

13. Giovanni LELLI, Alberto BONANOME, Renzo BEGANI e Mirella SAPPA. —
**Le fibrille collagene dell'avventizia di arterie liofilizzate viste
al microscopio elettronico.**

Riassunto. — Gli AA. hanno esaminato al microscopio elettronico alcuni frammenti di avventizia di aorta liofilizzata e di aorta fresca, cercando eventuali modificazioni del collagene in rapporto alla liofilizzazione.

I risultati ottenuti, mentre escludono cambiamenti di struttura, indicano un comportamento diverso del collagene liofilizzato di fronte ad alcuni agenti chimici.

Questi risultati interessano per una maggior conoscenza degli effetti del metodo della liofilizzazione, specie in rapporto allo studio sperimentale dei trapianti con tessuti liofilizzati ed alla conservazione del collagene per ricerche di microscopia elettronica.

Résumé. — Les auteurs ont examiné au microscope électronique certains fragments de l'adventitia de l'aorte lyophilisée et de l'aorte fraîche, à la recherche de possibles modifications du collagène dues à la lyophilisation.

Les résultats obtenus, tandis qu'ils excluent des changements de structure, indiquent que le tissu lyophilisé se comporte différemment par rapport à certains agents chimiques.

Ces résultats sont intéressants pour une connaissance plus approfondie des effets de la méthode de lyophilisation, surtout en ce qui concerne l'étude expérimentale de la transplantation des tissus lyophilisés et celle de la conservation du collagène pour les recherches au microscope électronique.

Summary. — The authors have examined some fragments of the adventitia of lyophilized aorta and fresh aorta, with a view to observing possible changes in the collagens due to the lyophile process, under the electronic microscope.

The results obtained have shown that there is no change in structure, but different behaviour on the part of the lyophilized tissue in contact with certain chemical agents has been observed.

These results are interesting in that they give a deeper knowledge of the effect of the lyophile method, particularly in its bearing on the experimental studies of graftings with lyophilized tissue and the preservation of the collagens for research under the electronic microscope.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben Fragmente der Adventitia der lyophilisierten sowie frischen Aorta unter dem Elektronenmikroskop untersucht, um eventuelle auf die Lyophilisierung zurückzuführende Collagenmodifikationen festzustellen.

Die Ergebnisse schliessen einerseits Strukturänderungen aus, zeigen aber auf, dass das lyophilisierte Gewebe sich gewissen chemischen Reagentien gegenüber verschieden verhält.

Diese Ergebnisse gewinnen Bedeutung für eine Vertiefung unserer Kenntnisse der Auswirkungen der Lyophilisierungsmethode, vor allem in Hinsicht auf die experimentelle Untersuchung der Verpflanzung lyophilisierter Gewebe und die Collagenerhaltung für die Forschungen unter dem Elektronenmikroskop.

I moderni indirizzi di chirurgia restauratrice hanno dato luogo, collateralmente alle complesse ricerche sui dibattuti problemi degli innesti e dei trapianti, ad una serie di studi riguardanti le modalità di conservazione dei tessuti da innestare, sì da poterli avere già pronti al momento dell'intervento.

Fondamentalmente il problema è limitato, per ora, ai trapianti di vasi omologhi, sia in chirurgia vascolare che extravascolare: la massima parte dei contributi è d'indole sperimentale, ed è proprio la notevole disparità di vedute, risultante dall'esame della letteratura sull'argomento, che dimostra come ancora non si sia apparentemente giunti ad una formula ideale.

Un importante metodo di conservazione dei tessuti da innestare è il procedimento di liofilizzazione, entrato recentemente in uso.

La liofilizzazione è un metodo di essiccamento per congelazione (FLOSDORF) ⁽¹⁾ da preferire agli altri specie quando si tratti di operare su sostanze labili, tipo proteine, grassi, enzimi, vitamine, plasma e siero di sangue, antibiotici e proteo-ormoni (CAPRA) ⁽²⁾. Conosciuto già da molti anni il processo è passato alla industrializzazione dopo il 1940, particolarmente per la conservazione delle sostanze suddette.

Nelle linee fondamentali le fasi del procedimento sono le seguenti:

a) congelamento preventivo del materiale, in apparecchi che consentono di raggiungere i -60° - -70° ;

(1) FLOSDORF: Freiz-drjing. Reinhold p. Corporation 1949.

(2) CAPRA: Il Farmaco 5, 741, 1950.

b) collocamento del materiale nel *liostato*, speciale autoclave, dove viene immediatamente prodotto il vuoto;

c) sublimazione del solvente congelato a temperatura adatta a mantenere il congelamento; aumento finale della temperatura per espellere l'umidità residua.



FIG. 1 - Fibrilla collagena liofilizzata. Dilacerazione in soluzione di ialuronidasi.
18.000 x

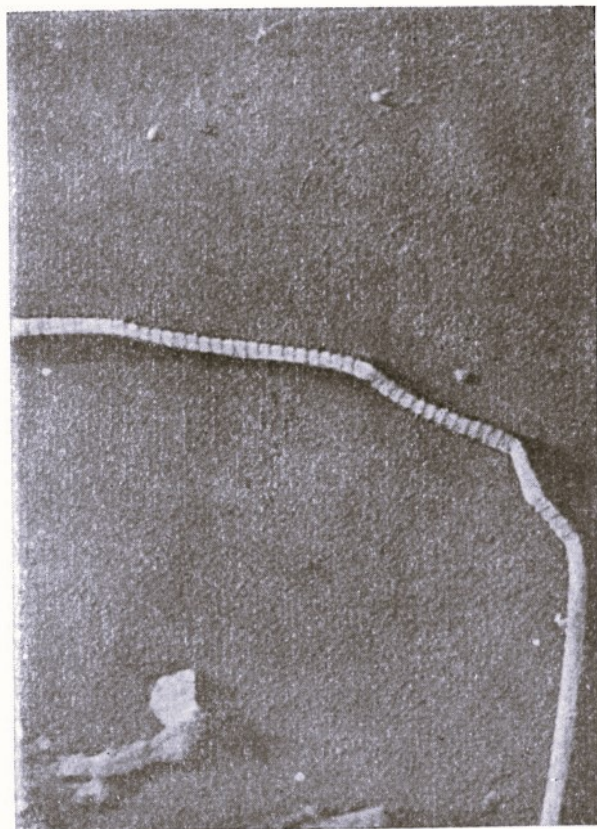


FIG. 2 - Fibrilla collagena liofilizzata. Dilacerazione in acqua a 40°.
18.000 x

Dopo la liofilizzazione i tessuti si presentano di aspetto cartaceo ed anche parzialmente retratti.

La liofilizzazione è stata usata di recente anche in citologia ed in istologia allo scopo di disidratare i preparati biologici.

Per quello che riguarda l'adozione di questo metodo per la conservazione dei tessuti da innestare, esistono già nella letteratura studi importanti (NATELLIS, ⁽³⁾ NATELLIS e VISALLI, MARANGONI e Coll.) ⁽⁴⁾ sui trapianti di arterie liofilizzate in vasi sanguigni. Due di noi (BONANOME e

⁽³⁾ NATELLIS: Atti Soc. Rom. Chir. Dicembre 1951.

⁽⁴⁾ NATELLIS e VISALLI: Arch. It. Chir. 74, 5, 328, 1951.

BEGANI) hanno sperimentato recentemente con segmenti di arteria, vena, coledoco e uretere liofilizzato.

In questo lavoro, con una ricerca di microscopia elettronica su alcuni componenti la parete di arterie liofilizzate, ci siamo proposti di mettere in luce eventuali alterazioni strutturali del tessuto, riportabili al trattamento conservativo praticato.

Le nostre ricerche sono state condotte con frammenti di aorta sana liofilizzata di cane, rimasta allo stato secco per alcuni mesi.

I frammenti dopo qualche ora in acqua bidistillata, riprendono lo aspetto di tessuto fresco. Noi abbiamo separato l'avventizia per studiarvi, per mezzo del microscopio elettronico, la struttura delle fibrille collagene.



FIG. 3 - Fibrille collagene non liofilizzate. Dilacerazione in soluzione di ialuronidasi.
18.000 x



FIG. 4 - Fibrille collagene non liofilizzate. Dilacerazione in acqua a 40°.
18.000 x

Per mettere in evidenza eventuali differenze strutturali in confronto con le fibrille collagene dell'avventizia di aorta non liofilizzata, abbiamo esaminato frammenti dei due tipi di tessuto, sottoposti prima alle stesse manipolazioni di tecnica necessarie per la separazione delle fibrille dalla sostanza fondamentale.

Abbiamo suddiviso il materiale di studio in tre gruppi.

Nel primo i campioni di avventizia sono stati sottoposti alla azione di una soluzione di ialuronidasi (LELLI e MAROTTA) (5).

Il fattore diffusore, alla concentrazione di 250 U. V. (unità viscosimetriche) in 3 cc. di soluzione, ha agito sul tessuto per un'ora, in alcuni casi alla temperatura di 31° C., in altri di 18° C. durante la dilacerazione.

Nel secondo gruppo il materiale da esaminare è stato dilacerato in acqua bidistillata e mantenuto a 40° C. per un'ora (LELLI) (6).

Nel terzo gruppo la dilacerazione è avvenuta in una soluzione di CaCl_2 al 10% a $\text{ph}=4,5$ lasciata agire per 21 ore, modificando una tecnica usata da PARTRIDGE (7).

L'osservazione al microscopio elettronico dei tessuti così trattati ha messo in evidenza quanto segue:

Nel 1° e nel 2° gruppo le fibrille collagene del tessuto liofilizzato hanno mostrato sempre con chiara evidenza la struttura periodica caratteristica (fig. 1-2) e non hanno mai rivelato, almeno apparentemente, modificazioni di spessore.

Su un numero notevole di elementi del tessuto liofilizzato e di quello fresco di controllo (fig. 3-4) abbiamo eseguito con un comparatore la misurazione dello spessore fibrillare e dell'ampiezza del periodo. Con questi valori abbiamo calcolato lo spessore medio e l'ampiezza media del periodo. I risultati ottenuti hanno dato valori che non permettono di differenziare in alcun modo i due tessuti, rientrando nei limiti ritenuti normali dai diversi AA. (HALL, JAKUS e SCHMITT (8), WOLPERS (9-10), GROSS e SCHMITT (11), LELLI e MAROTTA (12-13), HUBER e ROUILLER (14), ecc.).

Nel terzo gruppo invece abbiamo riscontrato differenze notevoli fra il tessuto fresco e quello liofilizzato.

La maggior parte delle fibrille collagene del tessuto liofilizzato, per azione della soluzione di CaCl_2 ha mostrato alterazioni più o meno marcate, dal semplice rigonfiamento fino al disfacimento più o meno completo delle fibrille, accompagnato spesso ad una specie di attorcigliamento (fig. 5-6-7).

(5) LELLI e MAROTTA: Ztschr. wiss. Mikr. 60, 6/7, 359, 1952.

(6) LELLI: Atti 52° Congr. Soc. It. Med. Int. Ottobre 1951.

(7) PARTRIDGE: Bioch. J. 43, 387, 1948.

(8) HALL, JAKUS e SCHMITT: J. Am. Chem. Soc. 64, 1234, 1942.

(9) WOLPERS: Das Leder 1, 3, 1950.

(10) WOLPERS: Virch. Arch. 312, 292, 1944.

(11) GROSS e SCHMITT: J. Exp. Med. 88, 5, 555, 1948.

(12) LELLI e MAROTTA: Rend. Ist. Sup. San. 13, 503, 1950.

(13) LELLI e MAROTTA: Acta Un. Int. c. Cancer 7, 4, 695, 1951.

(14) HUBER e ROUILLER: Experientia 7, 338, 1951.

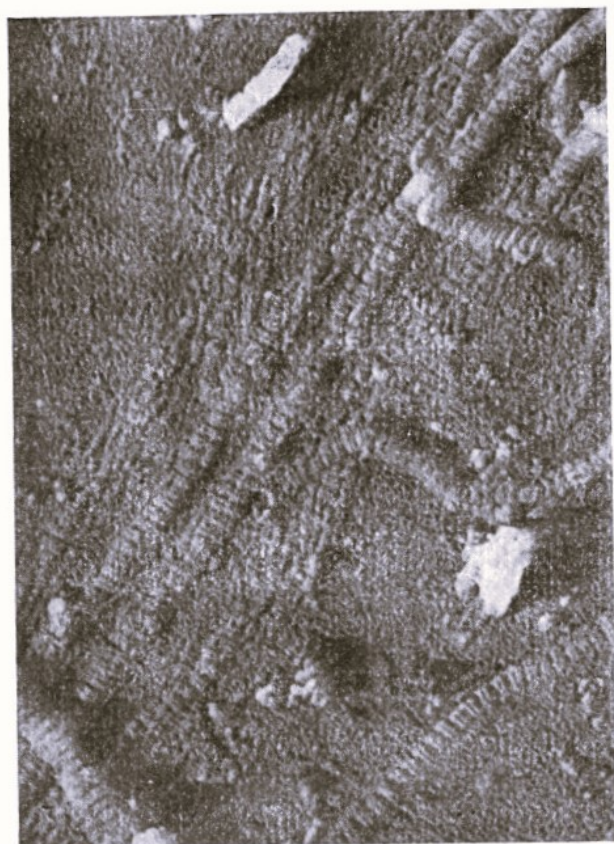


FIG. 5 - Fibrille collagene liofilizzate. Dilacerazione in soluzione di CaCl_2 . Rigonfiamento e disfacimento delle fibrille.
18.000 x

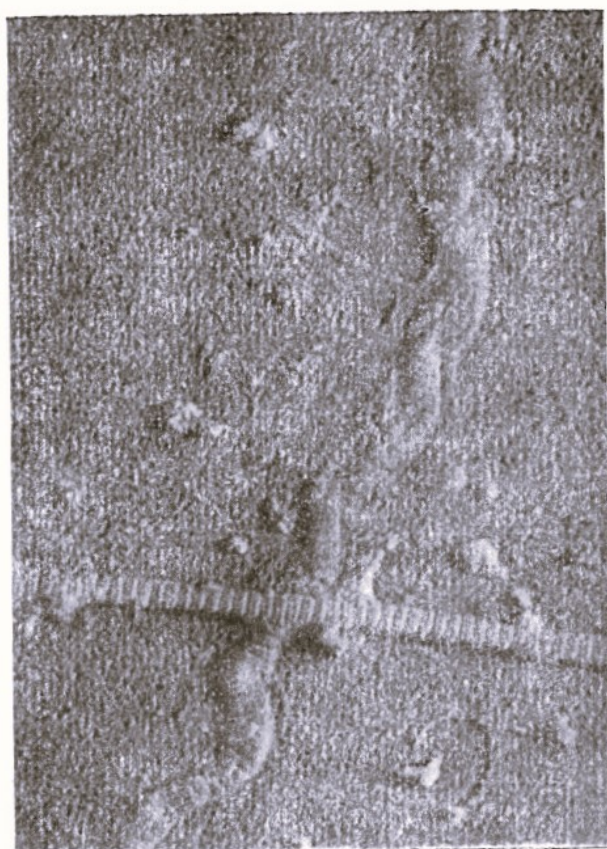


FIG. 6 - Fibrille collagene liofilizzate. Dilacerazione in soluzione di CaCl_2 . Una fibrilla si presenta rigonfiata e ritorta.
18.000 x

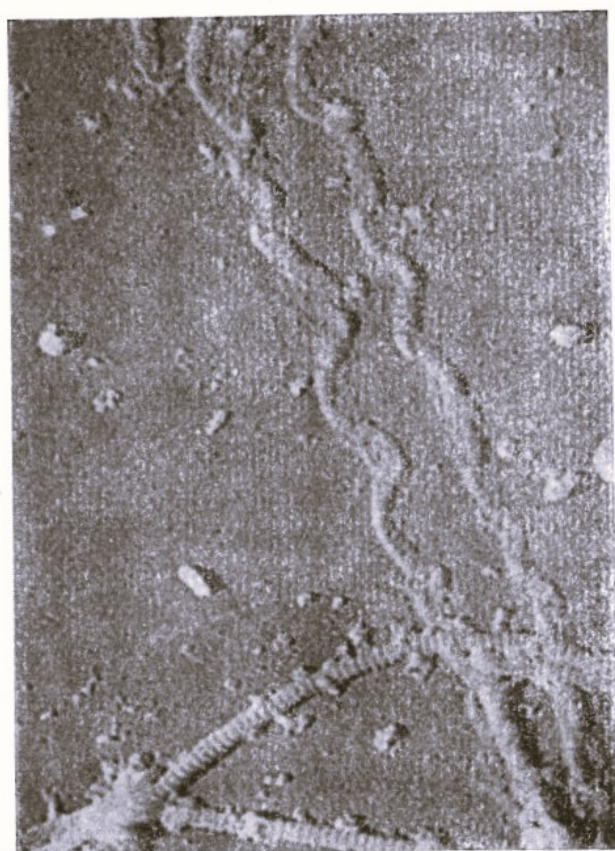


FIG. 7 - Fibrille collagene liofilizzate. Dilacerazione in soluzione di CaCl_2 . Evidente aspetto rigonfiato e ritorto di alcune fibrille.
18.000 x

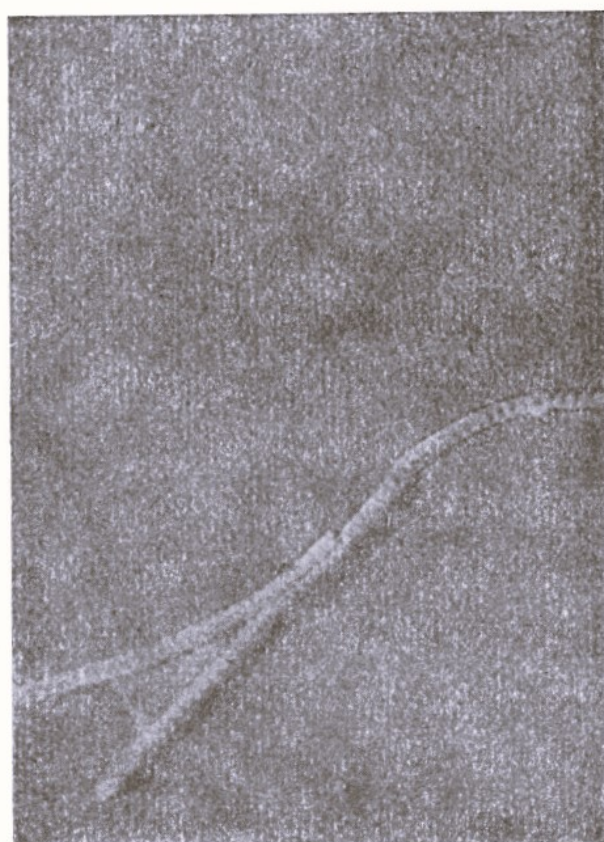


FIG. 8 - Fibrille collagene non liofilizzate. Dilacerazione in soluzione di CaCl_2 .
18.000 x

La struttura periodica trasversale è rimasta invece sempre evidentissima anche nelle fibrille più danneggiate.

Tali alterazioni sono da un punto di vista morfologico molto simili, se non addirittura sovrapponibili con quelle provocate dall'azione delle soluzioni acide (WYCKOFF ⁽¹⁶⁾, LELLI e MAROTTA) ⁽¹⁵⁾.

Sono mancate del tutto nelle fibrille del collagene non liofilizzato di controllo (fig. 8).

Le misurazioni dello spessore di numerose fibrille liofilizzate, ma non rigonfiate e dell'ampiezza del periodo hanno dato dei valori medi, che rientrano del tutto nelle cifre ritenute normali dai diversi AA.

CONCLUSIONI.

Dai rilievi suesposti si può concludere che, almeno secondo le nostre ricerche, la liofilizzazione non provoca nel tessuto collagene cambiamenti di struttura delle fibrille, ma ne modifica il comportamento di fronte a determinati agenti chimici.

Ciò è interessante sotto diversi punti di vista:

1) Interessa in senso generico per una sempre più profonda conoscenza degli effetti della liofilizzazione, ormai così diffusa tanto a fini squisitamente scientifici che industriali e pratici. Basti pensare alle preparazioni di siero umano normale, di frazioni separate del siero, che dopo essiccamento conservano la loro solubilità e la loro attività biologica per oltre un anno, al complemento del siero di cavia, che si conserva bene dopo essiccamento per un certo numero di anni, alla conservazione di enzimi, virus, vaccini da batteri e da virus, alla conservazione di succhi di frutta, nei quali può rimanere inalterato oltre il sapore e l'odore anche il contenuto vitaminico;

2) Interessa in particolare per il problema sperimentale dei trapianti fatti oggi con frammenti di tessuti liofilizzati; e a questo proposito riteniamo di notevole importanza sia la dimostrazione della buona conservazione delle fibre collagene dell'aorta liofilizzata dopo parecchi mesi di conservazione, sia il rilievo della possibilità di sofferenza degli elementi dello stroma arterioso di fronte a determinati agenti chimici.

(15) LELLI e MAROTTA: Rend. Ist. Sup. San. 13, 518, 1950.

(16) WYCKOFF: Electron Microscopy. Interscience N.Y. London 1949.

Questo fatto è degno di ulteriori indagini per accertare se in vivo possano determinarsi fenomeni del genere, sul tessuto innestato.

3) In senso più specifico interessa gli studiosi di microscopia elettronica, che vengono così ad apprendere che la liofilizzazione può essere usata come mezzo di conservazione del collagene, almeno in alcune ricerche.

Roma - Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Clinica Chirurgica.
