

96. G. D. BOMPIANI. — Ricerche sulla ultrastruttura della fibra muscolare striata nella avitaminosi E sperimentale del coniglio.

Riassunto. — L'A. divide la trattazione in due parti: nella prima esamina criticamente le nozioni precedentemente acquisite — in base a ricerche di microscopia a luce polarizzata come pure in base ad osservazioni di ordine chimico e chimico-fisico — sulle modificazioni della fibra muscolare striata in corso della avitaminosi E sperimentale del coniglio.

Nella seconda parte l'A. riferisce su una ricerca personale al microscopio elettronico volta a definire in forma diretta le modificazioni della struttura proteica contrattile delle miofibrille nella avitaminosi E del coniglio.

Vengono anche riferite alcune osservazioni sulla struttura delle miofibrille normali al microscopio elettronico.

I risultati si possono sintetizzare come segue:

La miofibrilla striata appare al microscopio elettronico come una unità precostituita « in vivo », formata da filamenti paralleli di actina diretti secondo l'asse longitudinale, e da filamenti di miosina situati a livello delle bande A.

Nella avitaminosi E sperimentale del coniglio la diminuzione di opacità della banda A deve essere interpretata come espressione della scomparsa parziale o totale della miosina, mentre la disgregazione dei filamenti di actina va considerata alla stregua di un difetto di polimerizzazione della stessa proteina.

Résumé. — L'ouvrage est divisé en deux parties:

Dans la première l'Auteur examine au point de vue critique les notions précédemment acquises — au moyen de la microscopie à lumière polarisée et au moyen des recherches chimiques et chimico-physiques — sur les modifications de la fibre musculaire striée au cours de l'avitaminose E expérimentale du lapin.

Dans la seconde partie, l'Auteur s'entretient sur les résultats des recherches personnelles, au microscope électronique, faites dans le but d'établir les modifications de la structure protéique contractile des myofibrilles dans les mêmes conditions expérimentales.

Quelques observations collatérales sur la structures des myofibrilles normales au microscope électronique complètent l'ouvrage.

Les résultats peuvent être résumés brièvement comme il suit:

La myofibrille striée apparaît au microscope électronique comme

une unité préconstituée « in vivo », formée de filaments parallèles d'actine orientés selon l'axe longitudinale des fibrilles et de filaments de myosine situés au niveau des bandes *A*.

Dans l'avitaminose *E* expérimentale du lapin la diminution de l'opacité de la bande *A* doit être interprétée comme expression de la disparition partielle ou totale de la myosine, tandis que la désagrégation des filaments d'actine doit être considérée comme un défaut de polymérisation de la protéine elle-même.

Summary. — The paper results from two sections. In the first section are critically examined the previously in literature reported investigations (realized both with the polarized light microscope and with the chemical and physico-chemical analysis) on the changes of the striated muscle fibre in vitamin *E* deficient rabbits.

In the second section, a personal study on the electron microscope is reported on the changes of the contractil protein structure of the myofibrils in vitamin *E* deficient rabbits.

Some related investigations are also reported on the structure of normal myofibrils under the electron microscope.

The results are summarizable as follows:

Under the electron microscope the striated myofibril appears as a « in vivo » pre-formed entity resulting from *F* actin filaments parallelly arranged and from myosin filaments, present only at the level of the *A* bands.

In muscles of vitamin *E* deficient rabbits, the decreased opacity of the *A* band is to be referred to the partial or total disappearance of myosin, while the disintegration of the actin filaments is to be considered in terms of a polymerization defect of this protein.

Zusammenfassung. — Im ersten Teil des Berichtes werden vom Verfasser kritisch die bisherigen Kenntnisse über die Veränderungen der quergestreiften Muskelfaser in Kaninchen bei experimentelle Vitamin *E* Mangel, geprüft. Diese Kenntnisse wurden mittels Mikroskopbeobachtung bei polarisiertem Licht ebenso wie auf Grund chemischer und chemisch-physikalischer Beobachtungen gesammelt.

Im zweiten Teil der Verfasser berichtet über seine eigene Untersuchungen, die er mit dem Elektronenmikroskop zwecks unmittelbarer Feststellung der Strukturveränderungen der Kontraktilen Protein der Myofibrillen bei Vitamin *E* Mangel des Kaninchens ausführte.

Ausserdem Verfasser berichtet über einige Beobachtungen am Elektronenmikroskop über die Struktur normaler Myofibrillen.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

Die quergestreifte Myofibrille erscheint im Elektronenmikroskop als eine « in vivo » präkonstituierte Einheit, die aus der Längsachse gemäss ausgerichteten parallelen Aktinfasern und auf der Höhe der *A* Streifen liegenden Myosinfasern besteht.

Bei dem experimentellen Vitamin E Mangel des Kaninchens ist die grössere Durchsichtigkeit des *A*- Streifens als Zeichen des teilweisen oder völligen Myosinschwunds zu werten, während die Auflösung der Aktinfilamente als Defekt der Polymerisierung des Proteins zu werten ist.

Le ricerche sulla struttura submicroscopica della fibra muscolare striata hanno trovato ampio motivo di approfondimento dall'introduzione del microscopio elettronico in biologia. Tale strumento infatti consente un limite massimo di risoluzione corrispondente all'ordine di grandezza delle macromolecole, ed ha reso quindi possibile il confronto diretto della struttura intima della miofibrilla con le proteine muscolari filamentose chimicamente estratte. In tal modo ipotesi varie, elaborate sulla base delle nozioni indirette derivanti dall'analisi chimica, dalle ricerche istologiche al microscopio polarizzatore, dalle indagini istochimiche, hanno trovato, a seconda dei casi, piena conferma oppure accoglimento parziale o, ancora, completo diniego.

Mentre la letteratura registra tutta una serie di osservazioni sulla struttura del muscolo normale al microscopio elettronico, del tutto assenti risultano, finora, le ricerche relative alla patologia muscolare.

Ho quindi creduto fare oggetto di pubblicazione questi rilievi preliminari sulle modificazioni della fibra muscolare striata nel corso della distrofia sperimentale da avitaminosi *E* nel coniglio. Le presenti osservazioni fanno parte integrante di un vasto piano di ricerche sulla patologia della fibra muscolare, indetto dal Centro per lo studio della Fisiopatologia del C.N.R., diretto dal Prof. Guido Vernoni.

Colgo l'occasione per esprimere all'Illustre Maestro l'espressione della più profonda gratitudine per avermi ammesso a partecipare di questo interessante corpo di investigazioni, affidandomi la parte relativa alle osservazioni al microscopio elettronico.

Prima di passare ad esporre i particolari della tecnica adottata ed i risultati ai quali sono pervenuto, non reputo fuori luogo sintetizzare alcune delle tappe fondamentali nello studio della distrofia muscolare sperimentale da avitaminosi *E*.

EVANS e SCOTT per primi constatarono che ratti alimentati con una dieta sintetica, bene equilibrata, alla quale venivano aggiunte tutte le vitamine allora conosciute, crescevano bene, ma divenivano sterili. La sterilità poteva essere evitata se la dieta era complementata con foglie di lattuga. La sostanza contenuta nella lattuga e ritenuta attiva fu chiamata vitamina *E* ed identificata con l'allofanato di due alcool denominati tocoferoli. Successivamente furono descritte sia nella cavia che nel coniglio lesioni degenerative gravi del tessuto muscolare da carenza di questo principio attivo (GOETTSCH M. e PAPPENHEIMER A. M. ¹). Quindi fu documentato come la mancanza di vitamina *E* fosse essenziale per l'insorgenza di miodistrofie alimentari (MORRIS S. G. ²; MACKENZIE G. C. e Mc COLLUM E. V. ^{3, 4, 5}).

Il comportamento del tessuto muscolare striato in corso di carenza del fattore *E* è stato studiato sotto gli aspetti rispettivamente morfologico (istologico e submicroscopico) e biochimico.

Le alterazioni istologiche del tessuto nella distrofia da ipovitaminosi *E* non presentano alterazioni peculiari. Si rileva precocemente perdita della striatura trasversale della fibra e perdita dell'orientamento interno in senso longitudinale delle colonnette di miofibrille, che si presentano a spirale o ad anelli, « accasciate nell'interno del tubo sarcolemmatico, come se il mioplasma fibrillare in diversi distretti non fosse più sostenuto dal sarcoplasma » (ALOISI M. ⁶). Si nota ancora moltiplicazione dei nuclei del sarcolemma, rigonfiamento del sarcoplasma che successivamente si vacuolizza, aspetti di « necrosi a zolle » di Zenker, in qualche caso edema e reazione infiammatoria del connettivo interstiziale con calcificazione delle fibre necrotiche (mioliti). I quadri istologici descritti riproducono quasi tutti gli aspetti regressivi e progressivi propri della patologia della fibra striata. Pertanto sembra logico concludere con ALOISI che « le alterazioni microscopiche sono verosimilmente un epifenomeno comune a molti, ed in sostanza diversi, processi submicroscopici ».

Particolarmente interessanti si sono rivelate le ricerche eseguite con il microscopio polarizzatore sul comportamento comparativo delle fibre muscolari di animali normali e di animali tenuti in carenza di vitamina *E*.

In questi ultimi anni ALOISI M., ASCENZI A. e BONETTI E. (⁷) hanno po-

(¹) J. Exp. Med., 54: 145 (1931).

(²) Science, 2: 424 (1939).

(³) Science, 89: 370 (1939).

(⁴) J. Nutr., 19: 547 (1940).

(⁵) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 48: 642 (1941).

(⁶) Arch. De Vecchi per l'Anat. Patol. e la Med. Clin., 3: 4 (1940).

(⁷) J. of Path. Bacter., 64: 321 (1952).

tuto rilevare come il potere birifrattivo della stria *A*, ad anisotropia positiva progressivamente si attenua. Rilievo che, d'altra parte, è suscettibile di documentazione quantitativa esatta. In stadii più avanzati del processo si rileva materiale ad anisotropia ottica negativa, dapprima in corrispondenza delle zone normalmente isotrope (strie *I*), quindi, in forma continua, lungo tratti abbastanza estesi della fibrocellula.

Ricerche coordinate di ordine biochimico e chimico-fisico sulle proteine contrattili, condotte da ALOISI M., BONETTI E. e MERUCCI (8) e da ALOISI M., ASCENZI A. e BONETTI E. (9, 10) hanno permesso di stabilire come negli stessi muscoli distrofici la quota di miosina progressivamente diminuisca fino a scomparire, mentre l'actina permane quantitativamente imm modificata anche negli stadii estremi della distrofia. Tuttavia, mentre la miosina non denuncia alterazioni qualitative apprezzabili, al contrario, negli stadii avanzati del processo, l'actina mostra completa incapacità a polimerizzarsi, cioè a trasformarsi dalla forma globulare o *G* nella forma filamentosa o *F*, quando venga trattata con KCl, NaCl, ecc. Il fenomeno è stato osservato sia studiando il comportamento della birifrangenza di flusso, sia definendo le modificazioni morfologiche delle proteine estratte, al microscopio elettronico.

In seguito ad ulteriori ricerche, gli stessi autori (11) sono riusciti ad interpretare i reperti relativi alle alterazioni substrutturali del muscolo al microscopio polarizzatore sulla base delle modificazioni delle proteine contrattili. La caduta della potenza birifrattiva nei tratti anisotropi dipende essenzialmente da perdita della miosina; la comparsa di materiale dotato di birifrangenza negativa è un fenomeno verosimilmente dovuto a depolimerizzazione della actina.

Sulla base dei presenti rilievi ho eseguito una ricerca sistematica diretta a stabilire le modificazioni della struttura dei muscoli striati nel corso della avitaminosi *E* sperimentale nel coniglio e ciò soprattutto nell'intento di definire, in forma più diretta, i rilievi inizialmente stabiliti dagli AA. sopracitati. Nel corso di queste ricerche mi si è offerta l'opportunità di eseguire osservazioni anche sulla struttura submicroscopica del tessuto muscolare striato normale. Degli uni e degli altri riferirò partitamente, dopo avere esposto i dati essenziali inerenti al materiale studiato ed alla tecnica seguita.

(8) *Experientia*, VIII/2, 69 (1952).

(9) *Rendiconti Ist. Sup. Sanità*, 45: (1952).

(10) *J. of Path. Bacter.*, 64: 324 (1952).

(11) *J. of Path. Bacter.*, 64: 324 (1952).

PARTE SPERIMENTALE

Il materiale di studio è rappresentato da muscoli somatici pallidi (muscolo psoas) di cavie e di conigli normali, nonché da muscoli distrofici di conigli tenuti a dieta di Houchin e Mattil, modificata, priva di vitamina *E* (Cfr. ALOISI M., ASCENZI A. e BONETTI E. ¹²).

La tecnica seguita per la preparazione del materiale e la osservazione delle miofibrille al microscopio elettronico è — nelle sue grandi linee — quella di DRAPER N. H. e HODGE A. J. (¹³), sia pure con qualche modificazione, come verrà illustrato più avanti.

La ricerca è stata realizzata in parte su muscoli freschi, in parte su muscoli fissati in formalina 10%.

Per il materiale non previamente fissato si è così proceduto:

frammenti di muscolo psoas di coniglio venivano tagliati in sottilissime strisce dello spessore di circa 0,3 cm., le quali erano poste in soluzione di 0,02M KCl (onde evitare la perdita di miosina) per una o due ore.

Seguiva dissociazione in apparecchio del tipo Waring-blender, previa aggiunta di 50-100 ml. di acqua bidistillata (a).

L'apparecchio era azionato per due tempi della durata di 20'' ciascuno intervallando una sosta di 10' al fine di evitare il riscaldamento del materiale.

Le fasi successive della preparazione corrispondono a quelle realizzate per il muscolo fissato e di esse riferirò più avanti.

La metodica adottata per il materiale fissato può essere così riassunta:

Il muscolo psoas veniva tagliato in strisce dello spessore di 0,3 cm. circa. Queste erano fissate su zoccolotti di sughero allo scopo di evitare alterazioni da contrattura. Seguiva la fissazione in una soluzione di formalina al 10% per la durata di 24 h. almeno. Quindi le striscioline fissate erano liberate dal supporto e finemente tagliuzzate. Si passava allora al trattamento in Waring-blender, previa aggiunta di circa 150 ml. di acqua bidistillata. L'apparecchio veniva azionato per tre tempi di 8' intercalati da opportuni periodi di sosta, onde evitare la benchè minima alterazione del tessuto per sovrariscaldamento.

Per i muscoli di conigli distrofici è necessario ridurre adeguatamente il tempo di dissociazione, perchè la resistenza meccanica del tes-

(a) Ho trovato particolarmente adeguato allo scopo l'apparecchio Braun-Multimix.

(¹²) J. of Path. Bacter., 64: 324 (1952).

(¹³) Aust. j. exp. Biol. Med. Sci., 27: 463 (1949).

suto risulta molto diminuita. Ho potuto ottenere materiale adatto per l'osservazione praticando un trattamento in tre tempi della durata di 5' ciascuno.

La preparazione veniva completata, sia che si usasse muscolo fresco o previamente fissato, centrifugando la sospensione a 2000 giri al minuto per 4' e raccogliendo il materiale sedimentato in modo da allontanare, insieme al liquido supernatante le più fini impurità, ed in particolare le esili fibrille collagene. Per separare invece le particelle più pesanti come i grossi frustoli di tessuto non dissociato è necessario sospendere nuovamente il materiale e centrifugare a 400-600 giri al minuto per 1'. Questa volta si raccoglie il supernatante.

Il materiale così preparato veniva portato alla concentrazione ottimale per l'osservazione al microscopio elettronico. Questa non può essere prevista, ma è soprattutto dettata dalla esperienza. Personalmente ho trovato di particolare utilità la prassi della osservazione preliminare di gocce del materiale al microscopio ottico. Essa permette di farsi una idea approssimativa, ma tuttavia adeguata, del grado di concentrazione.

Il materiale così allestito veniva deposto con un'ansa di platino sulla membrana portaoggetti di collodio. Ad essiccamento avvenuto, il preparato veniva « ombreggiato » con cromo secondo la tecnica di WILLIAM e WYKOFF.

Al fine di fornire dei ragguagli sull'ordine di grandezza del materiale che si osserva al microscopio elettronico nei confronti dei comuni rilievi istologici, credo utile far precedere, alla illustrazione dei miei reperti, i seguenti richiami preliminari.

La fibra muscolare striata è costituita da fasci di colonnette, che in sezione trasversale si identificano con le aree di CONHEIM; ogni singola colonnetta è a sua volta formata da unità minori, o miofibrille, disposte parallelamente le une alle altre e orientate secondo l'asse della fibra.

Orbene il materiale nastriforme che si osserva al microscopio elettronico corrisponde a frammenti — nel senso della lunghezza — di singole miofibrille.

In accordo con DRAPER e HODGE penso che la miofibrilla debba considerarsi una unità precostituita nella fibra muscolare. Sono giunto a questa conclusione in base all'osservazione che il diametro massimo di queste formazioni risulta sempre dello stesso ordine di grandezza, anche se le miofibrille siano state ottenute dopo trattamento di breve durata. L'unità miofibrilla è definita quindi dalla impossibilità di oltrepassare un certo limite quantitativamente superiore di organizzazione. Non mi

sembra si possa convenire con SZENT-GYÖRGYI A. (¹⁴, ¹⁵, ¹⁶) che considera le formazioni nastriformi del microscopio elettronico un prodotto della dissociazione meccanica, al quale mancano limiti precisi nel senso dello spessore.

Delle miofibrille non conosciamo invece la lunghezza, perchè la tecnica di preparazione ne spezza la continuità. A questo proposito, dall'esame dei miei preparati si rileva come l'interruzione della miofibrilla avvenga con spiccata regolarità a livello del disco *I* che si dimostra pertanto il luogo di minore resistenza alle sollecitazioni meccaniche, oltrechè all'azione degli enzimi, sia batterici (DRAPER e HODGE, ¹⁷), che triptici (SCHICK A. F. e HASS G. M., ¹⁸).

A) OSSERVAZIONI RELATIVE A MUSCOLO NORMALE.

L'immagine striata della fibra muscolare quale viene descritta dalla istologia classica, trova corrispondenza nelle formazioni strutturali che si osservano al microscopio elettronico (figg. 1, 2, 5). Il disco anisotropo *A* corrisponde ad una zona relativamente opaca al fascio elettronico. L'opacità è dovuta ad una sostanza meno permeabile al fascio medesimo, la quale si raccoglie in maniera quasi esclusiva in questa zona. Sulla natura di tale sostanza le opinioni sono ancora incerte; sembra che essa possa identificarsi, almeno in parte, con la miosina. Il disco *I* è di dimensioni più limitate ed è relativamente più trasparente al fascio elettronico. In questa zona è più evidente il disegno a filamenti longitudinali allineati parallelamente lungo l'asse della fibra, che tuttavia, ad una osservazione analitica fine, si può rilevare anche a livello del disco *A*.

Nel tratto intermedio del disco *I* trovasi la stria *Z* e, corrispondentemente, a metà del disco *A* repertasi la stria *M*. Esse appaiono rilevate rispetto alle parti restanti della miofibrilla. Più raramente la stria *M* o mesofragma è delimitata su entrambi i versanti da una depressione con i caratteri di un sottilissimo solco. Si ricava pertanto l'impressione che la sostanza opaca della zona *A* sia disposta simmetricamente in due semibande ai lati del mesofragma, senza tuttavia venire in contatto con il materiale di quest'ultimo. Tale aspetto è stato descritto da REED R. e

(¹⁴) Acta Physiol. Scandinava, 9: Suppl. 25 (1945).

(¹⁵) Chemistry of Muscular Contraction; Acad. Press. New York (1948).

(¹⁶) Science, 110: 411 (1949).

(¹⁷) Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 27: 465 (1949).

(¹⁸) Science, 109: 487 (1949).

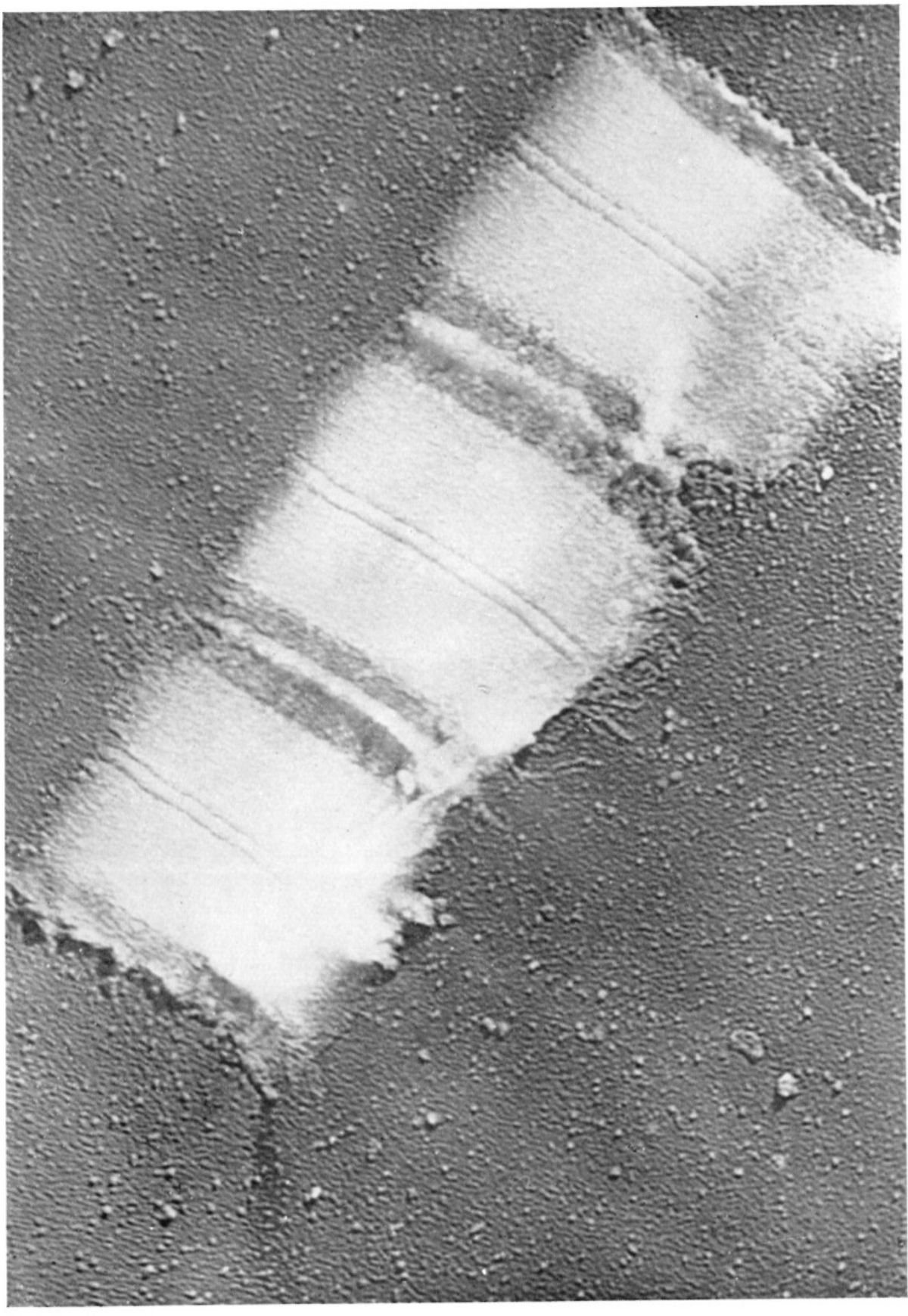


Fig. 1. - Miofibrilla normale preparata da muscolo non previamente fissato (Ingrandimento: 24.000 X).

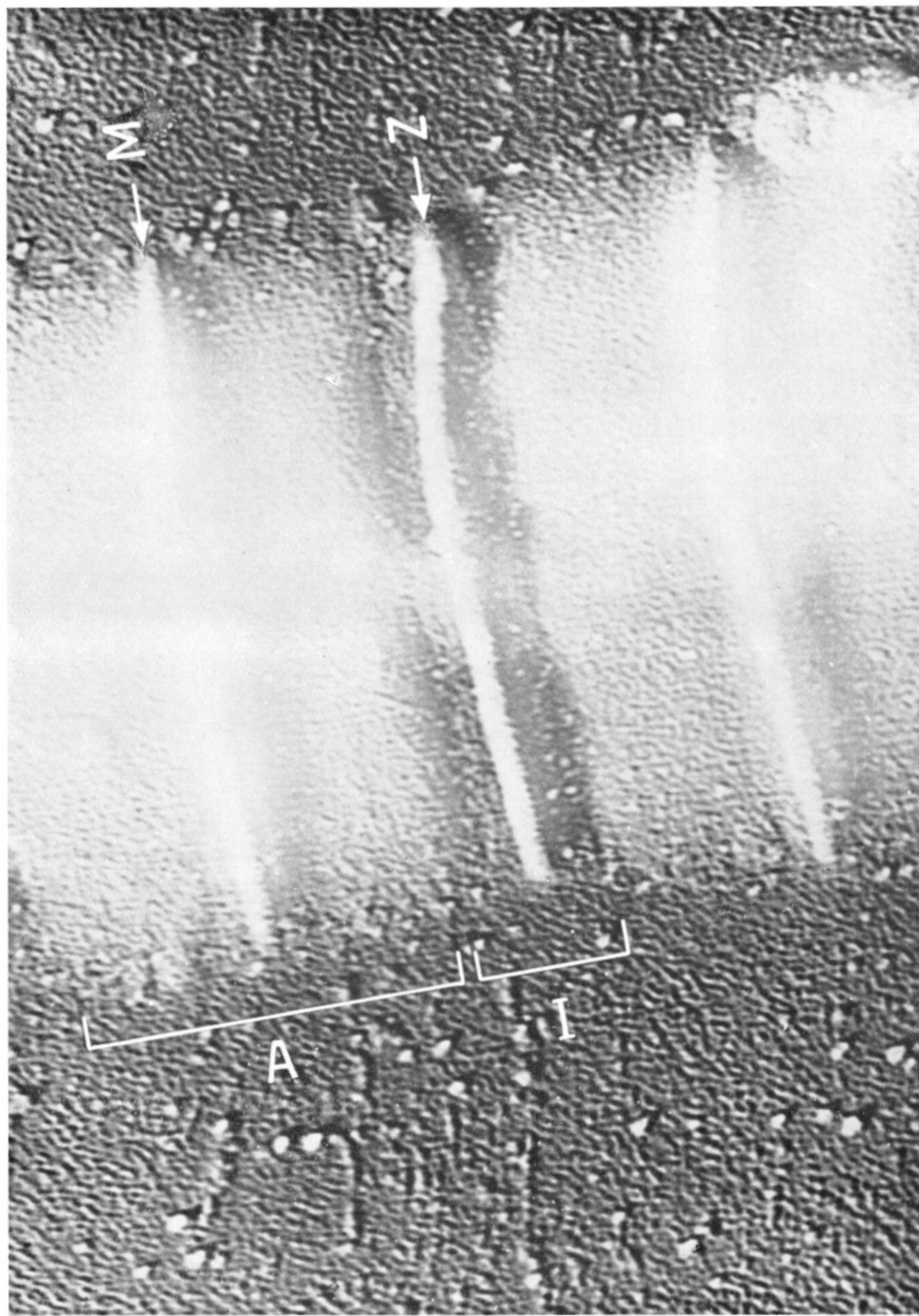


Fig. 2. - Miofibrilla normale, in parte « lavata », preparata da muscolo fresco (Ingrandimento: 18.000 X).

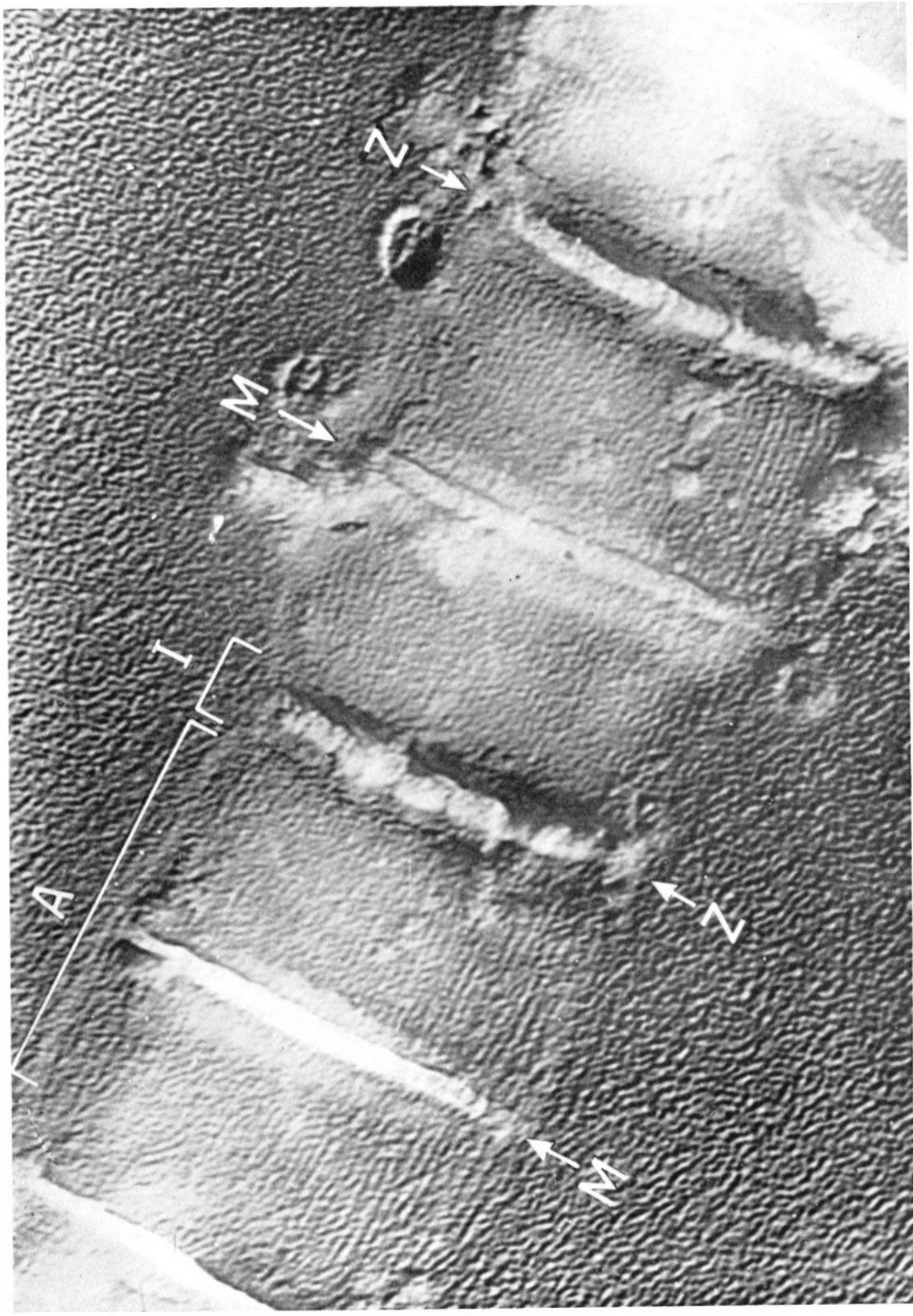


Fig. 3. - Miofibrilla normale « lavata », preparata da muscolo fresco. Permangono le strie Z ed M. Sono bene visibili i filamenti di actina a disposizione parallela (Ingrandimento: 18.000 X).



Fig. 4. - Miofibrilla normale « lavata », preparata da muscolo fresco (Ingrandimento: 18.000 X).

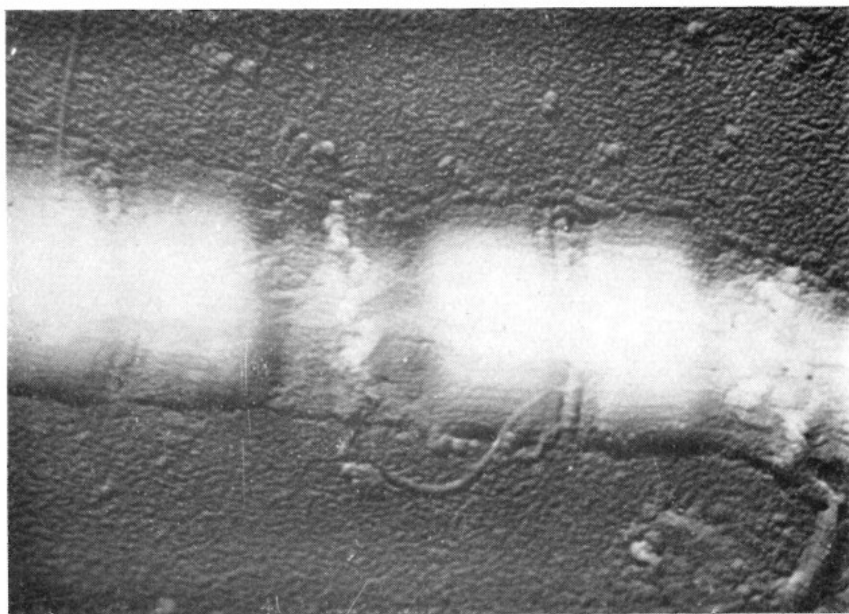


Fig. 5. - Miofibrilla di tessuto muscolare normale, fissato in formalina (Ingrandimento: 18.000 \times).

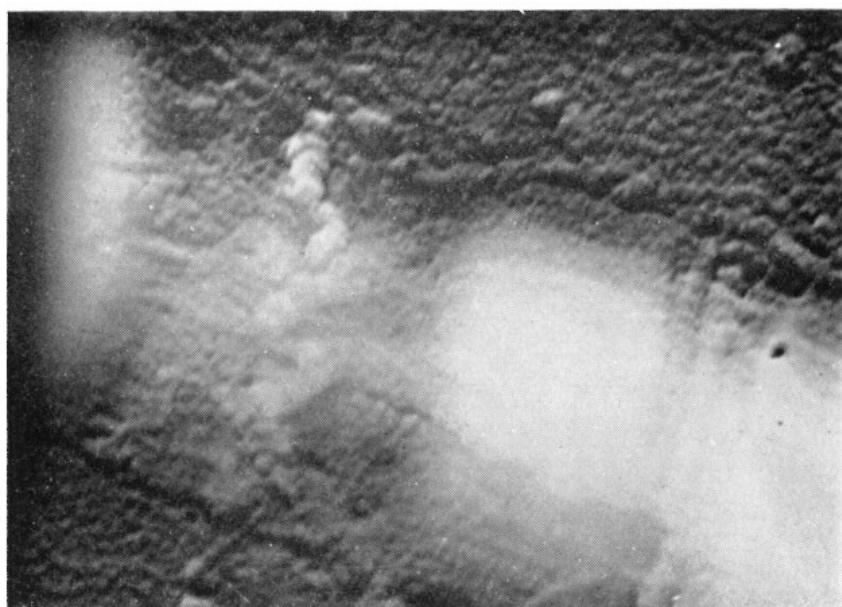


Fig. 6. - Particolare della miofibrilla illustrata nella figura precedente (Ingrandimento: 39.000 \times).

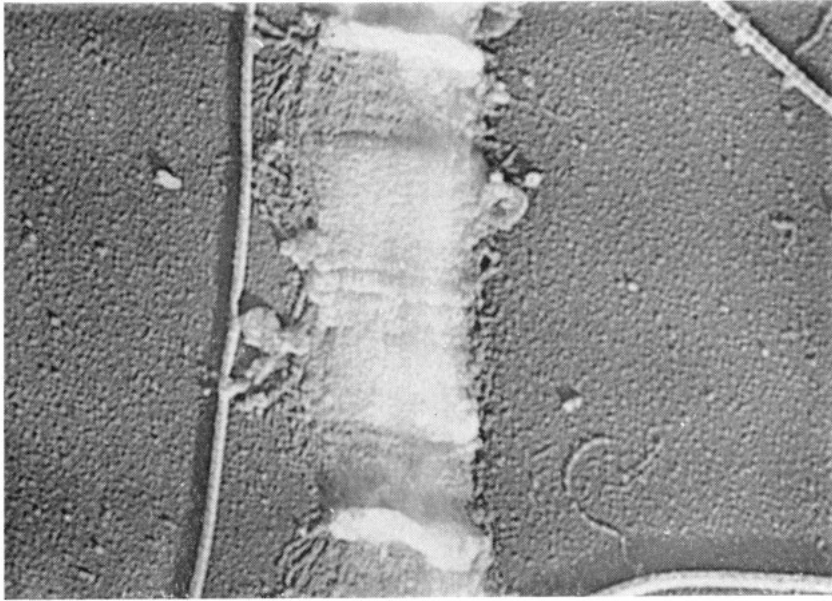


Fig. 7. - Miofibrilla di muscolo distrofico, previamente fissato in formalina. Fase iniziale di elisione del disco *A* (Ingrandimento: 18.000 \times).

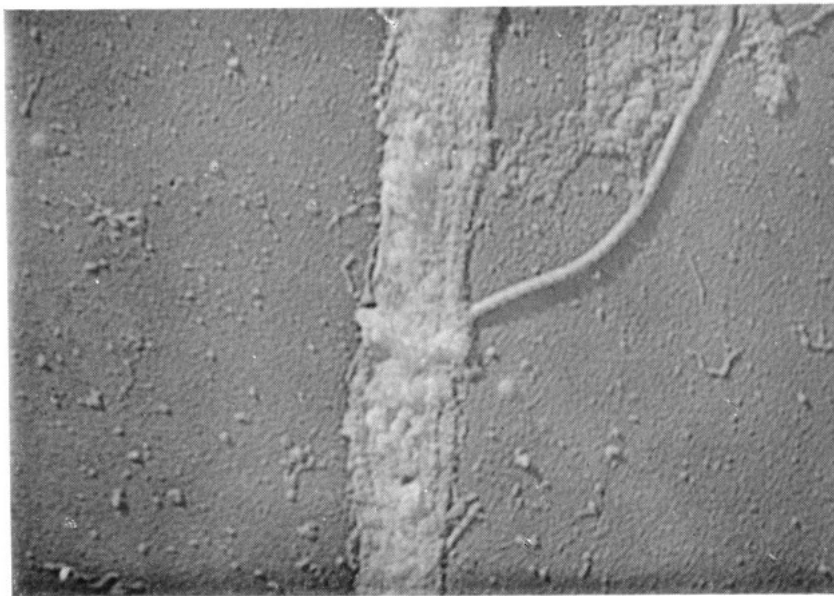


Fig. 8. - Miofibrilla di muscolo distrofico previamente fissato in formalina. Elisione del disco *A* con abbondante materiale coagulato disposto lungo il traliccio delle protofibrille (Ingrandimento: 18.000 \times).

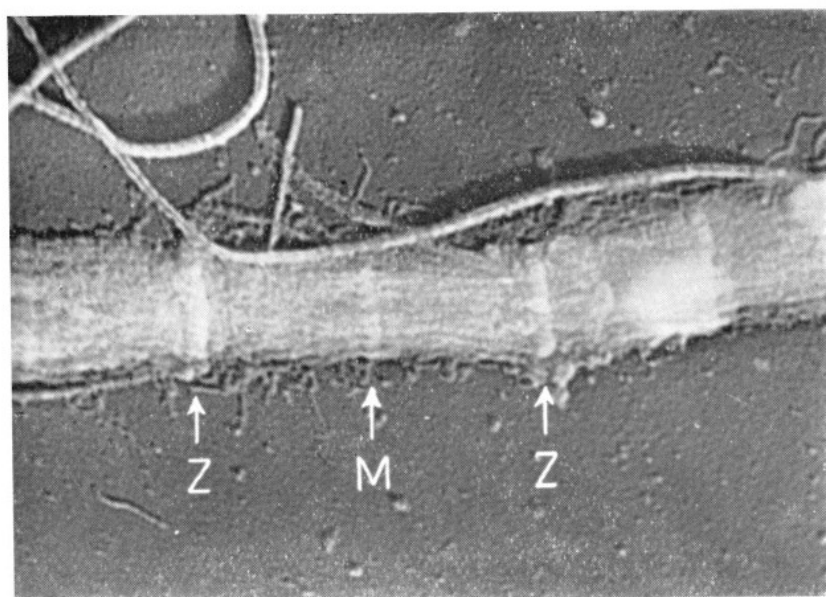


Fig. 9. - Miofibrilla di muscolo distrofico previamente fissato in formalina. Pressochè completa elisione del disco A (Ingrandimento: 18.000 X).



Fig. 10. - Miofibrilla di muscolo distrofico previamente fissato in formalina. Nel campo microscopico si visualizzano fibrille collagene (Ingrandimento: 18.000 X).

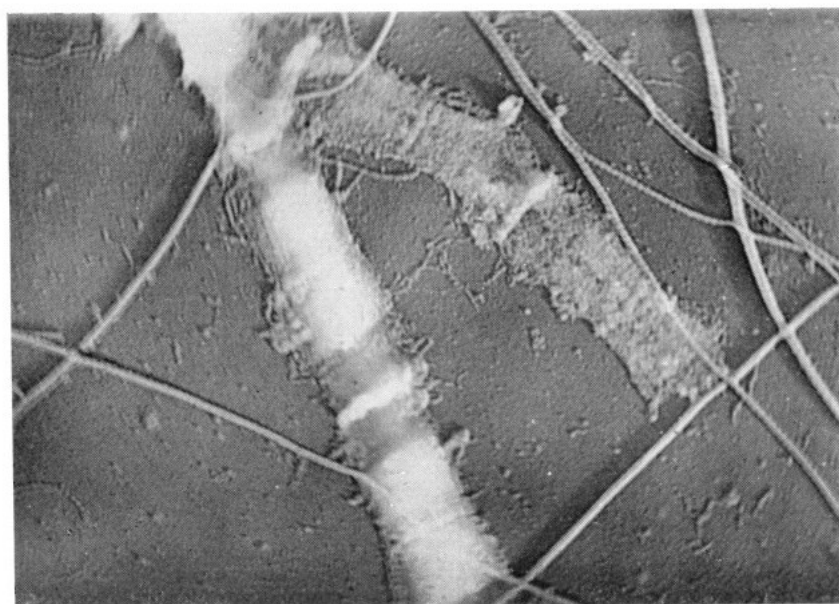


Fig. 11. - Miofibrilla di muscolo distrofico previamente fissato in formalina. Una di esse presenta completa elisione del disco A e dissociazione della trama delle protofibrille (Ingrandimento: 18.000 \times).

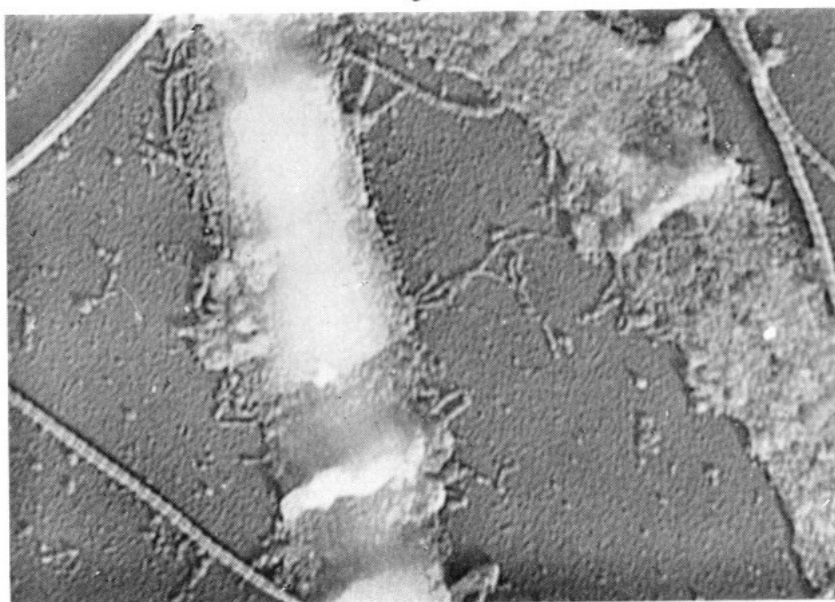


Fig. 12. - Particolare della miofibrilla illustrata nella figura precedente (Ingrandimento: 34.000 \times).



Fig. 13. - Miofibrilla di muscolo distrofico non previamente fissato. È scomparso il disegno alterno dei dischi *A* ed *I*. Permangono invece le strie *Z* ed *M*, la membrana del fondo è disseminata di detriti di protofibrille (Ingrandimento: 7.000 \times).



Fig. 14. - Particolare relativo ad un estremo della miofibrilla della figura precedente. Completa dissociazione della trama protofibrillare di actina (Ingrandimento: 18.000 \times).

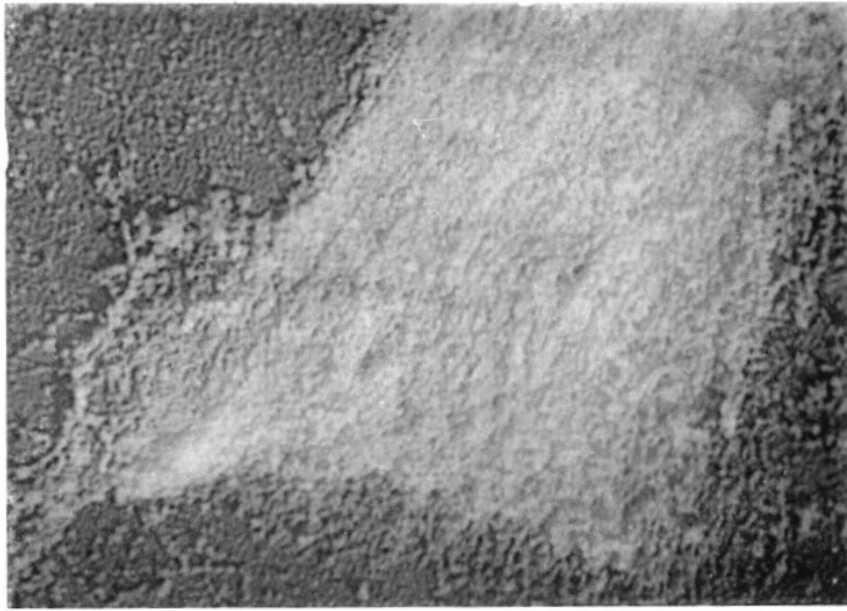


Fig. 15. - Particolare relativo all'altro estremo della miofibrilla precedente (Ingrandimento: 18.000 \times).

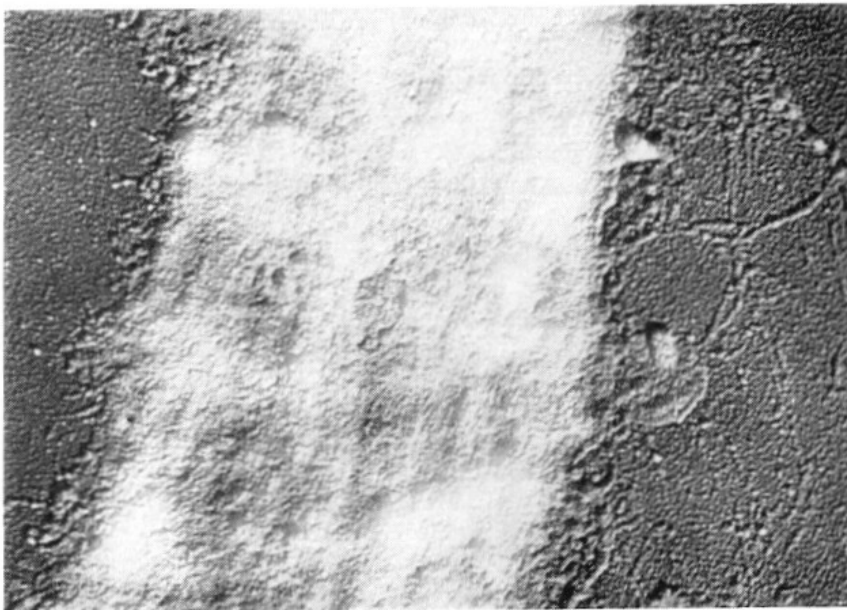


Fig. 16. - Miofibrilla di muscolo non fissato, allo stato di avanzata distrofia (Ingrandimento: 18.000 \times).

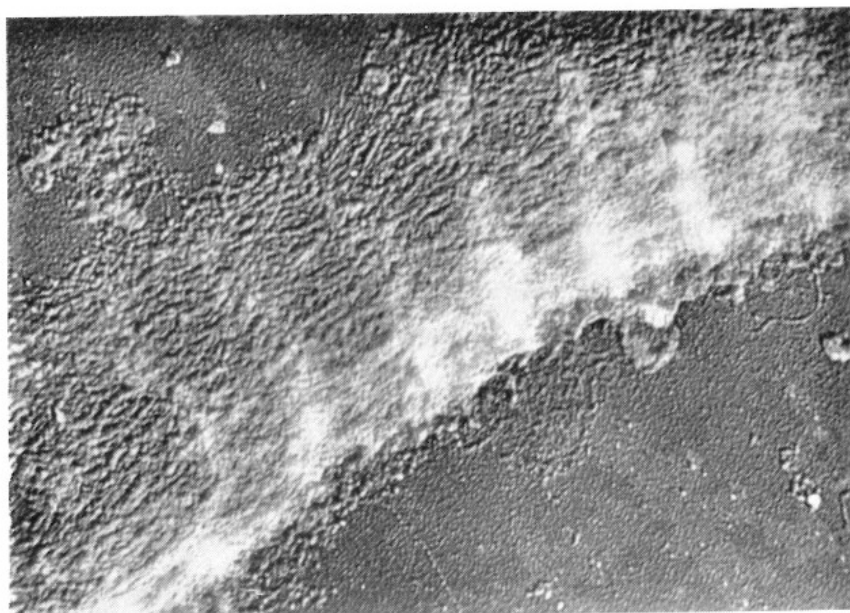


Fig. 17. - Miofibrilla di muscolo non fissata, allo stadio di distrofia estrema (Ingrandimento: 18.000 \times).

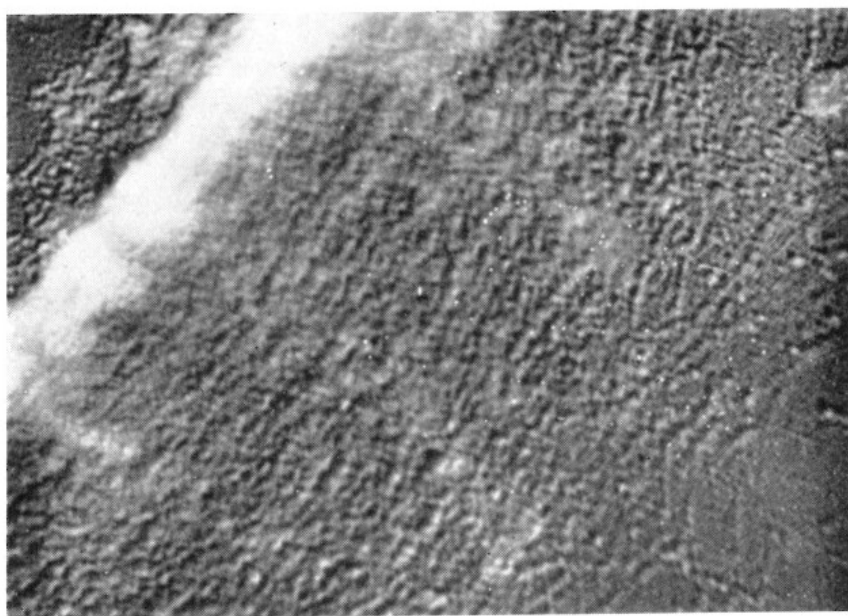


Fig. 18. - Particolare della miofibrilla illustrata nella figura precedente (Ingrandimento: 18.000 \times).

RUDALL K. M. (¹⁹, ²⁰) i quali ebbero a rilevarlo in preparati allestiti con il loro metodo delle repliche. Non è tuttavia di frequente osservazione. Non è stato descritto nè da DRAPER e HODGE nè da SZENT-GYÖRGY. Da parte mia ho avuto la possibilità di rilevarlo soltanto in alcuni preparati di materiale non previamente fissato (fig. 1).

Mentre la stria *Z* ha un aspetto amorfo, superficie accidentata e grossolanamente ondulata per sovrapposizione di masse di materiale apparentemente poco organizzate, la zona *M* mostra bene evidente la struttura e filamenti longitudinali continui.

La struttura submicroscopica della miofibrilla normale è anche più chiaramente apprezzabile quando il muscolo sia stato previamente fissato in formalina.

L'esame del muscolo non fissato permette tuttavia un'analisi più profonda attraverso la rimozione del materiale idrosolubile: cosiddetto « muscolo lavato » (figg. 3, 4). Le miofibrille infatti preparate da tessuto muscolare fresco tenuto in acqua per un lasso adeguato di tempo risultano omogeneamente costituite da filamenti disposti parallelamente secondo la direzione di allungamento. Pertanto non è più rilevabile la diversità di struttura tra disco *A* e disco *I* e la miofibrilla assume un aspetto uniforme. Si osservano tuttavia, regolarmente intervallati, gli inofragmi, che resistono all'azione solvente dell'acqua.

I filamenti proteici o protofibrille si continuano lungo più sarcomeri (fig. 4), disposti parallelamente gli uni agli altri, mantenendo un perfetto allineamento. Il diametro medio di una protofibrilla è di circa 100 Å, oscillando entro limiti rispettivamente massimo e minimo di 250 Å e di 50 Å. [Cfr. HALL C. E., JAKUS M. A. e SCHMITT F. O. (²¹, ²²)]. Dato che la tecnica di preparazione del materiale spezza le protofibrille, non è possibile determinare con esattezza la lunghezza delle stesse. Nella direzione dell'asse maggiore le singole protofibrille rivelano un caratteristico aspetto a nodi o a « corona di rosario » [HALL, JAKUS e SCHMITT (²³); SZENT-GYÖRGYI (²⁴)] dovuto versosimilmente all'allineamento di unità morfologiche elementari, di forma globulare o lievemente allungata di circa 300×100 Å. Per queste caratteristiche le protofibrille corrispondono morfologicamente alle macromolecole di actina *F* chimicamente estratta.

(¹⁹) Bioch. Biophys. Acta, 2: 19 (1948).

(²⁰) Bioch. Biophys. Acta, 2: 7 (1948).

(²¹) (citato da Grégoire), 1944.

(²²) J. Appl. Physiol., 16: 459 (1948).

(²³) (citato da Grégoire), 1944.

(²⁴) Chemistry of Muscular Contraction; Acad. Press. New York (1948).

(²⁵) SZENT-GYÖRGYI A. - Biol. Bull., 96: 140 (1949).

Si può quindi ritenere che l'actina sia presente in maniera continua lungo tutto il decorso della miofibrilla, anche nella zona *A*, dove tuttavia i filamenti proteici si associano ad altro materiale.

B) OSSERVAZIONI RELATIVE A MUSCOLO DI ANIMALI DISTROFICI.

Le miofibrille isolate da muscolo di conigli tenuti a dieta carente di vitamina *E*, rivelano modificazioni evidenti della struttura. A seconda della entità e dello stadio evolutivo del processo morboso, si rinvengono fondamentalmente, sia pure in via del tutto schematica, tre ordini di alterazioni.

Nelle miofibrille meno interessate appare ancora evidente, per quanto più sfumata ed indecisa, la successione alterna dei dischi *A* ed *I*. Così pure sono presenti e riconoscibili le strie *Z* ed *M*. In una fase ulteriore le miofibrille non dimostrano più il disegno a dischi alterni ma denunciano una configurazione molto simile a quella delle cosiddette miofibrille normali lavate. Esse cioè risultano di filamenti continui (protofibrille) a corona di rosario, la cui configurazione corrisponde a quella della actina *F* artificialmente estratta.

Infine le miofibrille maggiormente interessate appaiono disgregate al punto da costituire ammassi di granuli o di filamenti cortissimi.

Malgrado la pluralità e le particolarità degli aspetti assunti dalle presenti lesioni nelle singole miofibrille prese in esame si può prospettare come da un punto di vista generale, le caratteristiche morfologiche fondamentali indotte dallo stato carenziale siano le seguenti:

- a) graduale scomparsa della sostanza propria del disco *A*;
- b) evidenziazione della struttura fondamentale della miofibrilla risultante di soli filamenti di actina;
- c) perdita da parte di questi ultimi della aggregazione lineare dei globuli e conseguente scomparsa dell'orientamento e della struttura delle protofibrille.

Questi rilievi trovano chiara illustrazione nella documentazione fotografica.

Le figure 7, 11, corrispondono ad una miofibrilla ancora pressochè normale. Essa conserva quasi integralmente il materiale opaco localizzato come di norma a livello del disco *A*. Pur tuttavia spicca in maniera più evidente che di regola il disegno caratteristico delle protofibrille. Il processo distrofico può considerarsi pertanto in una fase molto precoce, corrispondente alla perdita della sostanza opaca della zona *A*.

Le figure 8, 9 mostrano la perdita pressochè totale del materiale opaco del disco *A*. Questo materiale si frammenta in zolle irregolari che sono disperse lungo il traliccio formato dalle protofibrille. La sostanza opaca è completamente assente nelle miofibrille illustrate dalle figure 9, 10, onde ne deriva un aspetto molto simile a quello delle miofibrille lavate (aspetto a stuoia). Persistono tuttavia le strie *Z* e *M* che si rendono evidenti anche nelle miofibrille maggiormente interessate dal processo distrofico. In questi preparati l'orientamento delle protofibrille di actina appare nell'insieme ben conservato. Tuttavia se si analizzano con attenzione i singoli filamenti ed i rapporti che intercorrono fra loro, non è difficile evidenziare la non più perfetta regolarità nella disposizione parallela e di conseguenza la perdita dell'allineamento trasversale dei granuli costitutivi dei filamenti.

Negli stadii avanzati della distrofia si manifestano in forma completa entrambe le espressioni fondamentali della lesione miofibrillare (figg. 11, 12, 13, 14, 15). Scomparsa della opacità a livello del disco *A*; persistenza dello « scheletro » di actina, che risulta tuttavia discontinuo e disorientato. Quest'ultimo rilievo è bene evidente a forte ingrandimento (figg. 14, 15). I filamenti sono molto corti, orientati in tutte le direzioni, a forma ora di *S* italica, ora di *C*, per lo più costituiti da pochi granuli. In alcuni tratti poi si rinvengono addirittura singoli granuli isolati. Formazioni molto brevi, a catenella, granuli minuti numerosissimi, talora raccolti in masserelle irregolari, si rinvengono anche dispersi sulla membrana portaoggetti al di fuori dell'ambito della miofibrilla degenerata. Nelle figg. 17, 18, 19 e 20 sono rappresentati alcuni preparati nei quali il processo di disgregazione delle protofibrille ha raggiunto la espressione estrema. Le miofibrille dimostrano aspetto granuloso, come pulverulento, simile ad un ammasso di detriti. I granuli ed i brevi filamenti sono del tutto disorientati e si adagiano disordinatamente sulla membrana portaoggetti.

* * *

In ordine ad una interpretazione adeguata dei presenti reperti, vorrei subito porre in rilievo come questi possano considerarsi in perfetta armonia con quelli desunti dalle già citate ricerche di BONETTI E., ALOISI M. e MERUCCI ⁽²⁶⁾ e di ALOISI M., ASCENZI A. e BONETTI E. ^(27, 28),

⁽²⁶⁾ *Experientia*, VIII/2, 69 (1952).

⁽²⁷⁾ *J. of Path. Bact.*, 64: 324 (1952).

⁽²⁸⁾ *Experientia*, VIII/7, 266 (1952).

sul comportamento chimico, fisico-chimico e submicroscopico (al microscopio polarizzatore) del muscolo nella distrofia da avitaminosi *E* del coniglio.

Infatti è possibile stabilire un netto parallelismo fra i rilievi degli AA. suddetti ed i miei.

La diminuzione quantitativa della miosina, che costituisce l'espressione apparentemente iniziale del processo distrofico, si manifesta al microscopio polarizzatore con caduta della potenza birifrattiva dei tratti *A*, mentre *al microscopio elettronico si evidenzia la diminuzione fino a scomparsa della sostanza propria degli stessi tratti A*.

Con l'evoluzione ulteriore del processo distrofico, il muscolo presenta al microscopio polarizzatore una forte birifrangenza negativa, dapprima limitata alle zone *I*, normalmente isotrope, quindi diffusa a tutta la fibra. A questo reperto fa riscontro, all'indagine con il microscopio elettronico, una immagine particolare delle miofibrille. Sia in corrispondenza dei dischi *A* che dei dischi *I* esse risultano omogeneamente formate da *protofibrille*, come filamenti di actina. Queste tuttavia non mantengono l'aspetto filamentoso continuo a nodi, ma *appaiono disgregate, interrotte*, e nei casi estremi ridotte ad un ammasso di *granuli*.

Questo reperto è *verosimilmente espressione di un'alterata condizione del processo di polimerizzazione della actina* che, come è stato dimostrato, pur mantenendosi quantitativamente imm modificata, perde la capacità di passare dalla forma globulare (G) nella forma filamentosa (F).

I rilievi su riportati — come desunti dall'osservazione condotta, qui, per la prima volta, al microscopio elettronico, sulla fibra muscolare di conigli in carenza di vitamina *E* — danno credito alla valutazione che le modificazioni ottiche, constatate su fibre muscolari in analoghe condizioni, al microscopio polarizzatore, con la comparsa di una forte birifrangenza negativa lungo il decorso della fibra, siano da riferire allo stato di depolimerizzazione della actina.

Le osservazioni da me perseguite al microscopio elettronico sui caratteri strutturali del tessuto muscolare striato pertinente sia a conigli normali che a conigli sottoposti a distrofia sperimentale da carenza di vitamina *E*, opportunamente vagliate sulla base di un'ampia revisione della letteratura mi consentono di formulare le seguenti proposizioni:

1) Lo studio della miofibrilla striata al microscopio elettronico porta a ritenere come questa rappresenti una entità strutturale precostituita e pertanto già esiste *in vivo*;

2) L'immagine striata della fibra muscolare, quale ci deriva dalle nozioni della istologia classica, non è espressione di un aspetto puramente funzionale del tessuto, bensì poggia su caratteri strutturali ben definiti anche al livello submicroscopico;

3) Il disco anisotropo *A*, ha come immagine corrispondente al microscopio elettronico una zona fortemente opaca costituita da un disegno apparentemente a duplice striatura, longitudinale e trasversale.

4) Il disco *I* isotropo è rappresentato da una zona di lunghezza più limitata rispetto al disco *A*. In questa zona è più evidente il disegno a filamenti longitudinali allineati parallelamente lungo l'asse della fibra;

5) La stria *Z* e quella *M* risultano particolarmente rilevate rispetto alle parti restanti della miofibrilla. La prima ha generalmente aspetto amorfo, mentre nella seconda si rinviene quasi sempre il disegno delle protofibrille longitudinali;

6) Le miofibrille preparate da frammenti di muscolo non fissato e rimasto lungo tempo in acqua (miofibrille « lavate ») dimostrano una parziale elisione della striatura, per cui non sono più riconoscibili le zone *A* da quelle *I*. Entrambe appaiono costituite da protofibrille longitudinali, parallele, con i caratteri di filamenti di actina *F*. Risaltano invece con particolare evidenza e permangono inalterate le strie *Z* ed *M*;

7) I muscoli di conigli in distrofia da avitaminosi *E* dimostrano profonde modificazioni nell'immagine delle miofibrille, immagine che varia sensibilmente a seconda della fase evolutiva raggiunta dal processo morboso;

8) In uno stadio iniziale il disco *A* diventa meno compatto e più trasparente, dimostrando con maggior risalto la struttura delle protofibrille;

9) In questo stesso stadio la sostanza propria della zona *A* appare spesso frammentata in piccoli blocchi disposti irregolarmente lungo la miofibrilla;

10) In una fase ulteriore scompare completamente la suddivisione in bande della miofibrilla e questa assume caratteri molto simili a quelli della miofibrilla « lavata »;

11) A questo stadio le protofibrille mostrano dapprima una dissociazione nell'allineamento parallelo, quindi una profonda modificazione di struttura contrassegnata dallo spezzettamento e dalla disgregazione dei filamenti che sono ridotti a piccole catenelle o a granuli sparsi senza alcun orientamento;

12) Oltre i filamenti ora accennati non si rinvengono strutture riferibili ad altri costituenti proteici;

13) Ritengo che le modificazioni strutturali ora riferite possano essere interpretate nel senso seguente:

a) la diminuzione di opacità della banda *A* è espressione della diminuzione fino a scomparsa della miosina;

b) la disgregazione delle protofibrille, riferibili all'actina *F*, va considerata come manifestazione di un difetto di polimerizzazione della proteina.

14) Questa interpretazione trova piena corrispondenza nelle ricerche chimiche quantitative e qualitative sulle proteine muscolari contrattili in coniglio distrofico per carenza di vitamine *E*, le quali dimostrano diminuzione fino a scomparsa della miosina estraibile e inattivazione dell'actina estratta, che permane tuttavia in quantità invariata.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Istituto di Patologia Generale dell'Università.