

43. A. ASCENZI (*) e E. L. BENEDETTI. (*) — Sulla ultrastruttura dell'osso fetale umano indagata mediante il microscopio elettronico.

Riassunto. — Lo studio al microscopio elettronico della struttura di ossa parietali di feti umani ha permesso di stabilire quanto segue:

1) Le fibrille elementari non hanno struttura periodica sensibilmente diversa da quella delle fibrille dell'osso adulto. Tuttavia esse sono più sottili ed il loro macroperiodo è di dimensioni più limitate.

2) All'impregnazione argantica le fibrille si comportano come quelle del tessuto connettivo reticolare.

3) Nelle fasi più precoci dell'ossificazione i sali di calcio si depositano attorno alle fibrille in maniera discontinua ed irregolare.

4) A mano a mano che le fibrille si accrescono in spessore e che la struttura periodica incrementa le sue dimensioni, compare un guscio calcareo sempre più continuo ed omogeneo.

5) Nelle fasi iniziali dello sviluppo la deposizione dei sali di calcio nella sostanza fondamentale ha luogo in forma di grossi blocchi omogenei, sferici od elissoidali. Solo in prosieguo di tempo i sali calcarei si distribuiscono in forma più minuta tra le strutture micellari della sostanza fondamentale ed attorno alle fibrille.

Résumé. — L'étude au microscope électronique d'os pariétaux de fœtus humain a permis d'établir les conclusions suivantes:

1) Les fibrilles élémentaires ont une structure périodique semblable à celle des fibrilles de l'os adulte. Toutefois elles sont plus fines et leur grande période est de dimensions plus réduites.

2) A l'impregnation argentine, les fibrilles se comportent comme celles du tissu conjonctif réticulaire.

3) Dans les phases plus précoces de l'ossification, les sels calcaires se déposent autour des fibrilles de façon discontinue et irrégulière.

4) Au fur et à mesure que les fibrilles croissent en épaisseur et que leur structure périodique augmente de dimensions la coque calcaire se fait progressivement plus continue et homogène.

5) Dans les phases précoces du développement la déposition des sels calcaires dans la substance fondamentale a lieu en forme de gros

(*) Ospite.

blocs homogènes, sphériques ou ellipsoïdaux. Seulement par la suite, les sels calcaires se distribuent de façon menue autour des structures micellaires de la substance fondamentale, ainsi qu'autour des fibrilles.

Summary. — The ultrafine structure of parietal bones in human foetus has been investigated by means of the electron microscope. The conclusions are as follows:

1) As compared with the post-natal bone fibrils, the morphology of embryonic fibrils is of a somewhat different type, the latter being essentially much thinner and their macroperiod falling in a lower size range.

2) The bone fibrils treated with Gomori's method are impregnated with silver granules in an irregular manner.

3) During the early stages of ossification, calcium salts are irregularly scattered on the fibrils in the form of fine granules.

4) In later stages, as the average value of the macroperiod gradually increases, the fibrils appear increasingly in number that are completely enclosed by calcareous sheaths.

5) The calcification process in the ground substance initially occurs in an interrupted manner, in the form of irregularly distributed spheroidal or ovoidal blocks, measuring a few microns in diameter. This early stage is followed by the breaking-down of the calcareous salts into particles of sub-microscopical size, spreading throughout the ossein matrix.

Zusammenfassung. — Die Untersuchung der Struktur des Scheitelbeins vom menschlichen Fötus am Elektronenmikroskop hat zu folgenden Ergebnissen geführt:

1) Die Elementarfibrillen haben keine merklich verschiedene periodische Struktur als die der Fibrillen des erwachsenen Knochens. Immerhin sind sie feiner und ihre Makroperiode ist von beschränkterer Dimension.

2) Bei der Silberimprägnierung verhalten sich die Fibrillen wie die des reticuläre Bindegewebes.

3) In den Frühstadien der Verknöcherung lagern sich die Kalksalze um die Fibrillen herum in nicht-kontinuierlicher und unregelmässiger Form an.

4) Hand in Hand mit dem Wachstum der Fibrillen in Dicke und der Vergrößerung der Strukturperiode in ihrer Dimension bildet sich eine immer dichtere und gleichmässigere Kalkhülle.

5) In den Anfangsphasen der Entwicklung findet die Ablagerung der Kalksalze in der Grundsubstanz in Form von dicken homogenen, kugelförmig oder ellipsoidalen Stücken statt. Erst im Verlauf der Zeit verteilen sich die Kalksalze in immer feinerer Form zwischen die Myzelar-Strukturen der Grundsubstanz und um die Fibrillen herum.

Lo studio degli aspetti strutturali del collagene, realizzato mediante il microscopio elettronico, si è dimostrato particolarmente proficuo nell'indagine dei caratteri embrionali del tessuto. Sono stati così svelati elementi di rilievo che hanno notevolmente contribuito al chiarimento di reperti già osservati nel tessuto connettivo adulto.

A scopo puramente esemplificativo, ricorderemo come nel collagene dell'embrione le fibrille elementari siano più sottili e dotate di un macroperiodo di dimensioni limitate, inoltre esse contraggono rapporti più intimi con la sostanza fondamentale interposta ed all'impregnazione argentea dimostrano una deposizione eminentemente discontinua ed irregolare dei granuli del metallo ridotto [cfr. SCHMITT, HALL e JAKUS ⁽¹⁾; RANDALL ⁽²⁾; PAHLKE ⁽³⁾].

Sulla base delle presenti considerazioni abbiamo cercato di integrare le nostre ricerche sulla struttura del tessuto osseo al microscopio elettronico con osservazioni su ossa embrionali umane. La peculiarità di alcuni rilievi ci ha indotto a fare di questi oggetto della presente nota.

MATERIALE E TECNICA

Il materiale di studio è rappresentato da ossa parietali di feti umani di età compresa tra 4 e 9 mesi di vita intrauterina, esenti da lesioni degne di rilievo, soprattutto a carico dello scheletro. L'osso veniva accuratamente liberato dal periostio ed, eventualmente, dal midollo.

Per l'osservazione al microscopio elettronico, i preparati venivano allestiti per dissociazione meccanica, sia partendo da osso intero fresco

che da osso previamente fissato in formalina e decalcificato in soluzione HNO_3 al 2%.

La tecnica seguita corrisponde, nelle sue linee generali, a quella precedentemente realizzata da noi stessi [cfr. ASCENZI e BENEDETTI ⁽⁴⁾] per lo studio della struttura della diafisi femorale umana. Sono state tuttavia apportate alcune variazioni, richieste dalla minore resistenza meccanica del materiale.

Per i preparati allestiti partendo dall'osso intero, questo veniva dapprima ritagliato in piccoli frammenti, quindi dissociato meccanicamente in frullatore del tipo « Waring blendor ». Il tempo di trattamento variava da 1 a 10 minuti primi, a seconda dell'età e, quindi, del grado di calcificazione e di resistenza del tessuto. Seguiva decantazione con separazione dei frammenti più grossolani. Poichè, da saggi preliminarmente eseguiti, era risultato che i frammenti precipitati in corso di decantazione erano costituiti essenzialmente da materiale inorganico, questo veniva ripreso ed ulteriormente dissociato per essere sottoposto ad osservazione. Pertanto la ricerca veniva effettuata sia sul materiale in sospensione, costituito prevalentemente da osseina, che sul materiale separato per decantazione e risultante per la maggior parte di frazione inorganica.

Si procedeva infine al lavaggio in acqua bidistillata ed alla centrifugazione del tessuto così dissociato. L'operazione veniva ripetuta più volte.

Per i preparati allestiti partendo da osso decalcificato, si aveva l'accortezza di ridurre al minimo il tempo di azione della soluzione di HNO_3 , facendo agire quest'ultima su tessuto previamente ritagliato in piccoli frammenti. Pertanto la durata complessiva del processo variava da mezz'ora (ossa più giovani) a 3-4 ore (ossa di feti al nono mese). Dopo abbondante lavaggio in acqua corrente e, successivamente, in acqua distillata, fino a neutralizzazione dell'acidità residua, i frammenti di tessuto venivano sottoposti a dissociazione meccanica.

Per osservazioni particolari è stato anche provveduto ad allontanare dall'osso la sola sostanza fondamentale organica, ma non le fibre, sottoponendo questo a digestione triptica. Rimandiamo per dettagli tecnici alla nostra già citata nota [cfr. ASCENZI e BENEDETTI ⁽⁴⁾].

La ricerca è stata completata da osservazioni sul comportamento delle fibrille ossee di fronte all'impregnazione argantica, secondo GOMORI. A tale uopo il tessuto, previamente dissociato, veniva fissato in formalina al 20% per 36-48 ore, quindi ripetutamente lavato per allontanare le tracce di formolo. Per l'impregnazione argantica è stata seguita la metodica indicata da SCHWARZ e PAHLKE ⁽⁵⁾.

RISULTATI E COMMENTO

Il rilievo saliente e di immediato riscontro è certamente rappresentato dalla estrema facilità con la quale nell'osso fetale, rispetto a quello lamellare compatto di soggetti di età pertinente alla vita post-natale, le fibrille si liberano dalla sostanza cementante. Ciò vale soprattutto per il parietale di feti di 4-7 mesi, mentre in quelli dei feti di età superiore, una certa quota di fibrille — sebbene sempre relativamente limitata — resta inguainata da un guscio calcareo non facilmente rimovibile mediante dissociazione meccanica. Ne deriva pertanto che le fibrille possono essere direttamente studiate ed analizzate nella loro fine morfologia anche in preparati allestiti da osso totale fresco.

A maggior chiarimento di questi riscontri preliminari, sarà forse opportuno stabilire che il termine di « sostanza cementante » viene qui usato per indicare il complesso della sostanza fondamentale organica interfibrillare e della frazione organica dell'osso [cfr. SCHMIDT ⁽⁶⁾]. E' appunto questo complesso che nell'osso fetale è facilmente rimovibile dalle fibrille. Ciò non esclude che la sostanza organica fondamentale possa restare adesa alle fibrille sottoforma di piccole frange che ne mascherano più o meno limitatamente la struttura (fot. 1), riscontro questo che si accorda con quanto è noto a proposito dei rapporti tra fibrille e sostanza fondamentale nel collagene embrionale [cfr. PAHLKE ⁽³⁾].

Le fibrille dell'osso fetale non mostrano caratteri qualitativamente diversi da quelli delle fibrille dell'osso proveniente da soggetti di età post-natale. Mantengono pertanto inalterata la loro individualità e non accennano a ramificarsi. Nei preparati sottoposti ad ombreggio è chiaramente riconoscibile la struttura macroperiodale (fot. 2). Così ogni macroperiodo è suddiviso, a sua volta, nella emibanda più densa e più estesa *D* o *A* ed in quella trasparente *H* o *B*. La prima si suddivide, ulteriormente, nelle due emibande dense δ , separate dalla sottile banda trasparente γ (fot. 3).

Se dal punto di vista qualitativo, le fibrille dell'osso fetale non dimostrano apparentemente note morfologiche peculiari, altrettanto non si può dire qualora si consideri il loro comportamento biometrico nei riferimenti dello spessore e delle dimensioni del macroperiodo. Analogamente a quanto hanno rilevato SCHWARZ e PAHLKE ⁽⁵⁾, lo spessore medio delle fibrille nel feto è sensibilmente ridotto e va progressivamente aumentando con il volgere dell'età. Lo stesso vale per il macroperiodo che, nell'osso fetale, è molto al di sotto di 640 Å. Infatti questo valore

è raggiunto solo alla fine della vita intrauterina. Nella figura 1 è riportato il grafico relativo alle dimensioni del macroperiodo in funzione del numero di fibrille esaminate in un feto di 5-6 mesi. Come si vede, la frequenza statistica media corrisponde a 520-540 Å. Tale comportamento non è peculiare delle fibrille del tessuto osseo, ma è comune alle fi-

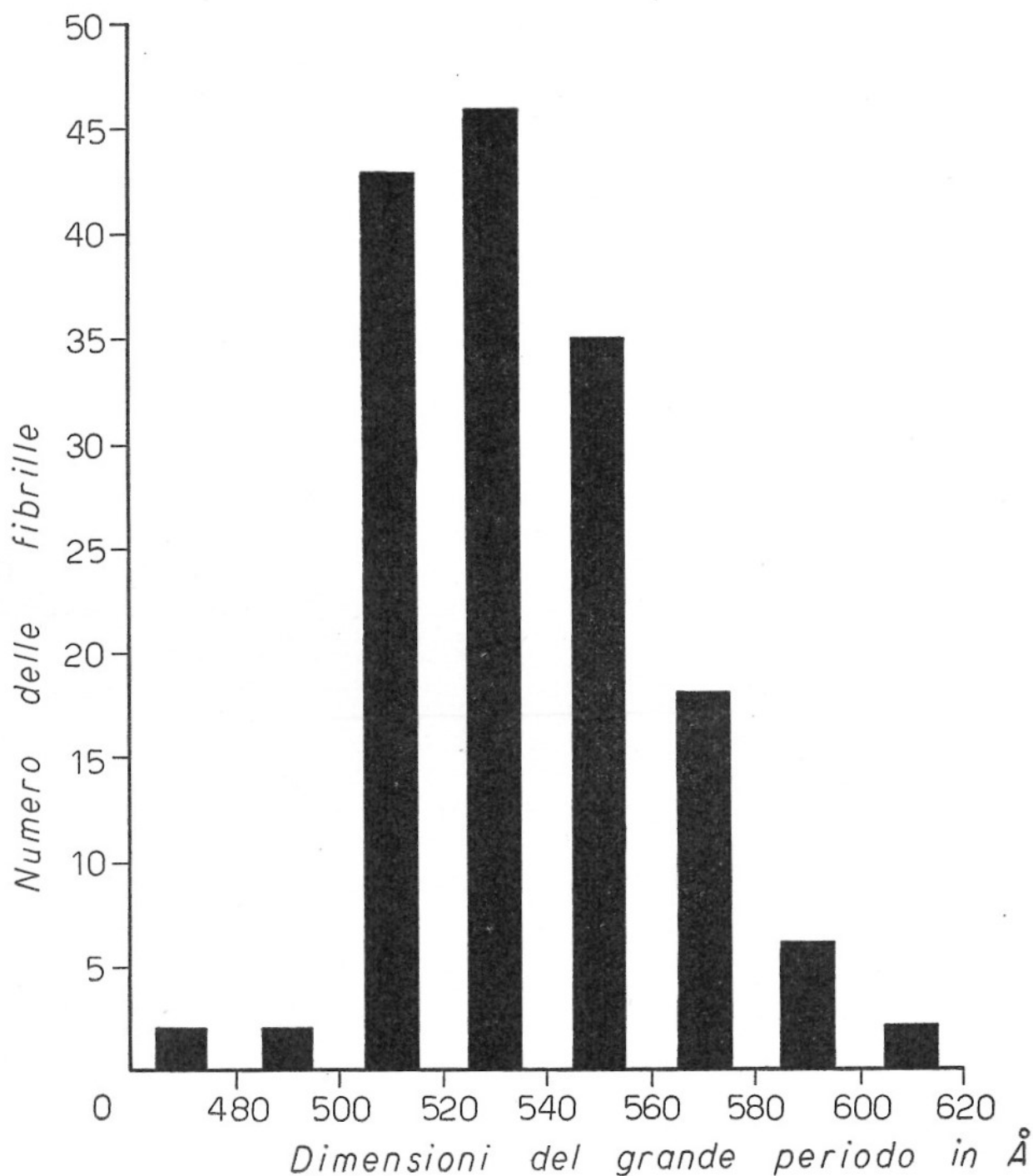


Fig. 1. - Variazioni delle dimensioni del macroperiodo delle fibrille ossee nel parietale di un feto umano di 5-6 mesi.

brille del tessuto connettivo in genere. Infatti, già da oltre un decennio a questa parte, SCHMITT, HALL e JAKUS ⁽¹⁾ avevano potuto stabilire che

durante la vita fetale il macroperiodo va accrescendosi progressivamente da 400 a 640 Å.

In analogia con quanto verificasi per l'osso lamellare dell'adulto [cfr. ASCENZI e CHIOZZOTTO (⁷⁻⁸)], anche nelle ossa fetali notasi la schietta tendenza delle fibrille a disporsi in fasci nei quali la struttura periodale trovasi in concordanza (fot. 4). Siffatto comportamento è, d'altra parte, comune al tessuto collagene ed a quello reticolare, come è stato dimostrato da WYCKOFF (⁹) in preparati di tendini e da BENEDETTI (¹⁰) per il reticolo stromale dei linfonodi.

Ai caratteri biometrici sopradescritti, pertinenti alle fibrille, si accompagna un particolare comportamento delle stesse nei confronti della componente inorganica dell'osso e, così pure, dell'impregnazione argentea, secondo GOMORI.

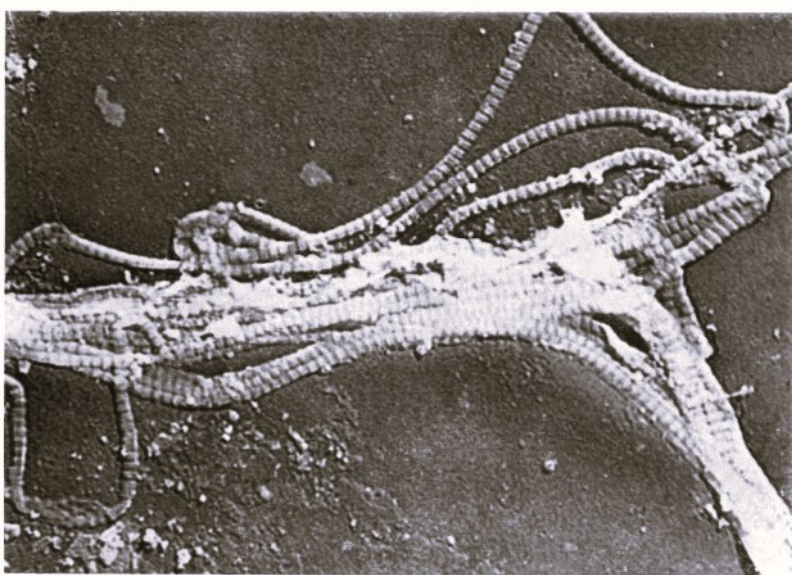
Accanto a fibrille che, come si è detto, risultano completamente nude, se ne ravvisano altre — e sono la maggior parte — intorno alle quali il calcio è depositato sotto forma di fini granuli. Questi non sono regolarmente distribuiti, nè dimostrano apparentemente alcuna tendenza a contrarre rapporti con l'una o con l'altra delle strutture periodali (fot. 5, 6). Corrispondentemente le stesse fibrille pertinenti all'osso fetale e sottoposte ad impregnazione argentea secondo GOMORI, dimostrano un comportamento pressochè analogo dei granuli di argento. Infatti, a somiglianza di quelli calcarei, questi risultano irregolarmente distribuiti alla periferia delle fibrille (fot. 7). E' noto [cfr. BENEDETTI (¹⁰)] che tale comportamento è caratteristico delle fibrille reticolari, le quali hanno una struttura macroperiodale le cui dimensioni sono inferiori a 640 Å e, pertanto, presentano analogie strutturali con le fibrille dell'osso fetale. Al contrario, le fibrille collagene e quelle del tessuto osseo adulto mostrano di lasciarsi compenetrare dai granuli d'argento che si dispongono sotto forma di una finissima punteggiatura a livello delle emibande δ [cfr. SCHWARZ e PAHLKE (⁵)].

Con il trascorrere della vita fetale, a mano a mano che i valori dello spessore delle fibrille e delle dimensioni del macroperiodo vanno elevandosi, sicchè quest'ultimo tende a raggiungere il valore di 640 Å, le fibrille medesime vanno acquistando progressivamente una guaina calcarea continua come quella della maggior parte delle fibrille dell'osso nella vita post-natale (fot. 8).

In breve, gli aspetti morfologici ed il comportamento delle fibrille nell'osso fetale, considerati soprattutto dal punto di vista del divenire evolutivo del tessuto, consentono di ravvisare alcuni nessi di interdipendenza tra caratteri delle fibrille e modalità di contrarre rapporti con i sali di calcio. E cioè le fibrille più giovani, quindi più esili e con ma-



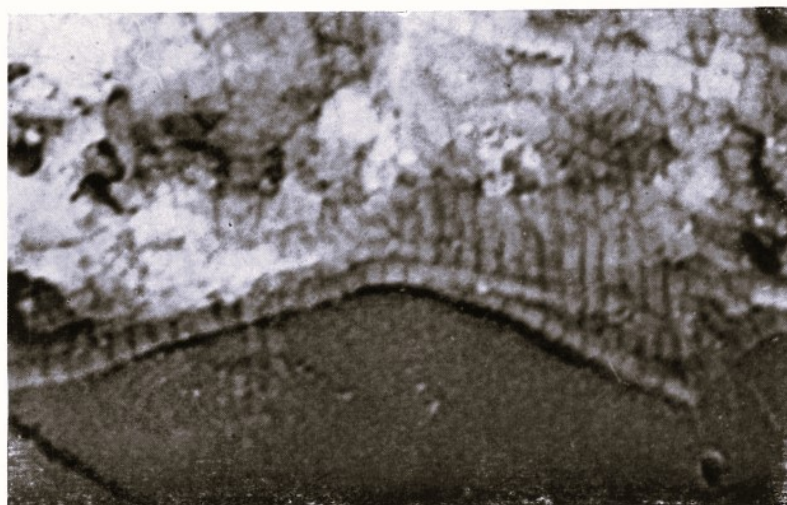
Fot. 1. - Feto di 5 $\frac{1}{2}$ mesi. Fibrille ossee in parte mascherate da sostanza fondamentale. Ingrandimento: 20.000 $\times$.



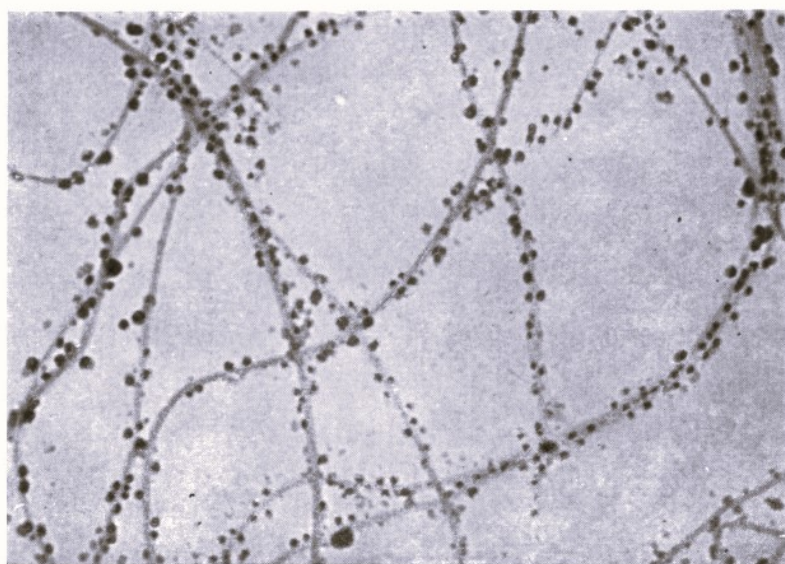
Fot. 2. - Feto di 7 mesi. Fibrille ossee in cui è chiaramente riconoscibile la struttura periodica. Ingrandimento: 20.000 $\times$.



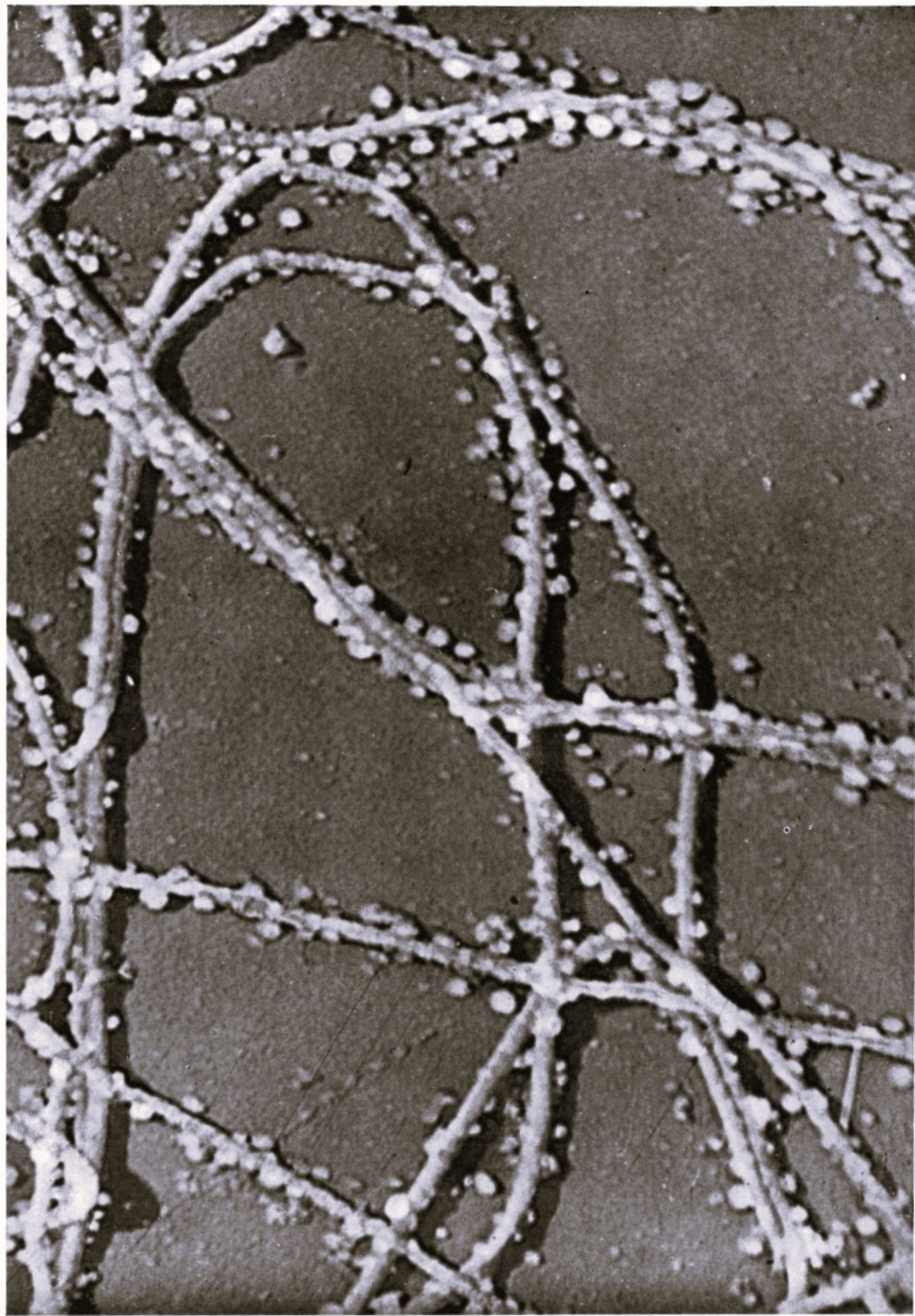
Fot. 3. - Particolare della figura precedente che dimostra ancora più schiettamente la struttura periodica delle fibrille. Ingrandimento: 40.000 $\times$.



Fot. 4. - Feto di 7 mesi. Fibrille ossee riunite in fasci con macroperiodo in concordanza. Ingrandimento: 40.000 $\times$.



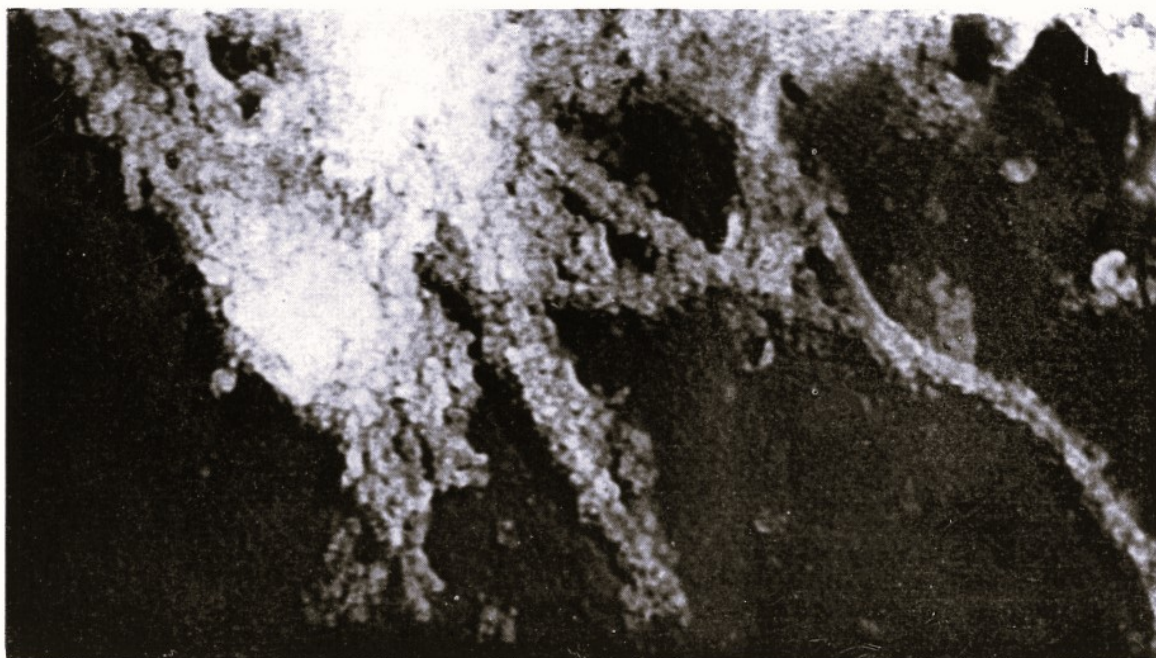
Fot. 5. - Feto di 4½ mesi. Fibrille ossee con deposizione di granuli calcarei. Ingrandimento: 20.000 $\times$.



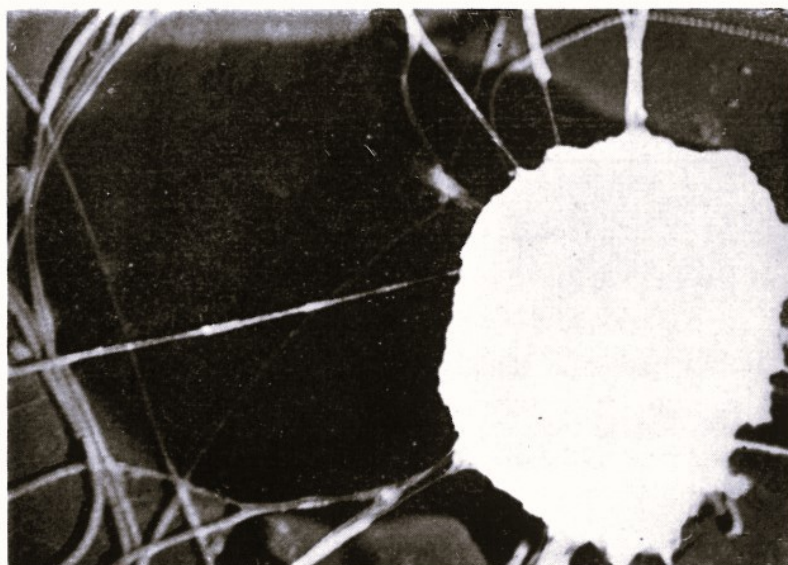
Fot. 6. - Feto di 4½ mesi. Fibrille ossee con deposizione di granuli calcarei. Ingrandimento: 40.000 X.



Fot. 7. - Feto di 5 mesi. Fibrille ossee impregnate con argento, secondo Gomori. Ingrandimento: 40.000 X.



Fot. 8. - Feto di 7 mesi. Osso sottoposto a digestione triptica. Le fibrille sono avvolte da una guaina calcarea. Ingrandimento: 40.000 $\times$.



Fot. 9. - Feto di 4 mesi. Grosso blocco omogeneo a struttura calcarea. Ingrandimento: 12.000 $\times$.

croperiodo più breve, le quali all'impregnazione argentica denotano un comportamento analogo a quello delle fibre reticolari, contraggono con i sali di calcio rapporti eminentemente discontinui. Questi divengono, successivamente, sempre più saldi e continui man mano che le fibrille assumono caratteri più prossimi a quelli delle fibrille collagene. Si può pertanto ritenere che esistono strette correlazioni tra maturità delle fibrille ossee ed i rapporti da queste contratti con i sali calcarei.

Passando ora a considerare la sostanza cementante interfibrillare, osserveremo, innanzi tutto, come anch'essa presenti caratteri spiccatamente diversi da quelli rilevati nel tessuto osseo lamellare dell'adulto. Così la sostanza organica fondamentale appare relativamente scarsa, specialmente nelle ossa di feti più giovani. Inoltre i rapporti di quest'ultima con la frazione inorganica non sono omologabili con quanto verificasi nelle ossa lamellari dell'età post-natale. Infatti, la sostanza inorganica non si dispone a costituire come un traliccio a maglie finissime entro le quali sono disposte le micelle di osteomucoide e di osteoalbuminoide [ASCENZI (¹¹); ASCENZI e BENEDETTI (⁴); ASCENZI e CHIOZZOTTO (^{7, 8})]: essa appare, invece, sotto forma di grossi blocchi rotondeggianti od ovoidali intensamente opachi, a struttura apparentemente omogenea. La forma sferica od ovoidale viene indirettamente rivelata dai caratteri dell'ombra nei preparati sottoposti a metallizzazione (fot. 9). Si tratta di entità di dimensioni cospicue che raggiungono perfino 3-4 micron di diametro. Sono pertanto apprezzabili anche al microscopio ottico. La natura essenzialmente calcarea dei detti blocchi è indirettamente rivelata dal fatto che non sono reperibili nei preparati di tessuto osseo decalcificato. Tali formazioni non sembrano contrarre altri rapporti, se non di contiguità, con le fibrille. Circa la loro interpretazione, particolarmente ci suffragano i rilievi forniti dall'istologia classica sull'ossificazione del tessuto osseo a fibre intrecciate, cioè di quel tipo di tessuto cui appartengono anche le ossa della volta cranica del feto umano. E' noto che, a differenza delle ossa lamellari, nelle quali la ossificazione ha luogo come per « presa » omogenea, lamella per lamella, la calcificazione di ossa fetali a fibre intrecciate avviene inizialmente in maniera discontinua, sotto forma di granuli del diametro di pochi micron, irregolarmente distribuiti [cfr. WEIDENREICH (¹²)]. A questa prima fase di precipitazione granulare dei sali calcarei, segue il dissolvimento degli stessi in entità submicroscopiche che si distribuiscono nel contesto dell'osseina. Orbene è verosimile ritenere che le grosse formazioni sferoidali surriferite corrispondano a quei granuli calcarei di rilievo istologico, che rappresentano i primi depositi di sali di calcio nell'ambito della sostanza inorganica.

Particolarmente abbondanti nelle fasi precoci dello sviluppo, vanno poi progressivamente scomparendo, essendo sostituite da quel tipo più fine di calcificazione, propria dell'osso lamellare [cfr. ASCENZI e BENEDETTI (⁴); ASCENZI e CHIOZZOTTO (^{7, 8})].

Volendo ora considerare i reperti fin qui descritti a proposito delle fibrille collagene e della sostanza cementante nell'osso fetale a fibre intrecciate alla stregua di una veduta interpretativa unitaria e coerente sulla evoluzione e sullo sviluppo del tessuto, ci sembra di poter prospettare quanto segue.

Dapprima i sali inorganici compaiono nella matrice osseinica sotto forma di grossolani accumuli sferoidali apparentemente disposti irregolarmente e senza rapporti definiti nè con la sostanza fondamentale, nè con le fibrille. Successivamente i sali di calcio, verosimilmente mobilizzati da siffatti accumuli, si distribuiscono tra le strutture micellari della sostanza fondamentale ed attorno alle fibrille. Quivi si depositano, inizialmente, in forma di granuli irregolari che non denunciano nessun carattere preferenziale per le strutture periodali; successivamente, in prosieguo di tempo, essi danno luogo a gusci calcarei continui che circondano e mascherano la morfologia strutturale delle fibrille medesime.

CONCLUSIONI

I risultati surriferiti sui caratteri strutturali dell'osso fetale a fibre intrecciate, indagati mediante il microscopio elettronico, ci consentono di prospettare le proposizioni conclusive seguenti:

a) le fibrille hanno una struttura periodica che non differisce sensibilmente da quella delle fibrille dell'osso adulto. Tuttavia lo spessore medio, come pure le dimensioni delle strutture periodali, risultano inferiori. Entrambi vanno progressivamente aumentando con l'età, talchè solo alla nascita la lunghezza media del macroperiodo supera i 600 Å;

b) il comportamento delle fibrille nei confronti dell'impregnazione argantica, secondo GOMORI, corrisponde a quello proprio delle fibrille del connettivo reticolare argentofilo;

c) nelle fasi più precoci dell'ossificazione, quando le fibrille sono ancora particolarmente sottili ed il macroperiodo ha un'estensione limitata, i sali di calcio si depositano attorno ad esse in maniera del tutto discontinua ed irregolare;

d) a mano a mano che le fibrille acquistano uno sviluppo dimensionale corrispondente a quello delle fibrille dell'osso adulto, la deposizio-

ne del calcio al loro livello assume un carattere sempre più continuo sotto forma di guscio;

e) la sostanza cementante interfibrillare è, soprattutto nelle fasi iniziali dello sviluppo, relativamente povera di componente organica. La frazione inorganica, invece, si deposita sotto forma di grossi blocchi omogenei, sferici od elissoidali;

f) solo in prosieguo di tempo i blocchi inorganici vanno progressivamente scomparendo, in quanto i sali calcarei si distribuiscono in forma più minuta tra le strutture micellari della sostanza fondamentale ed attorno alle fibrille.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di fisica. Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F. O. SCHMITT, C. HALL e M. A. JAKUS - J. Cell. and Comp. Physiol., 20: 11 (1942).
 - (2) J. T. RANDALL - *Nature and structure of collagen*, Butterworths, London, 1953.
 - (3) G. PAHLKE - Z. f. Zellforschung, 39: 421 (1954).
 - (4) A. ASCENZI e E. L. BENEDETTI - Arch. di Sc. Biol., 38: 234 (1954).
 - (5) W. SCHWARZ e G. PAHLKE - Z. f. Zellforschung, 38: 475 (1953).
 - (6) W. J. SCHMIDT - Ber. Oberhess. Ges. Natur- u. Heilk., Naturw. Abt., Giessen, 15: 219 (1933).
 - (7) A. ASCENZI e A. CHIOZZOTTO - Experientia, 11: 140 (1955).
 - (8) A. ASCENZI e A. CHIOZZOTTO - Rend. Ist. Sup. di Sanità, 18: 214 (1955).
 - (9) R. W. G. WYCKOFF - *The fine structure of connective tissues*, in « Connective Tissues », Transactions of third Conference, pag. 38, Edited by Ragan C., New York, Josiah Macy, Jr. Foundation, 1952.
 - (10) E. L. BENEDETTI - Scientia Med. Italica, 3: 157 (1954).
 - (11) A. ASCENZI - Rend. Ist. Sup. Sanità, 12: 893 (1949).
 - (12) F. WEIDENREICH, *Das Knochengewebe*, in Möllendorff (v.), Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen; vol. 2, parte II, Springer, Berlin, 1930.
-