

66. Antonio ASCENZI. — La struttura dell'osso umano osservata al microscopio elettronico.

Riassunto. — Sviluppando una serie di ricerche sistematiche sulla morfologia submicroscopica dell'osso umano, l'Autore riferisce le sue prime osservazioni sulla struttura submicroscopica della frazione inorganica studiata direttamente mediante il microscopio elettronico.

Résumé. — L'A. rapporte ses premières observations sur la structure sub-microscopique de la fraction inorganique de l'os humain, étudiée directement au microscope électronique.

Il résume les résultats obtenus dans les énoncés conclusifs qui suivent :

1) L'observation de la fraction minérale de l'os humain normal au moyen du microscope électronique permet de reconnaître une structure finement réticulaire ou poreuse.

2) Les dimensions des pores du réticulum font estimer que les cavités délimitées par celui-ci correspondent aux vides des macromolécules de l'ostéomucoïde e de l'ostéoalbuminoïde détruites par le processus de minéralisation.

3) Ces observations confirment directement les conceptions de Schmidt sur la disposition structurale sub-microscopique de la substance osseuse, telles qu'elles ont été déduites de l'étude des propriétés optiques.

4) L'état actuel de nos connaissances sur les caractères et les dimensions des molécules de l'ostéomucoïde et de l'ostéoalbuminoïde ne permet pas jusqu'à présent de faire des déductions interprétatives sur les rapports entre le réticulum inorganique décrit et la fraction organique de l'os.

5) Quelques images d'ensemble de la structure réticulaire spongieuse font entrevoir une disposition structurale bien définie (images à rosette) qui attend une définition topographique à la suite de recherches systématiques qu'il faudra accomplir sur des sections histologiques appropriées pour la microscopie électronique.

6) A 18.000 diamètres de grossissement il n'est pas possible de reconnaître des images se rapportant à des microcrystaux.

Summary. — The A. reports his first observations on the submicroscopic structure of the inorganic fraction of the human bone directly studied with the electron microscope.

He summarizes the results obtained in the following conclusions:

1) The study of the mineral fraction of the normal human bone through the electron microscope enables to recognize a finely reticular or porous structure.

2) The dimensions of the pores of the spongy reticulum suggest the opinion that the cavities delimited by it correspond to the empty spaces previously occupied from the macromolecules of the osteomucoid and osteoalbuminoid destroyed by the mineralization process.

3) These observations confirm directly Schmidt's concepts concerning the submicroscopic structural disposition of the bone substance as inferred from the study of the optical properties.

4) Our present knowledge of the properties and dimensions of the molecules of the osteomucoid and osteoalbuminoid does not as yet allow one to draw any interpretative conclusion about the relationships between the inorganic reticulum described and the organic fraction of the bone.

5) Some comprehensive arrangements of the reticular spongy structure seem to be indicative of a well-defined structural disposition (rosette-shaped images). In order to establish this structural arrangement, it would be necessary to carry out appropriate investigations on histological sections suitable for electron microscopy.

6) The observation with a magnification of 18,000 diameters does not allow one to recognize any microcrystals.

Zusammenfassung. — Der V. berichtet über seine ersten Beobachtungen der submikroskopischen Struktur des anorganischen Teiles des Menschenknochens, den er direkt, mit Hilfe des Elektronenmikroskops, erforscht hat.

Er fasst die erhaltenen Ergebnisse in den nachstehenden Schlussfolgerungen zusammen:

1) Die Beobachtung unter dem Elektronenmikroskop des anorganischen Anteils des normalen menschlichen Knochens ermöglicht es, eine fein retikuläre oder poröse Struktur zu erkennen.

2) Die Dimensionen der Poren des Netzes lassen es glaubwürdig erscheinen, dass die von diesen begrenzten Hohlräume, den Hohlräumen der Makromolekeln von Osteomukoid und Osteoalbuminoid, welche während des Mineralisierungsprozesses zerstört wurden, entsprechen.

3) Diese Beobachtungen bestätigen die Auffassung von Schmidt über die aus dem Studium der optischen Eigenschaften gefolgerte Strukturistik der Knochensubstanz.

4) Der Stand unserer Kenntnisse über die Kennzeichen und Dimensionen der Molekeln des Osteomukoid und des Osteoalbuminoid, erlauben es noch nicht, deutende Folgerungen über die Verhältnisse des beschriebenen anorganischen netzartigen Geflechtes und den organischen Teil des Knochens zu ziehen.

5) Einige Gesamtbilder der schwammigen Netzstruktur lassen eine gut definierte strukturelle Anordnung durchblicken (Rosetten-Bilder), die

erst nach systematischen Forschungen auf, für die Elektronenmikroskopie angemessene histologische Sektionen, eine topographische Definition geben können.

6) Die Untersuchung mit einer Vergrößerung von 18000 Durchmessern erlaubt es nicht, Bilder zu erkennen, die sich auf Mikrokrystalle beziehen.

L'osso privato della frazione organica appare dotato di birifrangenza di forma (Formdoppelbrechung) e segue la legge di Wiener ⁽¹⁾ per la birifrangenza di bastoncelli (Stäbchendoppelbrechung) secondo ricerche di Schmidt ⁽²⁾, Dallemagne e Mélon ⁽³⁾, Ascenzi ⁽⁴⁾.

Tale proprietà viene riferita da Schmidt sia ai canalicoli provenienti dalla distruzione delle fibre collagene, sia alle cavità submicroscopiche della « Kittsubstanz » formatesi per allontanamento delle molecole dell'osteomucoide e dell'ostealbuminoide dalle maglie del reticolo inorganico (o minerale). L'interpretazione viene suffragata da considerazioni sulle variazioni della potenza birifrattiva della frazione minerale dell'osso durante la compenetrazione da parte di un liquido di determinato indice di rifrazione, come pure dal comportamento cromatico dell'osso, privato della frazione organica immerso in soluzioni coloranti varie (rosso Congo, Tripanblau).

Ne discende pertanto che, secondo la concezione ormai più accreditata sulla struttura dell'osso, le fibre collagene risultano incorporate in una sostanza cementante (Kittsubstanz) la quale risulta di una frazione organica (osteomucoide, ostealbuminoide) e da una frazione inorganica (o minerale).

Ma se i rapporti di decorso e di topografia delle fibre ossee nella sostanza cementante sono ormai ben noti ed appartengono al dominio della microscopia ottica, non così si può dire per i rapporti tra la macromolecole osteomucoidi, rispettivamente ostealbuminoidi e la frazione minerale finora studiati solo in maniera indiretta mediante ricerche roentgen-spettrografiche [Caglioti ⁽⁵⁾]: ovvero attraverso la definizione delle proprietà ottiche dell'osso mediante il microscopio polarizzatore (Schmidt, Dallemagne e Mélon, Ascenzi).

(1) O. WIENER, Abh. sächs. Ges. Wiss. math. phys. Kl., 32, 509 (1912).

(2) W. J. SCHMIDT, Ber. d. Oberhess. Ges. f. Natur- u. Heilkunde zu Giessen, 15, 219 (1933).

(3) M. J. DALLEMAGNE e J. MÉLON, J. Washington Acad. of Sci., 36, 181 (1946).

(4) A. ASCENZI, Rend. Acc. Naz. Lincei (classe Sc. Fis., Mat. e Nat.) [8], 6, 777 (1948); 5, 100-171 (1948); Nature, 163, 604 (1949).

(5) V. CAGLIOTI, Atti del IV Congr. Naz. di Chim. pura e appl., pag. 320 (1935).

E' appunto nell'intento di recare un contributo diretto allo studio della struttura submicroscopica dell'osso e, in modo particolare, di definire gli aspetti submicroscopico-strutturali della frazione minerale che ho eseguito una serie di ricerche originali, facendo uso del microscopio elettronico.

MATERIALE E TECNICA

Ho scelto come materiale di studio la frazione minerale per due motivi fondamentali:

a) Uno fra i problemi più interessanti e tutt'ora aperti sulla struttura dell'osso è quello della composizione chimica e degli eventuali caratteri microcristallini della frazione minerale, quali è lecito desumere sia dall'analisi roentgenografica mediante spettri di Debye e Scherrer ⁽⁶⁾, sia dall'andamento della birifrangenza di forma e dall'esistenza di una birifrangenza propria negativa (Eigendoppelbrechung).

b) I requisiti di spessore imposti dall'osservazione con il microscopio elettronico sono tali che richiedono per l'allestimento delle sezioni appositi microtomi. Non avendone a disposizione, ho dovuto ricorrere a metodiche più semplici le quali, dopo una serie di tentativi preliminari si sono dimostrate applicabili con risultati attendibili alla sola frazione minerale.

Sarà inoltre opportuno aggiungere che la scelta del materiale è anche giustificata dal fatto che le manipolazioni tecniche atte a prepararlo non sembrano modificarne sensibilmente le proprietà strutturali, come, d'altra parte, risulta ben documentato dalle osservazioni sui caratteri istologici a luce polarizzata sulla birifrangenza di forma e sugli spettri di Debye e Scherrer, relative alla sola frazione inorganica.

Il segmento di osso che ha fatto oggetto delle presenti ricerche è il tratto diafisario del femore destro di un soggetto di sesso maschile di 25 anni (C.A., ♂, a. 25).

Alcuni frammenti, previamente liberati del midollo e sgrassati mediante lavaggio in tricloroetilene sono stati essiccati all'aria a temperatura ambiente. Quindi, senza subire altri trattamenti particolari propri della tecnica istologica corrente, sono stati sezionati longitudinalmente in laminette sottili (40-50 micron) mediante un grosso microtomo Leitz con slitta nella base ad avanzamento automatico dell'oggetto. Le sezioni così allestite sono state private della frazione organica mediante il metodo di Gabriel ⁽⁷⁾ (ebollizione in glicerina contenente il 6% di KOH), quindi sottoposte ad abbondanti lavaggi — fino a neutralizzazione — con acqua bollente ed essiccate in stufa a 110° per 2 ore.

⁽⁶⁾ P. DEBYE e P. SCHERRER, Nachr. Kgl. Ges. Wiss. Goettingen (1915-1916).

⁽⁷⁾ S. GABRIEL, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., 18, 257 (1894).

Allo scopo di ottenere frammenti così sottili da soddisfare ai requisiti di spessore e quindi di trasparenza richiesti per l'osservazione al microscopio elettronico, le sezioni di osso mineralizzato hanno subito accurata e prolungata triturazione in mortaio di agata, quindi la polvere è stata setacciata su tela di lino a maglie strette e fini.

Sebbene con questa tecnica si ottengano già frammenti sottili e quindi tali da permettere una buona osservazione, sono riuscito ad ottenere frammenti ancora più adeguati, dello spessore di appena qualche centinaio di Ångstroem, praticando la distruzione della frazione organica non già su sezioni, ma su segatura finissima, quasi impalpabile, dell'osso essiccato all'aria. La polvere di osso « mineralizzato », in tal modo ottenuta, è stata abbondantemente lavata con acqua bollente fino a neutralizzazione, quindi essiccata in stufa per 2 ore e conservata in piccoli pesafiltri sterili.

Per l'allestimento dei preparati sono state eseguite sospensioni a concentrazione decrescente della polvere in acqua tridistillata, facendo uso di provette o di tubi da saggio sterilizzati. Con ansa di platino è stata prelevata una goccia della sospensione e deposta su apposito diaframma portaoggetti munito di una sottilissima pellicola di « zaponlack » di qualche decina di millimicron.

L'osservazione è stata eseguita con il microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità ⁽⁸⁾. Ingrandimento: 18.000 diametri.

Allo scopo di ottenere immagini fortemente contrastate, sono state eseguite numerose osservazioni su preparati allestiti con la tecnica delle ombre.

Dei numerosi preparati esaminati, circa un centinaio, sono stati praticati rilievi fotografici.

RILIEVI ED OSSERVAZIONI

L'immagine strutturale costantemente rilevata è rappresentata da un reticolato a maglie sottili orientato secondo le tre dimensioni spaziali. L'esiguità del reticolo, pressochè al limite del potere di risoluzione del microscopio elettronico non permette ragguagli morfologici precisi circa la disposizione e la struttura delle singole maglie. Tuttavia ad un'indagine accurata, là ove i frammenti risultano più minuti, richiama l'attenzione una caratteristica disposizione come a piccoli quadrangoli che delimitano al centro un forellino rotondeggiante. Si trae pertanto in

(8) L'Autore sente il dovere di porgere i più vivi ringraziamenti al prof. Marotta Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità per l'ospitalità concessagli. Coglie l'occasione per esprimere al prof. Trabacchi l'espressione del suo profondo riconoscimento per l'assistenza e l'interessamento prodigatigli. Rinnova i più cordiali ringraziamenti alla dott.ssa Mortara e al dott. Castagnoli per la collaborazione tecnica.

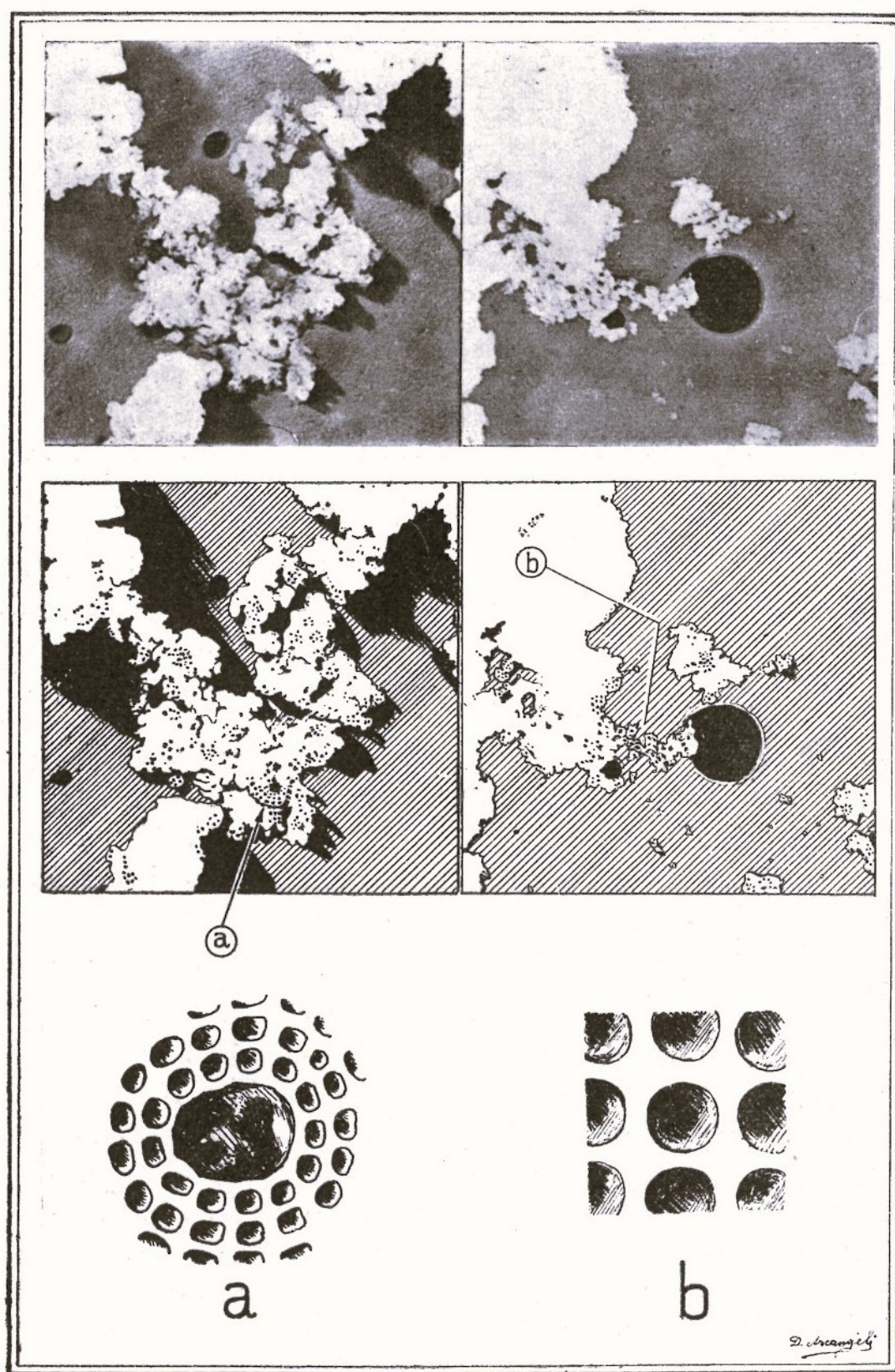


FIG. 1. - Microfotografia di frammenti di osso umano (C.A., ♂, a.25) privato dell'osseina osservato con il microscopio elettronico: 18.000 x.

I disegni schematici indicano alcuni degli aspetti più significativi: (a) immagine a rosetta; (b) caratteri del reticolo.

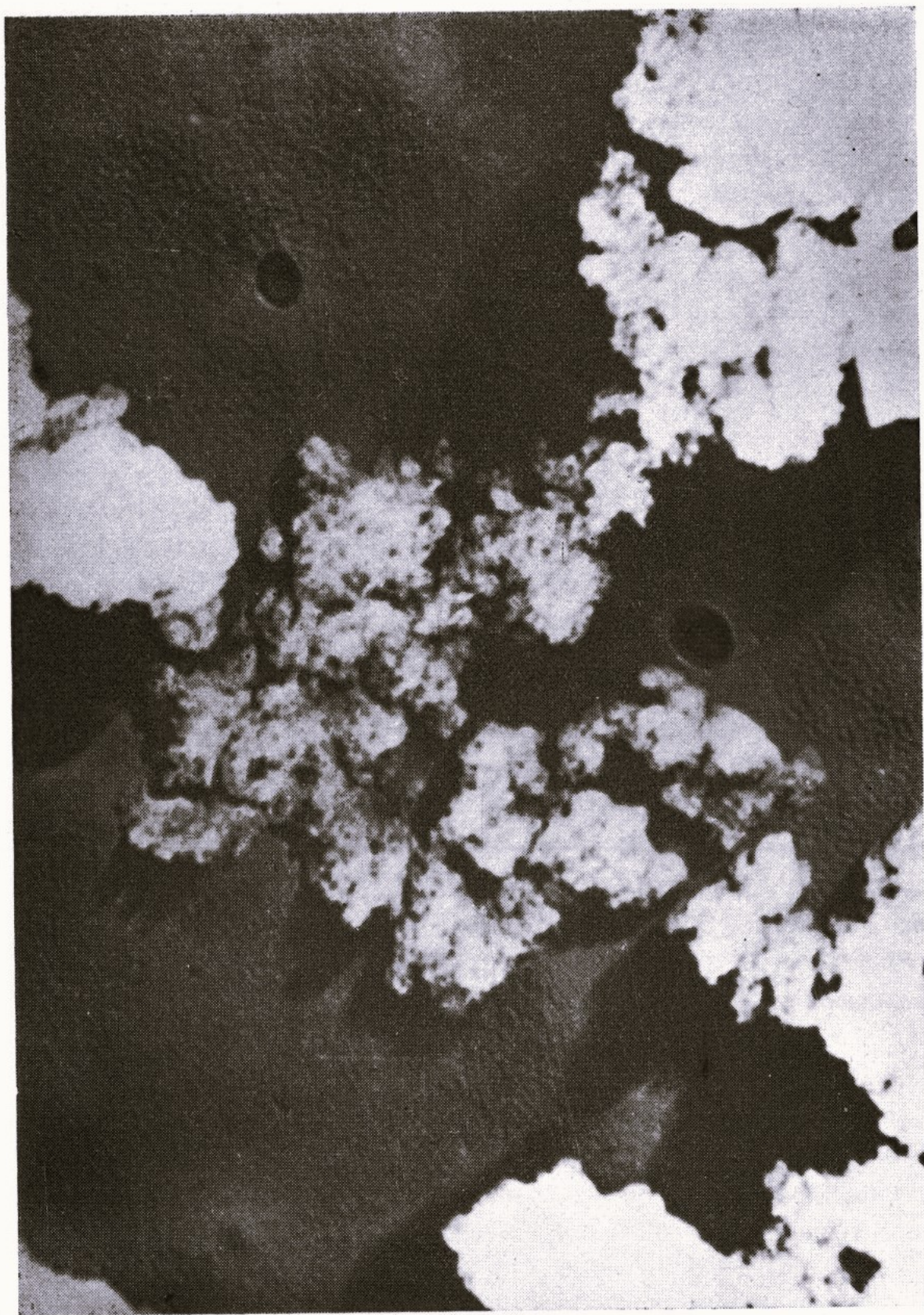


FIG. 2. - Ingrandimento di una microfotografia della fig. 1.
Notare l'aspetto spugnoso.

alcuni punti l'impressione che la frazione minerale dell'osso risulti nell'insieme di un reticolato complesso delimitante degli incavi o ricettacoli, comunicanti fra loro, onde si determina una struttura come a spugna. In qualche tratto si può anche osservare come il reticolato presenti orientazione radiata o concentrica con disegno d'insieme che potrebbe definirsi a rosetta. Misurazioni approssimative delle maglie del reticolo hanno dimostrato come il diametro medio dei ricettacoli da esso delimitati si aggiri intorno a 200-250 Å.

I reperti corrispondenti a questa descrizione sono riportati in maniera evidente nelle microfotografie delle figg. 1 e 2, riferentisi a preparati allestiti con il metodo delle ombre. In entrambi si riconosce egregiamente la struttura spongiosa. I tratti omogenei, apparentemente amorfi, corrispondono a frammenti molto spessi e quindi opachi al fascio elettronico. Si nota anche qualche immagine reticolare con atteggiamento a rosetta. Accanto alla struttura finemente spugnosa si rinven-
gono spesso formazioni cavitare di grandi proporzioni, irregolari, senza alcuna forma ben definita.

Allo scopo di facilitare la lettura delle microfotografie non ho ritenuto superfluo riprodurre nella fig. 1 disegni schematici relativi a particolarità delle strutture osservate.

Non ho mai avuto occasione di rilevare aspetti morfologici riferibili ad eventuali immagini di microcristalli.

Questi reperti possono trovare adeguata interpretazione solo se si tengono presenti le già ricordate concezioni sulla struttura dell'osso derivanti sia dallo studio istologico, sia dalla definizione delle proprietà ottiche. Infatti le dimensioni esigue del reticolo spugnoso, di gran lunga inferiori a quelle dei fasci collageni cementati dalla sostanza fondamentale permettono di ritenere che i vuoti limitati dalle maglie della frazione minerale siano verosimilmente da interpretarsi come gli spazi già occupati da macromolecole o da aggregati di macromolecole di osteomucoide e di osteoalbuminoide.

Ho tentato di confortare più decisamente quest'interpretazione, consultando la letteratura più recente sulla struttura chimica, sulla forma e sulle dimensioni molecolari dell'osteomucoide e dell'osteoalbuminoide onde stabilire raffronti con la forma e le dimensioni dei ricettacoli del reticolo inorganico. In tal senso avrei potuto forse avanzare ipotesi e trarre deduzioni interpretative sui rapporti tra frazione minerale e frazione organica della sostanza cementante interfibrillare (Kittsubstanz). Purtroppo le notizie ricavate sono frammentarie per cui non consentono criteri valutativi ed interpretativi attendibili. Ritengo tuttavia che elementi importanti, se non proprio decisivi, potranno ricavarsi dallo studio della struttura della fra-

zione organica dell'osso mediante il microscopio elettronico su sezioni eseguite con microtomi appositamente costruiti per questo tipo di ricerche.

Lo studio su sezioni microtomiche permetterà certamente di analizzare più profondamente la topografia delle immagini reticolari a disposizione concentrica con aspetti a rosetta che denunciano verosimilmente una condizione morfo-strutturale prestabilita quale è lecito ammettere sulla base dell'iso-orientamento ottico della frazione minerale e di quella organica.

Sarà ancora opportuno osservare che la morfologia reticolare della frazione organica, quale è stata da me descritta, non risulta sistematicamente — come ci si potrebbe aspettare dalle deduzioni di Schmidt in base alla teoria di Wiener — da cavità cilindriche parallele, bensì da reticoli apparentemente intercomunicanti. Se quindi, sempre secondo l'opinione del biologo tedesco, anche questa struttura submicroscopica incide nel determinismo della birifrangenza di forma dell'osso, è opinabile che tale legge possa in pratica venire eventualmente estesa anche ai corpi misti che non obbediscono strettamente a quella strutturistica bastoncellare come è rigorosamente previsto dagli sviluppi della teoria fisico-matematica.

Infine debbo rilevare come nei preparati presi in esame non mi è stato possibile individuare con precisione cavità riferibili ai fascicoli di fibre collagene andate distrutte nel corso del trattamento dell'osso con il metodo di Gabriel. Tale reperto negativo può trovare giustificazione qualora si tenga presente la metodica di allestimento del materiale che implica una polverizzazione minuta con frammenti di dimensioni certamente inferiori a quelle del reticolato a maglie relativamente larghe, risultante dall'allontanamento delle fibre collagene i cui fasci sono già per se stessi apprezzabili con il microscopio ottico.

Conclusioni definitivamente accettabili potranno essere enunciate solo quando i rilievi saranno eseguiti su sezioni microtomiche atte ad uno studio topografico più adeguato con il microscopio elettronico.

CONCLUSIONI

Da quanto sono venuto esponendo, ritengo lecito trarre le seguenti proposizioni conclusive:

1) L'osservazione della frazione minerale dell'osso umano normale mediante il microscopio elettronico permette di riconoscere una struttura finemente reticolare o porosa.

2) Le dimensioni dei pori del reticolo fanno ritenere che le cavità da questo delimitate corrispondano ai vuoti delle macromolecole di osteomucoide e di osteoalbuminoide distrutte dal processo di mineralizzazione.

3) Queste osservazioni confermano direttamente le concezioni di Schmidt sulla strutturistica submicroscopica della sostanza ossea dedotte dallo studio delle proprietà ottiche.

4) Lo stato delle nostre conoscenze sui caratteri e le dimensioni delle molecole dell'osteomucoide e dell'ostealbuminoide non permettono per ora deduzioni interpretative sui rapporti del reticolo inorganico descritto e la frazione organica dell'osso.

5) Alcune immagini d'insieme della struttura reticolare spongiosa fanno intravedere una disposizione strutturale ben definita (immagini a rosetta) che attende definizione topografica da ricerche sistematiche su sezioni istologiche adeguate per la microscopia elettronica.

6) L'esame ad ingrandimento di 18.000 diametri non permette di riconoscere immagini riferibili a microcristalli.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Anatomia patologica della Università, 16 luglio 1949.
