

7. Giovanni LELLI. — Osservazioni di microscopia elettronica sulle malattie del collagene. (*)

Riassunto. — L'Autore passa brevemente in rassegna i principali lavori di microscopia elettronica esistenti in letteratura in tema di malattie del collagene ed espone successivamente i risultati delle prime osservazioni di alcune personali indagini sull'argomento.

Trattando con soluzioni acide le fibrille collagene si osserva un comportamento variabile di queste con un coefficiente di resistenza in linea di massima direttamente proporzionale all'età del soggetto.

Le indagini si estendono al confronto dei risultati ottenuti sperimentando su collagene proveniente da portatori di mesenchimopatie varie con i risultati derivanti dall'uso di collagene di altri soggetti.

I dati a disposizione, anche se per ora troppo scarsi e quindi insufficienti per deduzioni di carattere generale, rappresentano una direttrice di studio nella ricerca di risultati nuovi atti ad una migliore conoscenza del complicato problema della biologia e della patologia del connettivo.

Résumé. — L'auteur passe rapidement en revue les travaux de microscopie électronique les plus importants parmi ceux de la littérature concernant les maladies du collagène et expose ensuite les résultats de ses premières observations au cours de recherches personnelles sur l'argument.

Si l'on traite avec des solutions acides les fibrilles du collagène, on observe un comportement variable de celles-ci selon un coefficient de résistance qui peut être considéré grosso modo comme directement proportionnel à l'âge du sujet.

Les recherches ont été poussées jusqu'à comparer les résultats obtenus par les expériences sur du collagène provenant de porteurs de mésenchimopathies diverses avec ceux obtenus sur du collagène provenant d'autres sujets.

Les données à notre disposition, même si elles sont pour le moment insuffisantes pour permettre des déductions de caractère général, permettent cependant d'orienter l'étude vers la recherche de nouveaux résultats qui permettront d'acquérir une plus profonde connaissance du problème complexe de la biologie et pathologie du tissu connectif.

(*) Comunicazione al III Congresso Internazionale di Medicina Interna, Stoccolma, 15-19 settembre 1954.

Summary.— The Author briefly reviews the results of the most important electron microscopic studies reported in the literature on the subject of the diseases of the collagen and then discusses the results of his first observations in his own studies of the problem.

By treating collagenous fibrils with acid solutions the former were seen to behave variously with a coefficient of resistance towards a maximum directly proportional to the age of the person.

These studies were made with a view to comparing the experimental results of using collagen derived from patients suffering from various morbid conditions of the mesenchym with the results obtained by using collagen from other persons.

The data so far obtained, even if they are as yet few and thus insufficient to permit deductions of a general character, do represent a line of approach in the study of new results towards a better understanding of the complicated problem of the biology and the pathology of the connective tissue.

Zusammenfassung.—Der Verfasser gibt eine kurze Uebersicht über die bisher am Elektronenmikroskop über Kollagenerkrankungen angestellten Beobachtungen, soweit sie in der Fachliteratur veröffentlicht wurden, und beschäftigt sich dann mit den Ergebnissen der ersten, von ihm selbst angestellten Beobachtungen auf diesem Gebiet.

Werden kollagenfibrillen mit Säurelösungen behandelt, so ist das Verhalten dieser Fibrillen verschieden, und der Widerstandskoeffizient ist grundsätzlich direkt proportional dem Alter des Patienten.

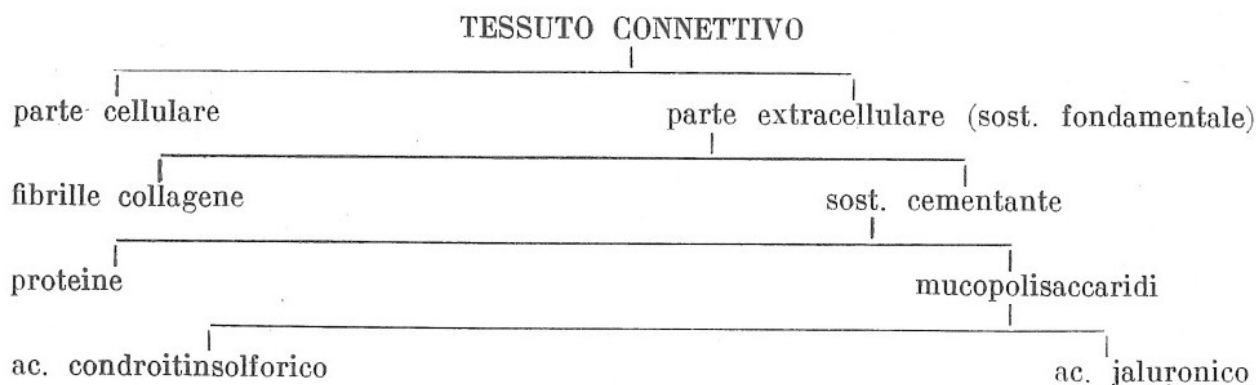
Die Forschung umfasst den Vergleich von Ergebnissen, die bei Versuchen mit von an verschiedenen Erkrankungen des Mesenchyma leidenden Patienten stammendem Kollagen erhalten wurden, mit den Resultaten, die mit von anderen Patienten stammendem Kollagen erhalten wurden.

Wenn die bisher zur Verfügung stehenden Angaben auch noch nicht genügen, um allgemeine Schlüsse zuzulassen, so bilden sie doch eine Richtlinie für weitere Forschung zwecks besseren Erkennens des schwierigen Problems der Biologie und Pathologie des Bindegewebes.

Le numerose ricerche di morfologia e di chimica condotte finora sul tessuto connettivo hanno messo in evidenza — almeno nelle grandi linee — la complessa costituzione di esso. Hanno inoltre rivelato la sua

grande importanza biologica ed un sinergismo funzionale esistente fra i vari componenti, necessario alla vita del connettivo stesso [BOMPIANI ⁽¹⁾].

La complessa costituzione può essere così riassunta:



Dati di particolare interesse provengono dalle ricerche di microscopia elettronica sulla componente *collagene*, che risulta costituita da elementi fibrillari sottilissimi, i quali ad ingrandimenti fra 18.000 e 70.000 diametri mostrano una netta striatura trasversale periodica a segmenti chiari e scuri (figg. 1 e 2) regolarmente alternati. Il loro spessore varia tra 200 e 2500 Å a seconda della specie e dell'età del soggetto (GROSS e SCHMITT ⁽²⁾, WOLPERS ⁽³⁾ ecc.), mentre l'ampiezza del periodo — costituito da un segmento chiaro e da uno scuro consecutivi — è costante intorno ai 640 Å.

Sulla base di questi dati sono state fatte ricerche di eventuali alterazioni esistenti nelle fibrille di soggetti colpiti dalle cosiddette *malattie del collagene*.

WOLPERS ⁽⁴⁾ riferisce che nella *necrosi fibrinoide* le fibrille collagene mantengono inalterata la loro struttura periodica, pur tendendo a conglomerare in fasci per interposizione di fibrina.

GALE ⁽⁵⁾ non riscontrò cambiamenti nella struttura e nella periodicità delle fibrille in 4 casi di febbre reumatica, in 2 di lupus eritematoso, in 3 di artrite reumatoide ed in uno di glomerulonefrite subacuta.

MAROTTA e TARANTA ⁽⁶⁾ in alcuni casi di sclerodermia giungono ad identiche conclusioni.

BALL, KELLGREN, RIED, ASTBURY e BEIGHTON ⁽⁷⁾ segnalano, invece, nella necrosi fibrinoide alterazioni degenerative delle fibrille collagene con formazione di residuo amorfo resistente all'azione della tripsina.

RICH, VOISIN e BANG ⁽⁸⁾ nelle fibrille collagene di focolai anafilattici del fenomeno di Arthus hanno riscontrato mancanza di normale struttura periodica, trasformazione ialina, variazioni della densità, irregolarità di margini, rigonfiamento e frammentazione.

Però si ritiene di norma che l'alterazione principale sia sempre nella

sostanza fondamentale del connettivo e che le eventuali modificazioni fibrillari rappresentino solo un fenomeno secondario.

In un recente lavoro in collaborazione con SAPPÀ (9) ho studiato al microscopio elettronico le alterazioni fibrillari su campioni di collagene provenienti da 53 soggetti umani di età diversa e morti per malattie varie. Detti campioni vennero trattati con soluzioni acquose di acido lattico, trattamento che fa rigonfiare in quantità e misura diversa le fibrille fino a determinarne, talora, il completo disfacimento (figg. 3, 4, 5). Con il conteggio delle fibrille conservate in ciascun campione si ottennero dati numerici che indicano una tendenza all'aumento della resistenza delle fibrille con il crescere dell'età.

Nel periodo compreso fra i 2 e i 60 anni tale tendenza è data approssimativamente dalla formula:

$$y = 13 + 1,2 x$$

dove y rappresenta il numero delle fibrille conservate ed x l'età.

Oltre i 60 anni la y si mantiene costante sul valore di 85 e cioè su quello della formula in cui $x = 60$.

Allo scopo di approfondire le indagini su questo interessante fenomeno ho ripetuto su 73 soggetti gli esperimenti precedenti. Perchè i risultati riuscissero il più possibile confrontabili, ho curato che il materiale, la sede del prelevamento ed il trattamento successivo fossero identici a quelli usati in precedenza.

Ho adoperato frammenti umani, non fissati, di derma cutaneo della regione sternale, ottenuti per biopsia o da autopsie di cadaveri a 24 ore dalla morte.

Il trattamento è stato il seguente:

- 1) dilacerazione del tessuto in acqua bidistillata;
- 2) immersione in soluzione di acido lattico a $\text{pH} = 1,7-1,9$ per 20 minuti, rinnovando la soluzione;
- 3) lavaggio ripetuto in acqua bidistillata;
- 4) montaggio nei portaoggetti del microscopio elettronico;
- 5) osservazione senza metallizzazione con ingrandimenti compresi tra 7000 e 10.000 diametri;
- 6) conteggio delle fibrille intatte in ogni campione distribuito su 4 portaoggetti.

Per avere un'idea del grado di esattezza del procedimento sperimentale seguito, ho operato, in ciascun caso, i conteggi delle fibrille su 5 frammenti diversi dello stesso tessuto, prelevati nella stessa sede e sottoposti separatamente allo stesso trattamento. Ho voluto così che si manifestassero fra l'uno e l'altro campione tutte le possibili differenze che possono presentarsi abitualmente tra un'esperienza e l'altra, per conoscere quanto, nelle variazioni delle cifre ottenute, fosse in dipendenza dell'età e quanto, invece, derivasse da eventuali errori per imprecisione del metodo.

Le percentuali da me avute per le fibrille intatte sono esposte nella seguente tabella, nella quale sono segnati di fianco i valori medi corrispondenti a quelli presumibili, applicando il metodo di LELLI e SAPPÀ.

Il rapporto fra i valori medi da me ottenuti nel presente studio e quelli presumibili di LELLI e SAPPÀ è riprodotto nel grafico n. 1 della fig. 6, dove la linea rappresenta l'ipotetico andamento del fenomeno (con la formula $y = 13 + 1,2 x$ fino a 60 anni e con la costante 85 per le età successive), ed i 73 punti, invece, la posizione dei nuovi valori sperimentali.

L'aumento della resistenza delle fibrille collagene con il crescere dell'età resta così confermato in linea di massima, nonostante il comportamento talvolta irregolare di alcuni casi.

Al fine di giungere a spiegare almeno in parte le irregolarità riscontrate nei miei dati numerici (irregolarità che non sembrano imputabili soltanto alle inevitabili imprecisioni del metodo sperimentale adottato)

Casi	Età	Fibrille intatte						Valore medio	Valori sec. $y=13+1,2x$	Diagnosi clinica
1	6	29	35	23	35	34	31	20	20	Mesenterite, cachessia
2	9	46	23	30	26	19	28	23	23	Tumore cerebrale
3	10	28	20	21	19	28	23	25	25	Cerebropatia, infantilismo
4	10	23	18	33	18	33	25	25	25	Sindrome bantiana
5	12	20	20	24	17	19	20	27	27	Leucemia
6	12	12	10	19	14	12	13	27	27	Sclerodermia
7	14	62	47	41	47	42	47	29	29	Uremia
8	14	11	15	13	12	20	14	29	29	Cardiopatia reumatica
9	17	21	16	26	20	13	19	33	33	Lupus eritematoso
10	21	38	37	35	38	34	37	38	38	Leucemia
11	24	40	32	59	35	16	36	41	41	Lupus eritematoso
12	24	57	72	58	57	68	62	41	41	Infortunio
13	25	81	66	38	57	82	65	43	43	Vizio congenito di cuore
14	26	42	53	33	52	14	39	44	44	Morbo di Pott
15	27	62	60	58	75	57	62	45	45	Morte violenta
16	31	55	86	66	91	81	75	50	50	Uremia
17	32	81	87	73	54	83	75	51	51	Miastenia grave, cachessia

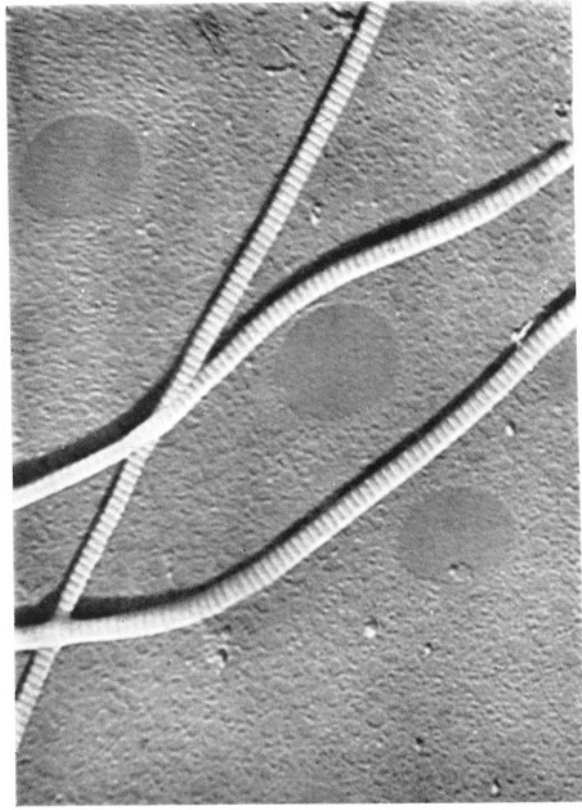


Fig. 1. - Fibrille collagene normali con netta struttura periodica trasversale. (18.000 $\times$). Ombreggiatura cromo.

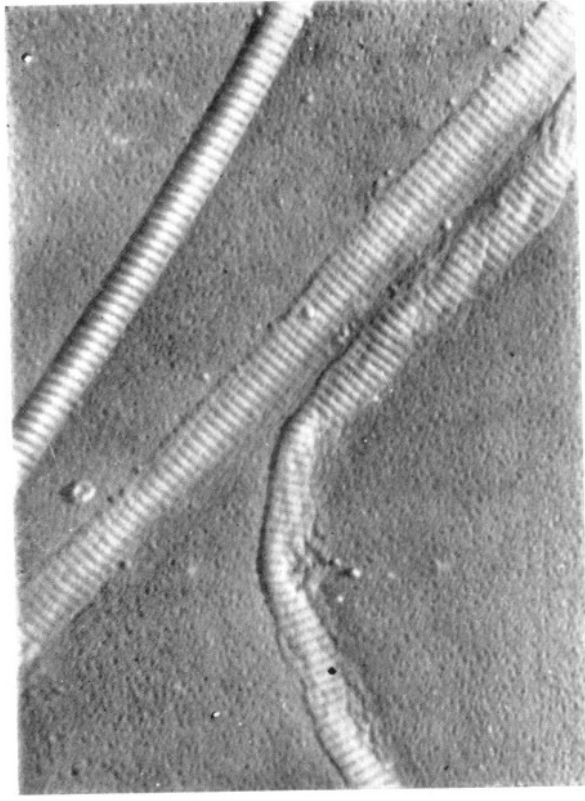


Fig. 2. - Fibrille collagene rigonfiate e alterate in seguito a trattamento con soluzioni acide. (18.000 $\times$). Ombreggiatura al cromo.

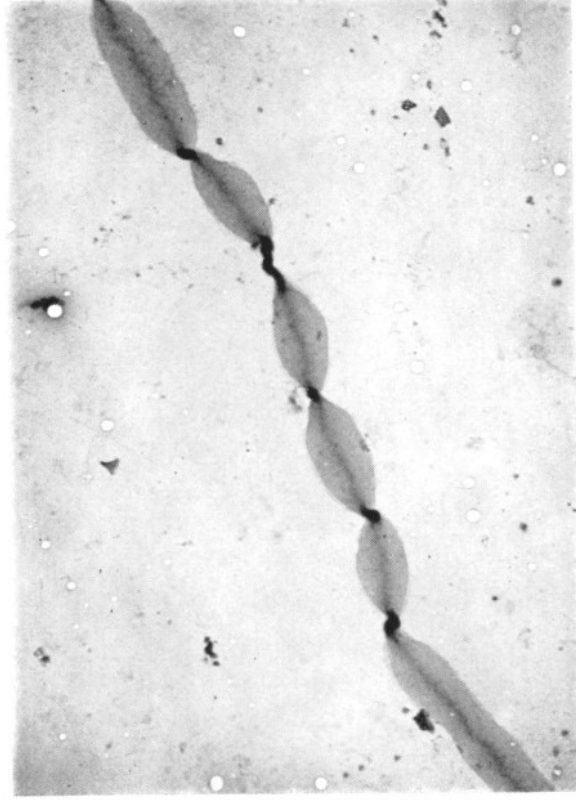


Fig. 3. - Fibrilla collagena con rigonfiamento segmentario in seguito a trattamento con soluzioni acide. (10.000 $\times$). Preparato non ombreggiato.



Fig. 4. - Fibrilla collagena quasi in completo disfacimento in seguito a trattamento con soluzioni acide. (18.000 $\times$). Ombreggiatura al cromo.

Casi	Età	Fibrille intatte					Valore medio	Valori sec. $y=13+1,2x$	Diagnosi clinica
18	33	44	43	50	67	29	46	52	Lupus eritematoso
19	33	60	100	100	100	50	82	52	Glomerulonefrite subacuta
20	34	76	57	42	35	54	52	53	Lupus eritematoso
21	38	46	57	49	58	65	55	58	Cardiopatìa reumatica
22	38	56	57	58	59	53	56	58	Cardiopatìa reumatica
23	38	56	63	52	80	85	67	58	Morte violenta
24	39	35	62	48	58	54	51	59	Cardiopatìa reumatica
25	39	57	61	58	62	—	59	59	Ulcera peptica
26	40	65	72	56	76	57	65	61	Morte violenta
27	41	67	76	46	64	51	60	62	Lupus eritematoso
28	41	59	38	66	57	52	54	62	Cardiopatìa reumatica
29	41	64	56	67	60	63	62	62	Cardiopatìa reumatica
30	42	51	56	44	50	48	50	63	Epatite acuta
31	43	91	90	95	100	88	92	64	Ascesso polm., cachessia
32	43	59	62	61	75	60	63	64	Meningo-encefalite acuta
33	44	64	64	76	63	49	63	65	Meningo-encefalite acuta
34	46	69	70	92	90	84	81	68	Cirrosi portale, cachessia
35	46	80	39	81	83	60	68	68	Carcinoma utero
36	47	57	53	57	50	60	55	69	Dermatomiosite
37	49	50	68	44	66	53	56	71	Emorragia cerebrale
38	50	73	82	66	71	74	73	73	Morte violenta
39	50	50	43	57	75	55	56	73	Lupus eritematoso
40	50	100	100	100	100	100	100	73	Bronchite asmat. (cortisone)
41	51	86	82	65	60	66	70	74	Carcinoma ovarico
42	51	71	78	90	93	85	83	74	Cardiopatìa, iperazotemia
43	53	69	100	60	69	74	74	76	T.b.c. polmonare
44	53	76	74	73	69	55	69	76	Pneumectomia, insuff. cardiaca
45	54	44	57	64	56	50	54	77	Cardiopatìa reumatica
46	54	59	55	61	61	65	60	77	Cardiopatìa reum., cirrosi
47	55	86	81	68	76	82	78	79	Porpora febbrile
48	55	95	80	72	96	98	88	79	Uremia
49	55	65	72	56	67	34	59	79	Lupus eritematoso
50	56	64	65	76	60	60	65	80	Peritonite fibrino-purulenta
51	57	20	11	22	20	11	17	81	Scleroedema adultorum
52	57	92	36	47	34	62	54	81	Scleroedema adultorum
53	57	81	86	84	79	76	81	81	Ipertrofia prostatica
54	57	71	69	67	60	70	67	81	Coronarioscler., infarto card.
55	59	78	86	73	85	89	82	83	Cardiopatìa reum., uremia
56	59	45	50	32	33	32	38	83	Cardiopatìa reumatica
57	59	83	82	81	85	80	83	83	Diabete, coma
58	61	79	82	80	83	83	81	85	Arteriosclerosi
59	62	89	87	85	92	79	86	85	Carcinoma prostata
60	63	76	60	70	77	88	74	85	Mieloma multiplo
61	63	56	56	72	67	64	63	85	Cardiopatìa reumatica
62	64	54	60	76	88	68	69	85	Carcinoma esofago
63	64	59	50	68	52	54	56	85	Asma, blocco card., cirrosi
64	66	98	96	72	86	76	85	85	Cardiopatìa reumatica
65	67	100	70	90	66	86	83	85	Ulcera duodenale
66	68	42	55	62	43	71	54	85	Colecistite acuta
67	72	100	100	86	100	100	97	85	Cachessia da tumore
68	72	22	74	50	47	43	47	85	Cardiopatìa reum., Parkinson
69	72	95	94	94	96	94	94	85	Ascesso anale
70	75	96	86	80	86	80	85	85	Epatite cronica, coma
71	78	98	100	100	100	100	99	85	Ipertensione, nefrite cronica
72	81	83	90	86	92	94	89	85	Ulcera duodenale
73	82	84	86	85	77	100	86	85	Cachessia, broncopolmonite

OSSERVAZIONI DI MICROSCOPIA ELETTRONICA SULLE MALATTIE DEL COLLAGENO

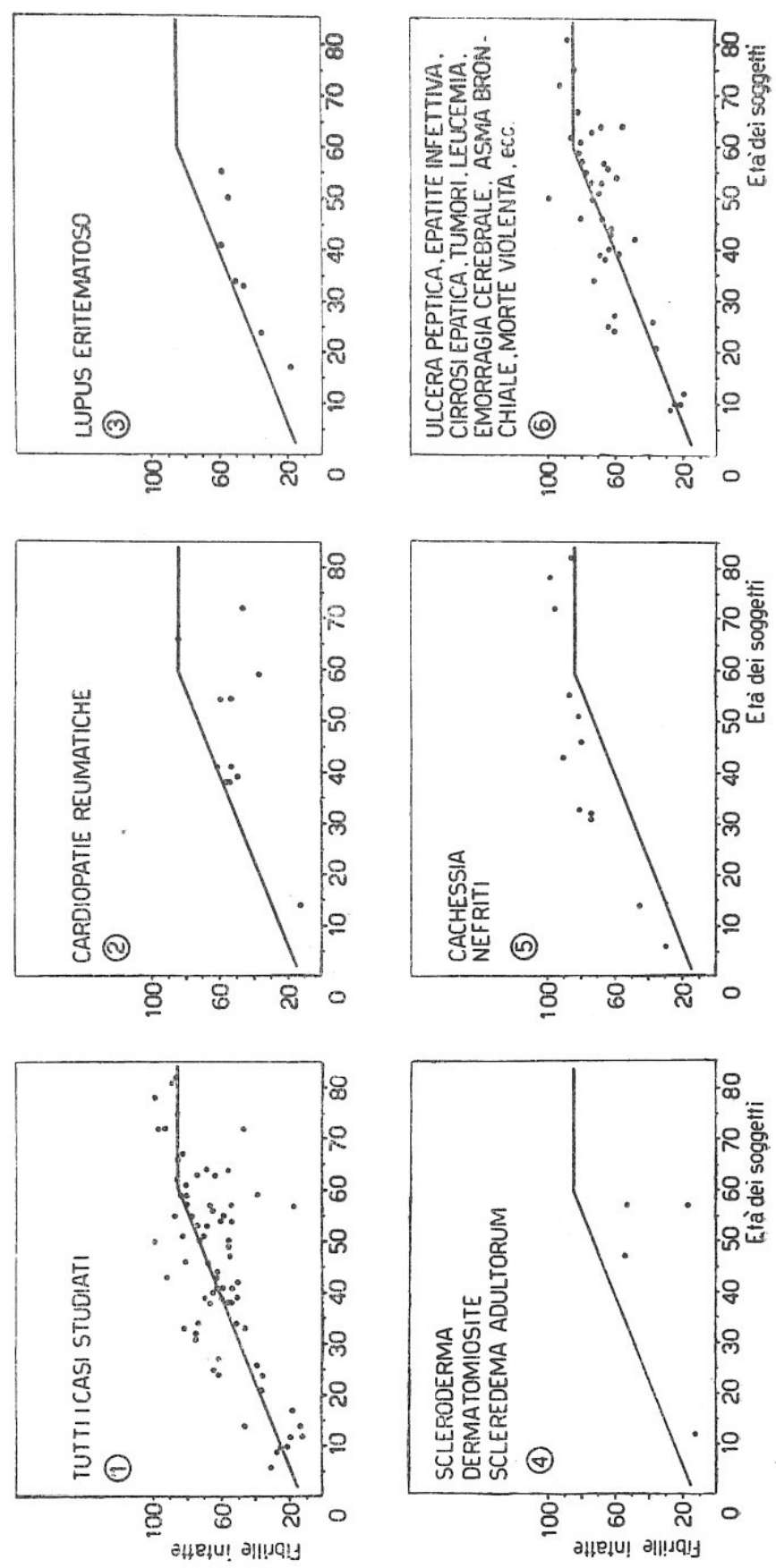


Fig. 6

ho cercato un eventuale rapporto fra i valori numerici ottenuti, l'età dei vari soggetti e la loro malattia.

Con i valori medi corrispondenti a tutti indistintamente i casi studiati di cosiddette malattie del collagene ho costruito i grafici 2, 3 e 4 della fig. 6. Ho potuto così mettere in evidenza che i valori medi corrispondenti a queste malattie sono situati nel grafico tutti al di sotto della linea di LELLI e SAPPÀ riprodotta in ogni grafico.

Su una stessa base (di una relazione cioè tra i valori numerici ottenuti dai conteggi, l'età e la malattia dei soggetti) ho costruito il grafico n. 5 della fig. 6, dove ho riprodotto i valori corrispondenti a tutti i casi di nefrite iperazotemica e di cachessia facenti parte del materiale esaminato. A differenza delle malattie del collagene, qui i valori risultano, senza eccezione, localizzati sopra alla linea indicata da LELLI e SAPPÀ.

Per altre forme morbose non mi è stato invece possibile stabilire raggruppamenti analoghi, anche per l'esiguità del materiale a disposizione.

Riunendo però in un grafico i valori corrispondenti a queste forme ho ottenuto il diagramma n. 6, non privo di interesse. In esso, infatti, appare ancor più evidente il regolare aumento della resistenza delle fibrille collagene con il crescere dell'età, ed è anche confermato che tale aumento segue, approssimativamente, la linea indicata da LELLI e SAPPÀ.

CONSIDERAZIONI RIASSUNTIVE

Anche se i dati numerici sopra riportati non sono in quantità tale da permettere conclusioni di ordine generale, essi tuttavia confermano l'aumento di resistenza delle fibrille collagene col crescere dell'età, aumento messo già in evidenza da LELLI e SAPPÀ, ed avvalorano l'ipotesi che detto aumento avvenga secondo una direttrice, che risponde alla formula approssimativa presentata dai suddetti AA.

I dati a disposizione indicano inoltre che nelle malattie del collagene vi è una diminuzione di resistenza delle fibrille anche al di fuori delle zone lese. Inoltre in un caso di scleroedema adutorum (osservazioni n. 51 e 52) l'esame del tessuto, anche a livello della lesione cutanea, ha messo in evidenza che tale diminuzione è assai più intensa nelle fibrille della zona lesa che in quelle della cute ritenuta, almeno apparentemente, sana.

Se ulteriori ricerche in corso potranno confermare i risultati sopra esposti se ne avvantaggerà l'oscuro capitolo della etiopatogenesi delle malattie del collagene. Diverse ipotesi potranno essere fatte, fra cui quella che la causa morbigena aggredisca l'organismo determinandovi

inizialmente una particolare labilità del collagene, che starebbe forse alla base delle lesioni anatomiche che si osservano in queste forme morbose. Assai meno probabile è che la particolare labilità del collagene, messa in evidenza in queste malattie, sia primitiva e rappresenti il terreno adatto allo sviluppo delle collagenosi per azione di stimoli morbigeni diversi.

Meritevole di attenta considerazione mi sembra anche il comportamento delle fibrille collagene nei casi di nefrite iperazotemica, di uremia e di cachessia, malattie nelle quali si osserva un'alta percentuale di elementi intatti in confronto ai valori presunti per le corrispondenti età. La presenza di un collagene più resistente che di norma, in tali malattie, richiama alla mente il rilievo clinico della controindicazione del trattamento cortisonico nei nefritici. In un caso di bronchite asmatica trattato con cortisone (osservazione n. 40) ho riscontrato fibrille resistentissime e completamente indifferenti al trattamento chimico subito (percentuale del 100% di fibrille intatte). In soggetti, come i nefritici, con collagene già di per sè particolarmente resistente, è facile pensare che il cortisone possa agire sfavorevolmente, accelerando forse i processi involutivi e l'andamento verso la sclerosi.

A prescindere dai risultati che, come già detto, debbono essere controllati su più ampia casistica, le presenti ricerche indicano una nuova via per lo studio delle malattie del collagene e del meccanismo di azione di alcuni farmaci ad esse collegati.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BOMPIANI G., ASCENZI A. e BENEDETTI E. L. - Rec. Progr. Med., 12: 287 (1952).
 - (²) GROSS J. e SCHMITT F. O. - J. Exp. Med., 5: 555 (1948).
 - (³) WOLPERS C. - Das Leder, 1: 3 (1950).
 - (⁴) WOLPERS C. - Frankf. Ztschr. Path., 61: 417 (1950).
 - (⁵) GALE J. C. - Amer. J. Path., 27: 455 (1951).
 - (⁶) MAROTTA U. e TARANTA: Lavoro in corso di pubblicazione.
 - (⁷) KELLGREN J. H., BALL J., ASTBURY W. T., REED R. e BEIGHTON E. - Nature, 168: 493 (1951).
 - (⁸) RICH A. R., VOISIN G. A. e BANG F. B. - Bull. J. Hopkins Hosp., 92: 222 (1953).
 - (⁹) LELLI G. e SAPPÀ M. - Rend. Ist. Sup. Sanità (1955).
-