
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PIETRO PALATRONI

**Osservazioni ultrastrutturali sulla localizzazione della
anidraresi carbonica e sulla morfologia delle cellule
parietali dello stomaco del topo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 58 (1975), n.5, p. 797–802.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_58_5_797_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/>

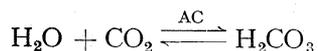
Biologia. — *Osservazioni ultrastrutturali sulla localizzazione della anidrasi carbonica e sulla morfologia delle cellule parietali dello stomaco del topo* (*). Nota di PIETRO PALATRONI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Morphological and histochemical observations have been performed on gastric parietal cells of the mouse, using optical and electron microscopy.

The histochemical study of the localization of carbonic anhydrase (CA) has been done according to Häusler's technique, whose specificity is also discussed. The results obtained have clearly shown an elective localization of CA activity in the intracellular canaliculi.

Some lysosome-like structures have been also observed in the parietal cells.

Tra i ruoli attribuiti all'anidrasi carbonica, presente anche nella mucosa gastrica (Davemport e Fisher, 1938; Davemport, 1939, 1943; Carter e Parsons, 1968, 1970, 1971, 1972 *a, b*; Carter, 1971, 1972), è quello che vede implicato l'enzima nella idratazione dell'anidride carbonica secondo la reazione:



che rientrerebbe nel meccanismo della secrezione dell'acido cloridrico nel lume gastrico.

Proseguendo alcune ricerche (Palatroni, 1974) tendenti a precisare la localizzazione istochimica dell'anidrasi carbonica nella mucosa gastrica nelle varie classi di Vertebrati è stato evidenziato detto enzima, sia con il microscopio ottico che a livello ultrastrutturale, nelle cellule parietali dello stomaco del topo.

Il metodo istochimico adottato per la microscopia ottica e per la microscopia elettronica è quello di Häusler (1958).

Topi albini maschi del peso di circa 30 g sono stati sacrificati con etere ed è stata prelevata la porzione ghiandolare dello stomaco.

Per l'osservazione morfologica al microscopio elettronico piccoli pezzi di tessuto di circa un millimetro di lato, sono stati prefissati in glutaraldeide al 2,5 % in tampone di fosfati 0,1 M pH 7,3 a 4 °C per due ore. Sono seguiti un lavaggio di dodici ore a 4 °C, una post-fissazione in tetrossido di osmio all'1 % per un'ora a 4 °C e tre lavaggi di due minuti ognuno a temperatura ambiente. Sia per i lavaggi che per la soluzione del tetrossido di osmio si è impiegato lo stesso tampone usato nella prefissazione. Dopo disidratazione nella scala degli alcool, il materiale è stato impregnato con acetato di uranile allo 0,2 % in alcool assoluto per due ore, lavato in alcool assoluto e incluso in araldite.

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

(**) Nella seduta del 10 maggio 1975.

Per lo studio istochimico il tessuto è stato fissato in una soluzione allo 0,5 % di glutaraldeide e 4 % di formalina in tampone di Millonig pH 7,4 per due ore a 4 °C (Cross, 1970). Dopo la fissazione sono state tagliate sottili striscie di tessuto di due millimetri di larghezza per cinque di lunghezza e di uno spessore pari a quello della parete dello stomaco. Esse sono state lavate in tampone di Millonig pH 7,4 per due ore a 4 °C con diversi cambi del tampone. Sezioni di circa 16 μ sono state tagliate con il criostato, orientando le striscie in modo che nelle sezioni risultassero presenti tutti gli strati che costituiscono la parete dello stomaco.

Le sezioni sono state mantenute flottanti in tampone di Millonig pH 7,4 per tutta la durata dell'operazione di taglio. Dal tampone sono state trasferite nel mezzo di incubazione di Häusler, preparato secondo il metodo descritto da Pearse (1972), utilizzando filtri Millipore e mantenute flottanti per un'ora a temperatura ambiente (circa 22 °C).

Dopo lavaggio in acqua distillata le sezioni, sempre flottanti, hanno subito un processo di annerimento in una soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ all'1% in H_2O e dopo essere state preventivamente lavate in acqua distillata sono state montate in glicerina per essere osservate con il microscopio ottico.

Per la microscopia elettronica invece, dopo il processo di annerimento ed il lavaggio in acqua distillata, le sezioni sono state post-fissate in tetrossido di osmio allo 0,2 % in tampone di Millonig pH 7,4 per due minuti e rapidamente disidratate in alcool assoluto (Cross, 1970). Alla disidratazione è seguita una normale inclusione in araldite.

Come controllo per la tecnica istochimica sono stati approntati dei preparati per i quali l'incubazione è stata eseguita nel mezzo di Häusler contenente acetazolamide ⁽¹⁾ alla concentrazione di 1×10^{-3} M.

Sezioni ultrasottili sono state tagliate ⁽²⁾ con l'ultramicrotomo LKB modello Huxley e dopo colorazione con citrato di piombo sono state osservate con il microscopio elettronico Hitachi HS-8.

La osservazione al microscopio elettronico dei preparati allestiti per lo studio morfologico (Tav. I, figg. 1 e 2) mostra che le cellule parietali dello stomaco del topo presentano una stretta rassomiglianza con quelle del pipistrello (Ito e Winchester, 1963) e del ratto (Helander, 1969). Hanno dimensioni maggiori delle cellule zimogeniche delle ghiandole gastriche, il nucleo occupa una posizione centrale e tra esso e i limiti cellulari si rinvengono diversi canalicoli caratterizzati dalla presenza di numerosi microvilli densamente stipati. Il citoplasma nelle adiacenze dei canalicoli si presenta molto vacuolizzato assumendo uno aspetto spugnoso.

I mitocondri, molto numerosi, sono dislocati nel citoplasma periferico e perinucleare e pertanto risultano in stretto rapporto con i canalicoli. L'aspetto dei mitocondri è alquanto vario, e pur prevalendo le forme rotondeggianti o

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

(2) Ringrazio il sig. Enzo Nardone per l'aiuto tecnico.

allungate si possono rinvenire anche forme irregolari. Caratteristica comune a tutti i mitocondri è la presenza di numerose creste disposte parallelamente le une alle altre e con pochissimo spazio tra esse.

Il reticolo endoplasmatico granulare è poco sviluppato ed è dislocato alla periferia della cellula; quello agranulare è invece abbondante.

Sono presenti lisosomi, come si può osservare nella Tav. I, fig. 2 e nella Tav. III, fig. 1.

I preparati istochimici, sia al microscopio ottico che al microscopio elettronico, hanno mostrato che il metodo di Häusler per la anidrase carbonica dà localizzazioni precise nei canalicoli delle cellule parietali.

Per la microscopia ottica sono stati allestiti anche preparati fissati in acetone (Cross, 1970), che hanno dato gli stessi risultati di quelli fissati con formaldeide e glutaraldeide, cioè con il fissativo adottato per l'indagine istochimica con il microscopio elettronico. Tuttavia questa seconda fissazione, pur completata dalla post-fissazione in tetrossido di osmio, è risultata insufficiente per la microscopia elettronica. Infatti alcune strutture cellulari, come ad esempio i mitocondri (Tav. II, fig. 2 e Tav. III, fig. 1) sono alquanto alterate; a questo contribuisce, molto probabilmente, il lungo periodo di permanenza delle sezioni nel mezzo di incubazione.

È da osservare che nei preparati istochimici per la microscopia elettronica solo le cellule parietali che si sono trovate sulla superficie delle sezioni durante l'incubazione nel mezzo di Häusler presentano la reazione. Questo, secondo Cross, dipenderebbe dal fatto che la tecnica di Häusler richiede una rimozione dell'anidride carbonica dalla superficie della sezione per consentire al carbonato di cobalto di precipitare nei siti in cui è presente l'anidrase carbonica; non potendo ciò verificarsi per le cellule oxintiche situate all'interno della compagine del tessuto si spiegherebbe l'assenza della reazione.

Nella Tav. II, fig. 1 si può osservare una porzione della mucosa gastrica come si presenta al microscopio ottico dopo il trattamento istochimico: la rete dei canalicoli intracellulari delle cellule oxintiche risulta con chiara evidenza.

La fig. 2 della Tav. II e la fig. 1 della Tav. III mostrano invece una porzione di una cellula parietale come si presenta al microscopio elettronico dopo il trattamento istochimico: si possono osservare canalicoli intracellulari tagliati longitudinalmente e trasversalmente, che, con i propri microvilli, hanno intensamente reagito alla reazione.

Nella Tav. III, fig. 2 si possono vedere dei microvilli dei canalicoli intracellulari a maggiore ingrandimento.

Nei preparati incubati in presenza di acetazolamide, inibitore specifico dell'anidrase carbonica, la reazione è del tutto assente.

Sulla specificità della reazione di Häusler per l'anidrase carbonica Muther (1972) ha avanzato riserve. Egli, con misurazioni sulla cinetica della reazione non catalizzata, ha rilevato che essa impiega un tempo minore di quello occorrente alla formazione del precipitato; l'inibizione da acetazolamide deriverebbe dalla formazione di complessi con il metallo presente nel mezzo di incuba-

zione. Tuttavia Muther conclude che la reazione di Häusler, anche se non specifica, può ritenersi indicativa della presenza di anidrasi carbonica.

La specificità del metodo comunque è stata confermata da Korhonen e Korhonen (1965 a, b) e per quanto concerne la rapidità della reazione Cross (1970) fa osservare che una rapida precipitazione del prodotto di reazione può ottenersi con lievi modifiche delle condizioni di incubazione. Infatti innalzando la temperatura del mezzo di incubazione da 22 °C a 37 °C e impiegando il solfato di cobalto alla concentrazione 0,0025 M anziché alla concentrazione 0,002 M il tempo si riduce da 60' a 5'.

I risultati di questa ricerca, forniti dai preparati istochimici, concordano con quelli ottenuti da Cross nel ratto e confermano che l'anidrasi carbonica, nelle cellule oxintiche della mucosa gastrica è localizzata nei microvilli dei canalicoli intracellulari, in accordo con le precedenti ricerche di Helander (1969).

Questo Autore ha infatti dimostrato, con metodi biochimici, che la comparsa di una attività carboanidrasica nello stomaco del ratto coincide durante lo sviluppo embrionale con la comparsa nelle cellule oxintiche (a seguito del processo di differenziamento) dei canalicoli di secrezione intracellulare.

Per quanto concerne la precipitazione del solfuro di cobalto sui microvilli dei canalicoli intracellulari (Tav. III, fig. 2) si può osservare come essa si presenti alquanto discontinua anche se questa discontinuità non è così evidente come quella osservata da Cross nel ratto. Questa diversità può dipendere da vari fattori: tra questi la variabile morfologia dei microvilli in rapporto al momento funzionale della cellula, che può essere o no in fase di secrezione.

È bene quindi interpretare con cautela la deposizione del solfuro di cobalto anche se, come dice Cross, è allettante supporre che la localizzazione dell'anidrasi carbonica su superfici che si ritengono attraversate da ioni durante la secrezione acida fa pensare che essa intervenga nel trasporto ionico, oppure che svolga un ruolo protettivo nel mantenimento del pH cellulare.

La funzione dei lisosomi che, come è risultato in questa ricerca, sono presenti anche in queste cellule, non è chiara; ulteriori indagini istochimiche, attualmente in corso, sono rivolte a precisarne le caratteristiche.

BIBLIOGRAFIA

- CARTER M. J. (1971) - *The carbonic anhydrase of the rumen epithelial tissue of the ox*, « Biochem. biophys. Acta », 236, 222.
- CARTER M. J. (1972) - *Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution and functional significance*, « Biol. Rev. », 47, 465.
- CARTER M. J. e PARSONS D. S. (1968) - *pH-stat method for measurement of rate of hydration of CO₂*, « J. Physiol. », Lond., 198, 13.
- CARTER M. J. e PARSONS D. S. (1970) - *The purification and properties of carbonic anhydrase from guinea-pig erythrocytes and mucosae of the gastrointestinal tract*, « Biochem. J. », 120, 797.

- CARTER M. J. e PARSONS D. S. (1971) - *The isoenzymes of carbonic anhydrase: tissue, sub-cellular distribution and functional significance, with particular reference to the intestinal tract*, « J. Physiol. », 215, 71.
- CARTER M. J. e PARSONS D. S. (1972 a) - *The isoenzymes of carbonic anhydrase: mimetic properties with particular reference to its function in the gastrointestinal tract*, « J. Physiol. », 220, 465.
- CARTER M. J. e PARSONS D. S. (1972 b) - *Action of carbonic anhydrase inhibitors in the gastrointestinal tract*. In: Intern. Encyclopedia of Pharmacol. and Therap. (Section 39 A) (ed. G. Peters). Pergamon Press, Oxford.
- CROSS S. A. M. (1970) - *Ultrastructural localisation of carbonic anhydrase in rat stomach parietal cells*, « Histochemie », 22, 219.
- DAVEMPORT H. W. (1939) - *Gastric carbonic anhydrase*, « J. Physiol. », 97, 32.
- DAVEMPORT H. W. (1943) - *The secretion of acid by the gastric mucosa*, « Gastroenterology », 1, 383.
- DAVEMPORT H. W. e FISHER R. B. (1938) - *Carbonic anhydrase in the gastrointestinal mucosa*, « J. Physiol. », 94, 16.
- HÄUSLER G. (1958) - *Zur Technik and Spezifität des Histochemischen Carboanhydrasenachweises im Modellversuch und in Gewebsschnitten von Rattennieren*, « Histochemie », 1, 29.
- HELANDER H. F. (1969) - *Ultrastructure and function of gastric parietal cells in the rat during development*, « Gastroenterology », 56, 35.
- ITO S. e WINGHESTER R. J. (1963) - *The fine structure of the gastric mucosa of the bat*, « J. Cell Biol. », 16, 541.
- KORHONEN L. K. e KORHONEN E. (1965 a) - *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in mast cells*, « Experientia », 21, 628.
- KORHONEN L. K. e KORHONEN E. (1965 b) - *Electrophoretic and histochemical studies of carbonic anhydrase activity*, « Histochemie », 5, 279.
- MUTHER T. F. (1972) - *A critical evaluation of the histochemical methods for carbonic anhydrase*, « J. Histochem. Cytochem. », 20, 319.
- PALATRONI P. (1974) - *Osservazioni istochimiche sull'anidraasi carbonica nello stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 56, 249.
- PEARSE A. G. E. (1972) - *Histochemistry*. Churchill Livingstone, Edinburg and London, Vol. II.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Microfotografia (m.e.) di una cellula parietale dello stomaco del topo; si possono osservare i canalicoli intracellulari (C) in sezione trasversale, stipati da microvilli, il nucleo (N), numerosi mitocondri. 16.000×.
- Fig. 2. - Microfotografia (m.e.) di parte di una cellula parietale a maggiore ingrandimento. (N) nucleo, (C) canalicoli in sezione longitudinale; è visibile un lisosoma indicato dalla freccia ed ingrandito nell'inserito. 18.500×; inserto 50.000×.

TAVOLA II.

- Fig. 1. - Microfotografia (m.o.) della mucosa gastrica del topo. Nei canalicoli intracellulari (C) delle cellule parietali (P) si osserva una intensa positività della reazione di Häusler che determina, in presenza di anidrasi carbonica, la formazione di un precipitato nero di solfuro di cobalto. 1.900×.
- Fig. 2. - Microfotografia (m.e.) di parte di una cellula parietale con canalicoli intracellulari in sezione longitudinale e trasversale, a livello dei quali la reazione di Häusler è fortemente positiva. 11.500×.

TAVOLA III.

- Fig. 1. - Microfotografia (m.e.) di parte di una cellula parietale. Si osservano i canalicoli in sezione trasversale e a destra uno in sezione longitudinale. Con (L) sono indicati tre corpi di tipo lisosomale. 14.000×.
- Fig. 2. - Particolare a maggiore ingrandimento della microfotografia precedente. 52.000×.

