

6. G. LELLI e M. L. RESTIVO. — Ricerche al microscopio elettronico sul legamento sospensore del cristallino.

Riassunto. — Gli AA. hanno studiato al microscopio elettronico il tessuto della zonula e confermano in esso una struttura fibrillare. Indicano come componenti fondamentali alcune fibrille di spessore fra 141-175 Å e considerano gli elementi fibrillari più spessi come aggregati di fibrille elementari. Dette fibrille, secondo gli AA., non appartengono per più caratteri al gruppo del collagene.

Summary. — Electron microscopic studies of the zonular tissue have confirmed that it has a fibrilla structure. The basic components appear to be fibrils of 141-175 Å thickness; thicker elements are thought to be aggregates of these. Several features appear to distinguish these basic elements from the collagen group.

PREMESSE.

La struttura del legamento sospensore del cristallino o zonula è stata oggetto di ricerche al microscopio elettronico (M.E.) da parte di vari AA. con risultati non sempre concordi. Per questo motivo, abbiamo ritenuto interessante ed opportuno condurre ulteriori indagini, determinando e discutendo poi le sostanziali differenze esistenti nei diversi reperti ed il loro significato.

Per operare con dati il più possibile numerosi ed omogenei, abbiamo preparato il materiale di studio con il metodo della dilacerazione, che è il più usato dagli AA. che prima di noi si sono occupati dell'argomento. Rare infatti sono, in questo campo, le osservazioni eseguite su materiale incluso in metacrilato e sezionato con l'ultramicrotomo.

RUSKA e SCHWARZ ⁽¹⁾ su materiale proveniente da occhi bovini dilacerato con ultrasuoni hanno descritto fibrille con struttura periodica simile a quella del collagene e con diametro variabile da 500 a 4.000 Å. Il periodo si aggirava su un valore di 770 Å con un contrasto più netto fra i due dischi di quello delle fibrille collagene trattate in maniera analoga. La parte scura del periodo risultò leggermente più larga di quella chiara, lasciando talora intravedere una suddivisione in due sottobande oscure. In qualche fibrilla gli AA. notarono anche una sottile linea tra-

sversale nel mezzo della parte chiara. Alle fibrille descritte aderiva spesso una sostanza amorfa, tendente a coprire la struttura periodica. Tra le fibrille suddette furono visibili agli AA. anche elementi fibrillari più sottili, più o meno stipati, che furono ritenuti appartenere al vitreo.

BINDER e ORTH ⁽²⁾, adoperando occhi umani, hanno confermato nella zonula una struttura a fibre con spessore compreso fra 5.000 e 120.000 Å. Nelle fibre più sottili essi osservarono al M.E. una striatura nel senso della lunghezza, dovuta alla presenza di filamenti con uno spessore di circa 100 Å.

BOKE e LINDNER ⁽³⁾ su frammenti di zonula, provenienti da occhi di cavia, hanno osservato elementi fibrillari con diametro compreso fra 400 e 2.400 Å e con lunghezza minima di 30.000 Å. Detti elementi presentavano una struttura periodica con periodo di 750 Å.

ZANELLA ⁽⁴⁾ su materiale della zonula di occhi bovini osservò al M.E. la presenza di due tipi fondamentali di fibrille. Il primo tipo era formato da elementi con spessore variabile da 300 a 800 Å e con una struttura periodica con periodo compreso fra 500 e 700 Å. Come nelle ricerche di Ruska e Schwarz, la banda scura mostrò spessore maggiore della banda chiara e talora due sottobande. Nel secondo tipo di fibrille egli evidenziò invece elementi più esili con spessore sui 400 Å, variamente intrecciati a formare un reticolo a maglie abbastanza fitte. Detti elementi erano caratterizzati in genere da aspetto irregolare per nodosità distribuite lungo l'asse e da mancanza di struttura periodica. Fu rilevata ed anche descritta una componente amorfa del tessuto, spesso aderente alle fibrille e capace di mascherarne la fine struttura. Secondo Zanella, le fibrille della zonula sarebbero elementi con caratteri morfologici del tutto simili a quelli delle protofibrille del collagene.

TEI YOSHIDA ⁽⁵⁾ effettuò ricerche sulla zonula di coniglio, bue ed uomo. Egli illustra le sue osservazioni con un'ampia documentazione fotografica, in cui si vedono riprodotte fra l'altro caratteristiche formazioni a spirale, spesso con aspetto a cavaturaccioli, alcune rivestite da sostanza membranosa e con estremità generalmente nette. I più caratteristici di questi elementi furono osservati nel coniglio. Secondo l'A., l'ampiezza della spirale oscilla fra 2.080 e 5.000 Å, mentre la lunghezza sarebbe sugli 84.000 Å nel coniglio e nel bue e sui 130.000 Å nell'uomo. Nella zonula di coniglio Tei Yoshida osservò anche elementi fibrillari più sottili e senza struttura a spirale. L'A. ritiene che le formazioni a spirale osservate facciano parte degli elementi caratteristici che costituiscono la zonula.

MATERIALE E METODI

Le nostre ricerche sono state condotte su 20 occhi di bue, prelevati subito dopo la mattazione, adoperati senza alcun trattamento fissativo.

La zonula è stata separata con la tecnica seguente:

1) asportazione totale della cornea (taglio con Graefe completato con forbici);

2) asportazione dell'iride (con forbice di De Wekers);

3) tagli in senso meridiano della sclera, partendo dal margine sclerocorneale fino all'equatore del bulbo oculare ed asportazione dei lembi sclerali compresi fra i tagli;

4) incisione circolare della zonula alla sua inserzione nei corpi ciliari con forbici di De Wekers, introducendo la branca posteriore fra la jaloide e l'inserzione ciliare della zonula, sotto lavaggio per allontanare il pigmento uveale;

5) asportazione del cristallino con la corona zonulare e lavaggio ripetuto in acqua distillata per ottenere un ulteriore allontanamento del pigmento uveale eventualmente residuo;

6) recisione della zonula alla sua inserzione nella capsula del cristallino.

I frammenti di zonula sono stati quindi sottoposti alla dilacerazione. Per ottenere la migliore separazione degli elementi componenti il tessuto e l'allontanamento di eventuale sostanza cementante, abbiamo eseguito la dilacerazione in soluzione di ialuronidasi ed in acqua bidistillata a 60°C.

Nel metodo con la ialuronidasi (Jalovis Vister) il materiale rimane per circa 24 ore a contatto con la soluzione dell'enzima, ove subisce periodiche dilacerazioni mediante aghi metallici. Successivamente passa in acqua bidistillata a 50°C. Qui rimane un tempo complessivo di 30 minuti primi, durante il quale viene sottoposto ad ulteriori dilacerazioni e ripetuti lavaggi.

Con l'altro metodo invece i frammenti, appena asportati dall'occhio, sono dilacerati in acqua bidistillata a 60°C con la quale subiscono anche dei successivi lavaggi per un tempo complessivo di 30 minuti primi.

Il trasferimento del materiale da esaminare sui portaoggetti del M.E. è stato ottenuto o col contatto dei frammenti dilacerati alla super-

fice dei portaoggetti stessi, o con la deposizione su di essi di piccole ansate del liquido di lavaggio. A questo punto parte del materiale in esame è stato sottoposto ad ombraggio metallico nel vuoto e parte invece esaminato direttamente.

OSSERVAZIONI

All'osservazione con il M.E. abbiamo rilevato la esistenza di elementi fibrillari generalmente molto sottili (fig. 1) forniti di una struttura periodica caratterizzata dall'alternarsi di un segmento scuro e compatto con uno chiaro e trasparente. Detta struttura conferisce alle fibrille più esili l'aspetto a fine corona di rosario.

Le fibrille sono talora risultate disordinatamente disposte, talora invece addossate le une alle altre a formare elementi filamentosi più spessi, ma con identica struttura periodica, dato il modo di aggruppamento delle fibrille « elementari » in perfetta concordanza di fase (figura 2). Interessante è il fatto che tutti gli elementi fibrillari più spessi si sono rivelati, nei nostri campi di osservazione, come aggregati di più fibrille elementari (figg. 3 e 4).

Mediante un microscopio comparatore abbiamo misurato su materiale non ombrato, lo spessore delle fibrille e l'ampiezza del loro periodo. Lo spessore è risultato pressochè costante con oscillazioni minime fra 144 e 175 Å, mentre il periodo ha mostrato differenze più marcate con oscillazioni da un minimo di 308 ad un massimo di 433 Å. Diversa è risultata l'altezza del segmento chiaro e di quello scuro del periodo secondo il rapporto da 1 a 2.

Addossata alle fibrille in quantità varia è stata talora osservata una sostanza amorfa di tipo cementante, tendente a nascondere la struttura periodica (figg. 5 e 6). Ciò è stato particolarmente evidente nelle preparazioni del tessuto con semplice dilacerazione e lavaggio in acqua bidistillata a temperatura ambiente.

COMMENTO AI REPERTI

Nelle nostre ricerche, come pure nella maggior parte di quelle dei precedenti AA., la zonula ha mostrato presenza di elementi fibrillari con struttura periodica. I rilievi però da noi ottenuti con la misurazione del-

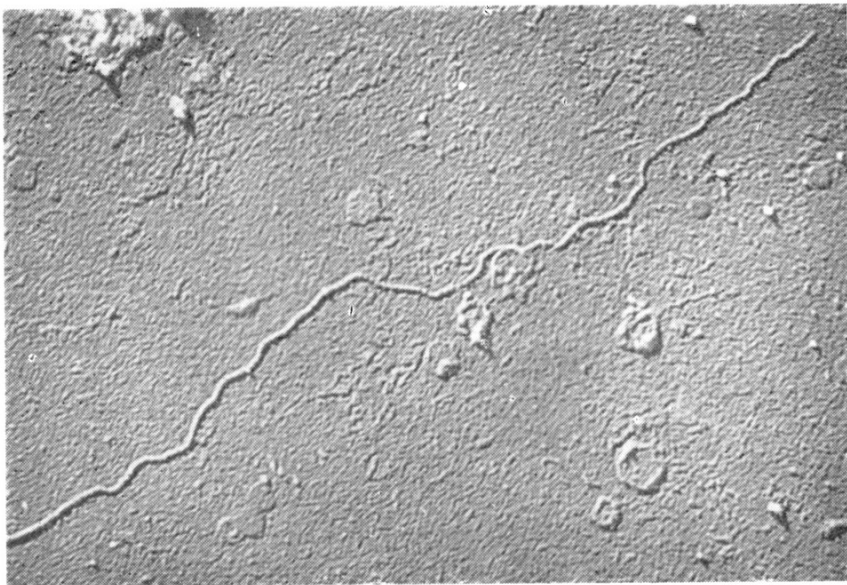


Fig. 1 — Fibrilla del tessuto della zonula. Trattamento con ialuronidasi - 12.000 x.

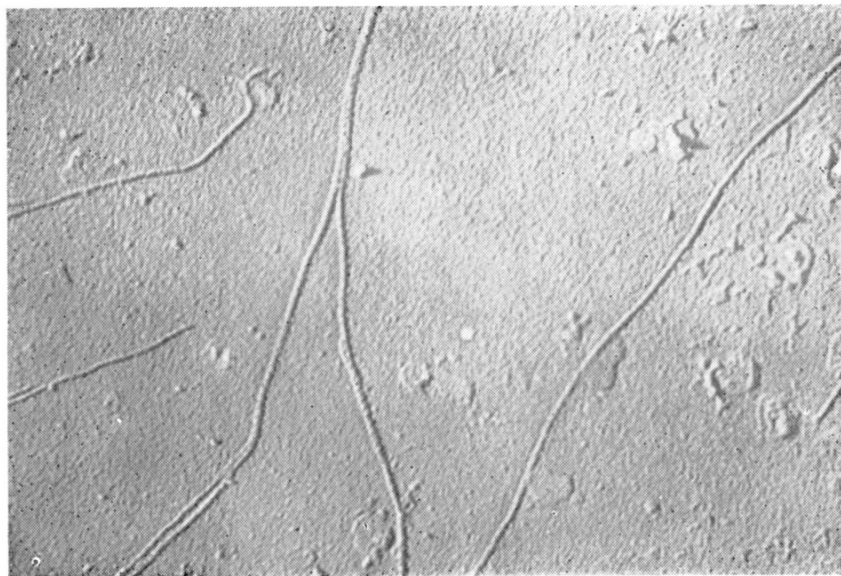


Fig. 2 — Fibrille del tessuto della zonula. Trattamento con ialuronidasi. Fibrille « elementari » spesso addensate a formare elementi fibrillari di maggiore spessore - 12.000 x.

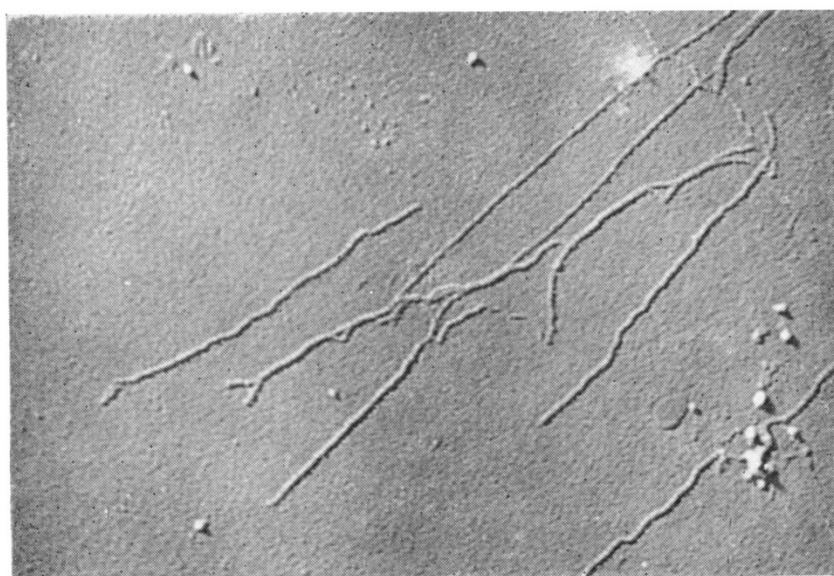


Fig. 3 — Fibrille del tessuto della zonula. Trattamento con ialuronidasi. Fibrille «elementari» spesso addensate a formare elementi fibrillari di maggiore spessore - 12.000 x.

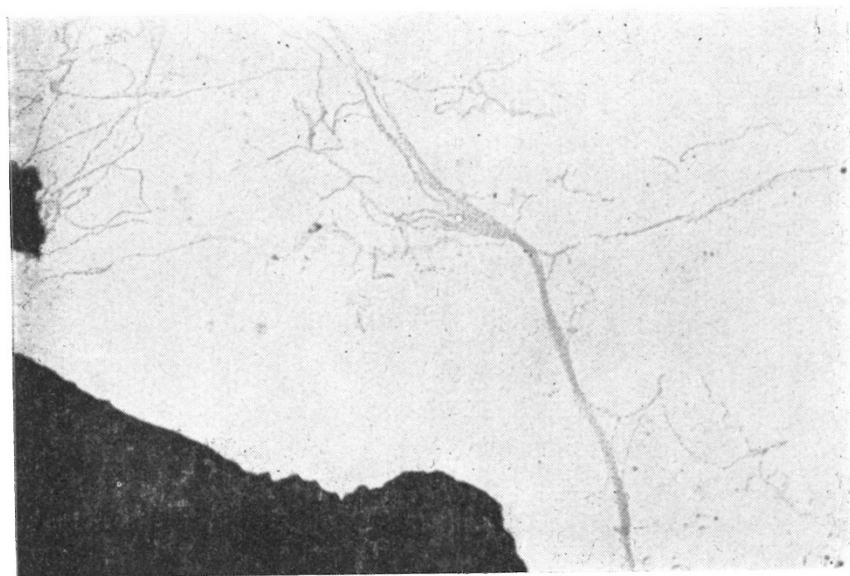


Fig. 4 — Tessuto della zonula. Trattamento con acqua bidistillata a 60°C. Elementi fibrillari composti da aggregati di fibrille «elementari» in vario numero - 12.000 x.

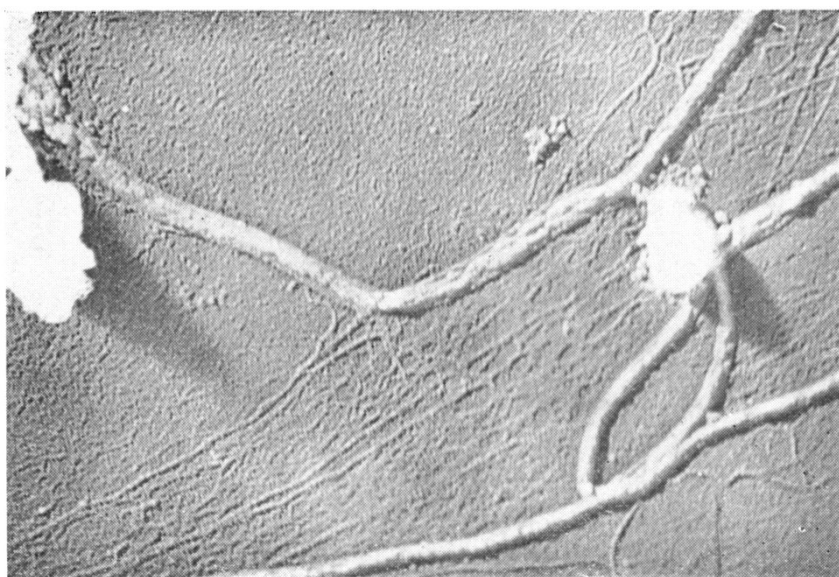


Fig. 5 — Tessuto della zonula. Evidente la sostanza cementante che rende spesso indistinte le fibrille e la loro struttura periodica - 12.000 x.

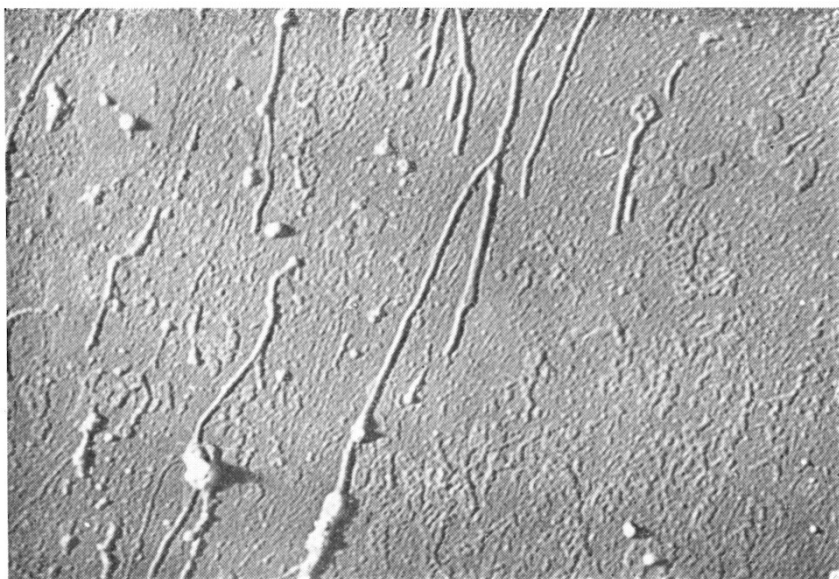


Fig. 6 — Tessuto della zonula. Evidente la sostanza cementante che rende spesso indistinte le fibrille e la loro struttura periodica - 12.000 x.

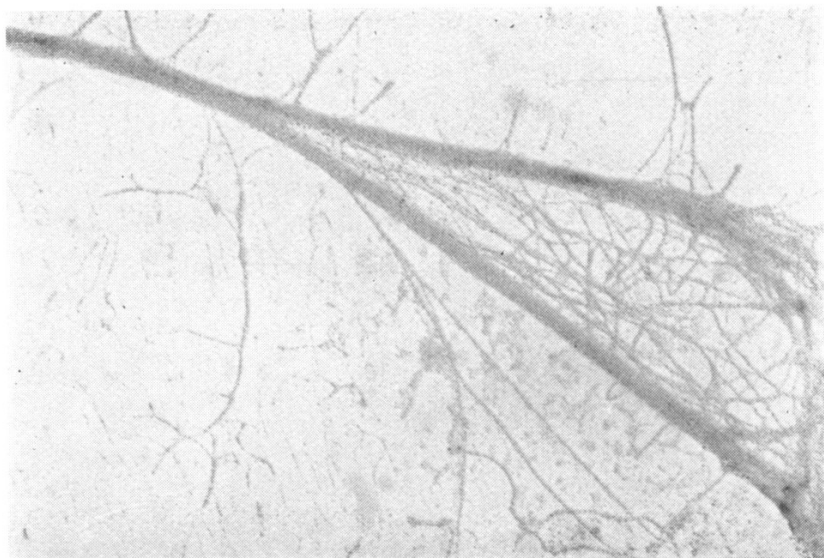


Fig. 7 — Tessuto della zonula. Trattamento con acqua bidistillata a 60°C. Elementi fibrillari composti da aggregati di fibrille «elementari» in vario numero - 12.000 x.

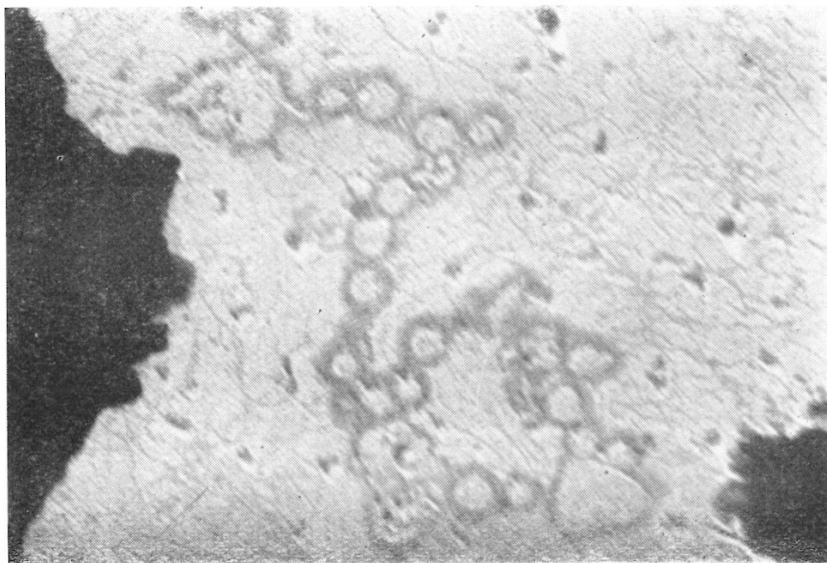


Fig. 8 — Tessuto della zonula. Fibrille con aspetto «a catenella» - 12.000 x.

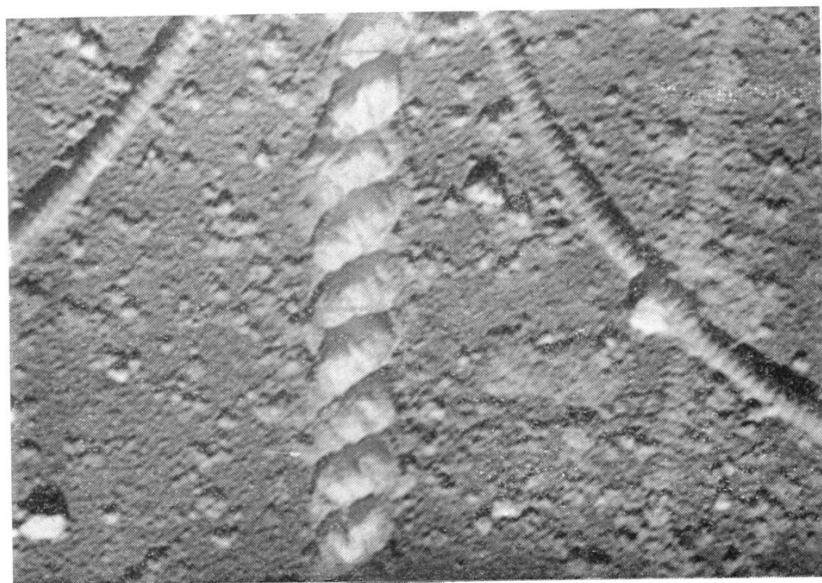


Fig. 9 — Formazione con struttura a spirale. Tessuto di nodulo sclero-jalino dell'ovaio - 18.000 x.

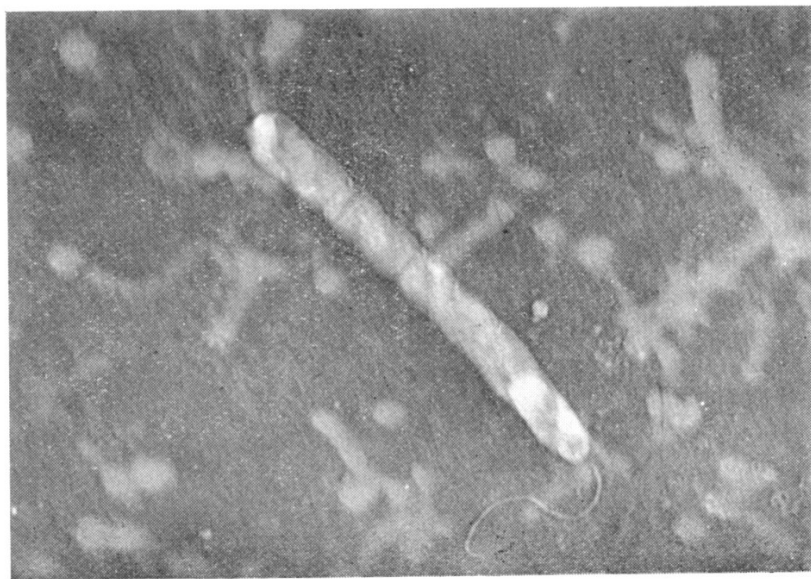


Fig. 10 — Formazione a spirale con un estremo fornito di ciglia. Tessuto di placca tendinea dell'epicardio - 9.000 x.

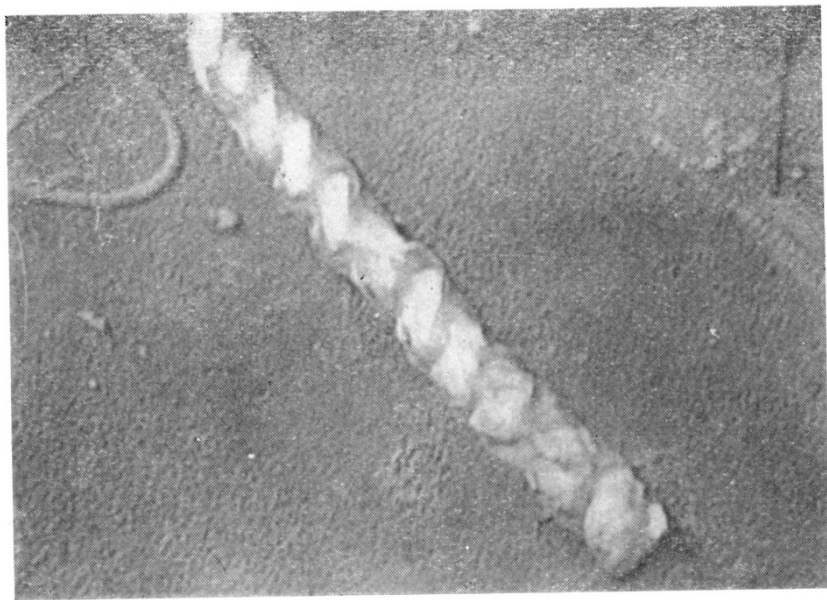


Fig. 11 — Estremità tronca di una delle formazioni a spirale. Tessuto di placca sclero-jalina della capsula della milza - 18.000 x.

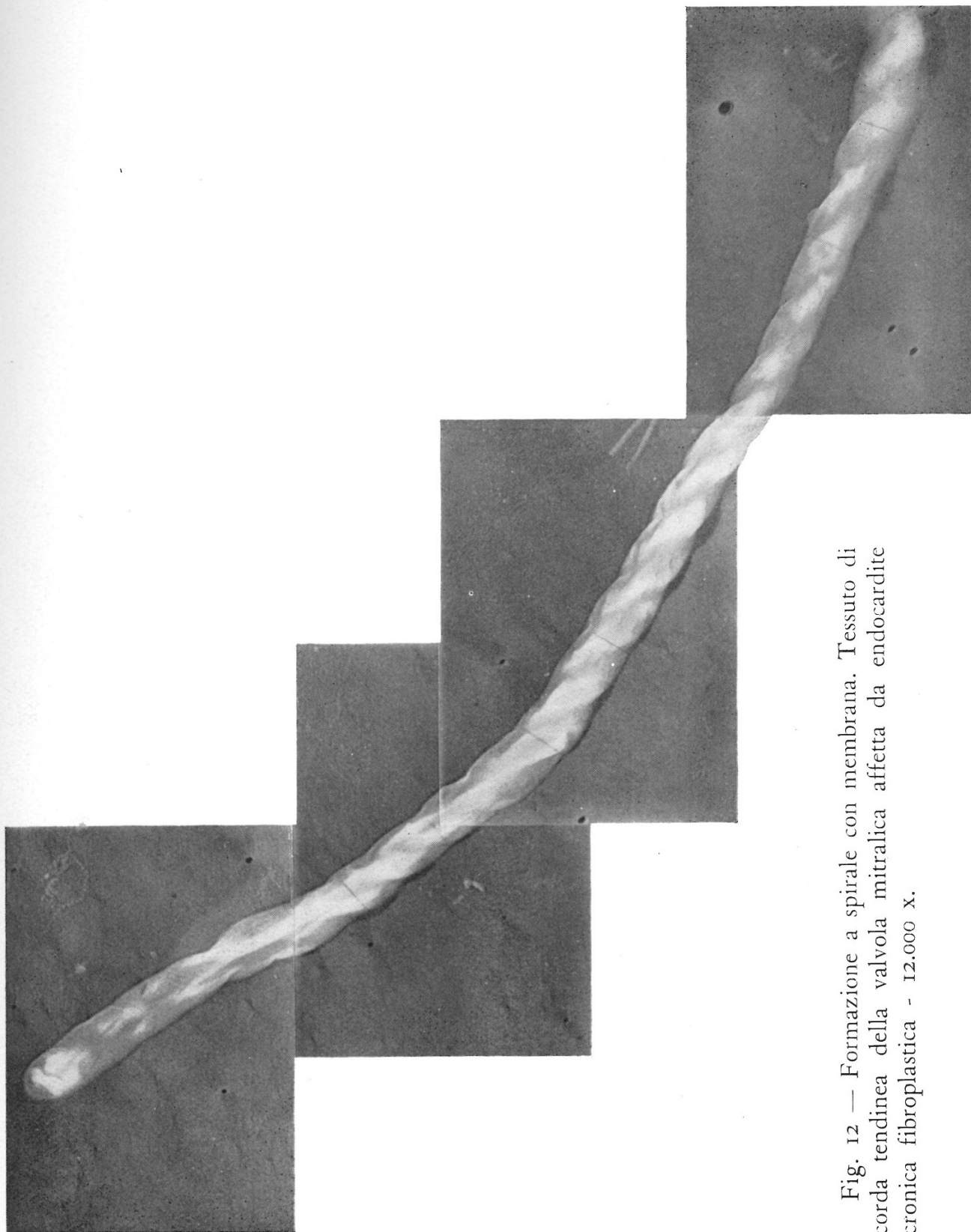


Fig. 12 — Formazione a spirale con membrana. Tessuto di corda tendinea della valvola mitralica affetta da endocardite cronica fibroplastica - 12.000 x.

le fibrille non concordano con quelli già noti, e ne sono anzi alquanto discordanti come può rilevarsi dalla seguente Tabella riassuntiva:

Spessore delle fibrille zonulari secondo i vari AA.				
Autori	M a t e r i a l e			
	bue	cavia	coniglio	uomo
RUSCKA e SCHWARZ	500-4000 Å			
BINDER e ORTH				5000-120000 Å
BORE e LINDNER		2000-4000 Å		
ZANELLA	300-800 Å			
TEI YOSHIDA	400-6600 Å		300-6660 Å	1660-2910 Å
LELLI e RESTIVO	141-175 Å			

Le differenze di spessore fra le fibrille non sono riportabili alle varie specie zoologiche da cui proviene il materiale esaminato, dato che esse esistono anche nelle osservazioni fatte dagli AA. su occhi dello stesso tipo. Si è pertanto condotti a pensare alla possibilità di un diverso effetto dei metodi usati nella dilacerazione del tessuto per spiegare le differenze riscontrate. L'azione della ialuronidasi e della temperatura a 60°C potrebbero avere infatti determinato nella zonula, a somiglianza di quanto avviene nel collagene, la rimozione della sostanza cementante e la liberazione delle fibrille elementari con gli spessori minimi da noi registrati.

Con i nostri rilievi concordano in parte BINDER e ORTH ⁽²⁾, rilevando in alcuni degli elementi fibrillari, presenti nella zonula umana, una striatura longitudinale dovuta a filamenti orientati nel senso della lunghezza e con uno spessore di circa 100 Å, di poco inferiore quindi a quello delle fibrille da noi osservate nella zonula dell'occhio di bue.

Ulteriori indagini potranno meglio stabilire se i veri componenti la zonula siano soltanto le fibrille elementari presenti nelle nostre immagini ed intraviste in precedenza da BINDER e ORTH ⁽²⁾. Se questo potrà

essere confermato, tutti gli elementi di maggiore spessore passeranno come semplici aggregati delle fibrille elementari, così come è costantemente apparso nelle nostre osservazioni.

Era logico però pensare se gli elementi fibrillari da noi osservati potessero appartenere al vitreo anzichè alla zonula, come già alcuni avevano opinato di fronte agli elementi più sottili presenti nel tessuto zonulare. Però l'accurata tecnica del prelievo e l'assenza nei nostri preparati di elementi fibrillari più spessi, ad eccezione degli aggregati fibrillari sempre come tali facilmente riconoscibili (fig. 7), ci fanno pertanto escludere questa possibilità.

La efficacia della ialuronidasi e della temperatura di 60°C per liberare le fibrille dal materiale amorfo avvicina il tessuto della zonula a quello collagene, in cui i due trattamenti furono già favorevolmente usati da LELLI e coll. (6). Riteniamo però che l'affinità risieda nella sostanza cementante più che nelle fibrille.

Infatti, le fibrille collagene risentono sfavorevolmente l'azione del calore a 60°C ed a questa temperatura mostrano già al M.E., le prime alterazioni che indicano l'inizio della trasformazione del tessuto in gelatina [G. LELLI (7)]. Nella fibrilla cominciano a presentarsi caratteristiche zone rigonfiate o « fuse », ove scompare del tutto la struttura periodica e si ha talora anche una perdita di tono delle fibrille stesse.

Negli elementi della zonula invece solo una volta abbiamo avuto occasione di riscontrare immagini « a catenella » (fig. 8), imputabili a perdita di tono delle fibrille medesime, forse in rapporto al trattamento termico subito. Mai abbiamo riscontrato elementi parzialmente o totalmente « fusi » come nel collagene.

D'altra parte, anche la incostante ampiezza del periodo da noi rilevata nelle fibrille zonulari differenzia queste dagli elementi del collagene, dove è riconosciuta universalmente un'ampiezza di periodo costante intorno a 640 Å.

La conoscenza che anche le fibrille collagene sarebbero formate da elementi filamentosi più sottili, di spessore da 50 a 100 Å con struttura periodica e disposti in perfetta concordanza di fase, suggerisce un'altra considerazione. Nelle preparazioni del collagene, operate anche con ialuronidasi e calore, questi elementi fibrillari sottilissimi non sono quasi mai reperibili e ciò fa pensare che in questo tessuto debba esistere anche uno stato di ben più tenace aggregazione degli elementi in confronto al tessuto della zonula, ove le fibrille elementari tendono, almeno come risulta nelle nostre ricerche, a separarsi facilmente fra loro per apparire isolate nei fotogrammi.

Gli elementi descritti da TEI YOSHIDA ⁽⁵⁾ non sono, secondo il nostro parere, da considerare appartenenti alla zonula, bensí a strutture completamente a parte.

Elementi più o meno identici a quelli di TEI YOSHIDA ⁽⁵⁾ sono stati infatti da noi osservati più volte su materiale di varia provenienza. Su frammenti di corpo albicante dell'ovaio, di corda tendinea di valvola mitralica affetta da endocardite cronica fibroplastica, di placca sclerojalina della capsula della milza, di focolaio sclerojalino dell'ovaio, di placca tendinea epicardica, di placca sclerotica non jalina della milza, di connettivo di fegato cirrotico, di aderenza fibrosa della milza, abbiamo osservato casualmente, oltre agli elementi fibrillari caratteristici del connettivo, la esistenza di formazioni a bastoncello, di varia grandezza, nelle quali esisteva una caratteristica struttura a spirale che richiama l'aspetto di un grosso canapo (fig. 9). Questi elementi di lunghezza varia presentano in genere la caratteristica di avere un estremo assottigliato e fornito di uno o due filamenti a forma di ciglia (fig. 10) e l'altro estremo tronco (fig. 11). In taluni di questi elementi è ben riconoscibile una specie di membrana, che ricopre la struttura spiralforme sopradescritta (fig. 12). Detti elementi hanno in genere una larghezza variabile fra 7220 e 3880 Å ed una lunghezza compresa fra un minimo di 33.300 Å ed un massimo di 161.000 Å. La spirale ci ha rivelato variabilità di ampiezza piuttosto notevoli ed oscillanti fra un minimo di 3.880 Å ed un massimo di 18.800 Å.

Il riscontro di tali formazioni su tessuto connettivo fibroso, spesso jalino, aveva fatto supporre all'inizio che esse potessero essere interpretate come elementi caratteristici di questo tipo di tessuto.

Ricerche bibliografiche condotte in proposito ci hanno dissuaso da tale supposizione. Le strutture da noi rilevate sono, infatti, identiche a quelle descritte da BAILLI ⁽⁸⁾, da RUSCKA ⁽⁹⁾, da HOUWINK ⁽¹⁰⁾ e da WIGAND e PETERS ⁽¹¹⁾.

Dette formazioni spiralforme sono state riscontrate dai suddetti Autori sui più vari materiali sia biologici che mineralogici. WIGAND e PETERS ⁽¹¹⁾ ritengono trattarsi di microrganismi provenienti dall'aria e che, pertanto, non hanno nessun rapporto con il materiale di studio al M.E. Questa idea è condivisa da DENUES ⁽¹²⁾ e sottoscritta anche da noi pure se non è stato mai possibile la cultura di questi cosiddetti germi tentata su terreni vari (agar, sangue, ecc.).

POLLI ⁽¹³⁾ riscontrò elementi dello stesso tipo all'osservazione elettronica di estratti di nuclei di leucociti umani normali e leucemici ed interpretò, secondo noi erroneamente, tali formazioni come cromosomi.

Premesso che, per addivenire ad una esatta conoscenza dell'ultrastruttura della zonula, dovranno essere condotte ulteriori ricerche, specialmente con i metodi di preparazione del materiale per inclusione in resine, tuttavia da quanto sopra riportato e discusso è possibile formulare le seguenti

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE:

1) Le nostre ricerche confermano la struttura fibrillare del tessuto della zonula con presenza di elementi forniti in genere di struttura periodica;

2) Gli elementi fibrillari da noi repertati ed indicati come « fibrille elementari » sono alquanto più sottili di quelli descritti dai precedenti AA., elementi che potrebbero rappresentare aggregati di fibrille elementari riunite fra loro in perfetta concordanza di fase;

3) Le cosiddette « fibrille elementari » della zonula, mentre si avvicinano per qualche carattere alle « fibrille collagene », se ne differenziano per altri come per la minore e non costante ampiezza del periodo, per il comportamento di fronte al calore e probabilmente per una minore capacità di coesione fra gli elementi stessi;

4) Gli elementi spiraliformi descritti da TEI YOSHIDA ⁽⁵⁾ non fanno parte dei componenti la zonula.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

Roma - Ospedale di San Giovanni - Laboratorio Istopatologico e Reparto Oculistico.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RUSKA H. e SCHWARZ W. - Z. wiss. Mikr., 60: 181 (1951).
- (²) BINDER R. e ORTH - Graefes Arch., 154: 266 (1953).
- (³) BOKE W. e LINDNER E. - Graefes Arch., 157 (1955).
- (⁴) ZANELLA E. - Ateneo parmense, 27: 303 (1956).
- (⁵) TEI YOSHIDA - Jap. J. of Ophthalmol., 3: 177 (1959).
- (⁶) LELLI G. e MAROTTA U. - Z. wiss. Mikr., 60: 361 (1952).
- (⁷) LELLI G. - Giornata Med. V. 397 (1952).
- (⁸) BAILLI - Citato da Wigand e Peters.
- (⁹) RUSKA H. - Citato da Wigand e Peters.
- (¹⁰) HOUWINK - Citato da Wigand e Peters.
- (¹¹) WIGAND R. e PETERS D. - Z. wiss. Mikr., 60: 403 (1952).
- (¹²) DENUES - Biochim. biophys. Acta., 10: 223 (1953).
- (¹³) POLLI E. E. - Biochim. biophys. Acta., 10: 215 (1953).