

36. Giovanni LELLI - Ugo MAROTTA. — Il collagene di alcune forme tumorali della mammella visto al microscopio elettronico (*).
(Prime osservazioni)

Riassunto. — L'importanza sempre maggiore assunta dallo stroma nell'organizzazione dei tumori e l'interesse dei più recenti studi sul collagene dell'organismo al microscopio elettronico hanno spinto gli Autori ad esaminare un forte numero di fibrille collagene di differenti forme tumorali della mammella.

E' stato possibile dimostrare costantemente in questo materiale la striatura trasversale caratteristica messa in evidenza nel collagene dei tessuti normali dagli studi di HALL, JAKUS e SCHMITT, di WOLPERS e di GROSS e SCHMITT.

La misurazione dello spessore di molte di queste fibrille, nonché di fibrille collagene del derma umano, ha permesso di determinare i cosiddetti «spessori medi». Lo spessore medio più alto (oltre i 1000 Å) è delle fibrille collagene del derma. Per le forme tumorali gli spessori medi sono risultati invece inferiori ai 680 Å con valori proporzionali al grado di maturità della forma neoplastica stessa.

A tali risultati gli Autori non assegnano alcun significato assoluto, ma riconoscono un valore indicativo per altra via da seguire verso una conoscenza morfologica sempre maggiore del collagene delle forme neoplastiche.

Résumé. — L'importance toujours plus grande attribuée au stroma dans l'organisation des tumeurs et l'intérêt des études les plus récentes sur le collagène de l'organisme vu au microscope électronique, ont engagé les Auteurs à examiner un nombre assez élevé de fibrilles collagènes de différentes formes de tumeurs de la mamelle.

Il a été possible de constater dans ce matériel la constante striature transversale caractéristique, que les études de HALL, JAKUS et SCHMITT, de WOLPERS et de GROSS et SCHMITT ont mis en évidence dans le collagène des tissus normaux.

Le mesurage de l'épaisseur d'un grand nombre de ces fibrilles, ainsi que de fibrilles collagènes du derme humain, a permis de déterminer celles qu'on appelle les « épaisseurs moyennes ». L'épaisseur moyenne la plus élevée (plus de 1000 Å) est celle des fibrilles collagènes du derme. Pour les formes dans les tumeurs, les épaisseurs moyennes se sont révélées au contraire infé-

(*) Comunicazione al Congresso di Oncologia - Cremona, marzo 1950.

rieures à 680 Å, avec des valeurs proportionnelles au degré de maturité de la forme néoplastique.

Les Auteurs n'attribuent pas de signification absolue à ces résultats, mais ils en reconnaissent la valeur indicative, afin de suivre une autre voie pour atteindre une connaissance morphologique toujours plus grande du collagène des formes néoplastiques.

Summary. — The ever increasing importance attributed to the stroma in the organisation of tumours and the interest arising from the recent electron microscope studies on collagen have stimulated the authors to carry out electron microscope studies on the structure of a large number of collagen fibers of different mammary tumours.

It was constantly found possible to demonstrate in this material the transversal striature observed in the collagen of normal tissues by HALL, JAKUS & SCHMITT, WOLPERS and GROSS and SCHMITT.

Measurements of the thickness of numerous collagen fibers of the mammary as well as the collagen fibers of human skin have made possible the determination of the so called « average thickness ». The highest average thickness (above 1000 Å) was found in collagen fibers of the skin.

The « average thickness » in tumour tissue was found to be lower than 680 Å and proportional to the maturity of the neoplastic form.

The authors realise that their results, in view of the limited number of measurements, have no absolute significance, but consider that they indicate a new way for further research towards increasing our knowledge of the morphology of collagen and neoplastic forms.

Zusammenfassung. — Die immer grössere Bedeutung die dem Stroma in der Geschwürbildung zukommt, sowie das Interesse das den neuesten Untersuchungen des Kollagens des Organismus im elektronischen Mikroskop entgegengebracht wird, haben die Verf. veranlasst eine grosse Anzahl von kollagenen Fibrillen zu untersuchen, die aus verschiedenen Brustgeschwürformen stammen.

In allen untersuchten Fällen konnte die seitlich verlaufende kennzeichnende Streifung erkannt werden auf die bereits durch HALL, JAKUS u. SCHMITT, WOLPERS, sowie GROSS u. SCHMITT im Kollagen von normalen Geweben aufmerksam gemacht wurde.

Durch Messung der Dicke zahlreicher Fibrillen, einschliesslich Fibrillen des menschlichen Dermis, konnten die sogenannten « mittleren Dicken » berechnet werden. Der höchste Wert (über 1000 Å) kommt den kollagenen Fibrillen der Dermis zu. In den Geschwürformen liegen die mitt.

leren Werte niedriger als 680 Å; diese Werte sind dem Reifegrad der neoplastischen Form proportional.

Die Verf. messen diesen Ergebnissen keinen absoluten Wert bei, sehen aber in ihnen einen neuen Weg zu immer eingehenderer morphologischer Kenntnis des Kollagens der neoplastischen Formen.

La grande importanza che ha il tessuto collageneo nell'organismo, dove insieme alle ossa costituisce uno dei primi fattori di stabilità, ha richiamato l'attenzione di numerosissimi studiosi.

Veramente larghissima è così la messe di lavori sull'argomento.

Alle conoscenze con i comuni mezzi di indagine istologica si sono andate aggiungendo quelle da mezzi e metodi di ricerca sempre più nuovi e perfezionati. Sono in tal senso da ricordare gli studi col campo oscuro e diaframma azimut (BAIRATI), quelli sulla struttura micellare, sull'esame a luce polarizzata (birifrangenza - PETERSEN), sulla struttura molecolare con i raggi X, oltre ai contributi delle ricerche chimiche della colorazione delle fibrille e del comportamento di queste in presenza di soluzioni a differente Ph.

Sicuramente non di minore interesse sono i risultati più recenti dello studio delle fibre collagene al microscopio elettronico. ANDERSON nel suo libro « Pathology » così si esprime in proposito:

« Perhaps the most significant discovery for pathologists is that collagenic fibers are made up of fibrils which are cross striated. The spacing of the striation is definite and characteristic for some kinds of fibers. This give us hope that pathologists eventually will be able by electron microscopy to determine the quality of collagenic fibers, just as engineers can that of steel ».

Secondo le ricerche elettroscopiche di HALL, JAKUS e SCHMITT, di WOLPERS e di GROSS e SCHMITT le fibre collagene sono costituite da fibrille elementari rigide, non ramificate, riunite in fasci con una larghezza oscillante fra 200 e 2500 Angström. Ma ciò che appare più interessante è stato il costante rilievo che la fibra collagena presenta una striatura trasversale.

SCHMITT, HALL e JAKUS su collagene per dilacerazione e non fissato, misero in evidenza che detta striatura trasversale consiste in un semplice alternarsi di zone chiare e scure, disposte perpendicolarmente all'asse delle fibrille e presenti su tutta la estensione di queste. Secondo gli stessi AA. trattando il materiale con acido fosfotungstenico nelle bande chiare e scure della fibra si osservano strutture, che si riassumono nella presenza di ben 5 fasce, che occupano in modo caratteristico quello spazio chiamato « periodo » e formato da un disco chiaro e da uno scuro consecutivo.

NUTTING e BORASKY studiando il collagene della pelle di mammifero os-

servarono 6 fasce sempre nel periodo mentre SCHMITT e GROSS ne misero in evidenza 7 su collagene di diversa provenienza.

Identico aspetto fu confermato circa due anni dopo anche da WOLPERS su fibre di diversa natura, dissociate con gli ultrasuoni o per dilacerazione. Anche tale A. andò intimamente a studiare le diverse zone chiare e scure, riuscendo a dimostrare come esse siano scomponibili in altre più piccole, disposte nello stesso senso, fino a distinguere 4 ed anche 6 dischi scuri. L'A. tenne conto della lunghezza dell'insieme di un disco chiaro e di uno scuro consecutivo (periodo) e dalle misurazioni eseguite il valore più frequente fu di 75 millimicron, dei quali 45 appartenenti alla parte scura e 30 a quella chiara.

Va tenuto presente nelle preparazioni che la sostanza fondamentale, che cementa fra loro le fibrille, può riuscire a coprire del tutto o in parte la striatura trasversale ed è necessario allontanarla per una visione più limpida.

In osservazioni comparative sullo spessore delle fibrille di materiale di diversa provenienza WOLPERS dichiara di avere rilevato fibrille più sottili negli individui giovani che in quelli vecchi.

Di particolare interesse sono le osservazioni di GROSS e SCHMITT relativamente recenti. Questi AA. usarono anche il metodo delle « repliche » per osservare le fibrille allo stato umido e su frammenti di uno spessore maggiore di quello utilizzabile comunemente al microscopio elettronico. Nel collagene del derma umano di 16 individui di età compresa fra 1 ora e 89 anni osservarono fibrille di spessore compreso fra 700 e 1400 Å, più frequentemente su i 1000 Å. La lunghezza del periodo assiale di dette fibre trattate con acido fosfotungstenico o ombreggiate con cromo o con platino risultò oscillante fra 500 e 800 Å, con maggiore frequenza fra 620 e 660 Å.

Non parve di apprezzare una differenza di lunghezza del periodo fra fibrille della pelle di soggetti in età infantile e quelli adulti o vecchi. Secondo loro la pelle dell'infante differirebbe invece da quella dell'adulto per una quantità considerevolmente maggiore di materiale amorfo (interfibrillare), una piccola parte del quale fortemente aderente alle fibrille collagene.

Visti i risultati più interessanti dello studio del collagene dell'organismo al microscopio elettronico, è sembrato a noi meritevole portare attenzione all'ultrastruttura del collagene di alcune forme neoplastiche, al quale oggi da molti AA. si dà particolare importanza per la vita e la crescita dei tumori.

Lo stroma è talvolta fornito al tumore dall'ospite come nei tumori infiltranti, che sfruttano l'impalcatura vascolo-connettivale preesistente, talvolta invece è il risultato di un'azione angioplastica esplicita dagli elementi tumo-

rali stessi. La concezione che lo stroma rappresenti qualcosa di sussidiario, di secondario, come trascinato al rimorchio dagli altri elementi della neoproduzione tumorale, ha avuto ed ha parecchi oppositori fra cui HUECK e ciò tanto nei confronti dei tumori connettivali che di molti di quelli epiteliali.

Le forme epiteliali benigne mostrano un'associazione epitelio-connettivale ben netta ed indiscutibile. Così secondo HUECK anche in molti carcinomi, dove i rapporti dei due tessuti sono tali da riconoscere al tumore una struttura addirittura organoide. In tal modo non si tratterebbe semplicemente di una proliferazione cellulare atipica, ma di un complesso mesenchimo-epiteliale in movimento verso la trasformazione neoplastica. In questo senso RONDONI scrive molto giustamente: « Quello che si descrive come stroma non è più qualcosa di accessorio e secondario, ma un costituente dell'organizzazione tumorale ».

Come è vero che la proliferazione connettivale specie se ad evoluzione sclerogena può condurre a strozzamento e isolamento di gettate neoplastiche, ostacolando lo sviluppo del tumore, altrettanto vero è che, in certi casi almeno lo sviluppo del connettivo può favorire l'accrescimento del tumore. Ciò risulta dagli studi di HUZELLA su culture in vitro, poichè le formazioni fibrillari mostrano di servire da sostegno, facilitando la progressione delle cellule neoplastiche verso i tessuti sani vicini. D'altra parte nei trapianti l'attecchimento può mancare per reazioni connettivali eccessive di demarcazione, ma anche per scarsa o mancante reazione angioplastica stromatica.

L'attuale comunicazione ha esclusivo significato di nota preliminare. Risultati più concreti ed attendibili si potranno avere, estendendo l'osservazione ad un maggior numero di casi e da un sempre maggiore perfezionamento della difficile tecnica di preparazione del materiale da osservare.

Le nostre attuali ricerche sono state condotte sul collagene di 7 casi di forme tumorali della mammella e precisamente 3 carcinomi, 2 fibroadenomi e 2 mastopatie fibrose-cistiche. Abbiamo studiato inoltre anche alcune fibre del collagene del derma di due casi diversi per avere un elemento di confronto da osservazione personale. La scelta del materiale su malattie tumorali esclusivamente della mammella è stata dettata dal desiderio di circoscrivere il più possibile il campo di studio. Per la stessa ragione la cute esaminata per il confronto è stata prelevata pure dalla mammella degli stessi soggetti lontano dalla forma neoplastica.

Non esistendo norme di tecnica per la preparazione del materiale da osservare abbiamo seguito diversi sistemi, modificandoli o man mano cambiandoli nell'intento di ottenere visioni elettromicroscopiche sempre più chiare.

Ci siamo serviti di materiale fresco oppure fissato nei comuni solventi.

Abbiamo potuto constatare che il materiale fresco si presta meglio per mettere in evidenza l'aspetto striato delle fibrille. Buono allo scopo è apparso anche quello fissato in formalina 8-10% per un periodo da 1 a 5 giorni. I materiali che hanno subito una fissazione più prolungata danno visioni non chiare, i campi di osservazione sono poco nitidi dato che il materiale troppo indurito si frammenta in una sostanza granulare, che disturba l'osservazione rendendo le fibrille ovattate. Per la stessa ragione abbiamo subito scartato l'alcool anche in fissazioni di breve durata. Abbiamo attualmente in prova altri liquidi fissativi con i quali ci ripromettiamo risultati anche migliori. Ci ripromettiamo di mettere in uso anche il cosiddetto « terreno » indicato dal PIACENTINI.

Per il quasi nessun potere penetrante dei raggi elettronici assorbiti da strati anche sottilissimi (0,1 micron) di sostanze solide, è stato necessario preparare il materiale nello spessore richiesto.

Il cosiddetto microtomo ad alta velocità (40.000 sezioni al minuto) ci ha dato risultati poco soddisfacenti. Lo stesso i tentativi di scomposizione del tessuto con gli ultrasuoni.

Abbiamo finito per preferire la lacerazione manuale del materiale da esaminare, anche per una maggiore garanzia contro la possibilità di artefatti, facili con gli altri metodi, fra cui il trattamento con acidi o altre sostanze chimiche usate allo stesso scopo.

La dilacerazione del tessuto viene eseguita con acqua bidistillata mediante pinze ed aghi adatti; segue sbattimento della sospensione fino ad un lieve grado di opalescenza del liquido. Decantando e lavando sempre con acqua bidistillata abbiamo ottenuto sospensioni pronte allo studio. Secondo la tecnica di WILLIAMS e di WYCKOFF abbiamo ombreggiato il materiale con cromo per avere una visione più netta, ma alcune osservazioni sono state fatte per confronto con materiale non ombrato.

L'ingrandimento del microscopio elettronico per le nostre ricerche è stato di 18.000 diametri.

Le ricerche hanno mirato a mettere in luce se anche nelle fibrille del collagene nelle forme neoplastiche sia presente la striatura trasversale riscontrata dagli AA. nel collagene dell'organismo in genere e se esistano differenze nello spessore delle fibrille appartenenti a forme tumorali diverse.

Resultati.

In tutto il materiale osservato il collagene ha presentato costantemente una striatura trasversale dei suoi elementi con presenza di dischi chiari e scuri alternati. La maggiore o minore evidenza di essi è risultata quasi sempre in rapporto con le preparazioni del materiale più o meno ben riuscite o con una più o meno perfetta messa a fuoco del campo. E' interessante il

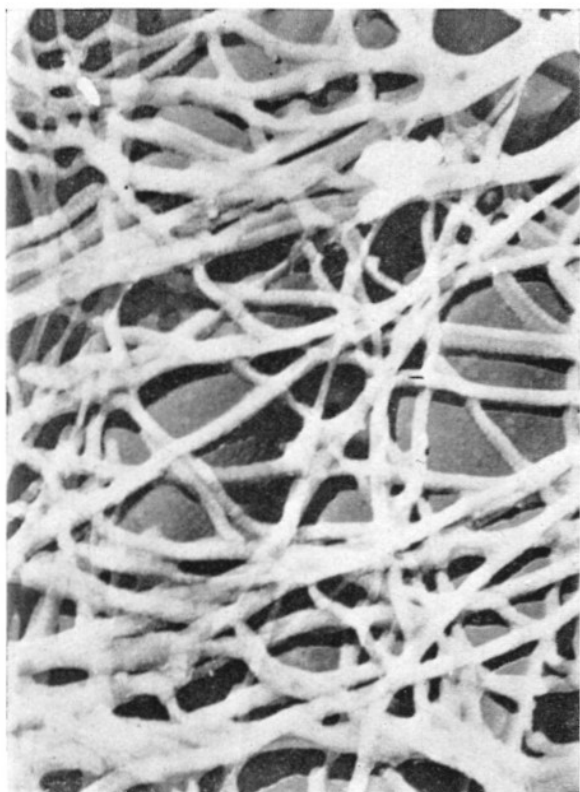


Fig. 1 - Fibre collagene del derma della cute della mammella. Fissazione in formalina.



Fig. 2 - Fibre collagene del derma della cute della mammella. Fissazione in formalina.

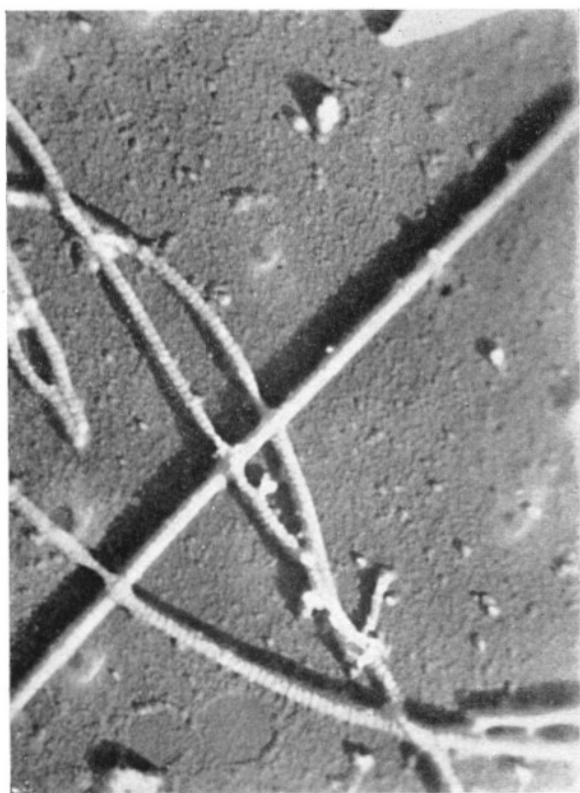


Fig. 3 - Fibre collagene del derma della cute della mammella. Fissazione in formalina.

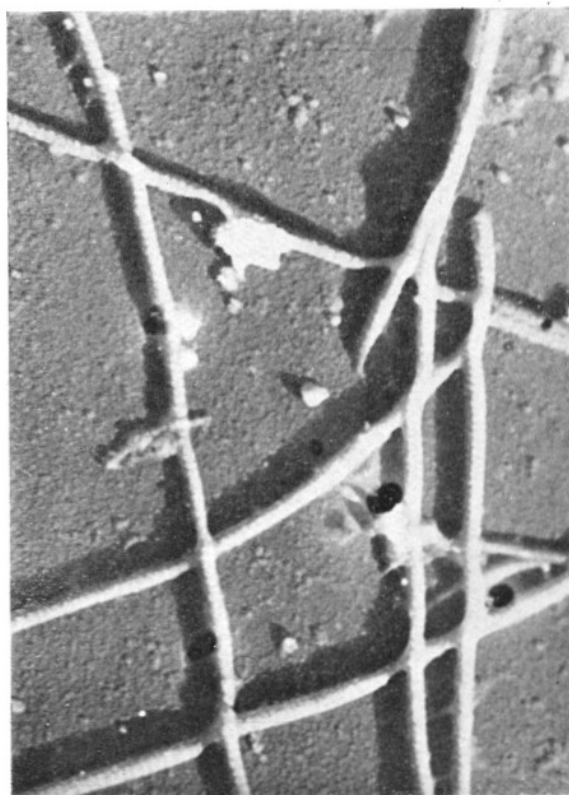


Fig. 4 - Fibre collagene del derma della cute della mammella. Fissazione in formalina.



Fig. 5 - Fibra collagena del derma della cute della mammella (materiale non fissato).

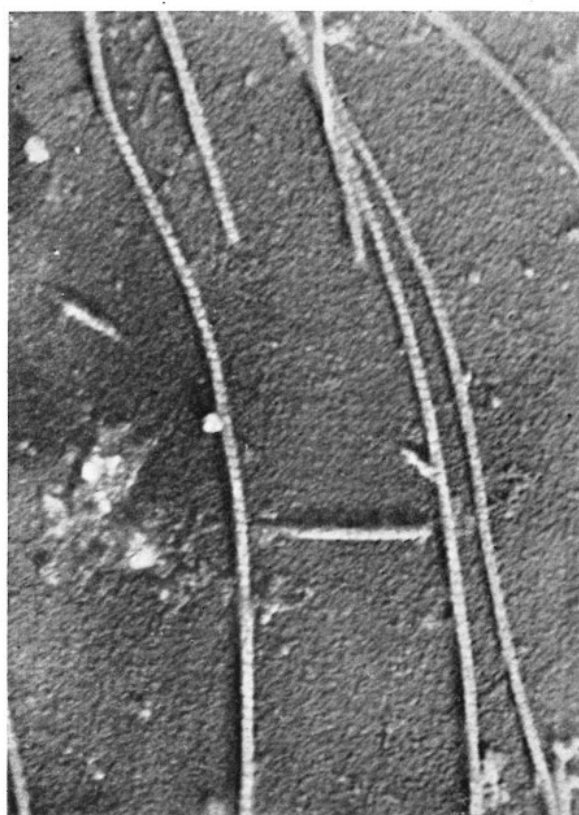


Fig. 6 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissaz. formolina.

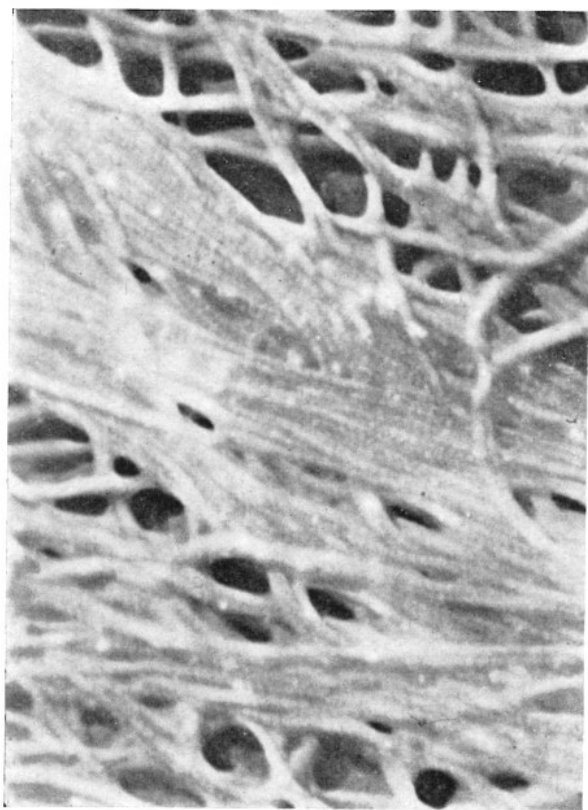


Fig. 7 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione formalina.

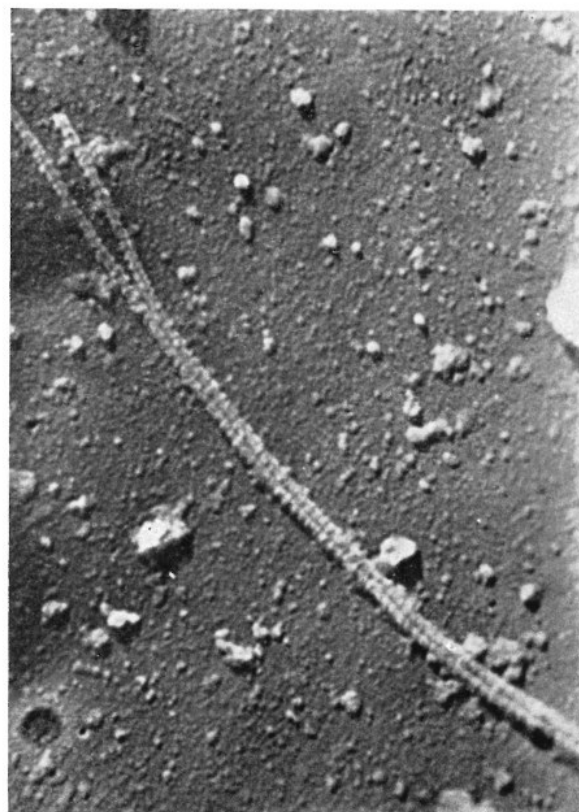


Fig. 8 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione in formalina.

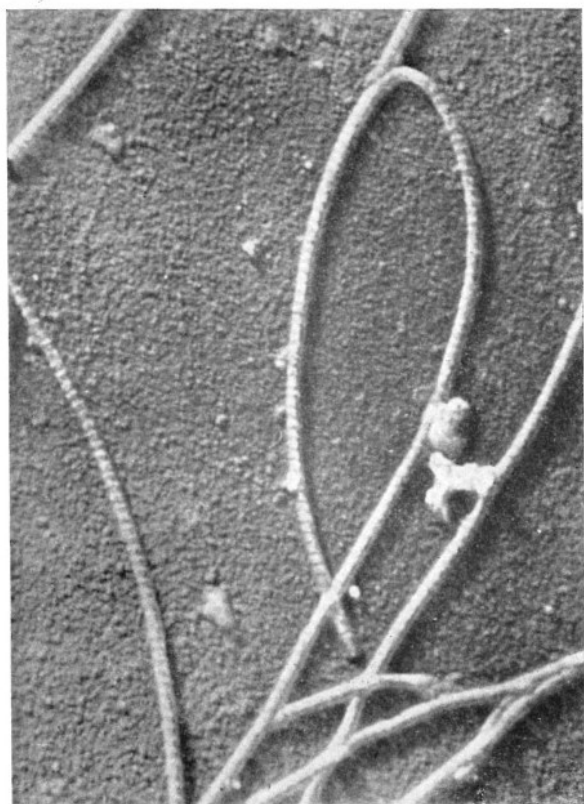


Fig. 9 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione in formalina.

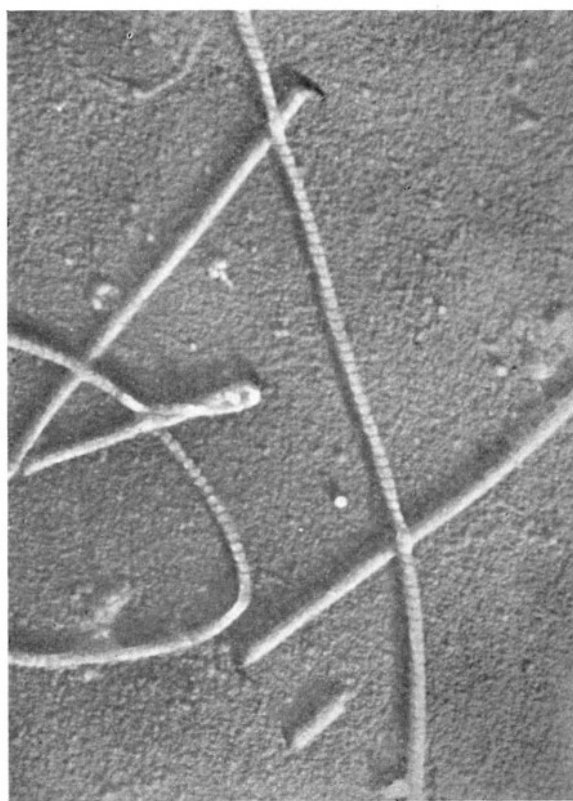


Fig. 10 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione in formalina.

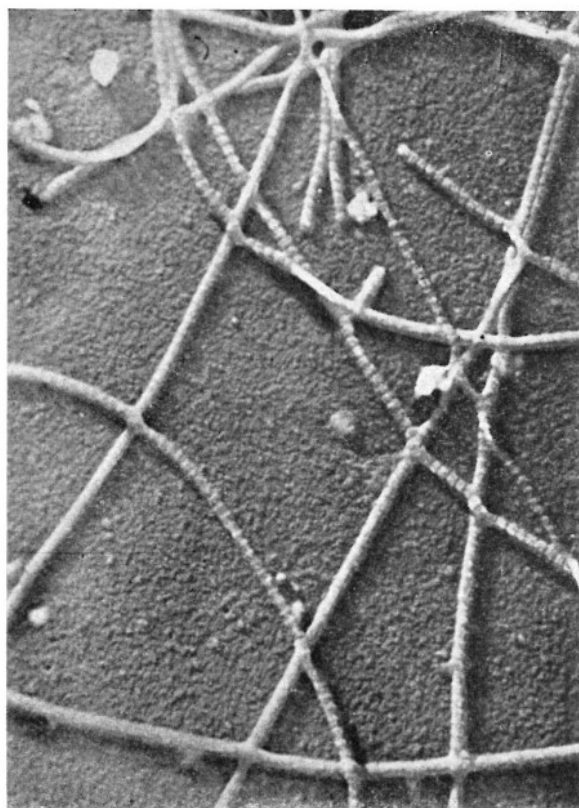


Fig. 11 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione in formalina.

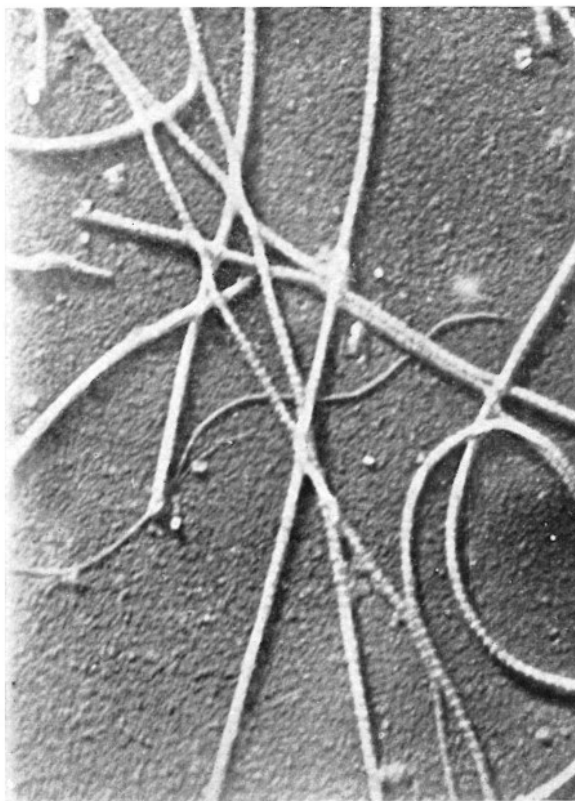


Fig. 12 - Fibre collagene di mastopatia fibroso-cistica della mammella. Fissazione in formalina.

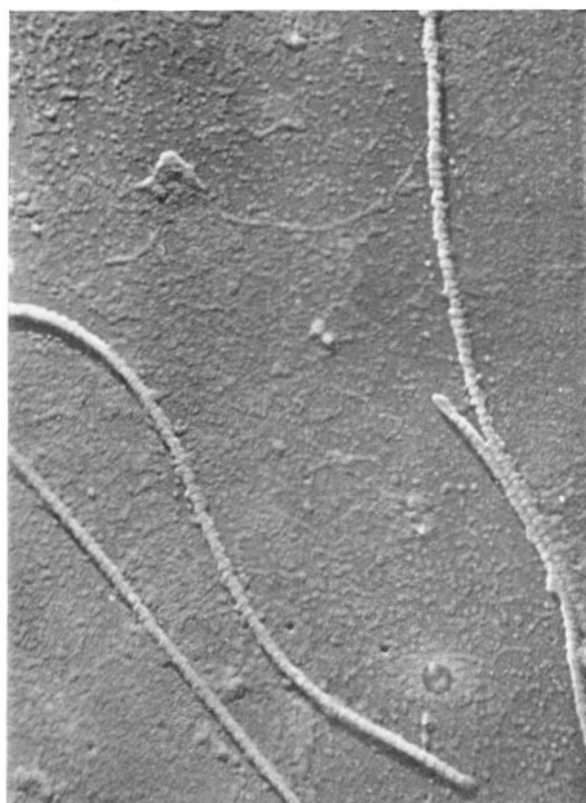


Fig. 13 - Fibre collagene dallo stroma di un carcinoma scirroso della mammella. Fissaz, in formalina.



Fig. 14 - Fibra collagene dallo stroma di un carcinoma scirroso della mammella. Fissaz, in formalina.

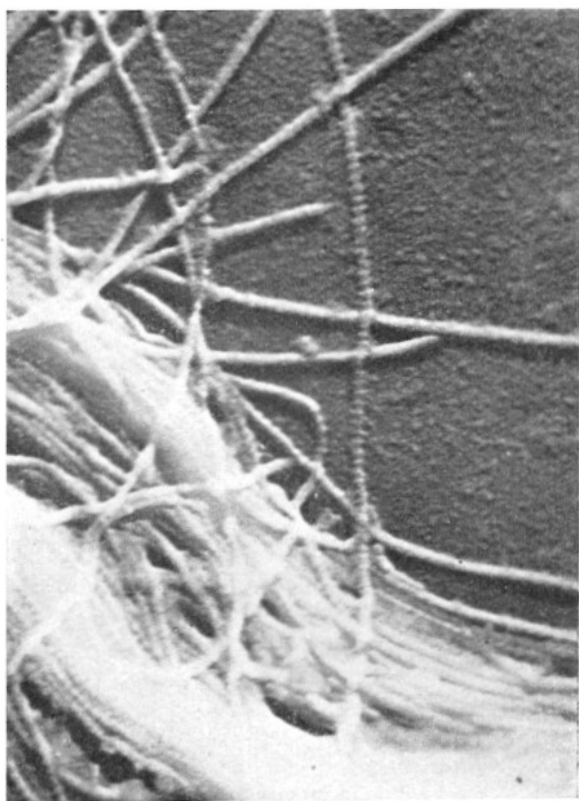


Fig. 15 - Fibre collagene dallo stroma di un carcinoma scirroso della mammella. Fissaz, in formalina.

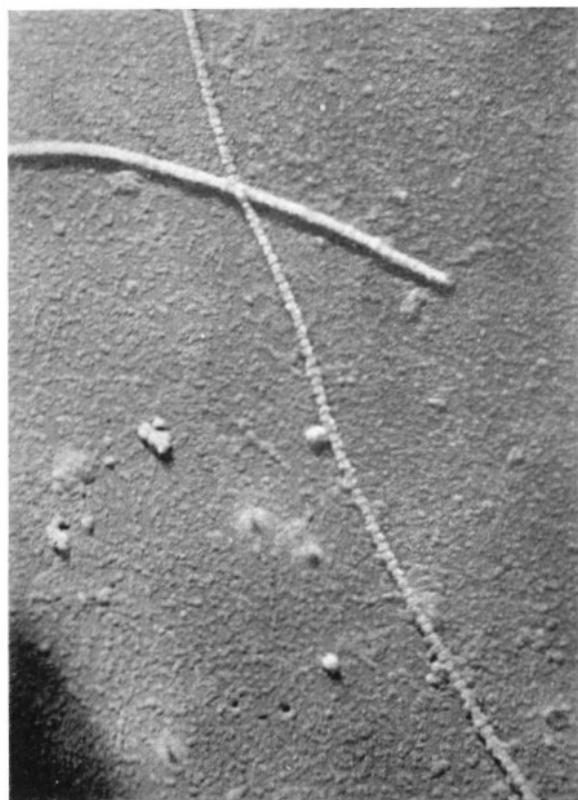


Fig. 16 - Fibre collagene dallo stroma di un carcinoma scirroso della mammella. Fissaz, in formalina.

rilievo che nelle due forme di mastopatia fibrosa cistica della mammella e solo in questi due casi, abbiamo osservato al microscopio elettronico in mezzo a fibrille regolarmente striate, la esistenza di qualche elemento fibrillare sottilissimo (spessore 194 Å) assolutamente privo di qualsiasi striatura.

Per la valutazione dello spessore delle singole fibrille ci siamo serviti dei numerosissimi fotogrammi elettromicroscopici. Mediante un comparatore abbiamo misurato lo spessore delle singole fibrille e precisamente di 57 appartenenti alla mastopatia fibrosa-cistica, di 38 provenienti da carcinoma mammario, di 20 provenienti da fibroadenomi e di 48 appartenenti al collagene del derma.

Nelle seguenti tabelle riportiamo i dati rilevati con queste misurazioni.

SPESORE DELLE FIBRILLE COLLAGENE DELLA MASTOPATIA
FIBROSA-CISTICA IN ANGSTRÖM

600	550	650	600	572	588
588	505	538	861	350	600
633	561	594	616	644	611
633	611	683	688	755	511
588	383	661	722	761	594
761	694	194	944	733	638
805	416	888	394	905	683
655	672	722	872	850	916
1122	1027	655	950	783	644
772	977	833			

SPESORE DELLE FIBRILLE COLLAGENE DEL CARCINOMA-MAMMARIO
IN ANGSTRÖM

627	583	650	644	644	633
683	788	666	566	638	650
488	533	922	666	405	688
527	488	377	311	355	833
688	494	522	711	477	705
394	566	472	333	288	277
300	455				

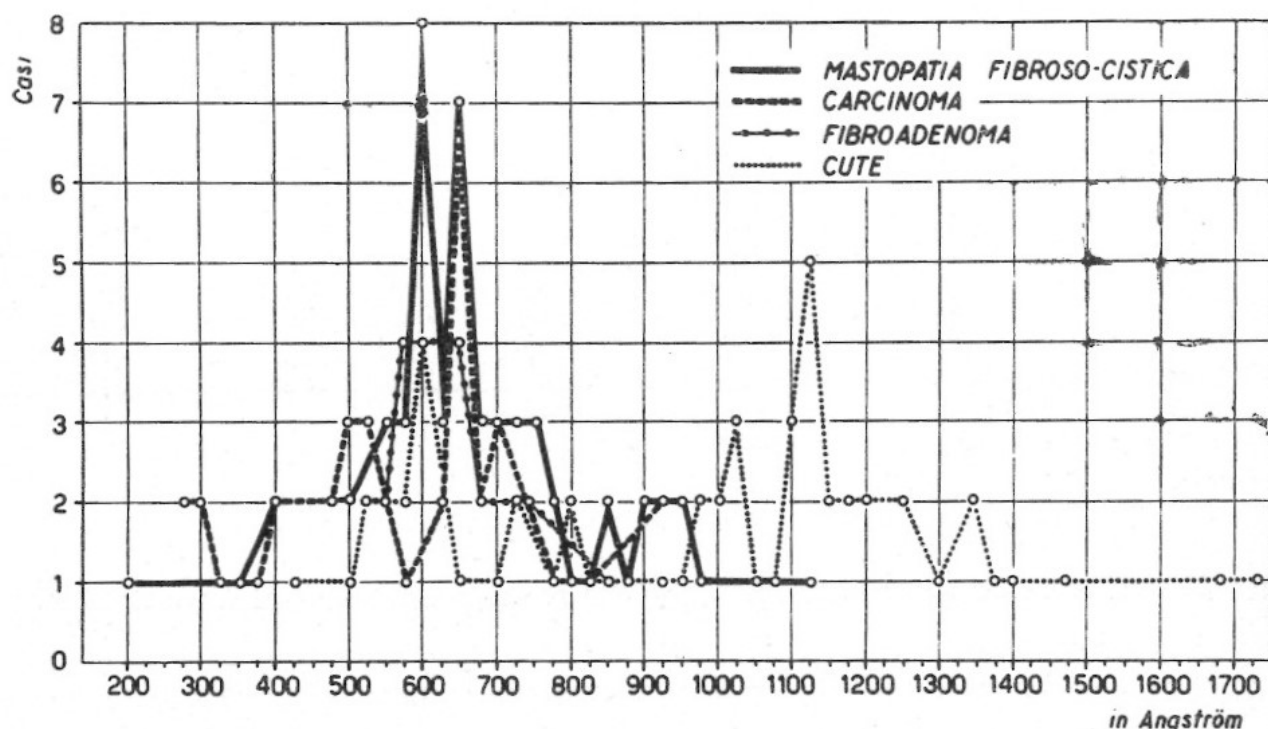
SPESORE DELLE FIBRILLE COLLAGENE DEL FIBROADENOMA
IN ANGSTRÖM

766	588	555	577	611	666
611	677	611	650	555	572
577	688	527	655	616	527
645	755				

SPESORE DELLE FIBRILLE COLLAGENE DEL DERMA CUTANEO IN ANGSTRÖM

1022	1377	1255	1005	1138	1416
438	844	1033	833	783	883
1733	1683	1255	1016	1022	1100
711	938	800	805	722	927
1211	1177	1133	1127	1183	1116
1305	927	1055	1105	1166	983
1150	727	1083	1138	1205	1366
1366	494	645	1111	1477	1333

Con queste cifre abbiamo costruito il seguente diagramma:



Sulle ascisse son segnati con approssimazione gli spessori delle singole fibrille, sulle ordinate il numero dei casi riscontrati per ogni valore misurato.

Dal grafico risulta abbastanza chiaramente che mentre il maggior numero delle fibrille del collagene della cute si aggira su uno spessore compreso fra 1000 Å e 1350 Å, lo spessore delle fibrille delle forme neoplastiche è notevolmente minore, non oltrepassando, specie per il carcinoma ed il fibroadenoma, mai i 925 Å.

Già durante le sedute al microscopio elettronico e dall'esame dei fotogrammi avevamo avuto la chiara impressione di ciò. Avevamo anche osservato una certa differenza di spessore fra le fibrille del carcinoma e quelle della mastopatia fibrocistica e del fibroadenoma, nel senso che quelle del carcinoma apparivano assai più sottili.

Nel nostro diagramma queste differenze non sono però rilevabili. Ma per confermare o escludere questa nostra impressione siamo andati a ricercare il valore medio degli spessori delle fibrille, sommando i valori riscontrati su ciascuna di esse nelle varie forme morbose prese in esame e dividendo il totale per il numero delle fibrille misurate. I risultati sono stati i seguenti:

Mastopatia fibroso-cistica		679,93 Å
Carcinoma	 ,	553,86 Å
Fibroadenoma		621,45 Å
Cute		1070,14 Å

Questi valori confermano in pieno le nostre impressioni e ci dicono anche che quanto più la forma tumorale è immatura tanto minore sembra essere lo spessore fino alle cifre più basse, che verrebbero così ad essere attributo di neoplasie maligne. Questo risultato potrebbe in certo qual modo avere dei punti di contatto con le osservazioni fatte da WOLPERS, dalle quali risulterebbe che le fibrille sono più sottili negli individui giovani che in quelli vecchi. C'è da pensare infatti che il collagene prelevato dalle zone neoplastiche sia effettivamente più giovane di quello del derma della cute della mammella e quello delle forme carcinomatose ancor più giovane di quello appartenente al fibro-adenoma o alla mastopatia fibrosa-cistica.

Ai risultati fin qui esposti, che devono essere ampliati e completati, non diamo per ora un valore assoluto, ma riconosciamo forse il merito di indicare un'altra via da seguire per una conoscenza morfologica sempre maggiore del tessuto collagene nelle forme neoplastiche.

Roma - Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDERSON — Pathology - 10 Mosby Company 1948 - St. Louis.
- 2) BAIRATI — citato da Levi.
- 3) BORRIES — Die Uebermikroskopie - Werner Laenger 1949 - Berlin.
- 4) FREY-WYSSLING — Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. Elsevier Publishing Company - 1948, New York.
- 5) GROSS e SCHMITT — J. Exp. Med. 5, 555, 1948.
- 6) HALL, JAKUS e SCHMITT — J. Am. Chem. Soc. 64, 1234, 1942.
- 7) HUECK — Ziegler's Beitr. 103, 308, 1930.

- 8) HUECK — Arch. f. Klin. Chirurg. 202, 382, 1941.
 - 9) HUZZELLA — Arch. f. exp. Zellforsch. 19, 363, 1937.
 - 10) LEVI — Trattato di Istologia. Utet - 1946 - Torino.
 - 11) NUTTING e BORASKY — J. Am., Leather Chem. Ass. 43, 96, 1948.
 - 12) PETERSEN — Grundniss der Histologie u. Mikroskopische Anatomie der Menschen - Springer 1941 - Berlin.
 - 13) PIACENTINI. — Bull. Scienze Med. Bologna 122, 1, 1950.
 - 14) RONDONI — Il cancro - CEA 1946 - Milano.
 - 15) SCHMITT, HALL e JAKUS — J. cell. comp. Physiol. 20, 11, 1942.
 - 16) SCHMITT, HALL e JAKUS — Biol. Symp. 10, 261, 1943.
 - 17) SCHMITT, HALL e JAKUS — J. appl. Phys. 16, 263, 1945.
 - 18) WOLPERS — Virch. Arch. 312, 292, 1944.
 - 19) WYCKOFF — Electron Mycroskopy - Interscience - New York - London - 1949.
-