carico degli altri tessuti. 30×.
- Fig. 4. - Particolare a maggiore ingrandimento della fig. 3. 120×.
- Fig. 5. - Stomaco ghiandolare di embrione al 15° giorno; particolare di una ghiandola zimogenica; si noti che non tutte le cellule presentano positività della reazione. 300×.
- Fig. 6. - Stomaco ghiandolare di embrione al 19° giorno; lo sviluppo dello stomaco ghiandolare è praticamente al termine; si osserva sempre la stessa positività della reazione nelle cellule epiteliali, sia della mucosa che delle ghiandole zimogeniche; nessuna colorazione specifica a carico del connettivo e del tessuto muscolare. 30×.

