

78. Ennio Lucio BENEDETTI. — Ricerche sul tessuto connettivo reticolare con il microscopio elettronico. — Nota II. Rilievi sulla morfologia delle fibre e delle microfibrille.

Riassunto. — L'Autore studia la struttura delle fibre reticolari dei linfonodi mediante il microscopio elettronico con i seguenti risultati:

Le fibre reticolari visibili con il microscopio ottico sono costituite da due strutture collegate, la sostanza cementante di natura glicoproteica e le microfibrille.

La sostanza cementante in soluzioni acide ed alcaline si rigonfia pur rimanendo aderente alle microfibrille, le quali anch'esse si rigonfiano.

Le microfibrille reticolari formano le fibre di maggiore spessore, riunendosi in fasci a spirale intrecciata.

Il periodo delle microfibrille corrisponde a 640 Å; si riscontrano microfibrille con il periodo di 210 Å.

Lo spessore più frequente delle microfibrille è di 400 Å.

Mediante le prove di rigonfiamento con soluzioni acide ed alcaline, le microfibrille si risolvono in filiere di globuli, le quali, se si disgregano ulteriormente, perdono la loro individualità filamentosa.

Le microfibrille presentano argentofilia ed argentaffinità.

Résumé. — L'auteur étudie au microscope électronique la structure des fibres réticulées des lymphonodes et obtient les résultats suivants:

Les fibres réticulées visibles au microscope ordinaire sont constituées par deux structures combinées dont la cimentation a lieu à travers une substance de nature glycoprotéique et par les micro-fibrilles.

La substance de cimentation en présence de solution acide et alcaline subit un regonflement tout en restant adhérente aux micro-fibrilles qui, elles aussi, subissent un regonflement.

Les micro-fibrilles réticulées forment les fibres plus épaisses en s'unissant en faisceaux tressés en spirale.

La période des micro-fibrilles correspond à 640 Å; on trouve aussi des micro-fibrilles dont la période correspond à 210 Å.

L'épaisseur la plus fréquente des micro-fibrilles est de 400 Å.

Par les expériences de regonflement avec des solutions acides et alcalines, les micro-fibrilles se transforment en colliers de globules qui, si on les désagrège encore, perdent leur individualité comme filaments.

Les micro-fibrilles sont argentophiles et ont une affinité pour l'argent.

Summary. — The author has investigated the structure of the reticular fibres of lymph-nodes by means of the electron microscope, with the following results:

The reticular fibres visible with the optical microscope are composed of two allied structures, the cementing substance (of glyco-protein nature) and the microfibrils.

The cementing substance swells in acid or alkaline solution, but remains adherent to the microfibrils, which themselves also swell.

The reticular microfibrils give rise to the thickest fibres, joining to form bundles of interlacing spirals.

The phase of the microfibrils corresponds to 640 Å; microfibrils are also found with a phase of 210 Å.

The most frequent thickness of the microfibrils is 400 Å.

During the tests for swelling in acid and alkaline solution, the microfibrils break up into separate globules which, if made to disintegrate further, lose their filamentous character.

The microfibrils show argentophilia and argento-affinity.

Zusammenfassung. — Der Verfasser untersucht die Struktur der Retikularfasern der Lymphknoten mit dem Elektronenmikroskop, wobei sich folgende Resultate ergeben:

Die mit dem optischen Mikroskop sichtbaren Retikularfasern bestehen aus zwei miteinander verbundenen Strukturen, die durch eine Glykoprotein-Substanz und Mikrofibrillen zusammengehalten werden.

In Säure- und Alkalilösungen schwillt die Glykoprotein-Substanz an, bleibt jedoch mit den ebenfalls anschwellenden Mikrofibrillen fest verbunden.

Die Retikular-Mikrofibrillen bilden die Fasern, die den grössten Durchmesser haben, indem sie sich zu spiralförmig verflochtenen Bündeln vereinen.

Die Periode der Mikrofibrillen entspricht 640 Å. Angetroffen werden auch Mikrofibrillen mit einer Periode von 210 Å.

Der häufigste Durchmesser der Mikrofibrillen beträgt 400 Å.

Infolge der Schwellversuche mit Säure- und Alkalilösungen lösen sich die Mikrofibrillen in aus kleinen Kügelchen bestehende Schnüre auf, die bei weiterer Zersetzung jede Filament-Eingeschaft verlieren.

Die Mikrofibrillen gehen mit Silber Verbindungen ein und sind dem Silber chemisch verwandt.

In una nota precedente ⁽¹⁾ ho illustrato alcuni aspetti morfologici della sostanza cementante, che, insieme alle microfibrille, costituisce le fibre riconoscibili al microscopio ottico; l'esistenza di essa era stata, fino a quella mia dimostrazione, piuttosto supposta che dimostrata.

TECNICA DELLA RICERCA

Abbiamo seguito le indagini su linfonodi normali prelevati da individui deceduti in età giovanile (20-30 anni) e da cavie apparentemente sane e di giovane età, usando della stessa tecnica indicata nella nota I.

Per eseguire le prove dell'argentaffinità e dell'argirofilia ed altre osservazioni si allestivano sezioni al congelatore di linfonodi non fissati, le quali venivano raccolte e seccate su portaoggetti in termostato a 37° per 4 ore.

Le sezioni come tali, venivano digerite in tripsina (0,5%, pH = 8,2 per 2 ore a 37°). Alla digestione seguiva un prolungato lavaggio. Successivamente, per mezzo di aghi, sotto il controllo del microscopio in contrasto di fase, venivano asportate, per quanto possibile completamente, le strutture collagene. Dopo ripetuti lavaggi le fibrille residue venivano distaccate dal vetrino e dissociate con omogeneizzatore, indi lavate più volte in acqua bidistillata mediante centrifugazione.

Le fibrille così dissociate venivano fissate per 6 ore in formalina al 20% neutralizzata con carbonato di calcio, indi ripetutamente lavate e lasciate in acqua distillata per 12 ore in ghiacciaia. Per escludere la presenza di formalina nel liquido sopranatante si impiegava il reattivo di Schiff.

Successivamente, le fibre così fissate venivano trattate con il metodo di Bielschowsky oppure con acido periodico 0,5% per 5 minuti poi ancora lavate in acqua distillata e poste nella soluzione argentica preparata nel seguente modo: 10 cc. sol. nitrato di argento 10%, 2 gocce di NaOH 40%; dissoluzione incompleta del precipitato con NH₃. Le fibre rimanevano per tre ore a 37° C al buio in questa soluzione, poi lavaggio in acqua bidistillata, quindi fissazione in soluzione di iposolfito di sodio 5% per 10 minuti e lavaggio in acqua. Le fibrille venivano osservate senza ombreggiatura, oppure metallizzate con vapori di cromo.

Le osservazioni sono state eseguite con il microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità diretto dal prof. D. Marotta al quale esprimo i sensi della mia devota gratitudine.

⁽¹⁾ BENEDETTI E. L. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 16, 494 (1953).

Al prof. C. Trabacchi, ai proff. Bocciarelli e Mortara ed al sig. Tomassini i quali mi hanno generosamente guidato e coadiuvato durante la ricerca va il mio ringraziamento sincero e profondo.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Le fibre visibili al microscopio ottico, nella visione elettronica (fig. 1) hanno l'aspetto di un nastro costituito da una sostanza finemente granulosa, dalla quale a volte sporgono alcune microfibrille. I tratti di incrocio delle fibre hanno l'aspetto di placchette dalle quali si originano i rami in varie direzioni (fig. 2)

La sostanza cementante è costituita da un insieme di globuli aventi il diametro di 300 Å i quali appaiono aderenti alla superficie delle microfibrille tanto da mascherarne per lo più totalmente la struttura. Le fibre reticolari, anche se lavate in acqua a lungo ed energicamente mediante omogeneizzatore non perdono la sostanza cementante (fig. 3), al contrario delle fibre collagene della capsula e delle trabecole fibrose, che anche con un semplice lavaggio si liberano quasi totalmente della sostanza cementante, per cui si rende facilmente visibile la struttura periodica della microfibrilla (fig. 4).

Sulla superficie delle microfibrille reticolari lavate a lungo si riconoscono globuli di sostanza cementante disposti abbastanza regolarmente lungo di esse, probabilmente in rapporto ad uno dei tratti del periodo (tratto A?).

Le fibre reticolari trattate con soluzioni acide ed alcaline (pH = 3,4; pH = 9,2) si rigonfiano notevolmente. In queste condizioni la struttura globulare della sostanza cementante si rende ancor più evidente (fig. 5).

Nella compagine della fibra rigonfiata si intravedono le microfibrille anch'esse modificate pur non essendo riconoscibile la loro fine struttura.

Alcuni globuli di sostanza cementante risultano dispersi alla periferia della fibra; altri risultano come asseriati trasversalmente all'asse longitudinale della fibra (fig. 5).

Ove sia possibile riconoscere le microfibrille incorporate nella sostanza cementante, esse risultano rigonfie e ricoperte fittamente di globuli (figg. 6, 7, 8).

Se le fibre reticolari non digerite con tripsina vengono trattate con una soluzione acida acido acetico pH = 3,5) ed omogeneizzate a lungo (10 minuti per 4 volte) la sostanza cementante si distacca pressochè totalmente dalle fibrille e si deposita in forma di granuli del diametro me-

dio di 500 Å sul fondo del preparato (figg. 9, 10, 11). Le microfibrille appaiono notevolmente aumentate di larghezza per l'effetto del rigonfiamento. Lungo il loro decorso si riconoscono tratti ristretti e più densi che appaiono come occupati da una fascia di sostanza più densa, finemente granulosa (figg. 12, 13, 14, 15). La distanza esistente fra i tratti ristretti, in alcune microfibrille, risulta essere abbastanza costante e corrispondente a 6.000 Å (fig. 12). Si nota una grande analogia strutturale ed anche la continuità tra la sostanza cementante ancora aderente alla superficie e le fasce anulari che restringono le microfibrille (figg. 11, 13, 15). Le modificazioni delle microfibrille in conseguenza del rigonfiamento essendo analoghe a quelle appartenenti alle fibre digerite in tripsina, verranno descritte successivamente.

Struttura delle microfibrille: Mediante la digestione triptica secondo le modalità indicate, la sostanza cementante si elimina completamente, cosicchè la struttura dei fasci costituiti dalle microfibrille si rende completamente evidente (figg. 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Le fibre di maggiore ordine di grandezza, formate dalle microfibrille, decorrono per un certo tratto senza suddividersi in collaterali. Le ramificazioni sono formate da un certo numero di microfibrille le quali provengono tanto dal tratto a monte che da quello a valle di esse (figg. 18, 19).

Le fibre, per lo più, sono costituite da microfibrille che hanno un andamento a spirale o addirittura si intrecciano (figg. 20, 21, 22). Le microfibrille possono essere giustapposte tra loro in concordanza di periodi; tuttavia poichè le singole microfibrille sono disposte per lo più a spirale intrecciata non sempre i periodi concordano. In questa evenienza il tratto A è allineato con quello B in apparente continuità strutturale, tanto che l'insieme delle microfibrille forma un nastro striato a zig-zag trasversalmente (fig. 23).

Lo spessore delle microfibrille più frequente è di 400 Å (su 200 misurazioni). Tale spessore è per lo più uniforme; vale a dire i valori massimi (800 Å) e quelli minimi (200 Å) sono molto rari.

Le microfibrille sono dotate di un caratteristico periodo che è dato dal susseguirsi regolare di tratti densi con altri meno densi.

Su 146 misurazioni si hanno 33 periodi di 630 Å, 42 di 640 Å, 40 di 550 Å, 18 di 500 Å e 8 di 700 Å. Nelle microfibrille, anche se non fissate, si può riconoscere nettamente la struttura interperiodica, la quale ha aspetti variabili. Nella foto 24 abbiamo riunito gli aspetti più tipici delle strutture periodiche che occorrono nell'osservazione.

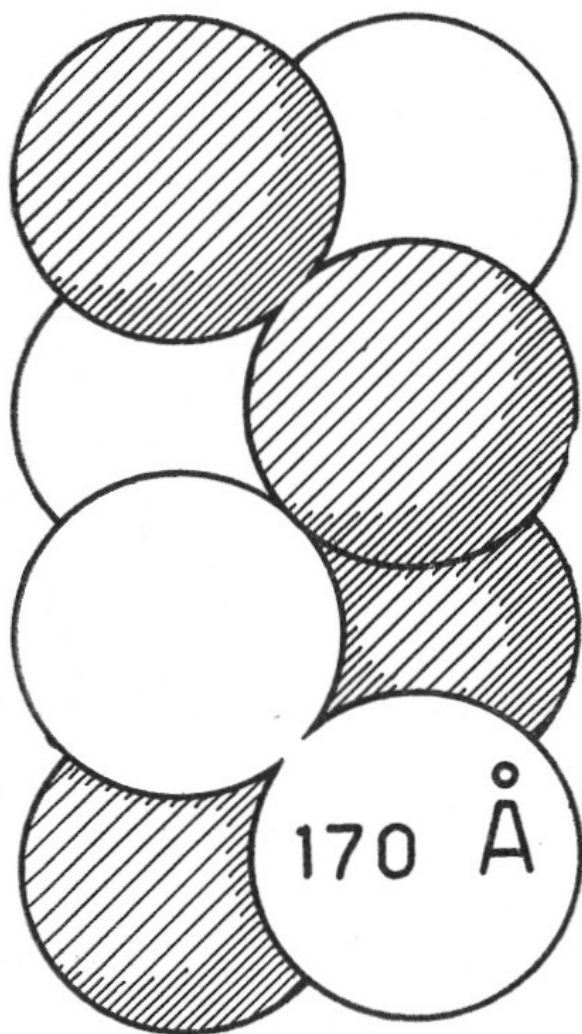
In (1) è rappresentato il periodo tipico, vale a dire l'alternarsi di

un tratto più denso (A), nel quale si riconosce una linea intermedia meno densa, con un tratto più corto e meno denso (B). In (2) si riconosce un secondo tipo di periodo caratterizzato da una banda più densa nel tratto B, mentre il tratto A è più basso. In (3) è rappresentato il terzo tipo di periodo costituito dal susseguirsi regolare di dischi densi con un periodo di 210 Å. Tuttavia, ogni tre di questi dischi si riconosce un tratto meno denso, cosicchè il periodo complessivo risulta essere di 640 Å.

Struttura delle microfibrille indagate per mezzo del rigonfiamento in soluzioni acide ed alcaline: le fibre reticolari digerite in tripsina alcalina e poste in soluzioni acide od alcaline, presentano aspetti diversi del rigonfiamento, i quali dipendono dal grado di acidità o di alcalinità delle soluzioni e al tempo di permanenza delle fibre in queste. Tuttavia anche le microfibrille trattate nelle identiche soluzioni, per il medesimo tempo, possono presentare aspetti diversi. In una stessa fotografia si riconoscono microfibrille ben conservate, le quali hanno diametro e periodo come di norma, accanto ad altre profondamente modificate (fig. 25).

Il primo effetto del rigonfiamento si traduce in un aumento di larghezza delle microfibrille del doppio o del triplo rispetto al primitivo spessore, senza che il periodo venga ad essere modificato (fig. 26). Nel qual caso la banda A risulta composta da globuli asseriati regolarmente secondo l'asse trasversale. I globuli tuttavia, non appaiono costituire filiere longitudinali parallele tra loro, ma piuttosto ne formano altre disposte obliquamente. La disposizione obliqua e a spirale dei filamenti considerati secondo la loro lunghezza, si rende ancor più manifesta nelle altre fasi del rigonfiamento, nelle quali le microfibrille appaiono segmentate obliquamente e si risolvono in fusi di varia lunghezza, ed anche in filamenti che conservano ancora la disposizione a spirale intrecciata (figg. 27, 28, 29). I filamenti in alcuni tratti appaiono costituiti da filiere di globuli come ovoidali delle dimensioni approssimative di 170-120 Å. Si può osservare come i globuli appartenenti a due filamenti adiacenti non si dispongono paralleli tra loro e sullo stesso piano, ma piuttosto su piani diversi ruotati in un certo angolo, come è schematicamente dimostrato nella tav. 1. I filamenti che costituiscono le microfibrille hanno lunghezza apparentemente indeterminata. Tuttavia se ne osservano alcuni costituiti da globuli aventi un diametro che diminuisce a mano a mano che ci si allontani dal tratto mediale. Nel qual caso i filamenti hanno lunghezza determinata (3.000 Å) e terminano con due estremi a punta mal definibili (fig. 30). La scomposizione in filamenti delle microfibrille non è uniforme in tutta la lunghezza di esse. Si osservano dei segmenti ancora non rigonfiati i quali conservano il periodo di 640 Å. I tratti non

rigonfiati hanno la forma di fusi tozzi (figg. 31, 32, 33); il loro spessore e la loro lunghezza è molto variabile. Alcune microfibrille rigonfiate hanno un asse centrale costituito da un filamento di lunghezza indefini-



Disegno schematico per dimostrare la disposizione a spirale delle filiere di globuli che costituiscono le microfibrille.

bile oppure da fusi disposti longitudinalmente che si congiungono con i due estremi obliqui, attorno ai quali sono disposti filamenti a spirale o addirittura perpendicolari all'asse maggiore dei fusi (figg. 34, 35), oppure residui indistinti di materiale in parte globulare, in parte filamentoso.

ARGENTOFILIA ED ARGENTAFFINITÀ DELLE MICROFIBRILLE RETICOLARI

Per mettere in evidenza l'argentofilia, le fibre reticolari, dopo la digestione triptica e la fissazione in formalina, venivano impregnate secondo il metodo di *Bjelschowsky*. In conseguenza di ciò lungo le microfi-

brille si osservano (fig. 36) numerosi granuli intensamente opachi i quali sembrano disposti alla superficie delle fibrille senza una corrispondenza con la struttura periodica. In alcuni tratti (a) i granuli sono poco numerosi, in altri (b) invece molto fitti e sembrano disposti con una certa regolarità sempre in superficie delle microfibrille. La forma dei granuli è rotondeggiante od ovulare ($200 \text{ \AA} \times 150 \text{ \AA}$).

Nelle microfibrille trattate con soluzione argentica dopo *ossidazione con acido periodico*, si notano numerosi granuli fortemente opachi, disposti per lo più come nel caso precedente. Tuttavia, mentre alcuni granuli appaiono disposti sulla superficie delle microfibrille, altri fanno corpo con la struttura filamentosa, così che questa risulta formata da granuli asseriati il cui diametro è di circa 220 \AA (fig. 37). Gli stessi preparati, osservati dopo ombreggiatura metallica, dimostrano che i granuli che sporgono alla superficie sono prevalentemente localizzati nel tratto A del periodo (fig. 38).

COMMENTO

Nella nota precedente (cui ho accennato al principio del lavoro) e con la presente ricerca ho dimostrato come le fibre reticolari visibili al microscopio ottico siano costituite da due strutture che risultano collegate: la sostanza cementante e le microfibrille. La prima è costituita da un insieme di globuli del diametro medio di 300 \AA . Poichè la sostanza cementante si colora con il metodo di Mac Manus⁽²⁾ e viene eliminata per mezzo della digestione triptica, ma non dalla ialuronidasi, è verosimile che essa sia costituita da glicoproteine.

Nella precedente nota ho sottolineato come la sostanza cementante delle fibre reticolari, a differenza di quella delle fibre collagene, sia dotata di un forte grado di coesione, sia per quello che riguarda i suoi componenti globulari, sia nei confronti delle microfibrille in essa incorporate. Anche i risultati ulteriori qui riportati dimostrano infatti che un prolungato lavaggio in acqua nell'omogeneizzatore non è in grado di eliminare la sostanza cementante, che rimane aderente alle microfibrille. Anche il trattamento con acidi ed alcali diluiti, seppure ha l'effetto di rigonfiare le fibre, non è in grado di eliminare la sostanza cementante da queste strutture.

Dettagli più precisi dei rapporti esistenti tra microfibrille e sostanze cementate, si sono ricavati dall'esame di fibre trattate in omogeneizza-

⁽²⁾ BENEDETTI E. L. - Boll. Soc. Med. chir. Pisa, 48, 309 (1950). MASSARI F. e MARSICO G. - Boll. Soc. It. Biol. sp., 28, 1141 (1952).

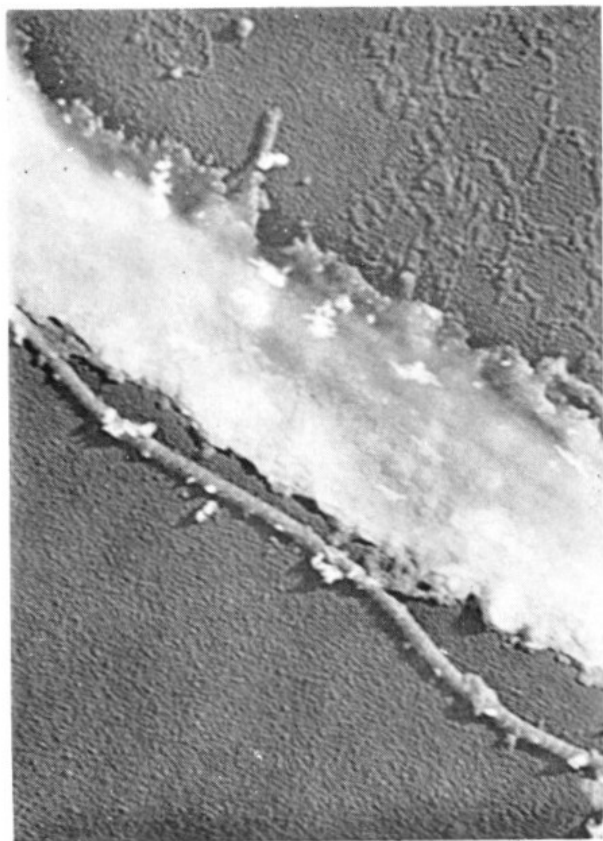


Fig. 1. - Fibra reticolare non digerita in tripsina. Le microfibrille sono immerse nella sostanza cementante ($\times 18000$).

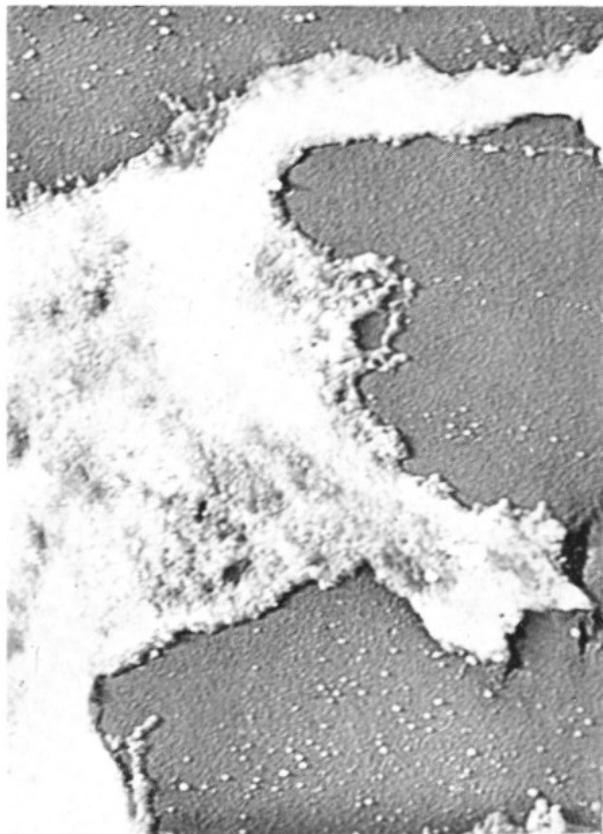


Fig. 2. - Incrocio di fibre reticolari ($\times 15000$).



Fig. 4. - Fibre collagene della capsula. La sostanza cementante non aderisce alle microfibrille ($\times 18000$).



Fig. 5. - Fibra reticolare rigonfiata ($\text{pH} = 3,5$). Si notano i globuli di sostanza cementante asserriti trasversalmente all'asse longitudinale della fibra ($\times 15000$).

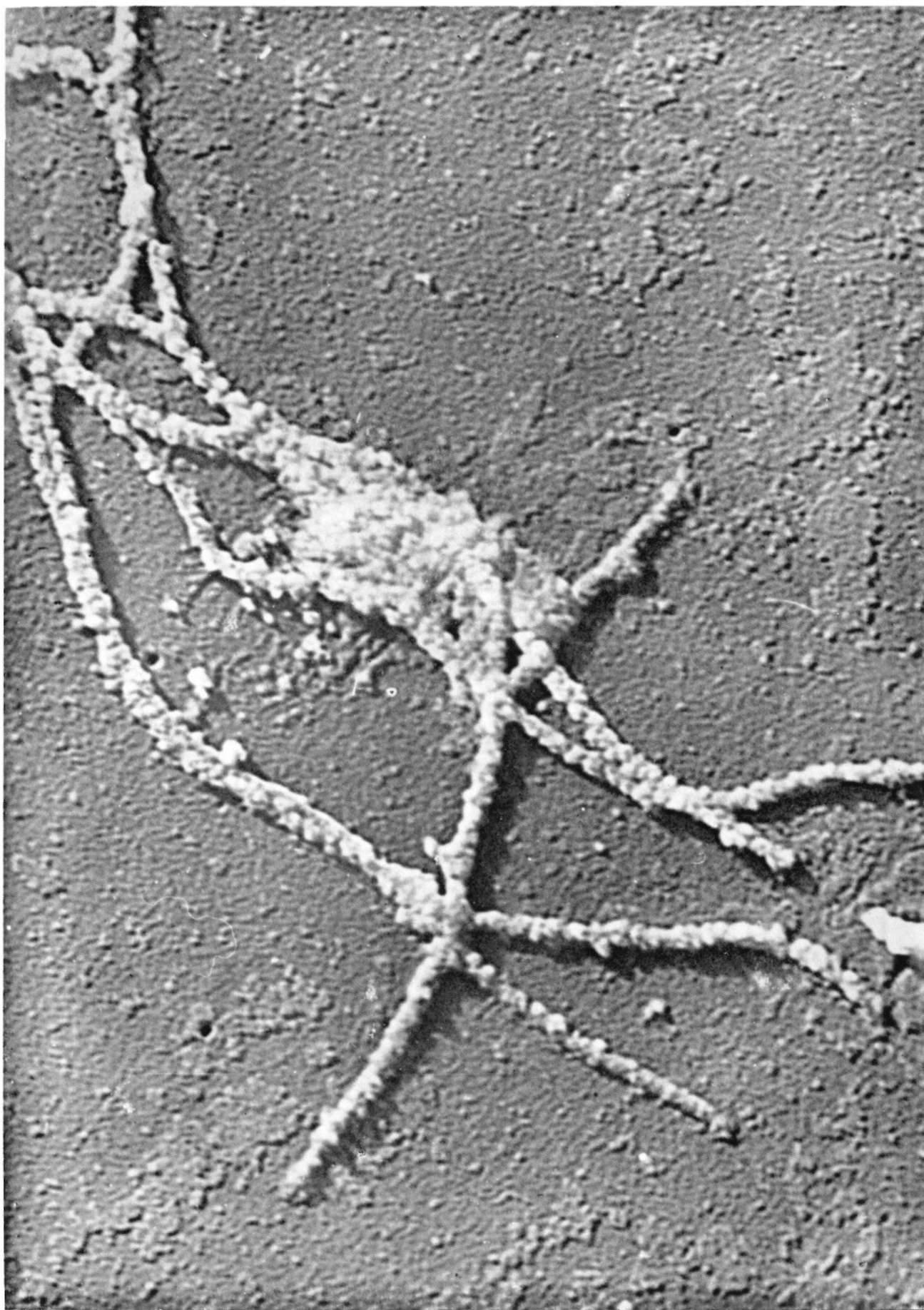


Fig. 3. - Microfibrille reticolari sulle quali sono adesi globuli di sostanza cementante ($\times 39000$).

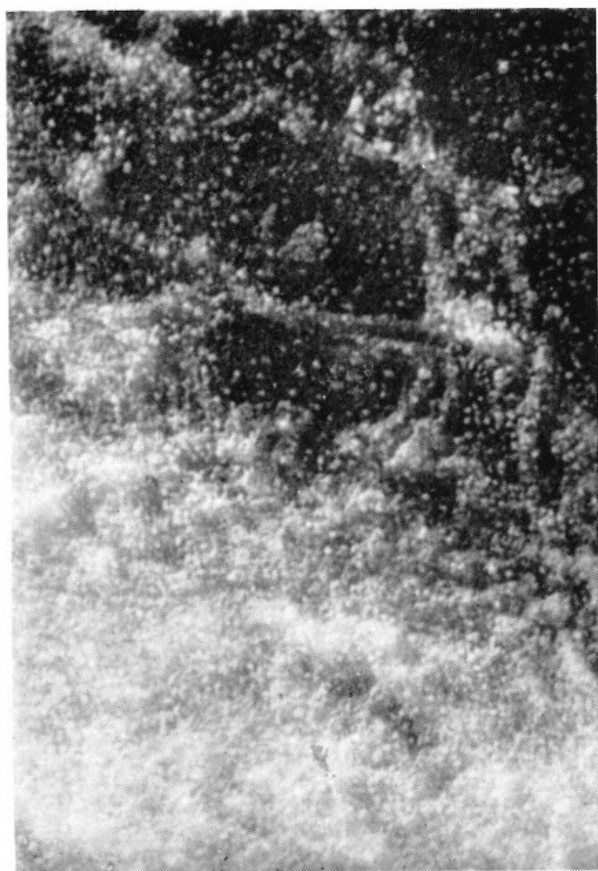


Fig. 6. - Fibra reticolare rigonfiata (pH = 3,5). Si notano i globuli di sostanza cementante e le microfibrille ($\times 20000$).

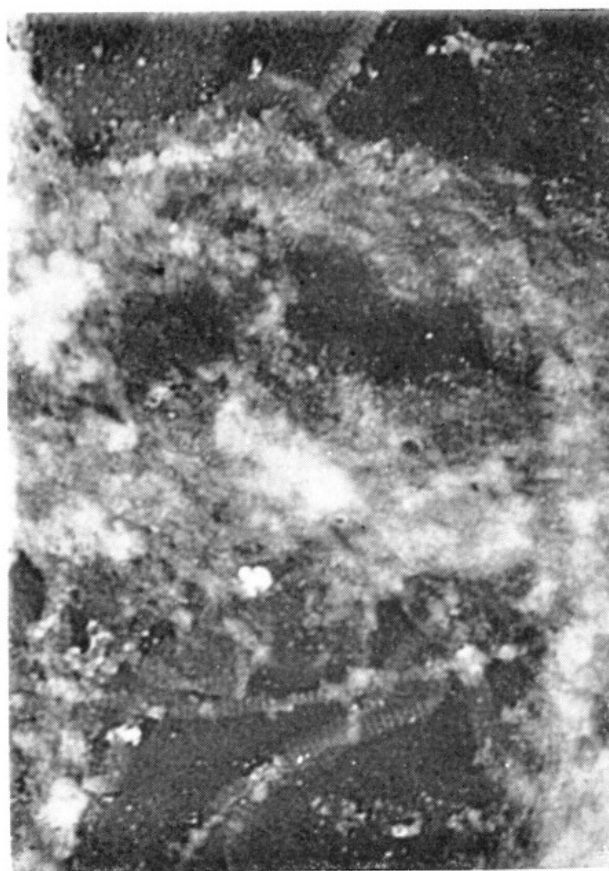


Fig. 7. - Fibra reticolare rigonfiata (pH = 3,5) ($\times 12000$).

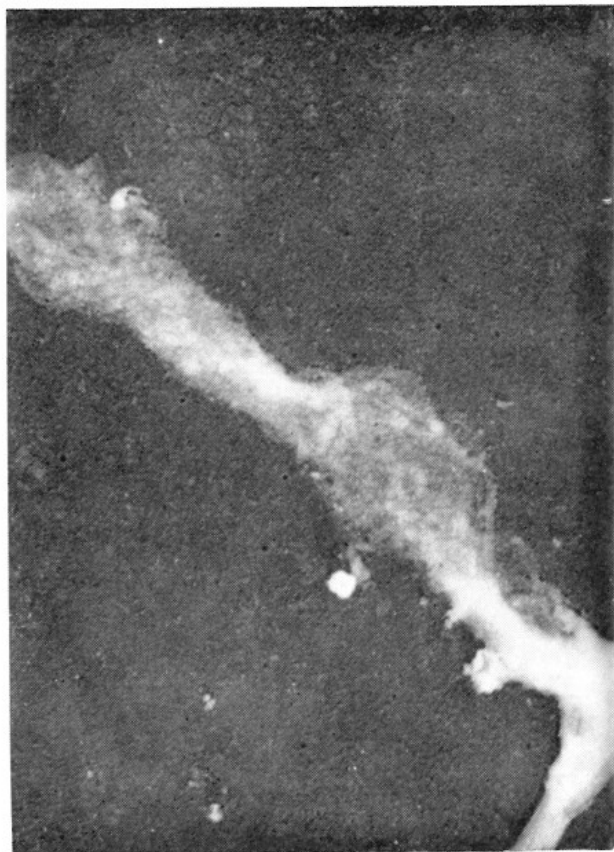


Fig. 8. - Fibra reticolare rigonfiata (pH = 3,5). Si nota la duplice composizione (sostanza cementante e microfibrille) ($\times 6000$).



Fig. 9. - Microfibrille reticolari dopo lavaggio prolungato in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 10000$).

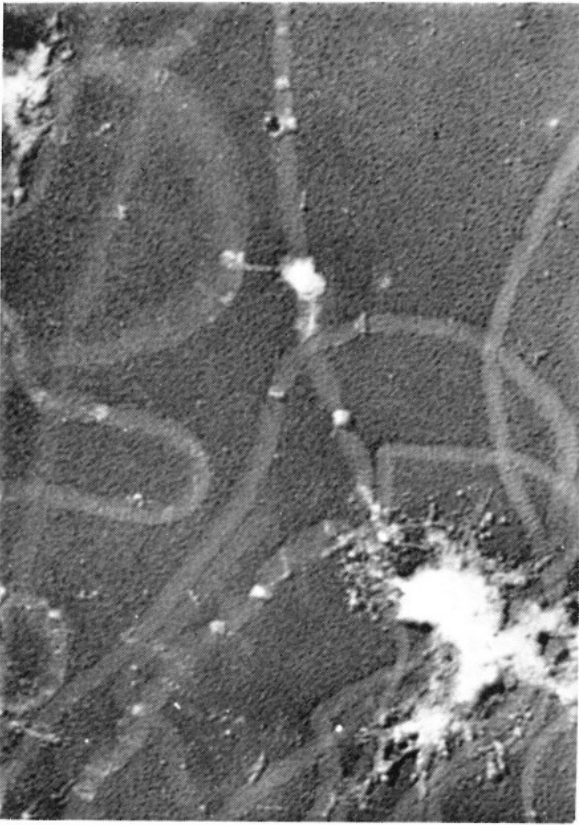


Fig. 10. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 10000$).



Fig. 11. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 10000$).

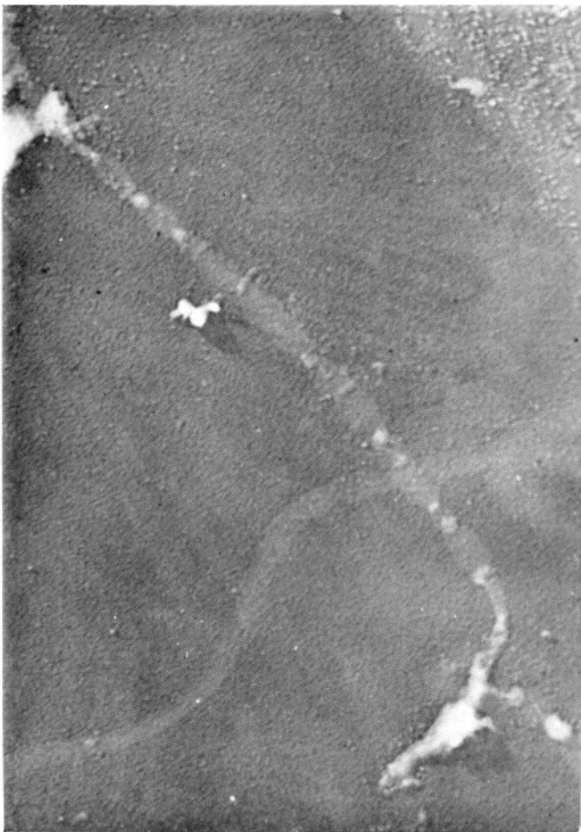


Fig. 12. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 9000$).



Fig. 13. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8). I restringimenti anulari sono disposti a distanze regolari ($\times 12000$).

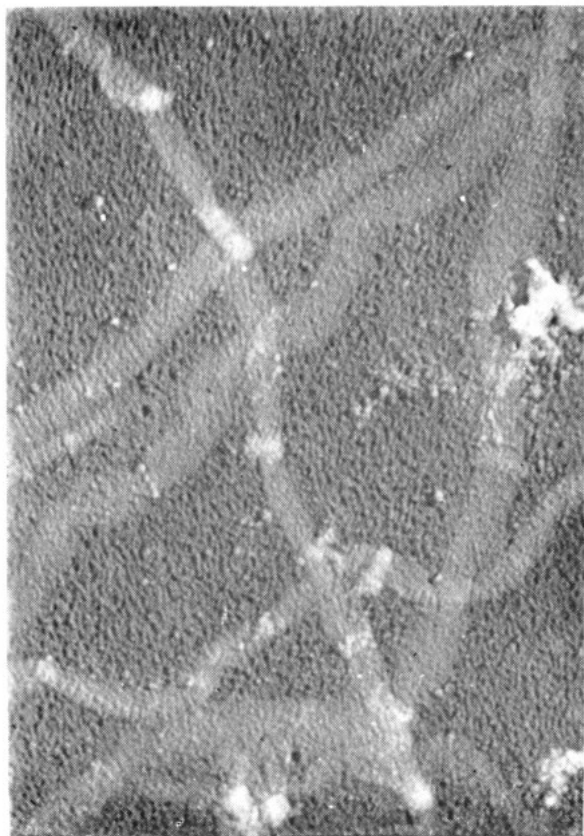
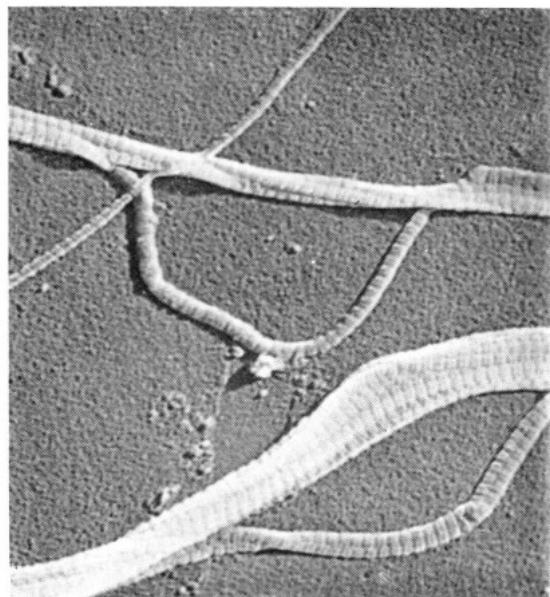
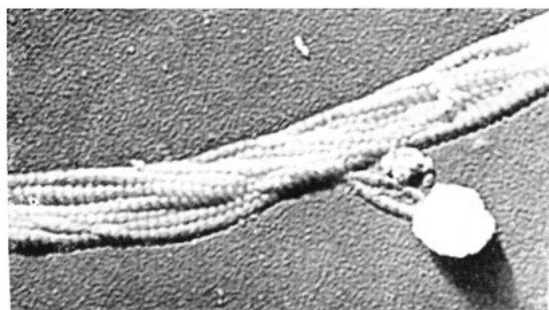


Fig. 14. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 15000$).



Fig. 15. - Microfibrille reticolari dopo prolungato lavaggio in soluzione acida (pH = 3,8) ($\times 20000$).



Figg. 16 e 17. - Fibre reticolari digerite in tripsina alcalina. Disposizione a spirale delle microfibrille ($\times 18000$).

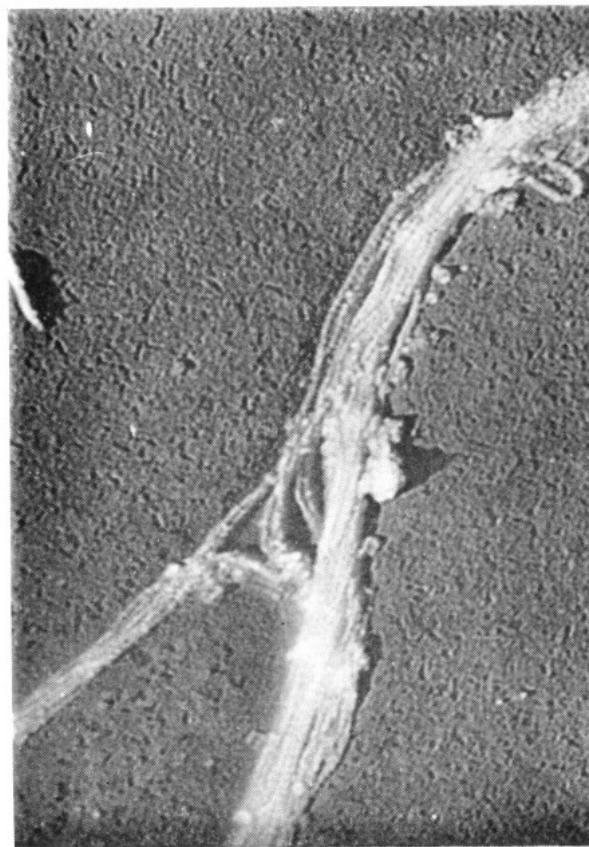


Fig. 18. - Fibre reticolari digerite in tripsina alcalina. Tratto d'incrocio ($\times 15000$).

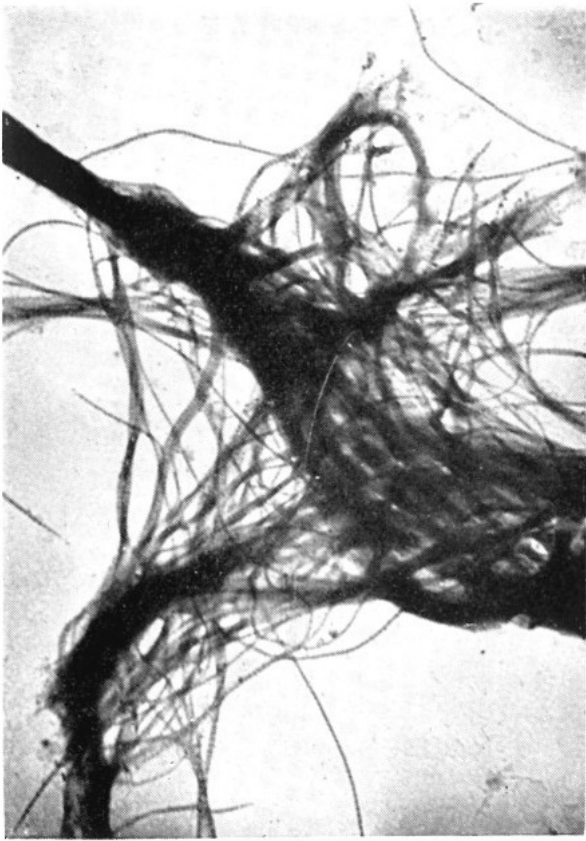


Fig. 19. - Incrocio di fibre reticolari digerite in tripsina alcalina. Preparato non ombrato. Fissazione in acido fosfotungstico ($\times 9000$).

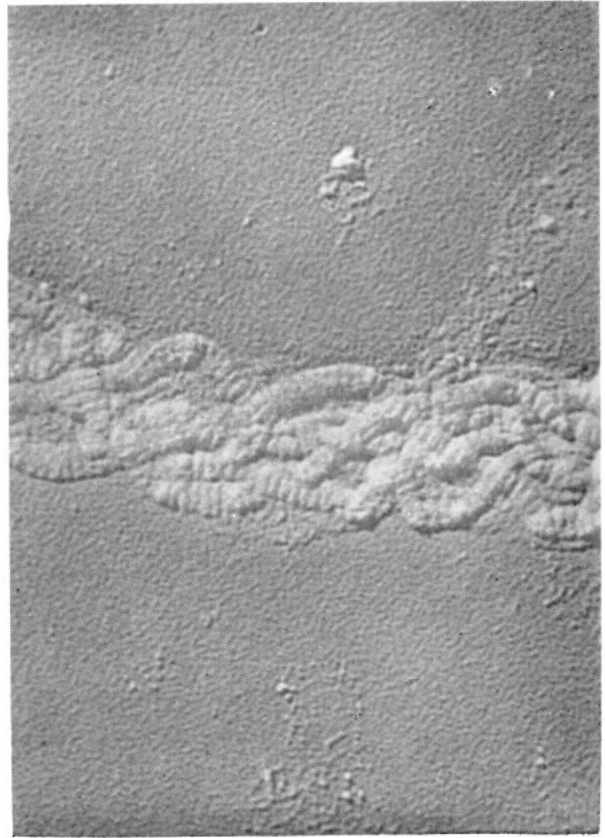


Fig. 22. - Fibra reticolare digerita in tripsina e rigonfiata in soluzione alcalina (pH=9,3) ($\times 18000$).

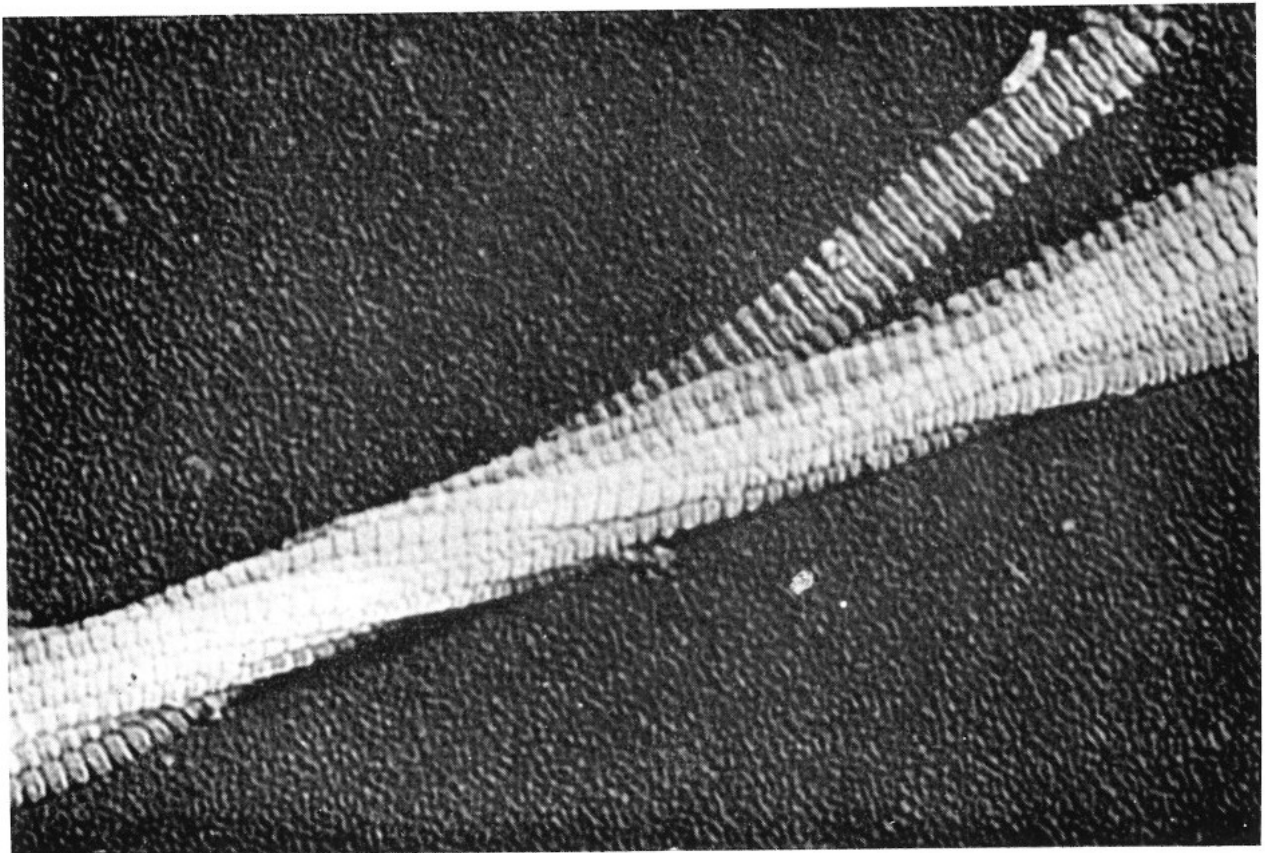


Fig. 20. - Fibra reticolare. Dopo la digestione triptica si nota la disposizione a spirale delle microfibrille ($\times 36000$).

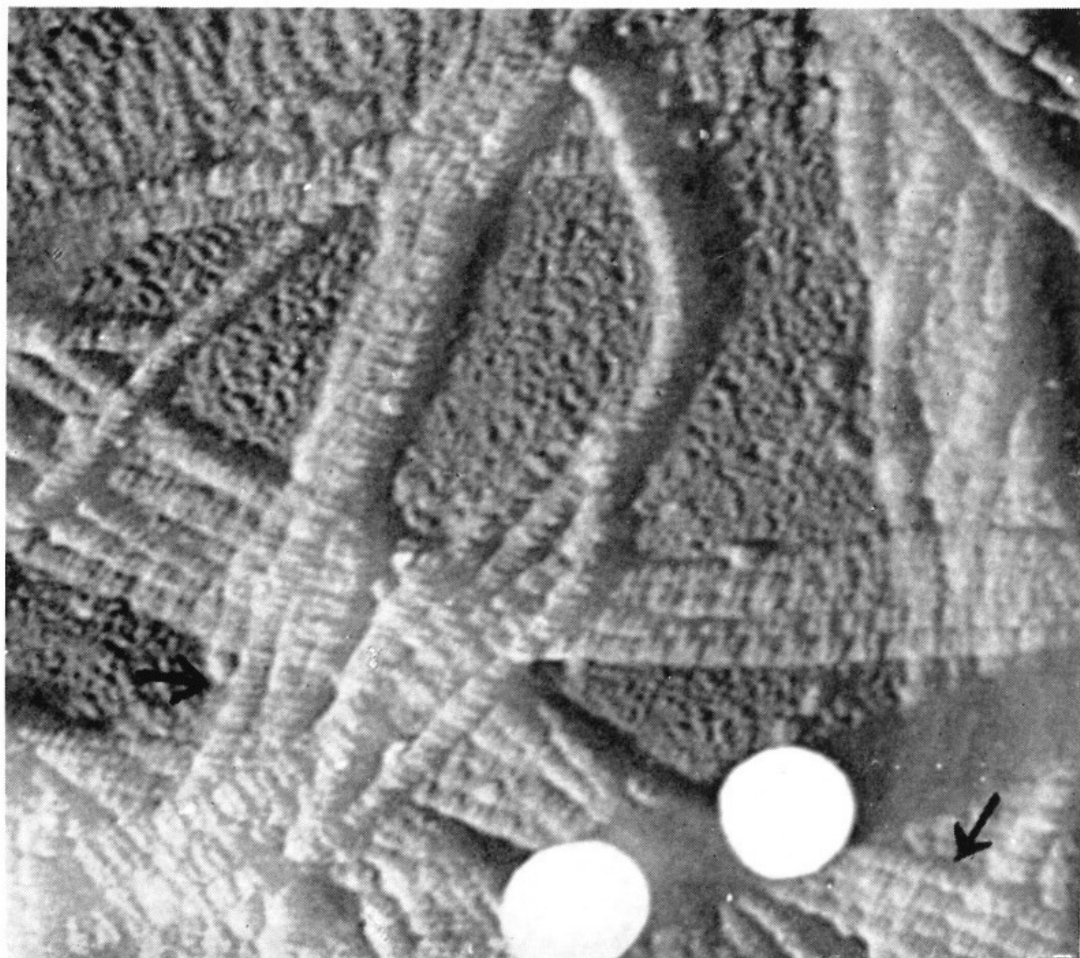


Fig. 21. - Fibre reticolari digerite in tripsina. Disposizione a spirale delle microfibrille. Periodo di 210 A di alcune microfibrille ($\times 38000$).

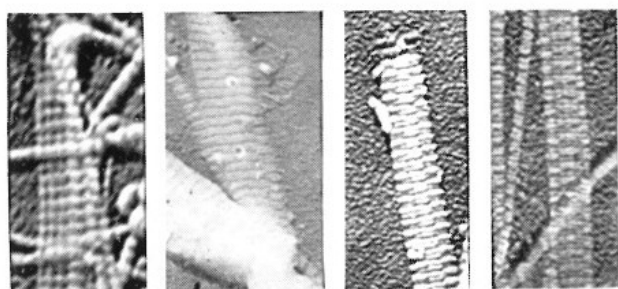


Fig. 23. - Fasci di microfibrille. Nelle prime due figure i periodi concordano, nelle altre due la banda A concorda con quella B ($\times 18000$).



Fig. 24. - Aspetti diversi della struttura periodica delle microfibrille ($\times 36000$).

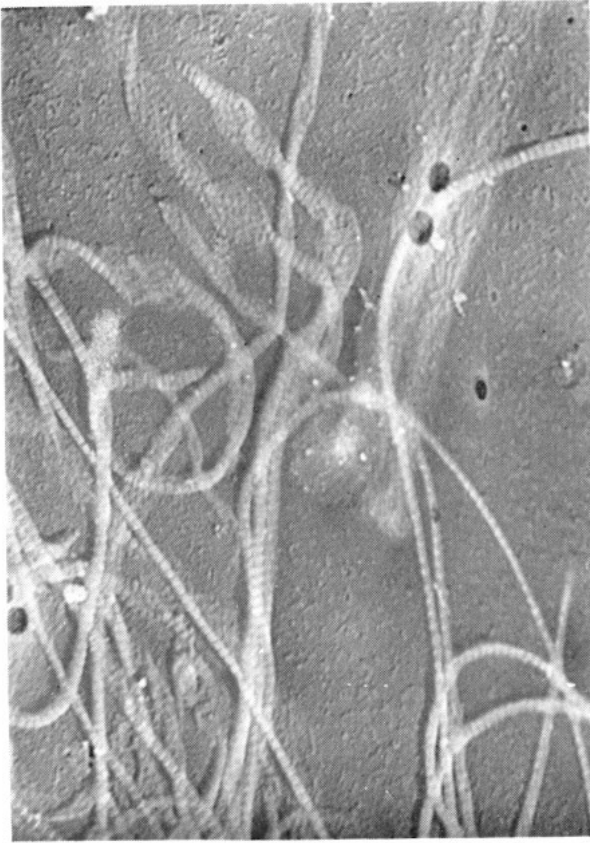


Fig. 25. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina alcalina e poste in soluzione acida (pH = 3,4) (\times 12000).



Fig. 26. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina alcalina e rigonfiate (pH = 3,8) (\times 18000).

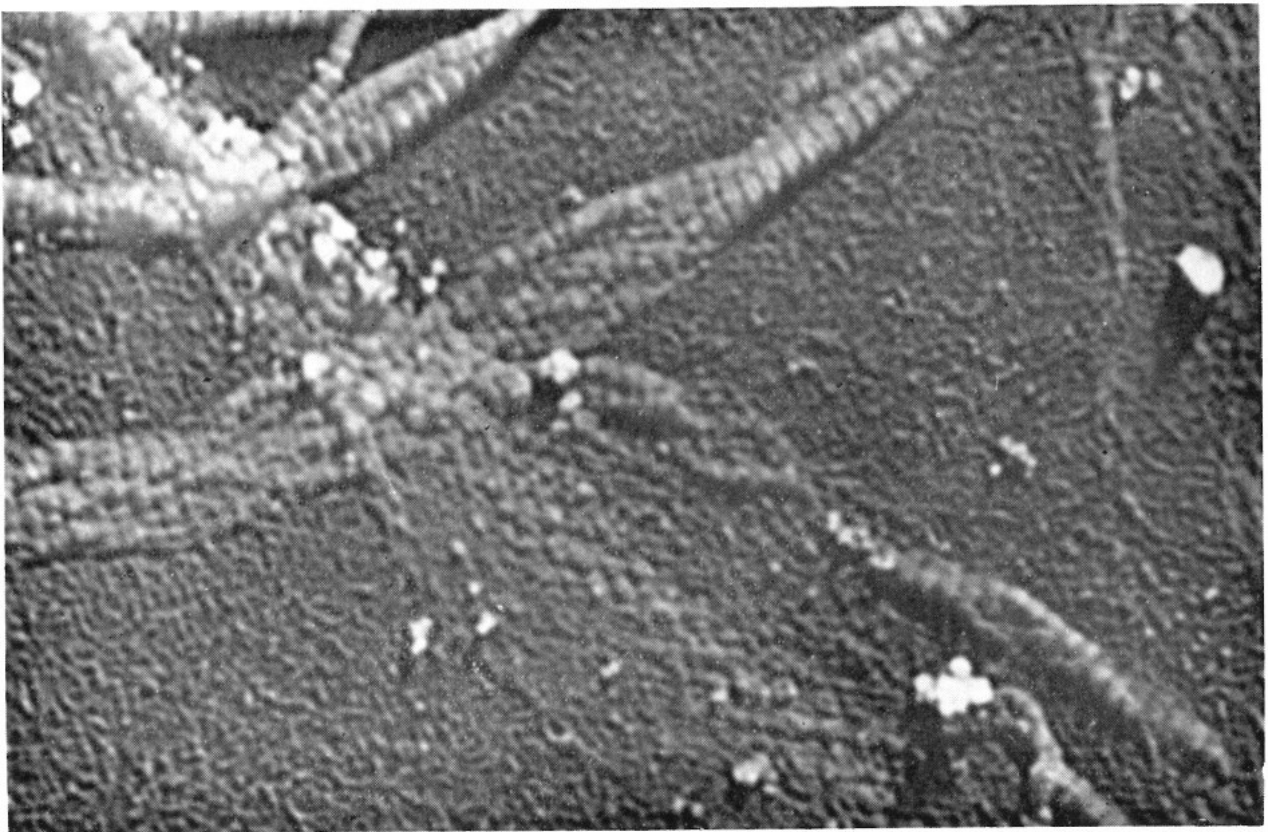


Fig. 28. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina e rigonfiate (pH = 3,2) (\times 40000).



Fig. 27. - Microfibrille reticolari rigonfiate in soluzione acida (pH = 3,5) dopo digestione in tripsina. Disposizione a spirale dei filamenti ($\times 36000$).



Fig. 29. - Disposizione a spirale dei filamenti che costituiscono le microfibrille (pH = 3,1) ($\times 18000$).

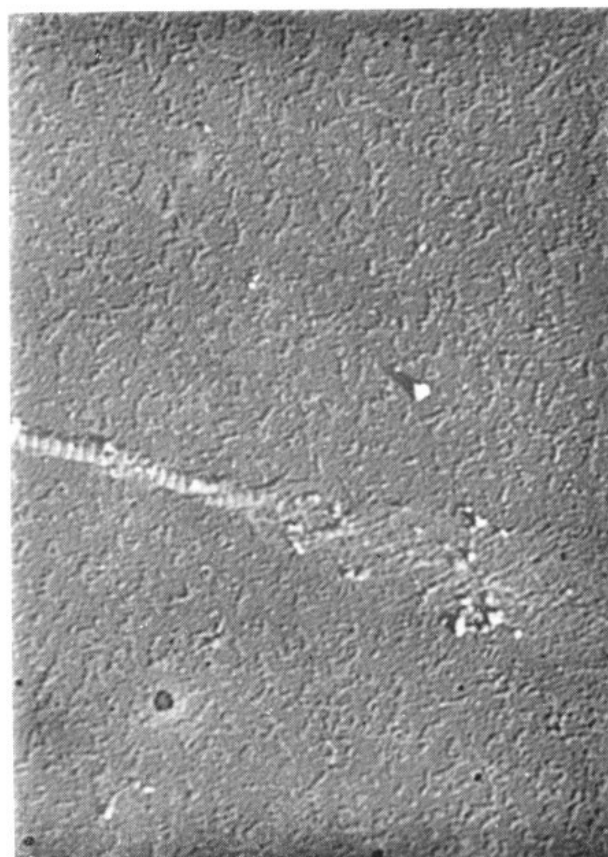


Fig. 30. - Microfibrilla digerita in tripsina e rigonfiata (pH = 3,8). Notare la disposizione trasversale ed obliqua dei filamenti ($\times 18000$).

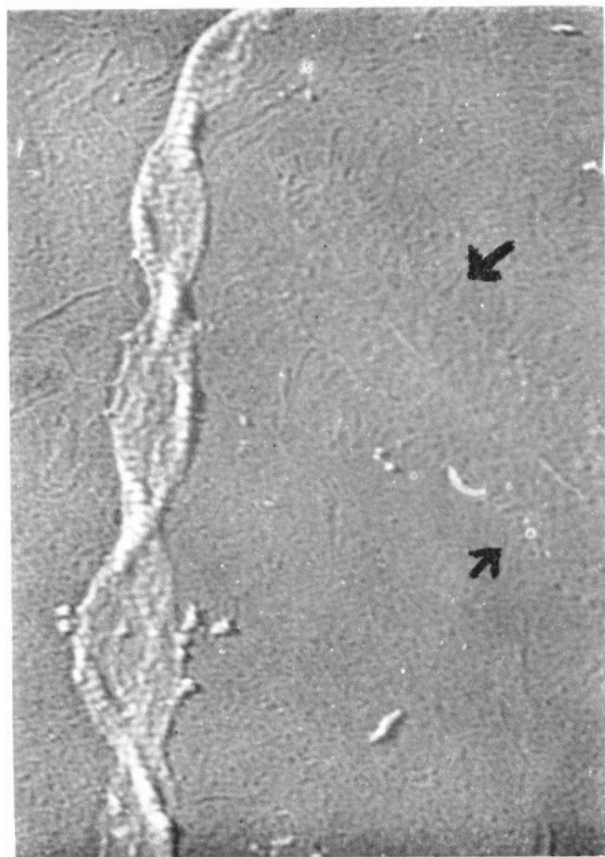


Fig. 31. - Microfibrilla rigonfiata dopo digestione triptica. I segmenti rigonfiati si alternano a quelli non rigonfiati (pH = 3,8) ($\times 18000$).

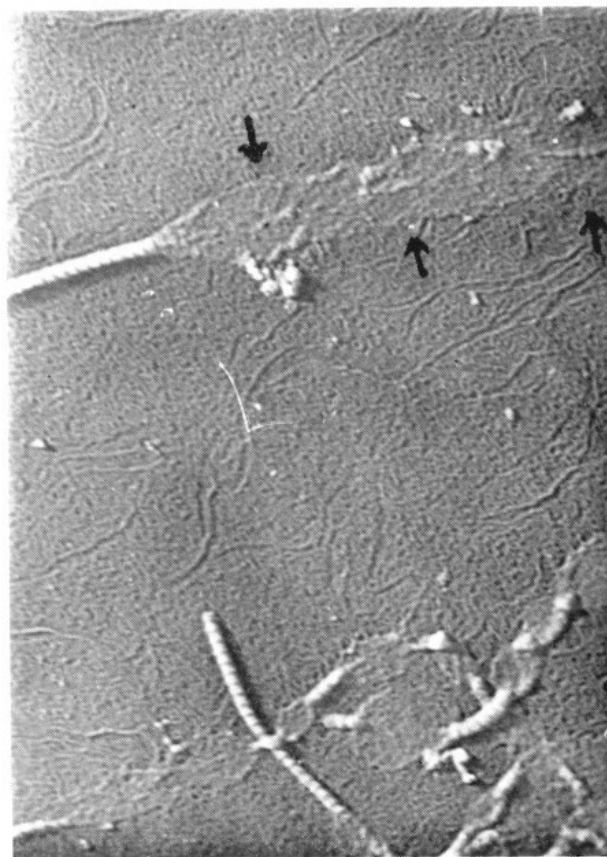


Fig. 32. - Microfibrille rigonfiate dopo digestione. Notare i segmenti assiali simili a fusi non rigonfiati.

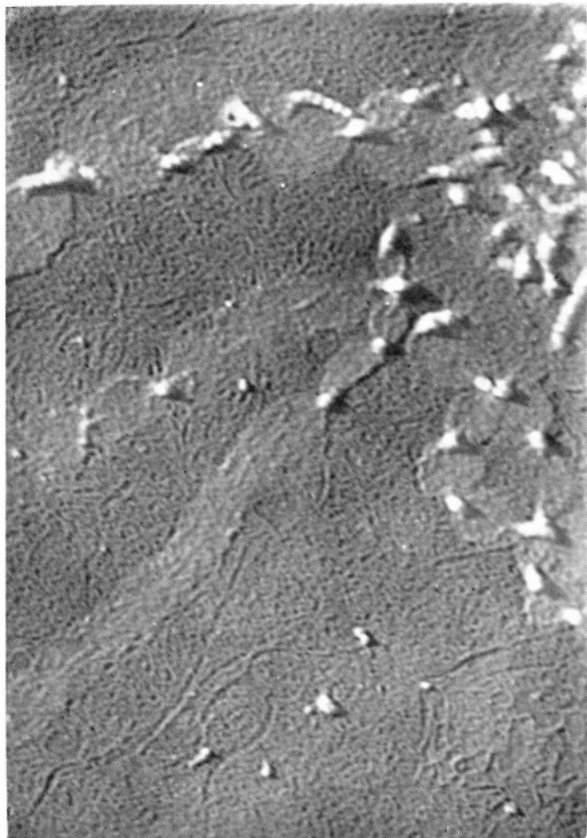


Fig. 33. - Microfibrille rigonfiate dopo digestione triptica. Notare i segmenti non rigonfiati (pH = 2,8) ($\times 18000$).

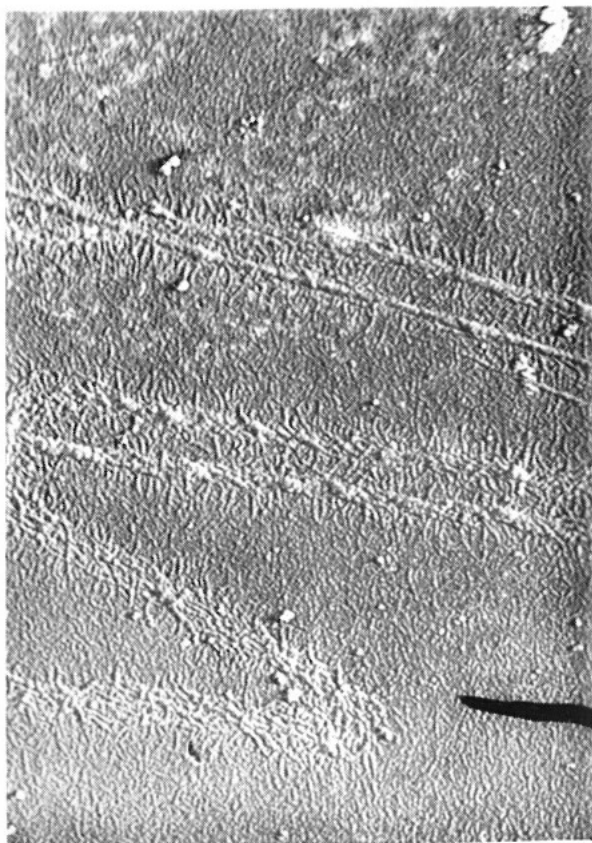


Fig. 34. - Microfibrille rigonfiate nelle quali si notano segmenti assiali non rigonfiati (pH = 9,5) ($\times 18000$).

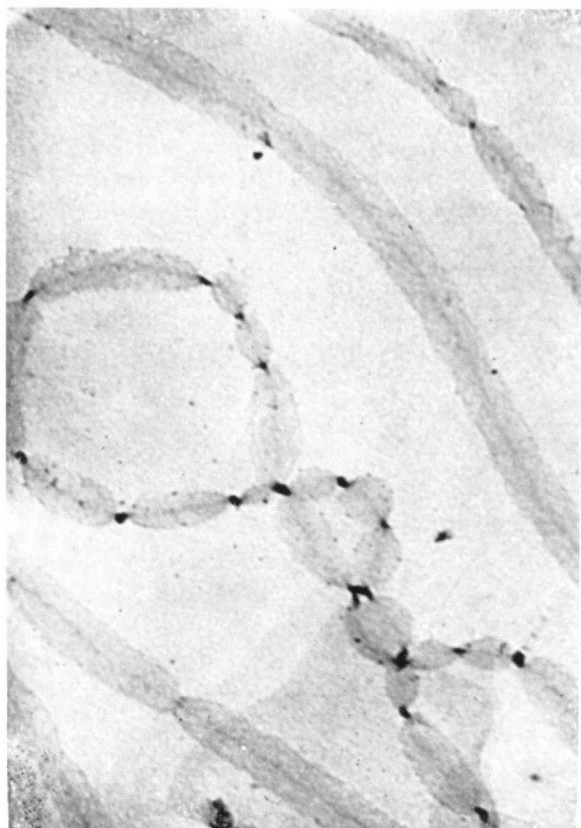


Fig. 35. - Microfibrille rigonfiate con segmenti assiali non rigonfiati. Preparato non metallizzato (pH = 3,5) ($\times 20000$).

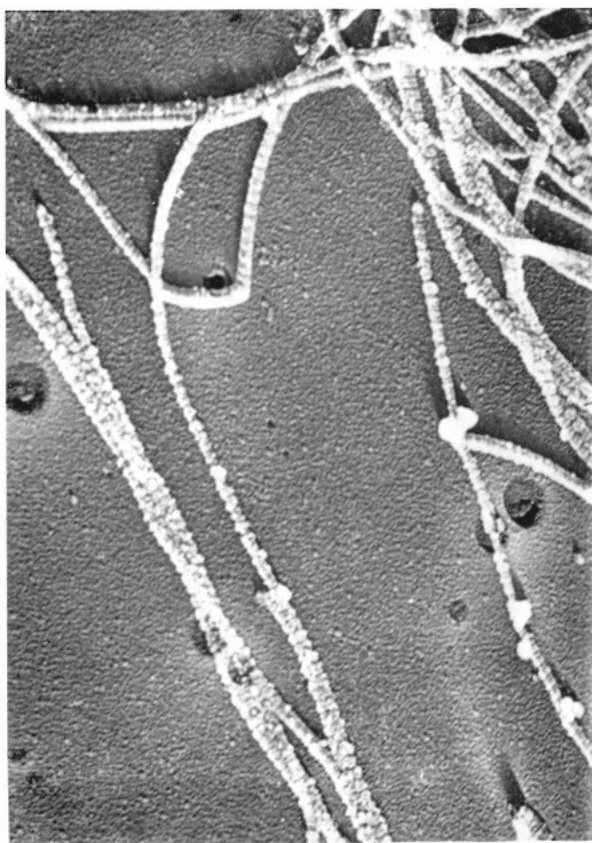


Fig. 38. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina ed impregnate con la soluzione argentica dopo l'ossidazione con acido periodico ($\times 18000$).

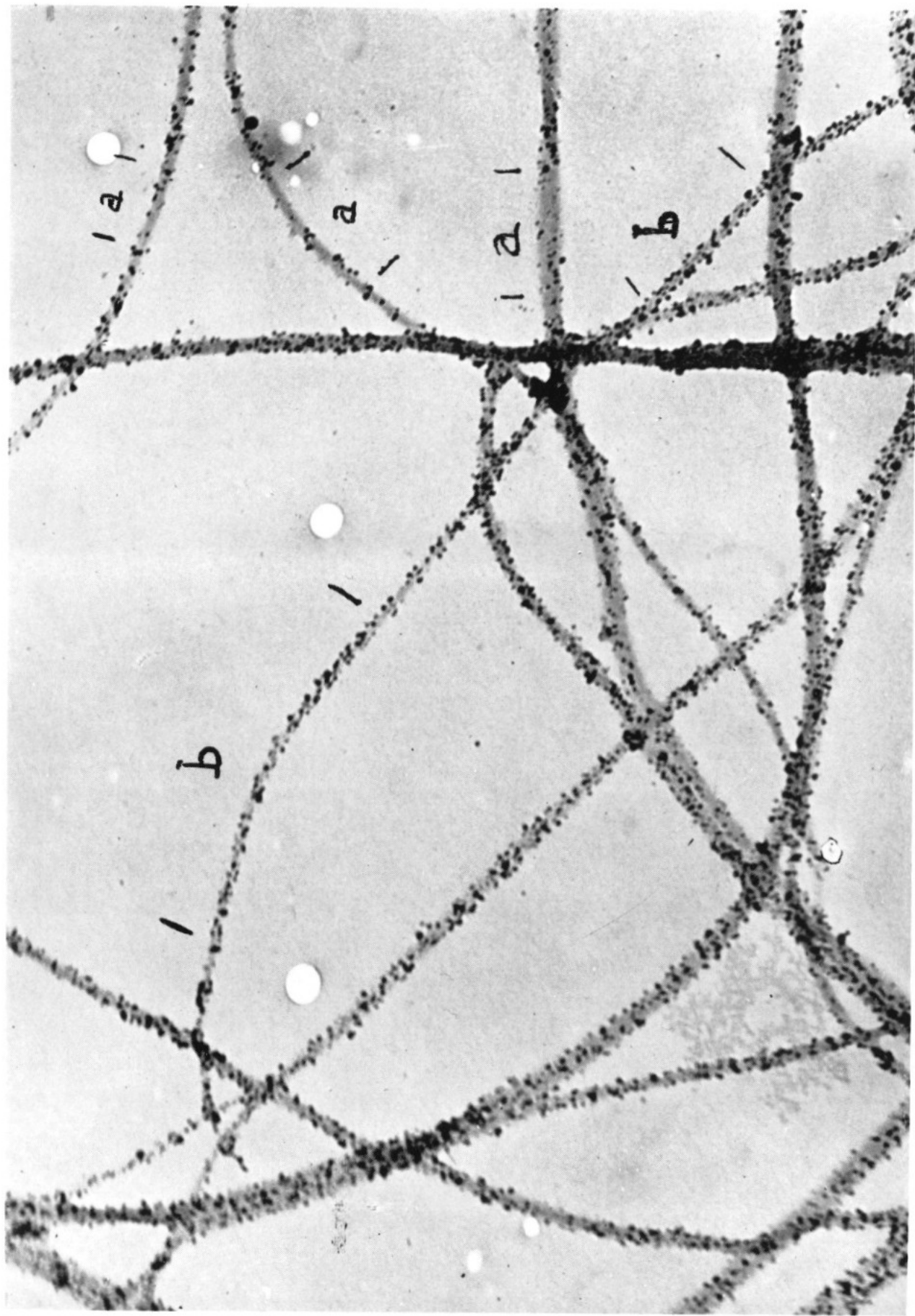


Fig. 36. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina ed impregnate secondo il metodo di BIELSCHOWSKY. Preparato non metallizzato ($\times 36000$).

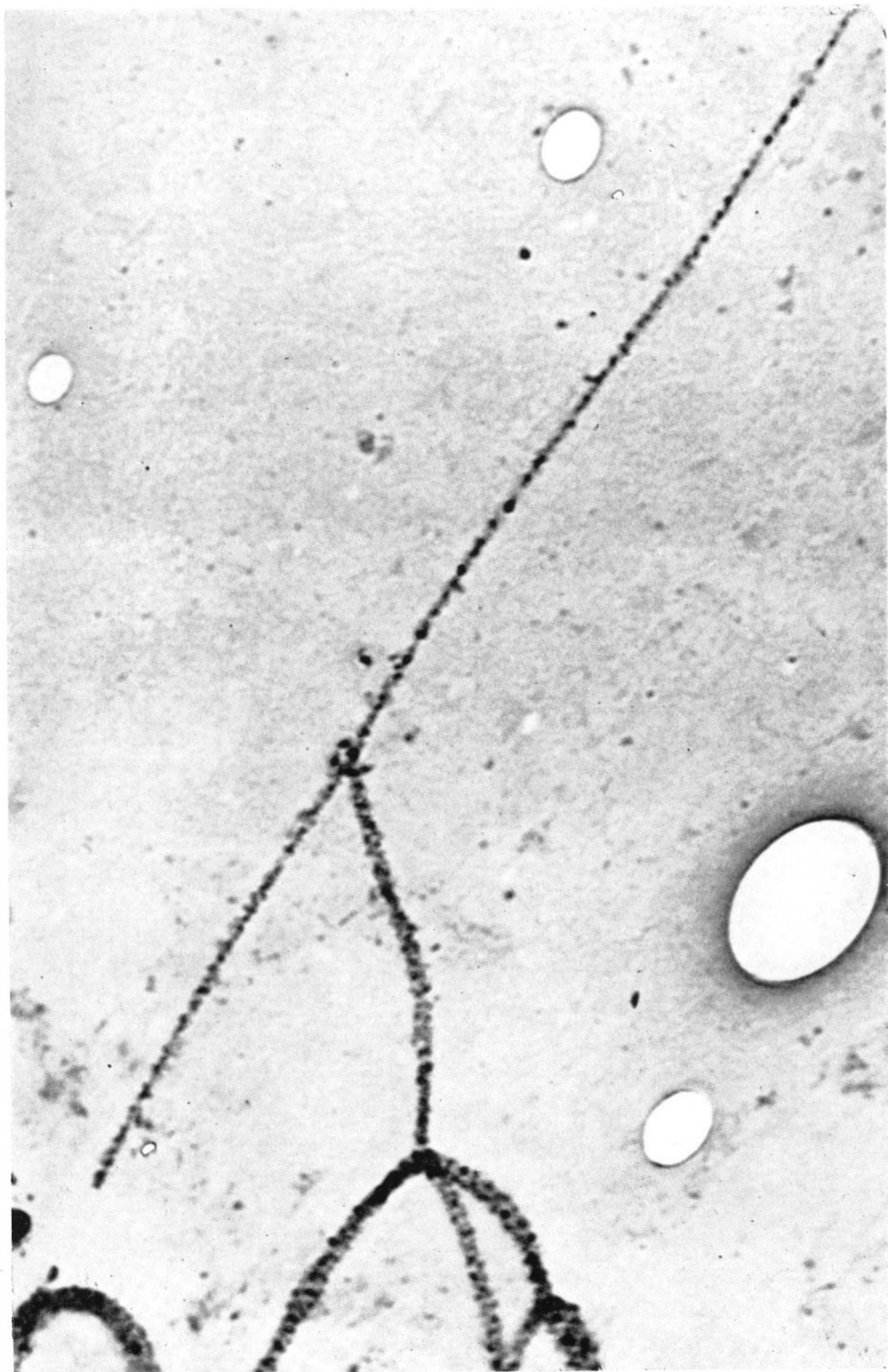


Fig. 37. - Microfibrille reticolari digerite in tripsina ed impregnate con la soluzione argentica dopo ossidazione con acido periodico. Preparato non metallizzato. ($\times 40000$).

tore, a lungo, con acqua e con soluzioni acide od alcaline. Nella prima condizione, lungo tutto il decorso delle fibre, si è notato l'asserimento di globuli che fanno corpo con un segmento delle microfibrille, probabilmente con il tratto A. Mediante il secondo procedimento, si è potuto svelare l'esistenza di una fascia trasversale alle microfibrille, che si ripete ad intervalli abbastanza regolari (6.000 Å). Tale fascia trasversale, che in alcuni tratti impedisce l'aumento di larghezza della microfibrilla per effetto del rigonfiamento, risulta costituita dalla giustapposizione di globuli i quali, ove la sostanza cementante sia presente, risultano continui con quelli che costituiscono quest'ultima. Un altro dato che permette di stabilire l'analogia di queste strutture anulari con la sostanza cementante, è il rilievo che esse vengano eliminate per mezzo della digestione triptica. Infatti, nelle microfibrille trattate con tripsina e rigonfiate, i restringimenti che si osservano hanno altro aspetto dalle fasce trasversali testè discusse e che invece non sono più riconoscibili.

Poichè la preparazione delle fibre reticolari comporta la completa lisi delle cellule ad esse collegate, nulla si può dire in riguardo di tale rapporto, nè, ovviamente, se le fibre reticolari, nel tratto ove siano giustapposte al citoplasma cellulare, probabilmente compenetrandolo, siano rivestite da sostanza cementante. Dalle fibre di maggiore spessore sporgono microfibrille con un sottile strato di globuli di sostanza cementante aderente alle strutture filamentose, ma non è da escludere che questo sia l'effetto delle manipolazioni tecniche, piuttosto che la dimostrazione di una condizione morfologica preesistente a queste.

In accordo con le osservazioni di K. LITTLE e H. KRAMER⁽³⁾, lo spessore più frequente delle microfibrille è di 400 Å.

Le microfibrille appartenenti al tessuto reticolare, al pari di quelle collagene, sono caratterizzate dalla ripetizione periodica di bande trasversali più dense, alternate a tratti meno densi e più sottili. Tuttavia l'aspetto del periodo non è sempre uguale. Un carattere peculiare delle microfibrille del tessuto reticolare corrisponde al fatto che anche senza alcuna fissazione o colorazione è sempre molto evidente la struttura interperiodica. Si riconoscono almeno tre tipi di strutture periodiche aventi caratteristiche diverse. Il primo corrisponde al susseguirsi regolare ogni 640 Å di una banda densa (A) ad un'altra meno densa (B); il secondo caratterizzato essenzialmente da una minore altezza della banda A e dalla presenza di un netto tratto più denso situato nel mezzo della banda B. Il terzo tipo è caratterizzato dalla sovrapposizione di strutture che hanno l'aspetto di dischi molto densi con un periodo di 210 Å. Quest'ul-

⁽³⁾ Nature, 170, 499 (1952).

timo tipo si è riscontrato frequentemente, ma non in tale proporzione da dover essere considerato come peculiare delle microfibrille reticolari. Secondo A. W. PRATT e B. W. G. WYCKOFF ⁽⁴⁾ il periodo di 210 Å è proprio delle microfibrille più giovani e meno spesse (200 Å).

In accordo con le osservazioni di G. TARANTA e U. MAROTTA ⁽⁵⁾, che hanno accuratamente studiato le fibre collagene, non ho rilevato una costante concordanza di periodi nelle microfibrille giustapposte. Queste a volte sono adese reciprocamente con la concordanza della banda A con quella B.

Tale caratteristica che può essere espressione di un artificio legato alle manipolazioni, per le fibre reticolari potrebbe essere messa in rapporto con il fatto che esse non siano disposte in fasci paralleli, ma invece formino delle spirali intrecciate, così come è già stato osservato da BAIRATI e collaboratori ⁽⁶⁾.

I risultati delle prove di rigonfiamento, provocato da soluzioni acide ed alcaline, dimostrano che *le microfibrille si risolvono in filamenti* i quali, quando conservino la loro individualità strutturale, sono costituiti da entità globulari. I singoli filamenti non sono collegati tra loro parallelamente, come descrivono F. O. SCHMITT, C. HALL e M. A. YAKUS ⁽⁷⁾, ma spirale, che nel corso del rigonfiamento si detorce in varia misura. Tale struttura a spirale delle microfibrille non è tuttavia peculiare delle fibre reticolari dal momento che è stata segnalata anche da WYCKOFF, LELLI e MAROTTA, e NECKEL ⁽⁸⁾ per il tessuto collagene.

Anche le osservazioni condotte mediante le culture in vitro per indagare la fibrillogenesi ci ragguagliano sulla costituzione globulare delle microfibrille. K. R. PORTER ⁽⁹⁾ ha osservato che la formazione di tali strutture si inizia con la comparsa sulla superficie del citoplasma dei fibroblasti di filiere di globuli con un periodo di 210 Å circa, le quali attorcigliandosi vanno costituendo entità filamentose di maggiore spessore.

Non è tuttavia, completamente chiarito come si determini il periodo di 640 Å a partire da quello di 210 Å. Vi sono alcuni indizi, che a tale processo partecipino i mucopolisaccaridi della sostanza fondamentale, i quali potrebbero agire come anioni multivalenti cementando le molecole

⁽⁴⁾ Bioch. Biophys. Acta, 5, 166 (1950).

⁽⁵⁾ Rend. Ist. Sup. Sanità, 16, 718 (1953).

⁽⁶⁾ BAIRATI A., MASSARI F. e MARSICO G. - Experientia, 8, 341 (1952).

⁽⁷⁾ J. Cell. and comp. Physiol., 20, 11 (1952).

⁽⁸⁾ WYCKOFF R. W. G.: *Electron microscopy*. - Int. sc. p. New York, 1949. LELLI G. e MAROTTA U. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 13, 518 (1950). NECKEL L. - Zeit. f. Mikr., 60, 298 (1954).

⁽⁹⁾ Trans. II. conference on connective tissues, pag. 89. - Jorah macy Found.

proteiche costituendo in tal guisa gli edifici macromolecolari propri delle microfibrille ⁽¹⁰⁾.

K. MEYER, J. W. PALMER e E. M. SMYTH ⁽¹¹⁾ hanno dimostrato che l'acido condroitinsolforico è in grado di formare con varie proteine (tra le quali il collagene) complessi in cui i gruppi acidi dei mucopolisaccaridi sono salificati con quelli basici delle proteine.

Le microfibrille presentano dei segmenti ove il rigonfiamento non si è verificato; non vi sono tuttavia elementi probativi per stabilire se questi abbiano diversa struttura rispetto ai segmenti che si idratano; infatti non si sono rilevate diversità morfologiche delle microfibrille nei vari tratti di esse, prima del rigonfiamento. A volte i segmenti non rigonfiati hanno l'aspetto di fusi intercalati a quelli rigonfiati. E' probabile che la formazione di tali fusi dipenda dal fatto che la detorsione dei filamenti trovi motivo di incepparsi per la stessa disposizione intrecciata di questi ultimi. I fusi soprari cordati non hanno carattere di analogia morfologica con i restringimenti anulari che si verificano nelle fibre rigonfiate, ma non digerite con la tripsina; tuttavia non è possibile escludere nè affermare che le due formazioni abbiano sede corrispondente.

Le esperienze condotte mediante l'impregnazione argentea secondo *la tecnica di Bjelschowsky* e con *l'acido periodico - impregnazione argentea dimostrano che le microfibrille sono argentofile ed argentaffini*.

Si deve tuttavia, notare che l'argentofilia, qui dimostrata, non ha lo stesso significato di quello che abbia nelle sezioni istologiche, dove l'impregnazione argentea dipende con ogni verosimiglianza dalla sostanza cementante nella quale sono incorporate le fibrille.

Eliminata la sostanza cementante, nel nostro caso con la tripsina, si può svelare un'argentofilia ed un'argentoaffinità proprie delle microfibrille.

Il significato istochimico di tali risultati non è facilmente valutabile. Tuttavia l'effetto della impregnazione argentea può essere considerato dal punto di vista morfologico, cioè rilevando la disposizione dei granuli di argento ridotto a livello delle microfibrille. Questa disposizione, secondo E. VON HERRAT e M. DETTMER ⁽¹²⁾ serve a distinguere nettamente le strutture fibrillari appartenenti al tessuto collagene da quelle che formano il tessuto reticolare, ed anche quelle più mature da quelle meno mature. In accordo con le osservazioni di VON HERRAT e DETTMER, si è notato che la riduzione dell'argento dà luogo alla formazione di granuli variamente

⁽¹⁰⁾ RAGAN C. - *Annal. Rew. Physiol.* 14. 51 (1951).

⁽¹¹⁾ *J. Biol. chem.* 119, 501 (1937).

⁽¹²⁾ *Zeit. f. Mikr.* 60. 282 (1951).

disposti sulla superficie delle microfibrille, il che prova ulteriormente come le nostre osservazioni siano state condotte su strutture reticolari.

L'impregnazione argentrica, invece, per svelare l'argentaffinità dà luogo ad aspetti alquanto diversi, poichè la formazione dei granuli ha una disposizione regolare e più fitta, inoltre in alcune microfibrille molto sottili, la riduzione dell'argento è compresa nella stessa struttura fibrillare ed ha come probabile sede la banda A del periodo.

Tenendo conto della specificità di azione dell'acido periodico sui polisaccaridi, si potrebbe ritenere che l'argentaffinità, qui dimostrata, sia la prova dell'esistenza alla superficie o nell'interno delle microfibrille di tali composti.

Tuttavia la formazione di gruppi attivi riducenti nel corso del lungo procedimento tecnico impiegato può avere origini diverse (digestione triptica, fissazione in formalina, ossidazione periodica), per cui il significato istochimico di tale risultato rimane di dubbia valutazione; verosimilmente servirà a chiarire tale questione la conoscenza della natura del composto che si forma con la riduzione dell'argento ammoniacale.

Roma — Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica dell'Università.
