

Osservazioni sul processo di calcificazione ossea

DARIA STEVE BOCCIARELLI

Laboratori di Fisica

Riassunto. — Dalle osservazioni di sezioni sottili di osso al microscopio elettronico si possono stabilire le relazioni spaziali tra il minerale di calcio e il substrato organico, a livello molecolare. Queste vengono commentate e discusse sulla base delle nozioni che oggi si possono raccogliere dall'enorme massa di lavoro fatto da biologi, biochimici e mineralogisti in questo campo.

Summary (*Observations on calcification process in bone*). — The calcification in bone is a special case of a more general phenomenon which is the tissue mineralization: it occurs largely in biological specimens, with examples ranging from bacteria to the most highly organized species. Despite the enormous efforts made in the last decades in bone research, none of the processes related to the mineralization of the organic matrix has been up to now completely understood (SOGNNAES, 1958; RAMACHANDRAN, 1963; FLEISCH, BLACKWOOD & OWEN, 1965; AMPRINO, 1961; WHIPPLE, 1963; ONCLEY, 1959).

In these last years we have been concerned with studies in this field, and many observations have been performed at the electron microscope on different specimens with different techniques. From these, the spatial relationship between organic and inorganic material may be obtained at a molecular level. To facilitate the understanding of these observations, the chemical, biological and physico-chemical informations obtained from the current literature are synthesized.

In summarizing the results we may conclude that:

1) the needle-shaped crystallites well known in calcified tissues (which are shown free from the organic matrix in Plate 1), when found in bone tissues, seem generally flanked by thropocollagen molecules, as they appear to lay down in the plane of the section in Plate 3 (*top*) and in cross section in Plate 3 (*bottom*) (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965*a*; *b*; 1966).

2) Incipient calcification of the matrix appears as small spots (no more than 10 Å in diameter) which grow as thin needleshaped crystals

(Plate 4, right side) (ASCENZI, FRANÇOIS & STEVE BOCCIARELLI, 1963). They are not necessarily in correspondence to the laying down of collagen fibrils (Plate 11) (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965a; b).

3) Later, small aggregates of randomly distributed crystallites are found sometimes along the collagen fibrils, but frequently there is evidence that they are only in relationship to the surrounding material (Plates, 5, 6, 10 and 11); as they grow in size, the crystallized areas coalesce to form a continuous stratum (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965a; b).

4) In osteons (Haversian system) the calcified fibrils show two different aspects of the deposition of calcium salts: the first is a series of parallel calcified bands which are separated by clear interbands and run almost perpendicular to the osteon axis: this banding corresponds to the well-known major collagen periods; the second is made by needle-shaped crystallites which, owing to their length, can cover two or many major collagen periods; their thickness reaches about 40 Å (Plate 13) (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965a; b).

5) The investigations on the dynamics of osteon calcification showed, after a sudden initial deposition of the calcium salts in the two forms described above, that the apatite is laid down slowly, on a large percentage of the organic matrix, starting from the broad bands at the major collagen periods (Plate 13) (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1966).

INTRODUZIONE

È difficile fare un quadro organico dei dati che si possono ricavare dalla letteratura sul processo di ossificazione, non solo per l'enorme massa di lavoro fatto da decenni e l'esistenza di parecchi risultati difficilmente compatibili, ma anche perchè, essendo l'argomento molto complesso, i singoli ricercatori o gruppi di ricercatori lo hanno sempre affrontato entro un campo necessariamente limitato, legato alla disciplina che essi professano: biologia, biochimica, mineralogia, fisico-chimica. E malgrado si facciano ogni anno parecchi simposi nell'intento di fondere, accordare e completare i risultati così ottenuti, un quadro organico dei passi che sono stati fatti finora per risolvere il problema dell'ossificazione è ben difficile a farsi.

Ricorderemo quindi solo i dati essenziali soffermandoci su alcuni più recenti, senza pretesa di completezza, rimandando alle varie particolari rassegne sull'argomento e ai testi più recenti per una visione più approfondita (SOGNNAES, 1958; RAMACHANDRAN, 1963; FLEISCH, BLACKWOOD & OWEN, 1965; AMPRINO, 1961; WHIPPLE, 1963; ONCLEY, 1959; MAC LEAN & BUDY, 1964).

Per calcificazione ossea si intende il processo secondo il quale su una matrice organica si deposita in fase solida, per la maggior parte cristallina,

un fosfato di calcio. Dai diagrammi di diffrazione ottenuti con raggi X (BALB, 1940; TRAUTZ, 1954), dalle prove chimiche (HONG, 1954; STRANDH, 1960) e dalla microanalisi con raggi X (MELLORS, 1964) risulta che la fase cristallina corrisponde a quella di una apatite, e si ammette generalmente che si tratti di idrossiapatite: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Questo processo di calcificazione, che avviene in particolare nei vertebrati dove dà luogo alle parti più rigide, lo scheletro e i denti, è uno dei molti che si verificano in biologia. È noto come nelle cellule vegetali si trovi CaCO_3 sotto forma di calcite, e ossalato di calcio come urtiavellite; come pure da carbonati di calcio sia formato l'esoscheletro dei molluschi e degli artropodi; complessi silicei si trovano cristallizzati in protoni radiolari, in spugne e diatomee, solfato di stronzio si trova come calcite nell'ecoscheletro dei radiolari. Alterazioni patologiche, infine, come la calcinosi, possono dar luogo alla formazione di vari tipi di cristalli inorganici (ossalati, apatiti, calcio-apatiti).

Sembra che carbonati di calcio e magnesio si trovino anche in bassa percentuale nel tessuto osseo, o come fase separata, o come apatiti carbonato, o come nei loro ioni adsorbiti sulla superficie del cristallo. Vi si troverebbe inoltre citrato di calcio e tracce di fluoro. Altri tipi di apatiti, oltre l'idrossiapatite, potrebbero essere presenti; sul fosfato ottocalcico $\text{Ca}_8\text{H}(\text{PO}_4)_6$ si è di recente ripreso la discussione (MAC GIBSON & BROWN, 1955).

La identificazione della tipica idrossiapatite nell'osso è un po' infirmata dal rapporto di un rapporto Ca/P più basso di quello esistente nell'idrossiapatite cristallina, e ciò particolarmente nell'animale giovane. Data l'estrema superficie rispetto al volume dei cristallini, si deve però ammettere che vi siano molti difetti nel cristallo, molta vacanza e sostituzioni ioniche. Si ritiene che l'acqua sia in qualche modo legata alla superficie di questi cristalli. È noto anche che da soluzioni che contengono ioni di calcio e apatite si forma una serie di precipitati colloidalii che hanno tutti la struttura dell'apatite e rapporti Ca/P che vanno da 1,2 a circa 2,0 (CARRINGTON, 1957); tra questi precipitati quelli con un basso rapporto Ca/P sono stabili solo in soluzioni acide, quelli con alto Ca/P solo in soluzioni alcaline. In soluzione neutra, solo la idrossiapatite rimane inalterata.

Le fotografie fatte da diversi A.A. al microscopio elettronico hanno messo in evidenza la forma dei cristallini che sono tipici dei tessuti ossei, e si presentano prevalentemente come piccoli aghi di circa 40 Å di diametro e lunghezza assai continua di Å (Tav. 1) e possono presentarsi con un orientamento preferenziale. La figura di diffrazione fatta al microscopio elettronico (nella Tav. 2) su una zona di cristallini prevalentemente orientati, corrisponde con la struttura degli anelli. L'imperfezione del reticolo cristallino.

La cella elementare dell'idrossiapatite, assai complessa, è un parallelepipedo a basi romboidali nel piano 001, $a = b = 9,43$ Å circa (Fig. 1); la terza dimensione è $c = 6,88$ Å. Si dice spesso che la struttura del cristallo è a

cella esagonale, intendendo la forma indicata in tratteggio nella stessa figura: sui vertici degli esagoni si trovano ioni Ca^{++} . Al microscopio elettronico si possono identificare aggetti fino a circa 10 \AA di sezione trasversa. È chiaro che, anche a prescindere dalle possibilità di scambi ionici dovuti alle condi-

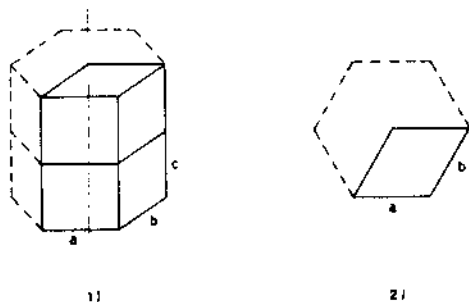


Fig. 1. — Forma cristallina dell'idrossiapatite: 1) formazione del cristallino allungato; 2) cella elementare. ($a = b = 9,43 \text{ \AA}$; $c = 6,88 \text{ \AA}$).

zioni particolari in cui si trovano questi cristallini, alle loro dimensioni il cristallo non può rispondere alle relazioni stechiometriche che si hanno in un cristallo di grandezza visibile, e neppure di dimensioni dell'ordine di 1 micron, cioè visibile all'ottico (dimensioni che sono già 10.000 volte quelle della cella elementare). Anzi si può dire che parlare di formula chimica non ha più senso, perchè il grande sviluppo di superficie creato da così minuti cristallini rende non più trascurabili le variazioni ioniche di superficie per eventuale sostituzione degli atomi di Ca con altri, per esempio, Mg, Sr, K, Na, ecc., o di gruppi fosfati con carbonati o citrati.

Del resto, anche nelle apatiti che si trovano in natura e che rispondono alla formula $\text{Ca}_5\text{R}(\text{PO}_4)_3$, dove R può essere F, Cl, OH, costituendo così le fluoro-cloro-idrossiapatiti, gli ioni F, Cl, OH possono sostituirsi a vicenda, ed è difficile avere i termini puri, mentre si trovano facilmente le loro miscele isomorfe. La grande diffusione che hanno questi cristalli in natura, nelle rocce e nelle sabbie, assicura la costante presenza, nel terreno, del fosforo che tanta importanza ha nella vita degli organismi.

L'osso, come è noto, non è un sistema inerte, ma incessantemente subisce processi di distruzione e ricostruzione attraverso i quali si rinnova di continuo; il minerale di calcio ha funzione, non solo di sostegno, ma anche di riserva di calcio. La concentrazione del calcio è infatti critica nel sangue dei vertebrati: nell'uomo normale varia tra 9 e 11 mg/100 ml, e un sistema di regolazione, che si ritiene comandato da ormoni paratiroidei, mobilita, quando occorre, il calcio del tessuto osseo. Fosfati di calcio sono, d'altra parte, sempre presenti nei liquidi extracellulari.

Il problema della deposizione e del riassorbimento del calcio nel tessuto osseo, e solo in quello, è legato alla conoscenza delle caratteristiche struttu-

rali, biochimiche e fisico-chimiche del substrato. Queste sono solo parzialmente note, malgrado l'enorme lavoro di ricerca fatto da qualche decennio in questo campo.

Strutturalmente, il tessuto osseo è un tessuto connettivo che è capace, a differenza degli altri tessuti connettivi, di fissare la fase solida del fosfato di calcio. È costituito di poche cellule, che si protendono in lunghi rami tra i molti fasci di fibrille collagene. Il collagene, infatti, costituisce in peso secco più del 90 % di tutta la matrice organica; la matrice organica è il 20-35 % del peso secco totale. Oltre il collagene, non tutto organizzato in fibrille (SCHMITT, 1959), si trovano nella matrice varie specie di mucopolisaccaridi, che sono composti formati da una proteina e un polisaccaride (SCHUBERT, 1964) e che costituiscono dall'1 al 5 % del peso secco. Sono presenti vari elettroliti; l'acqua si trova in quantità variabile a seconda della specie dell'animale, l'età, lo stato di nutrizione e il tipo di tessuto osseo.

Le fibrille collagene sono aggregati macromolecolari formati da lunghe catene di una proteina, il tropocollagene, affiancate a formare una struttura ordinata periodica. Il tropocollagene è costituito da tre catene polipeptidiche avvolte ad elica attorno a un asse comune e tenute assieme da legami idrogeno (SCHMITT, 1959; GLIMCHER, 1960). Ne risulta una macromolecola di 14 Å di sezione, lunga circa 3.000 Å, e di peso molecolare circa 300.000 (SCHMITT, 1959; PETRUSKA & HODGE, 1964), avente struttura periodica; il modello della struttura del tropocollagene, compatibile con i dati ottenuti dalle figure di diffrazione in raggi X, studi nell'infrarosso, dati analitici e fisico-chimici, è schematicamente quello riportato nella Fig. 2; il grande periodo è 28,6 Å (RICH & CRICK, 1955). Nelle sezioni di osso, là dove il materiale inorganico assai denso dà luogo a una sorta di contrasto negativo per quello organico, si può mettere in evidenza una struttura periodica in elementi allungati, della matrice che dovrebbero identificarsi (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965 a; b) con il tropocollagene. Nella Tav. 3 (*in alto*), per esempio, si vedono chiaramente strutture periodiche in elementi allungati che affiancano gli aghetti di apatite; il loro spessore massimo è 13-15 Å, il periodo circa 24 Å; tenuto conto delle possibili deformazioni del preparato, dovute in particolare ai trattamenti di disidratazione e inclusione, questi valori corrispondono bene a quelli ricavati da RICH & CRICK (1955) per il tropocollagene. È tuttavia da ricordare che, nel modello della molecola proposto come il più probabile da RICH & CRICK (1961) e perfezionato da Ramachandran e coll. (RAMACHANDRAN, 1962), la disposizione dei gruppi laterali che appartengono alle singole eliche sarebbe tale da simulare una suddivisione del periodo in tre parti. Il periodo apparente dovrebbe quindi essere circa 9 Å. Le sezioni trasverse delle molecole di tropocollagene possono essere osservate là dove il taglio della sezione è opportunamente orientato: si presenta spesso (Tav. 3, *in basso*), nel tessuto osseo, l'affiancamento di tre o quattro molecole

attorno ad un aghetto di idrossiapatite. Nella fibrilla queste molecole sono disposte, e legate lateralmente, in modo da dar luogo al periodo di 640 Å caratteristico delle fibrille collagene native (Tav. 4, a sinistra). Le fibrille collagene possono essere, in genere, facilmente disgregate (quelle dell'osso un po' meno facilmente delle altre) mediante trattamento con vari acidi diluiti o sali neutri: il tropocollagene passa in soluzione e, in appropriate condizioni fisico-chimiche, è possibile ricostituire le fibrille: il tropocollagene può riaggregarsi in fibrille identiche a quelle native, oppure in fibrille che presentano periodicità differenti.

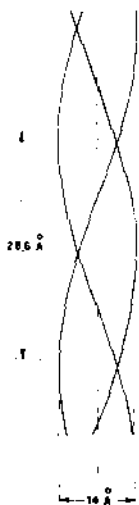


Fig. 2. — Schema della struttura della molecola del tropocollagene (RICH & CRICK 1955; 1961).

È generalmente riconosciuta la partecipazione del collagene al processo di precipitazione del fosfato di calcio. Infatti è stato provato che le fibrille collagene agiscono come centri di nucleazione per la precipitazione dell'idrossiapatite da una soluzione metastabile (FRANÇOIS, 1962; SOLOMONS, IRVING & NEUMAN, 1960); e ciò è stato ottenuto solo con fibrille aventi periodo 640 Å, native o ricostituite. L'asse lungo del cristallo risulta, dalle figure di diffrazione, parallelo all'asse longitudinale della fibrilla collagena su cui è depositato (GLIMCHER, 1959). Contro l'affermazione che occorra la presenza di fibrille collagene per la nucleazione dell'idrossiapatite sta però il fatto che esistono batteri, ben noti agli odontoiatri, che calcificano, formando aghetti di idrossiapatite (TAKAZOE, TACHENCHI & NAKAMURA, 1963), su una matrice organica, che non solo non contiene fibrille collagene, ma neppure è costituita da proteine di composizione in ammino-acidi simile al tropocollagene. Similmente, una deposizione di idrossiapatite si può avere sui flagelli di certe alghe unicellulari, il cui substrato contiene presumibilmente solo flagellina; e la deposizione appare del tutto simile a quella dell'osso fetale degli animali superiori e genericamente della cartilagine (SOGNNAES, 1958).

Si è visto, poi, che nell'uomo, in condizioni patologiche, si può avere una deposizione intracellulare di fosfato di calcio, che inizia nei mitocondri e si accresce poi, senza evidentemente la presenza di fibrille collagene (LAFFERTY, REYNOLDS & PEARSON, 1965). Una calcificazione metastatica nel rene si può ottenere sperimentalmente, somministrando al ratto paratormone (ENGFELDT *et al.*, 1958; GIACOMELLI, SPIRO & WIENER, 1964). La nucleazione avviene

nell'interno di corpi intracellulari ialini, che poi danno luogo a calcoli renali. Si deve quindi ammettere che la formazione di aghetti di apatite possa verificarsi in presenza di strutture diverse dal collagene: di molecole che avranno, forse, qualche aspetto strutturale in comune col tropocollagene (FAUTARD, 1966).

Ben poco si sa sulla funzione dei mucopolisaccaridi nel processo di ossificazione. Ancora nel 1964 SONEL ha postulato che, dato che la mineralizzazione avviene normalmente solo su certi tessuti connettivi, mentre una sufficiente concentrazione di ioni Ca^{++} e PO_4^{---} si trova in molti di essi (i quali tuttavia possono mineralizzare in condizioni patologiche, la pelle, per esempio), il tessuto osseo differisce dagli altri per la presenza di un «fattore locale»: questo è sembrato poi potersi identificare con un mucopolisaccaride [vedere in merito BELANGER (1954)].

È però da osservare che, anche se vogliamo ammettere che la calcificazione, per esempio, di un batterio, avvenga con la presenza di macromolecole che hanno strutturalmente qualcosa in comune col collagene, i fattori implicati nel processo devono essere abbastanza diversi; poiché, nel caso del batterio, la presenza di un polisaccaride non sembra affatto necessaria alla nucleazione (TAKAZOE, TACHENCHI & NAKAMURA, 1963).

Nel tessuto connettivo, come si è già accennato, il polisaccaride non è libero, ma è associato ad una proteina, che non è collagene: esiste, cioè, come proteopolisaccaride [le associazioni di molecole di importanza biologica con le proteine sono frequenti: sono tali, per esempio, le glicoproteine o le nucleoproteine (*)]. Le proteine sono, in genere, polielettroliti cationici, mentre i polisaccaridi sono polielettroliti anionici: essi portano molte cariche negative, poiché ne hanno almeno una, ma talvolta più di due, per ogni unità di disaccaride di cui è composta la catena (SCHUBERT, 1964). Essi sono perciò in genere associati ad un numero di cationi equivalenti alla loro carica totale, che in parte sono liberi nella soluzione e possono scambiarsi e in parte sono legati: quanto più alta è la loro valenza, tanto più sono legati. Le proteine si legano fortemente, mentre cationi di bassa valenza, come potassio, calcio, magnesio, sono in continuo scambio. Nella cartilagine, che è il precursore dell'osso, si è potuto stabilire che il polisaccaride più diffuso è il condroitintetrasolfato, e che questo è in combinazione con una proteina che costituisce circa il 15% del complesso. Questo insieme dà luogo a strutture molto ramificate, di peso molecolare $1-50 \cdot 10^6$, che conferiscono al liquido interfibrillare una elevata viscosità; queste sarebbero anche impigliate fra loro e impigliate alle fibrille collagene che non sono solubili in acqua. Le proprietà elastiche del tessuto sarebbero legate a questa configurazione, in quanto

(*) Non si conosce la natura di queste proteine né il tipo di legame.

sarebbero dovute alla possibilità, da parte del polisaccaride, di trattenere molecole di acqua (SCHUBERT, 1964). Ciò, malgrado che i polisaccaridi siano presenti in così bassa percentuale.

È stata fatta l'ipotesi (GLIMCHER, 1960) che i gruppi proteina-polisaccaride, attraverso un giuoco di polimerizzazione e depolimerizzazione, trattengano e rispettivamente rilascino gli ioni Ca^{++} , costituendo così il meccanismo di regolazione della mineralizzazione dell'osso. Non vi sono dati sperimentali che confermino questa ipotesi, benchè sia certo, anche da estese ricerche fatte con radioisotopi (AMPRINO, 1955) che il condroitinsolfato è strettamente legato al processo di ossificazione. Si può ricordare che, mentre vi sono dati per ritenere che ormoni paratiroidi, o controllati dalla paratiroide, regolino l'equilibrio dinamico tra il minerale dell'osso e la sua soluzione ionica, è noto anche che l'ormone tiroideo favorisce la formazione del condroitinsolfato, per lo meno in alcuni tessuti (DZIEWIATOWSKY, 1964), mentre deprime quella del collagene (ROBERTSON, 1964). Alcuni AA. ritengono che la regolazione degli ioni Ca^{++} e PO_4^{--} possa essere semplicemente spiegata in base alle condizioni fisico-chimiche locali (MAC GREGOR & BROWN, 1965). Completamente diversa sarebbe l'azione dell'estrogeno che, iniettato negli uccelli, promuove la deposizione di minerale di riserva per la formazione dell'uovo, in quanto esso eccita la formazione del collagene (ROBERTSON, 1964).

LA GERMINAZIONE DEL CRISTALLO DI IDROSSIAPATITE E LE FIBRILLE COLLAGENE

Sono ormai classiche, ma sempre molto discusse, le esperienze di GLIMCHER (1959) sulla nucleazione del collagene *in vitro*. Esse dimostravano che fibrille di collagene ricostituite, preparate da tessuti normalmente non calcificati — quali il tendine della coda del topo, la pelle del vitello o della cavia, la vescica natatoria dei pesci — potevano costituire centri di cristallizzazione di soluzioni metastabili di fosfato di calcio, purchè fossero del tipo del collagene nativo, fossero cioè ricostituite col periodo di 640 Å. Le fotografie al microscopio elettronico mostravano una distribuzione regolare e periodica di granuli del minerale di calcio sulle fibrille, all'inizio della calcificazione. L'esperienza non riusciva, tuttavia, se il collagene veniva preso dall'osso; e l'insuccesso fu attribuito alla possibile presenza di legami laterali. Sul collagene nativo dell'osso decalcificato, inoltre, la cristallizzazione avveniva, ma con maggior difficoltà che sul collagene ricostituito, il che venne giustificato con le probabili alterazioni della fibrilla dovute al processo di decalcificazione. La figura di diffrazione mostrava che questi cristallini non avevano un orientamento preferenziale come quelli nativi; e in realtà le immagini al microscopio elettronico li mostrano di forma del tutto diversa dagli aghetti

della Tav. 1: essi appaiono infatti come granuli tondeggianti che arrivano fino a 200-300 Å di diametro.

Secondo la nostra esperienza, basata sulla ricerca di centri di nucleazione su tessuti differenti in via di ossificazione, l'idrossiapatite nativa non forma mai granuli tondeggianti, neppure quando sembra precipitare senza la presenza di un supporto organico strutturalmente definito. Un esempio è dato dalla Tav. 4 (a destra). In questo caso (osso follicolinico) la matrice su cui il minerale è depositato non sembra avere una struttura ordinata (ASCENZI, FRANCON & STEVE BOCCIARELLI, 1963): la zona corrisponde a un fronte di ossificazione. È chiaro che i più piccoli cristallini del sale di calcio che si possono qui identificare sono granelli di non più di qualche decina di angstrom di diametro, ai quali si affiancano altri granelli; e la struttura si completa formando sempre degli aghetti, sia pure di solo qualche decina di angstrom di lunghezza; ma mai dei grossi granuli tondeggianti.

Sempre dall'osso follicolinico, possiamo prendere come esempio la prima deposizione del minerale in zone in cui è riconoscibile la giacitura di fibrille collagene, come nella Tav. 5. La sezione non è colorata, perchè la colorazione delle fibrille implica la distruzione, o per lo meno l'alterazione, dei cristallini di apatite. Le fibrille sono tuttavia riconoscibili come ombre allungate, ed è chiaro che i cristallini vanno formandosi lungo di esse. È evidente che alla prima apparizione di granuli non segue mai un ispessimento, ma solo un allungamento della struttura cristallina.

Altro esempio può essere preso da sezioni di teca cranica di ratto neonato (19° giorno di gestazione), fissata in OsO_4 1%, tampona Palade, pH 7,4 e inclusa in metacrilati (Tav. 6). L'osservazione si ripete identica. Questo ultimo esempio non concorda con le osservazioni fatte sull'osso embrionale di uccello da FITTON JACKSON (1957). Come nella esperienza di GLIMCHER (1959), infatti, appaiono in questo caso lungo le fibrille grossi granuli sferici (100-200 Å di diametro), disposti lungo le bande chiare del collagene. Il preparato è fissato in OsO_4 1%, in soluzione di Tyrode, aggiustata a pH 9,2 con bicarbonato di sodio, e inclusa in metacrilati. Non è impossibile che alterazioni del preparato dovute a effetti di ricristallizzazione possano essere responsabili di risultati di questo tipo (DUDLEY & SPIRO, 1961).

Iniziata la nucleazione, è da chiedersi la ragione per cui l'accrescimento dell'idrossiapatite dell'osso avviene prevalentemente in un senso. Le apatiti note in mineralogia costituiscono cristalli che si accrescono nelle tre direzioni dei loro assi cristallini, anche se spesso danno forme tabulari o allungate; se ciò non succede nelle apatiti biologiche, è da pensare che l'accrescimento sia per esse limitato da condizioni ambientali. Esiste, d'altra parte, un caso di tessuto biologico mineralizzato in cui l'idrossiapatite non forma aghetti, ma piccole placche: questo è lo smalto dei denti. È assai più duro dell'osso, contenendo solo il 3% di sostanza organica. Il substrato organico non è

più connettivo, ma una matrice organica che proviene da un processo di secrezione delle cellule dell'epitelio degli amenoblasti, ed è costituito da proteine fibrose che non sono più collagene, ma — sembra — una cheratina (la struttura delle cheratine è poco nota) e si presentano come sottili filamenti, di 48 Å di sezione, per lo più accoppiati in doppietti (separazione 120 Å), legati lateralmente a formare una struttura reticolare. Gli spazi interfibrillari contengono mucopolisaccaridi. I cristalli di idrossiapatite hanno la forma di piastrine, che in media sono lunghe 1300 Å, larghe 400 e spesse 19 (TRAVIS & GLIMCHER, 1964). L'asse lungo del cristallo risulta parallelo al lato lungo delle fibrille della matrice. L'accrescimento dei cristalli è graduale, sia in spessore, sia in larghezza.

Le fibrille di cheratina costituiscono un tessuto assai rado, entro il quale trovano posto i larghi cristalli. Nel tessuto osseo, in cui la matrice organica è in quantità dieci volte maggiore, non può esservi altrettanto spazio; anzi il collagene è tanto che si può fare la ipotesi che in esso ogni aghetto di idrossiapatite si trovi circondato da collagene.

Questa ipotesi è confortata dall'osservazione al microscopio elettronico di sezioni sottili. Infatti, non solo nell'osso follicolinico, come nella Tav. 7, *in alto*, si può notare che al minerale è sempre adiacente un materiale di bassa densità, ma anche (Tav. 7 *in basso*), nell'osteone in fase finale di calcificazione; cioè in un tessuto che contiene la massima quantità di calcio, su una matrice che contiene solo il 4 % di mucopolisaccaridi, quindi è in pratica tutto collagene. Dobbiamo concludere che ciò che circonda ogni aghetto di idrossiapatite è collagene. Nelle sezioni di osso osservate al microscopio elettronico, là dove l'aghetto si presenta in sezione trasversa, esso appare come un punto nero circondato da materiale di bassa densità: questo costituisce spesso un piccolo quadrilatero (v. anche Tav. 3, *in basso*). Le dimensioni trasversali dell'aghetto sono circa 40 Å. Se si pensa che lo spessore della sezione non può essere inferiore a qualche centinaio di angstrom, è evidente che, quando l'aghetto appare come un puntino nero, esso e il collagene che lo affianca devono essere disposti normalmente al piano di taglio e attraversare tutta la sezione. Le dimensioni trasversali dell'aghetto suggeriscono che esso non possa essere costituito da più di quattro celle elementari, in larghezza. In lunghezza, invece, possono allinearsi parecchie centinaia di celle. Se è vero che ogni aghetto è circondato da collagene, ne viene di conseguenza che gli aghi che appaiono, nelle zone di maggior densità, di spessore superiore a circa 40 Å sono in realtà la sovrapposizione, nell'immagine, di aghi più sottili che si trovano nello spessore della sezione. Se la parte organica non fosse così intramezzata agli aghi, non vedremmo mai, nell'immagine di una sezione spessa qualche centinaio di angstrom, dei cristallini singoli spessi 40 Å.

Il problema che sorge ora è se è proprio vero che la formazione dei cristallini nei vertebrati, e in condizioni non patologiche, avviene solo sulle

fibrille collagene aventi periodo 640 Å. Le osservazioni sull'osso follicolinico sembrano testimoniare che non è necessaria una così elevata organizzazione della matrice organica. L'osso follicolinico, infatti, viene deposto su una matrice abbastanza disorganizzata, anche se contiene un certo numero di fibrille collagene. Le sezioni di osso follicolinico osservate al microscopio elettronico mostrano, accanto alle fibrille collagene, larghe zone contenenti un materiale spugnoso, che non è impossibile sia costituito, se non da mucopolisaccaridi che sono qui in gran quantità (il 40%), per lo meno da collagene frammentato ed essi, non organizzato in fibrille. Un esempio di questo substrato è dato dalla Tav. 8, in cui le fibrille collagene appaiono tagliate pressoché trasversalmente, e dalla Tav. 9, in cui appaiono longitudinalmente. Il notevole disordine nel quale si presenta l'ossificazione su questo tessuto e il fatto che spesso si presenta in zone in cui chiaramente non mostra preferenza per le fibrille collagene (Tav. 10) fa ritenere che essa non sia legata alla ordinata struttura di una fibrilla a periodo 640 Å.

Altrettanto si può dire per quanto riguarda l'ossificazione della teca cranica di ratto; abbiamo già visto, nella Tav. 6, una zona in via di calcificazione. Le fibrille collagene, chiaramente riconoscibili nella sezione, sembrano costituire una tessitura piuttosto rada, dato che lo spessore della sezione è all'incirca uguale allo spessore della fibrilla collagena. Tra di esse appaiono zone calcificate, che sembrano disporre in vani tra le fibrille piuttosto che lungo le fibrille. Analogo dato si ricava dalla Tav. 11, ottenuta da una sezione del fronte di mineralizzazione dell'orletto osteoide, nella quale numerose fibrille collagene appaiono in sezione trasversa: sebbene su alcune di esse si inizi chiaramente la calcificazione, molti centri di cristallizzazione si trovano disseminati ovunque. Questi risultati sono in accordo con quanto è noto già da molti anni sulla cartilagine dell'epifisi: nella cartilagine che calcifica, la maggioranza dei cristallini non è orientata come le fibrille collagene (GLIMCHER, 1960).

Si arriva quindi alla conclusione che una organizzazione rigorosamente ordinata delle molecole di tropocollagene non sembra essere necessaria per la germinazione dell'idrossiapatite.

MUCOPOLISACCARIDI E FIBRILLE COLLAGENE

Abbiamo già detto che i mucopolisaccaridi o i complessi proteina-polisaccaride, che si trovano in grande abbondanza nella cartilagine, sono in bassa percentuale nel tessuto osseo. Ed è stato provato (come è riportato, per esempio, da GLIMCHER nel suo articolo *Organic matrices in mineralization*, 1960) che essi vanno man mano scomparendo col procedere dell'ossificazione; cosicché è stata fatta l'ipotesi che la loro rimozione, non la loro presenza, sia necessaria affinché la calcificazione avvenga. Si conosce ben

poco sulla natura di questi composti, cosicché i dati sperimentali, ottenuti su qualcuno di essi o sui polisaccaridi liberi, anche se hanno fatto progredire le nostre conoscenze su questi grossi polielettroliti, non sono sufficienti per discutere alcune ipotesi, non solo sulla loro partecipazione al processo di calcificazione, ma neppure sulla loro eventuale associazione al collagene. L'osservazione di tessuti colorati con coloranti specifici e osservati al microscopio ottico ha mostrato che vi è una perdita di sostanza fondamentale, in particolare di solfato organico, durante la calcificazione. La ipotesi che ai polisaccaridi possano essere legati ioni Ca^{++} , i quali verrebbero lasciati liberi di formare idrossiapatite in seguito a depolimerizzazione del polielettrolita, suffragata da alcuni dati chimici, è difficilmente controllabile con prove dirette.

Abbiamo fatto alcuni tentativi per ottenere per mezzo del microscopio elettronico qualche indicazione sulla presenza dei mucopolisaccaridi nel tessuto osseo. Da questi si può ricavare qualche dato, che, anche se non è ancora confermato da prove istochimiche, può essere tuttavia considerato come un contributo alla discussione del problema. Questi dati sperimentali sono ottenuti dallo studio dell'orletto osteoide.

Quando l'osteone è in formazione, viene deposta in un primo tempo la matrice organica, e su di essa avviene bruscamente la calcificazione. La deposizione, e la conseguente calcificazione, avviene a strati, a partire dal margine esterno della cavità (CARETTO, 1959); l'osteone in formazione può presentare un sottile (circa $2 \cdot 10^{-3}$ mm) orletto interno neodeposto non ancora calcificato: questo si chiama orletto osteoide.

Al microscopio elettronico (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965 a; b) quest'orletto appare composto principalmente da fibrille collagene raggruppate in fasci con orientazioni differenti, disposti a formare grossolanamente strati concentrici attorno al bordo interno dell'orletto. Di questo bordo fanno parte alcune cellule, che si presentano pressoché uniformemente opache agli elettroni, siano esse fissate in sola formalina 10 %, o in glutaraldeide e OsO_4 , o solo alcool, o subacetato di Pb, e siano o no colorate (con acetato di uranile o con PTA). Vi si distinguono tuttavia chiaramente il nucleo e l'ergastoplasma ricco di ribosomi, e i mitocondri, anche se le cristae non sono ben definite. Da queste cellule sembra che si partano delle fibrille collagene, in quanto il bordo cellulare non è ben definito. Adiacente alle cellule è spesso uno strato di materiale spugnoso, che ricorda, nel suo aspetto, quello già osservato nel substrato organico dell'osso follicolinico (Tav. 8 e 9), e che abbiamo trovato integro solo in alcuni preparati fissati in alcool. Al di là di questo vi è solo la distesa delle fibrille collagene, sulle quali appare, a distanza di circa 20 micron dalla cellula, a piccoli aghi e poi a piccoli gruppi di aghi, l'idrossiapatite.

Nell'orletto osteoide, il fronte di calcificazione si presenta a notevole distanza dalle cellule che producono il tropocollagene, e dove questo è già

organizzato in fibrille di 800-1000 Å di diametro. Le fibrille, come mostra la Tav. 12, occupano quasi completamente il substrato: la colorazione con acido fosfotungstico mette in evidenza le bande del collagene e un materiale filiforme, tra e sopra le fibrille nella parte non calcificata, che non compare nella parte calcificata, dove appaiono invece i vani lasciati dagli aghi di idrossiapatite che si sono sciolti per l'azione del PTA e sono stati portati via dai successivi lavaggi.

Negli interstizi tra le fibrille che vanno calcificandosi deve trovarsi un materiale che permette il trasporto di ioni e favorisce la deposizione del calcio. Esso dovrebbe contenere i mucopolisaccaridi. È vero che, con le normali fissazioni in aldeidi e OsO₄, in soluzione acquosa, i mucopolisaccaridi dovrebbero restare in soluzione, e quindi venire eliminati nei successivi passaggi; ma è anche vero che, se il mucopolisaccaride è un complesso costituito da un polisaccaride fortemente legato a una proteina, esso potrebbe venire preservato da qualsiasi buon fissatore della proteina stessa. D'altra parte, un tentativo di fissazione al subacetato di Pb, che dovrebbe preservare, colorando contemporaneamente, i polisaccaridi, ha mostrato le fibrille collagene della parte non calcificata rivestite di un materiale denso, nel quale è da riconoscere la colorazione al Pb.

Se, nella parte non calcificata, tra le fibrille sono presenti soltanto o prevalentemente i mucopolisaccaridi, si deve ammettere che la loro presenza non è più necessaria quando il primo processo di calcificazione è avvenuto. Essi quindi non contribuirebbero al successivo accrescimento del minerale di calcio.

La bassa percentuale di mucopolisaccaridi ottenuta dai dati chimici sarebbe in accordo con queste osservazioni.

CALCIFICAZIONE DELLE FIBRILLE COLLAGENE

La calcificazione, nell'orletto osteoide, appare — come abbiamo detto — là dove le fibrille sono già formate, ma la fibrilla non costituisce solo un supporto utile, in quanto fornisce un sostegno che ha determinate proprietà di elasticità, permeabilità, ecc. La costituzione molecolare della fibrilla interviene nelle modalità di deposizione del minerale. Ciò si può affermare in base alle osservazioni al microscopio elettronico sulle fibrille calcificate. Si osserva infatti che su di esse la deposizione del minerale si presenta sotto due aspetti diversi (ASCENZI, BONUCCI & STEVE BOCCIARELLI, 1965 a, b; 1966) (Tav. 13). Il primo dà luogo, lungo la fibrilla, a bande trasversali, di poco meno di 400 Å di ampiezza, separate da interbande di circa 250 Å (i limiti delle bande non sono così definiti da consentire misure precise). L'insieme di una banda e una interbanda copre quindi, entro gli errori di misura, l'ampiezza di un periodo della fibrilla.

Il secondo tipo di calcificazione dà luogo a sottili aghi, che sono l'aspetto più noto e vistoso della calcificazione dell'osso: essi si trovano preferibilmente paralleli all'asse longitudinale della fibrilla, si partono spesso dall'inizio della banda densa, ma, allo stadio iniziale della calcificazione (che contiene circa il 70 % del calcio che si troverà a calcificazione completa), essi sono in buona parte già formati. Negli stadi successivi si accrescono in numero e in larghezza, fondendo in cristallini che si prolungano per più bande, fino a tre o quattro.

Che si tratti di due tipi di calcificazione differenti appare chiaro dalle fotografie ottenute eliminando la parte organica dell'osso (Tav. 1). Infatti in esse si trovano, dissociati dal trattamento, non solo i piccoli agbi liberi, ma anche delle sottili placche, di densità uniforme e inferiore a quella degli aghi; queste, dato il loro aspetto e le loro dimensioni, devono ritenersi librate da quelle che abbiamo chiamato le zone dense delle fibrille calcificate. Le figure di diffrazione fatte su zone di tessuto osseo che apparivano, nelle sezioni ultrasottili, particolarmente povere di aghi, e dove quindi era quasi esclusivamente presente la calcificazione a placche, non differiscono da quelle che si ottengono da zone coperte di cristallini aghiformi e non isorientati. Qualcuna di queste placche appare con un accenno a forma poligonale, presentando al margine un angolo di circa 120° ; anche volendo ammettere qualche processo di riassetamento dell'edificio cristallino dopo l'eliminazione della parte organica, questo aspetto conferma l'ipotesi che si tratti di una seconda forma di cristallizzazione dell'idrossiapatite.

Questo tipo di cristallizzazione a zone sembra richiedere la presenza della fibrilla collagena per verificarsi. Infatti non compare, come si è visto, nella teca cranica o nell'osso follicolinico dove le fibrille sono dissociate, nè nella sostanza cementante interlamellare. Essa richiederebbe, quindi, una certa organizzazione nel substrato, una disposizione particolare delle molecole di tropocollagene. A questo proposito si può ricordare che la formazione dei larghi cristalli che costituiscono lo smalto dei denti avviene parimenti sopra un substrato di lunghe molecole orientate: sono proteine fibrose, aggregate a costituire fibrille sottili, le quali si legano a formare un caratteristico reticolo a lunghe maglie.

Il fatto che le zone dense nelle fibrille collagene sono alternate a zone ove questo tipo di calcificazione sembra non poter avvenire deve essere messo in relazione con la costituzione delle fibrille stesse.

Le ben note immagini di fibrille collagene libere ottenute dalla microscopia elettronica mostrano, lungo le fibrille stesse, bande trasversali, che in contrasto negativo appaiono alternativamente chiare e scure. Sono state fatte varie ipotesi sullo stato di aggregazione delle singole molecole di tropocollagene a formare le fibrille, per spiegare l'esistenza di queste bande, che si presentano, dopo colorazione con acido fosfotungstico, suddivise in carat-

teristiche sotto bande (Tav. 4, *a sinistra*). Recentemente GRANT, HORNE & COX (1965) hanno fatto uno studio accurato di questa struttura: da questo risulta che le due zone, l'una chiara che essi hanno chiamato A, l'altra scura (dove cioè penetra il mezzo di contrasto), chiamata B, hanno rispettivamente spessore 275 e 365 Å. Nella zona A, le molecole di tropocollagene appaiono saldamente unite da legami laterali; nella zona B, invece, esse appaiono poco legate, tanto poco che due vicine possono addirittura permutare le reciproche posizioni.

La collagenasi digerisce rapidamente la zona B, mentre altera poco la zona A. La molecola di tropocollagene, lunga circa 3000 Å, si distende su circa quattro periodi. GRANT, HORNE & COX (1965) dimostrano che, se si suppone che questa molecola sia costituita da cinque zone, ciascuna di 275 Å di ampiezza, capaci di formare facilmente legami laterali, alternate a quattro zone di 365 Å di ampiezza in cui tali legami non si formano, il periodo di 640 Å si può ottenere ammettendo che l'aggregazione di tali molecole avvenga a caso. Questa ipotesi è in aperto contrasto con quella finora accettata (HODGE & PETRUSKA, 1963) di una disposizione delle molecole a file parallele, sfasate, ciascuna rispetto alle vicine, di un quarto della lunghezza della molecola. Questa costruzione, peraltro, è geometricamente impossibile se è considerata in tre dimensioni, e può essere accettata solo per strati coassiali alla fibrilla (SMITH, 1965).

Sulla base dello schema di GRANT, HORNE & COX (1965), la nostra osservazione sulle zone dense nella calcificazione delle fibrille collagene si spiegherebbe con la formazione del deposito a placche nella zona B, cioè dove, essendo scarsi i legami laterali tra le molecole, il cristallo avrebbe possibilità di estendersi entro tutta l'ampiezza della banda.

L'inizio della formazione degli aghi a partire dall'estremo di queste stesse zone dovrebbe ascrivarsi a particolarità della struttura del tropocollagene: forse alla presenza di gruppi laterali NH_3^+ della lisina e idrolisina (FRANÇOIS, 1962). L'aghetto di idrossiapatite, una volta iniziata la nucleazione, crescerebbe poi in lunghezza, penetrando anche la banda A.

Bisogna infine ricordare che è stato anche dimostrato (NEMETSCHEK & GANSELM, 1961) che la penetrazione di elettroliti può produrre un rigonfiamento o un rattrappimento della fibrilla collagena, con conseguente disintegrazione ed eventuale riaggregazione della fibrilla stessa: ciò porta a ritenere che il tropocollagene possa dar luogo a configurazioni non stabili, anche se in equilibrio chimico con l'ambiente circostante. Le osservazioni che noi facciamo al microscopio elettronico sulla calcificazione delle fibrille costituite potrebbero quindi essere relative, per quanto riguarda in particolare la disposizione degli aghi, a condizioni del tutto transitorie.

Ringrazio gli amici, in particolare il prof. R. Amprino, che hanno voluto leggere, criticare, rivedere questo lavoro, e i tecnici del Reparto di Microscopia Elettronica G. Arancia, L. Crateri, F. Rosati-Valente, F. Tangucci, alla cui abilità e interessamento al lavoro devo la parte sperimentale.

23 novembre 1966.

BIBLIOGRAFIA

- AMPRINO, R., 1961. Rinnovamento del tessuto osseo studiato autoradiograficamente. *IV Congresso nucleare. 1° Simposio Europeo. Le tecniche autoradiografiche nelle scienze mediche*, Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare, p. 1-22.
- AMPRINO, R., 1955. Autographic research on the ^{35}S -sulphate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth. *Acta Anat.*, **24**, 121-163.
- ASCENZI, A., E. BONUCCI & D. STEVE BOCCIARELLI, 1965a. An Electron Microscope Study of Osteon Calcification. *J. Ultrastruct. Res.*, **12**, 287-303.
- ASCENZI, A., E. BONUCCI & D. STEVE BOCCIARELLI, 1965b. Etude au microscope électronique de la matrice ossifiable. *Symposium sur l'ostéomalacie*, Artigny, 1965, Masson, Parigi.
- ASCENZI, A., E. BONUCCI & D. STEVE BOCCIARELLI, 1966. An Electron Microscope Study on Primary Periosteal Bone. *J. Ultrastruct. Res.*, (In corso di stampa).
- ASCENZI, A., C. FRANÇOIS e D. STEVE BOCCIARELLI, 1963. On the Bone Induced by Estrogens in Birds. *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 491-505.
- BALE, W. F., 1940. A Comparative Roentgen-Ray^x Diffraction Study of Several Natural Apatites and the Apatite-Like Constituent of Bone and Tooth Substance. *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy*, **43**, 735-747.
- BELANGER, L. F., 1954. Discussione lavoro SOBEL A. E. (1954).
- CARETTO, L., 1959. Contributo allo studio della matrice ossea neodeposta. *Arch. Putti*, **10**, 211-230.
- CARLSTROM, D., 1955. X-Ray Crystallographic Studies on Apatites and Calcified Structures. *Acta Radiol., Suppl.*, **121**, 7-59.
- DUDLEY, H. R. & D. SPIRO, 1961. The Fine Structure of Bone Cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 627-649.
- DZIEWIATOSKY, D., 1964. Effect of Hormone on the Turnover of Polysaccharides in Connective Tissues. *Biophys. J.*, **4**, 215-138.
- ENGFELDT, B., S. GARDELL, J. HELLSTROM, B. INEMARK, J. RHODIN & J. STRANDH, 1958. Effect of Experimentally Induced Hyperparathyroidism on Renal Function and Structure. *Acta Endocrinol.*, **29**, 5-26.
- FITTON JACKSON, S., 1957. The Fine Structure of Developing Bone in the Embryonic Fowl. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **146**, 270-280.
- FLEISCH, H., H. J. J. BLACKWOOD & M. OWEN, Eds., 1965. *Calcified Tissues 1965*. Third European Symposium on Calcified Tissues, Davos. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1966.
- FRANÇOIS, C., 1962. L'association moléculaire fibres collagènes-cristaux d'apatite et les fonctions biochimiques des cellules osseuses dans les théories actuelles de la calcification. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **25**, 473-486.
- GIACOMELLI, F., D. SPIRO & J. WIENER, 1964. A Study of Metastatic Renal Calcification at the Cellular Level. *Cell. Biol.*, **22**, 189-206.
- GLIMCHER, M. J., 1959. Molecular Biology of Mineralized Tissues with Particular Reference to Bone. *Rev. Mod. Phys.*, **31**, 359-393.

- GLIMCHER, M. J., 1960. Specificity of the Molecular Structure of Organic Matrices in Mineralization. In: *Calcification in Biological Systems*, American Association for the Advancement of Science.
- GLIMCHER, M. J., E. J. DANIEL, D. F. TRAVIS & S. KAMHI, 1965. Electron Optical and X-Ray Diffraction Studies of the Organization of the Inorganic Crystals in Embryonic Bovine Enamel. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.*, 7, 1-77.
- GRANT, R. A., R. W. HONEY & R. W. COX, 1965. New Model for the Tropocollagen Macromolecule and Its Mode of Aggregation. *Nature*, 207, 822-826.
- HODGE, A. I. & J. A. PETRUZZA, 1965. Electron Microscopy of Collagen. In: *Aspects of Protein Structure*, G. N. Ramachandran, Ed., Academic Press, New York, p. 289-308.
- LAFVERTY, F. W., E. S. REYNOLDS & O. H. FRANKEN, 1963. Tumoral Calcinosi, A Metabolic Disease of Osseous Etiology. *Ann. J. Med.*, 35, 105-118.
- MAC GIBSON, J. & W. E. BROWN, 1965. Blood: Bone Equilibrium in Calcium Homeostasis. *Nature*, 207, 358-361.
- MAC LEAN, F. C. & A. M. BURT, 1964. *Radiation, Isotopes and Bone*. Academic Press, New York.
- MELLORE, H. G., 1964. Electron Probe Microanalysis. I. Calcium and Phosphorus in Normal Human Cortical Bone. *Lab. Invest.*, 12, 183-193.
- NEMETSCHNEK, R. & H. GANGLER, 1964. Quellung von Kollagen. Reaktionen mit anorganischen und organischen Kationen. *Z. Naturforsch.*, 19b, 496-509.
- ONCLEY, J. E., 1969. *Biophysical Sciences. A Study Program Reviews of Modern Physics*, J. Wiley & Sons Inc., New York.
- PAUTARD, F. G. K., 1965. A Hemolysate Survey of Calcification in Calcified Tissues. In: *Calcified Tissues 1965*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1966, p. 102-122.
- PETRUZZA, J. A. & A. J. RICHES, 1964. A Subunit Model for the Tropocollagen Macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 51, 871-876.
- RAMACHANDRAN, G. N., 1963. *Collagen*, J. Wiley & Sons, New York.
- RAMACHANDRAN, G. N., Ed. 1964. *Aspects of Protein Structure*. Madras Symposium, 1963. Acad. Press, New York, p. 39-53.
- RICH, A. & F. H. CRICK, 1956. The Structure of Collagen. *Nature*, 176, 915.
- RICH, A. & F. H. CRICK, 1961. The Molecular Structure of Collagen. *J. Mol. Biol.*, 3, 423-503.
- ROBERTSON VAN, B. W., 1964. Metabolism of Collagen in Mammalian Tissues. *Biophys. J.*, 4, 93-102.
- SCHMIDT, F. O., 1959. Interaction Properties of Elongate Protein Macromolecules with Particulate Reference to Collagen. *Rev. Mod. Phys.*, 31, 349-352.
- SCHUBERT, M., 1964. Intercellular Macromolecules containing Polysaccharides. *Biophys. J.*, 4, 119-130.
- SMITH, J. W., 1964. Packing Arrangement of Tropocollagen Molecules. *Nature*, 208, 356-358.
- SOBER, A. E., 1954. Local Factors in the Mechanism of Calcification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60, 712-732.
- SOGNINAR, H. F., Ed. 1958. *Calcification in Biological Systems*. Washington Meeting of the American Association for the Advancement of Science, p. 165-202.
- SOLOMONS, C. C., J. T. IRVING & W. F. NEUMAN, 1962. Calcification of the Dentin Matrix. In: *Calcification in Biological Systems*. Washington Meeting of the American Association for the Advancement of Science, p. 203-216.
- STRANDE, T., 1960. Microchemical Studies on Single Haversian Systems. *Exptl. Cell. Res.*, 19, 515-523.
- TAKAROM, I., T. TAGENCHI & T. NAKAMURA, 1963. A Chemical Investigation of the Intracellular Calcification of *Bacterionema matruchotii*. *Bull. Tokyo Dental Coll.*, 4, 61-75.

- TRAUTZ, O. R., 1954. X-Ray Diffraction of Biological and Synthetic Apatites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **60**, 661-712.
- TRAVIS, D. F. & M. J. GLIMCHER, 1964. The Structure and Organization of, and the Relationship between, the Organic Matrix and the Inorganic Crystals of Embryonic Bovine Enamel. *J. Cell. Biol.*, **23**, 447-497.
- WHIPPLE, H. E., 1963. Comparative Biology of Calcified Tissue. *Ann. New York Acad. Sci.*, **109**, 1-410.

Tav. I. — Sezione di osteone calcificato al 70 %, privo di sostanza organica; inclusione in metacrilati. La cristallizzazione avviene in piccoli aghi di circa 40 Å di sezione trasversa; tra e sotto di essi appaiono placche assai meno dense.

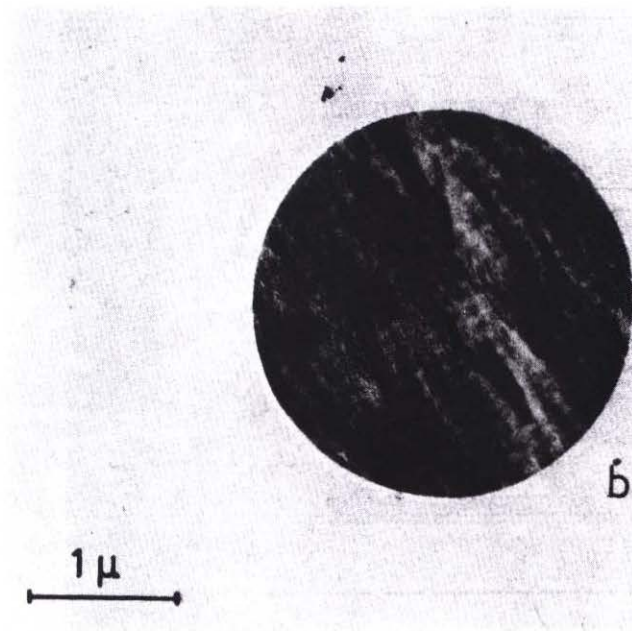
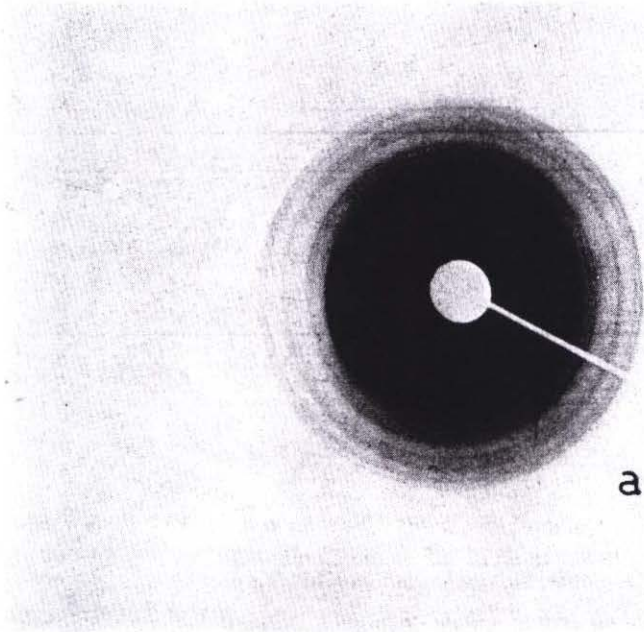
TAV. I



Tav. 2. — a) Figura di diffrazione ottenuta nel campo b).

b) Sezione di osteone calcificato al 100 %, zona scelta di cristallini isorientati.

TAV. 2



Tav. 3 (*In alto*). — Sezione di orletto osteoide; inclusione in araldite. I fili chiari del collagene sono inframezzati agli aghetti di idrossiapatite; ove giacciono longitudinalmente, essi mostrano una struttura periodica.

(*In basso*). — Sezione di osteone calcificato al 70 $\frac{0}{0}$. Ove il taglio è trasversale rispetto alla giacitura degli aghetti, si osserva l'affiancamento di 3 o 4 molecole di tropocollagene attorno ad un aghetto di idrossiapatite (freccia).

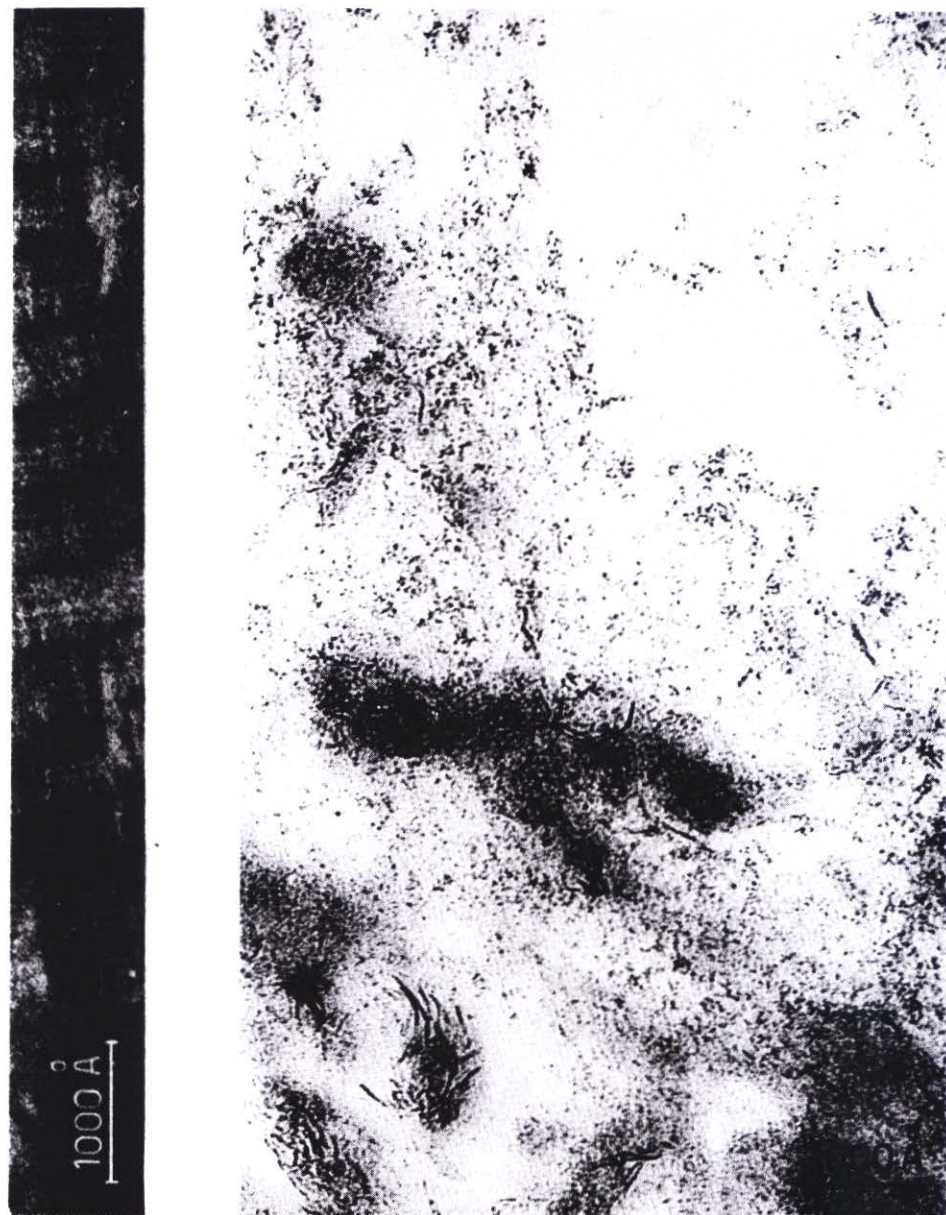
TAV. 3



Tav. 4 (*A sinistra*). — Fibrilla collagena decalcificata (con acido tetra-acetico della etilendiammina) e colorata con acido fosfotungstico. È evidente il periodo di 640 Å.

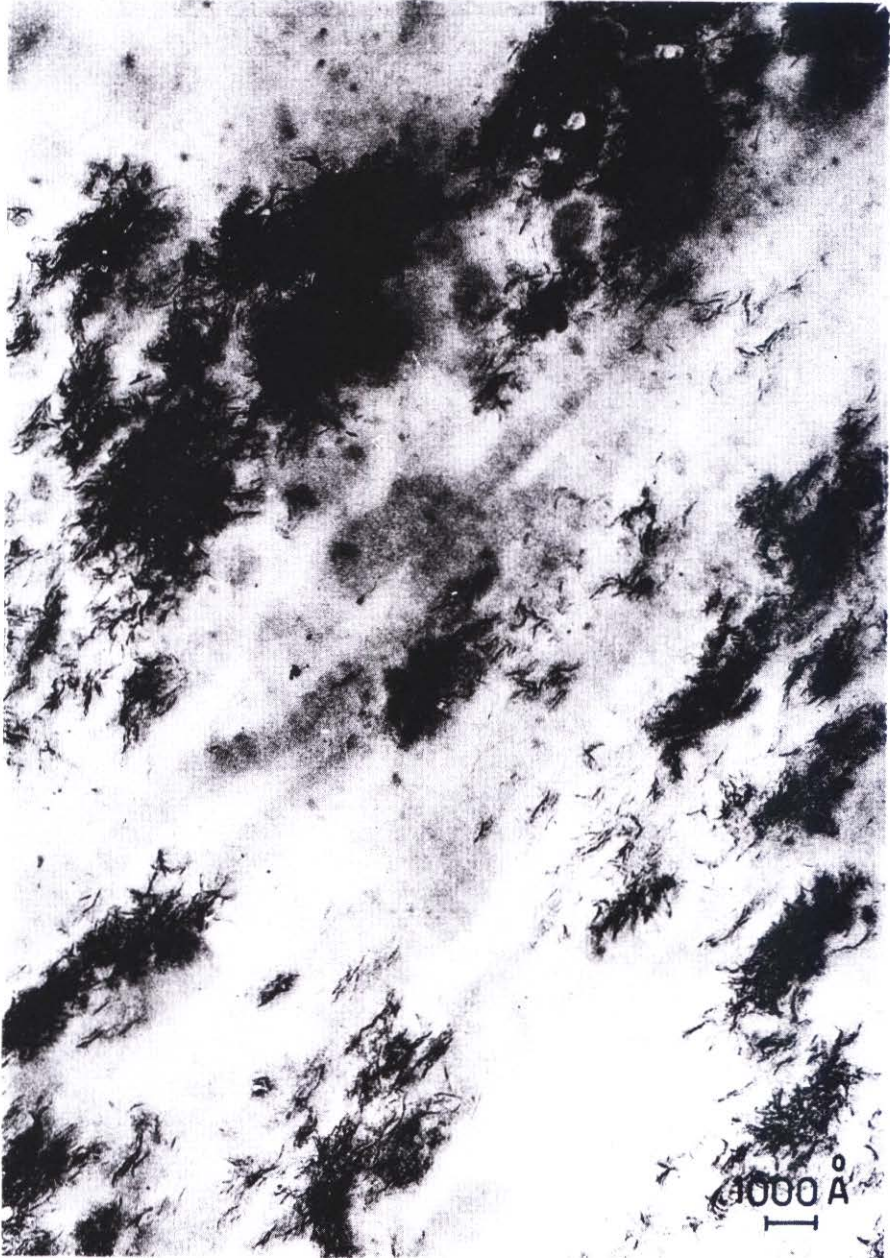
(*A destra*). — Sezione di osso follicolinico incluso in metacrilati: germinazione dei cristallini di idrossiapatite.

TAV. 4



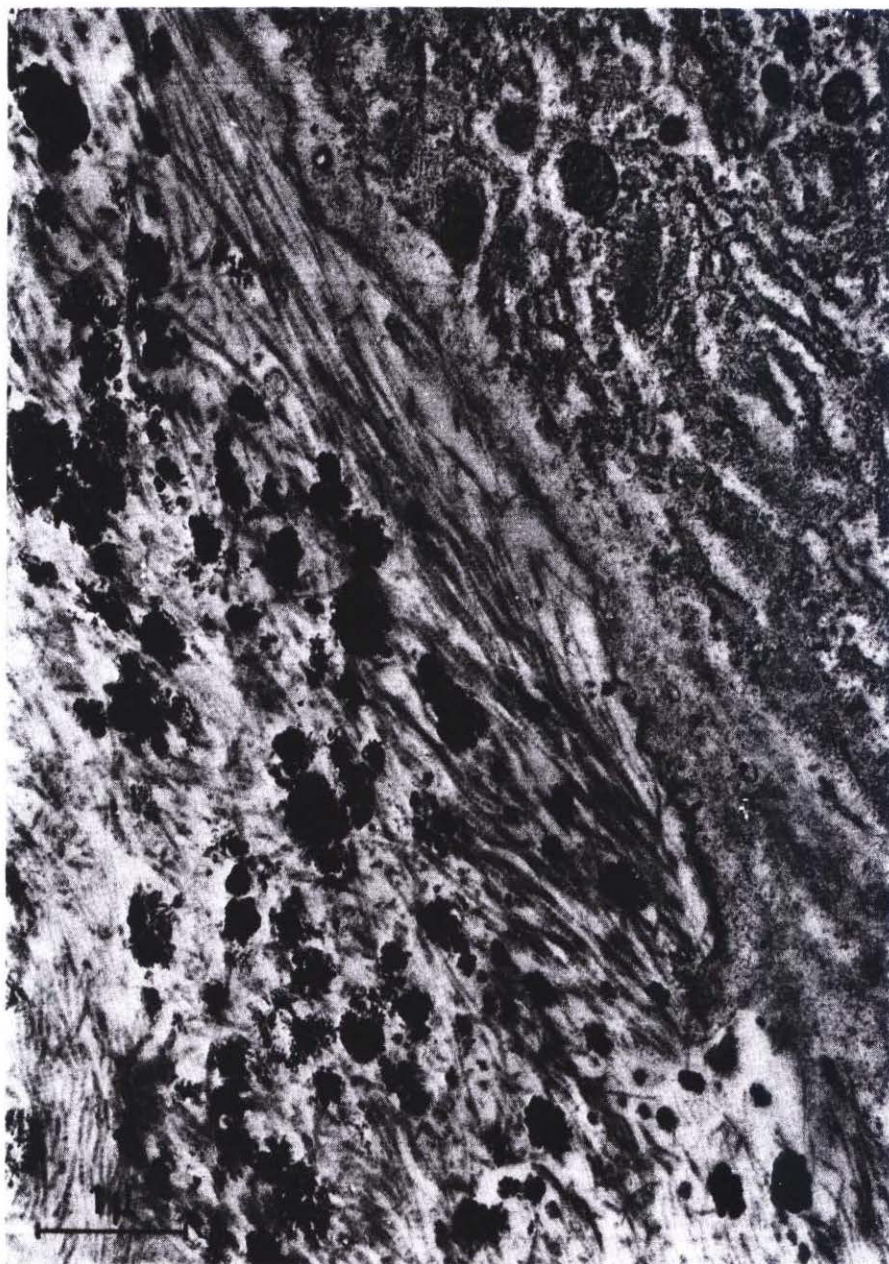
Tav. 5. — Sezione di osso follicolinico incluso in araldite: inizio della mineralizzazione sulle fibrille collagene.

TAV. 5



Tav. 6. — Sezione di teca cranica di ratto, inclusa in metacrilati: la disposizione dei cristallini non rispetta la giacitura delle fibrille collagene.

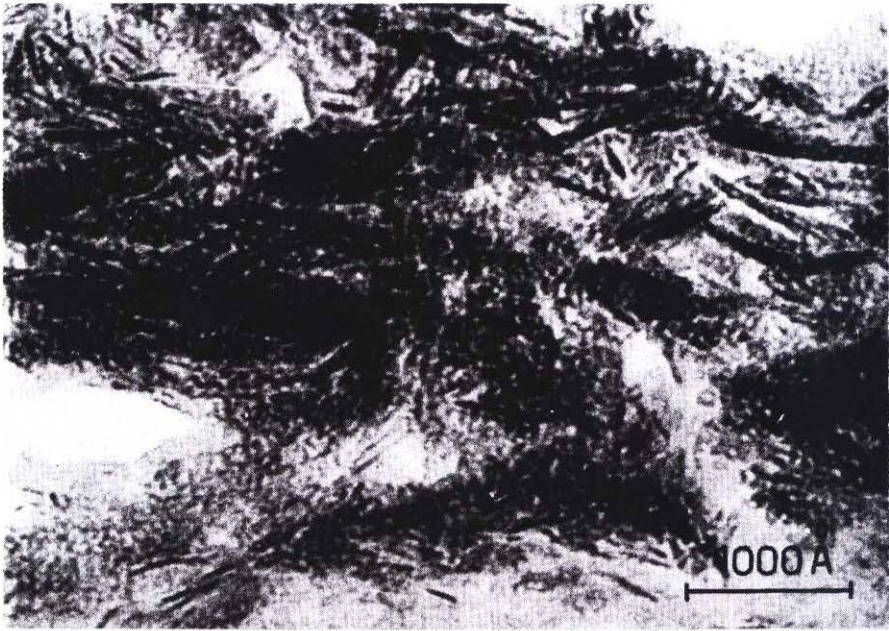
Tav. 6



Tav. 7 (*In alto*). — Sezione di osso follicolinico, incluso in metacrilati: al minerale è sempre adiacente un materiale di bassa densità.

(*In basso*). — Sezione di osteone calcificato al 100 % in inclusione in araldite.

TAV. 7



Tav. 8. — Sezione di osso follicolinico incluso in metacrilati, decalcificato e colorato con acido fosfotungstico; le fibrille sono tagliate in buona parte trasversalmente; tra di esse appare un materiale spugnoso.

TAV. 8



Tav. 9. — Sezione di osso follicolinico incluso in metacrilati, decalcificato e colorato con acido fosfotungstico: si vedono fibrille collagene in sezione longitudinale, fiancheggiate da materiale spugnoso.

TAV. 9



Tav. 10. — Sezione di osso follicolinico incluso in metacrilati. L'ossificazione non avviene preferibilmente lungo le fibrille collagene.

TAV. 10



Tav. 11. — Sezione di orletto osteoide, incluso in araldite, non trattato. I piccoli tratti disseminati mostrano l'inizio della mineralizzazione: solo talvolta essa appare sulle sezioni trasverse delle fibrille collagene.

Tav. 11



Tav. 12. — Sezione di orletto osteoide, incluso in araldite, trattato con acido fosfotungstico. Zona di passaggio tra la zona (inferiore) in cui la calcificazione è appena all'inizio e la superiore in cui è già avvenuta. Nella parte inferiore si vede un materiale denso che, stretto tra le fibrille, appare filiforme.

TAV. 12



Tav. 13. — Sezione di osteone incluso in araldite, non trattato. Stadio iniziale di calcificazione. Sono visibili di due tipi di calcificazione: a bande e ad aghi.

TAV. 13

