11. D. GIGANTE, U. MAROTTA e N. TOMASSINI. — **Osservazioni al microscopio elettronico di linfonodi in condizioni normali e patologiche (leucemia linfoide cronica, granuloma maligno e linfosarcoma).**

Riassunto. — E' stata studiata al microscopio elettronico, in sezioni ultrasottili, la struttura cellulare di linfonodi umani normali e di leucemia linfoide cronica, di granuloma maligno e di linfosarcoma.

Vengono descritti e commentati gli aspetti morfologici delle cellule linfatiche normali e le alterazioni che presentano nelle condizioni morbose prese in esame.

In particolare sono riferite le caratteristiche ultrastrutturali delle cellule pre-Sternberg e giganti di Sternberg e di quelle linfosarcomatose.

Summary. — Lymph nodes from the normal man and from cases of chronic lymphoid leukaemia, malign granuloma and lymphosarcoma have been studied in ultra-thin sections under the electron microscope.

The morphology of normal lymphatic cells and the changes which they show under pathological conditions are described and discussed. Particular attention is given to the ultra-structure of pre-Sternberg and giant Sternberg cells and to lymphosarcomatose cells.

La struttura dei tessuti linfatici, ormai ampiamente indagata coi metodi istologici, è stata esplorata in questi ultimi anni su preparati per sfrisciamento e apposizione con le metodiche citologiche, che ne hanno consentito lo studio a livello cellulare. Pochi sono però ancora i contributi sull'ultrastruttura di questi elementi, come si può osservare al microscopio elettronico in sezioni ultrasottili. Questa tecnica può infatti consentire un preciso rilievo della struttura del nucleo e del citoplasma ed è quindi in grado di accertare le fini alterazioni indotte dai vari processi morbosi.

Ci siamo quindi proposti di indagare con il microscopio elettronico i linfonodi umani normali, e, mantenendo costante la metodica delle sezioni ultrasottili, quelli affetti da leucemia linfoide cronica, da granuloma maligno e da linfosarcoma.

Abbiamo scelto queste tre malattie, fra quelle che più frequentemente interessano il tessuto linfatico, poichè per le loro ben note caratteristiche citologiche, ci sono sembrate meglio rispondenti allo studio di altera-

zioni ultrastrutturali, e alla definizione di tipi diversi di patologia cellulare.

I linfonodi sono stati in parallelo studiati sia con i metodi classici della istologia che, da un punto di vista citologico, nei preparati per apposizione, al fine di selezionare il materiale da esaminare e di stabilire le caratteristiche morfologiche delle cellule da esplorare.

Le nostre ricerche sono state in particolare rivolte allo studio dell'ultrastruttura degli elementi istiocitari e di quelli della serie linfatica, distinti, a seconda dei successivi stadi evolutivi, in istiociti indifferenziati e in orientamento linfatico, in linfoblasti e in grandi e piccoli linfociti. In condizioni patologiche abbiamo quindi indagato sulle cellule di Sternberg e su quelle linfosarcomatose.

MATERIALE E TECNICA

Abbiamo preso in esame frammenti prelevati da zone diverse di linfonodi normali e di malati di leucemia linfoide cronica, di granuloma maligno e di linfosarcoma.

Il materiale è stato accuratamente selezionato, scegliendo quello che meglio si prestava a fornire i quadri caratteristici del processo da esaminare, e proveniva da soggetti operati di appendicopatia cronica (linfogangli mesenterici di aspetto normale, prelevati lontano dal focolaio flogistico) e da malati di leucemia linfoide cronica (linfonodi latero-cervicali e in un caso dell'ilo splenico), di granuloma maligno (linfonodi latero-cervicali), di linfosarcoma (linfonodi latero-cervicali ed ascellari).

Frammenti di linfonodo, immediatamente dopo il prelevamento per biopsia, venivano fissati per 4 ore una parte in soluzione tampone di Palade (pH 7,2 e 0,11 M) [1] e una parte in soluzione tampone di Sjöstrand (pH 7,2 e 0,35 M) [2] contenenti O_s O_4 2%.

La disidratazione dei preparati si eseguiva nella serie di alcooli a concentrazione crescente, partendo dal 30% fino all'assoluto.

Dopo un ultimo passaggio in acetone puro, i preparati erano inclusi in resine acriliche, che venivano fatte polimerizzare in stufa a 50° C.

Le sezioni venivano allestite con l'ultramicrotomo Porter Blum, e quindi raccolte su reticelle ricoperte di formvar.

L'osservazione si compiva mediante microscopio elettronico Siemens E_1.

RISULTATI

Linfonodi normali.

Con la microscopia elettronica, in accordo con le osservazioni di Bernhard e Granboulan ([3]), nelle sezioni ultrasottili di linfonodi normali (fig. 1) abbiamo osservato elementi cellulari che per le caratteristiche morfologiche si potevano identificare come cellule istiocitarie indifferenziate e in evoluzione verso la linea linfatica (istiociti linfatici), linfoblasti e grandi e piccoli linfociti, distribuiti con frequenza molto diversa, a seconda dello stadio evolutivo, che è apparso chiaramente svolgersi secondo il suddetto ordine.

Prima di trattare delle cellule patologiche presenti nei linfonodi dei vari processi morbosi presi in esame, ci sembra opportuno riferire brevemente le principali caratteristiche dell'ultrastruttura degli elementi normali.

Le cellule istiocitarie, di forma più spesso allungata, appaiono voluminose e a limiti poco netti. Il nucleo, multiforme, è definito da una doppia membrana, e presenta un nucleoplasma a scarsa e tenue densità elettronica, raccolto talvolta in piccoli ammassi. Il nucleolo, più o meno grande, è formato d'un ammasso piuttosto compatto di granuli molto osmiofili. Il citoplasma, relativamente abbondante, è ricco di granuli di Palade e di un esteso reticolo endoplasmico: sono presenti anche alcuni mitocondri, di aspetto rigonfio, privi quasi completamente di creste, come si riscontra in cellule embrionali di molti tessuti.

Gli istiociti, quando evolvono in senso linfatico, diminuiscono di grandezza e acquistano una forma sempre più rotondeggiante e a limiti netti, il nucleo anch'esso rotondo, grande, si presenta a cromatina ancora poco abbondante, ma a struttura già più densa, e costituita da fini granuli distribuiti in maniera uniforme e omogenea. Il nucleolo, disposto al centro, è di grandi dimensioni e piuttosto compatto. Il citoplasma appare meno esteso e più povero di granuli di Palade e di reticolo endoplasmico. I mitocondri sono meno rigonfi, e le creste si fanno visibili.

Attraverso queste forme di transizione si arriva al linfoblasto (fig. 2), che appare come una cellula rotondeggiante, a limiti netti, con nucleo voluminoso, centrale, rotondo o ovale, contornato da citoplasma relativamente scarso. Vi è un nucleolo più spesso unico e grande. Il nucleoplasma, a distribuzione omogenea, è divenuto più denso, mentre il citoplasma si conserva tenue. Il reticolo endoplasmico lamellare è molto ridotto o addirittura assente e invece piuttosto numerosi sono i granuli di Palade, sparsi irregolarmente, od anche ammassati in tutto il cito-

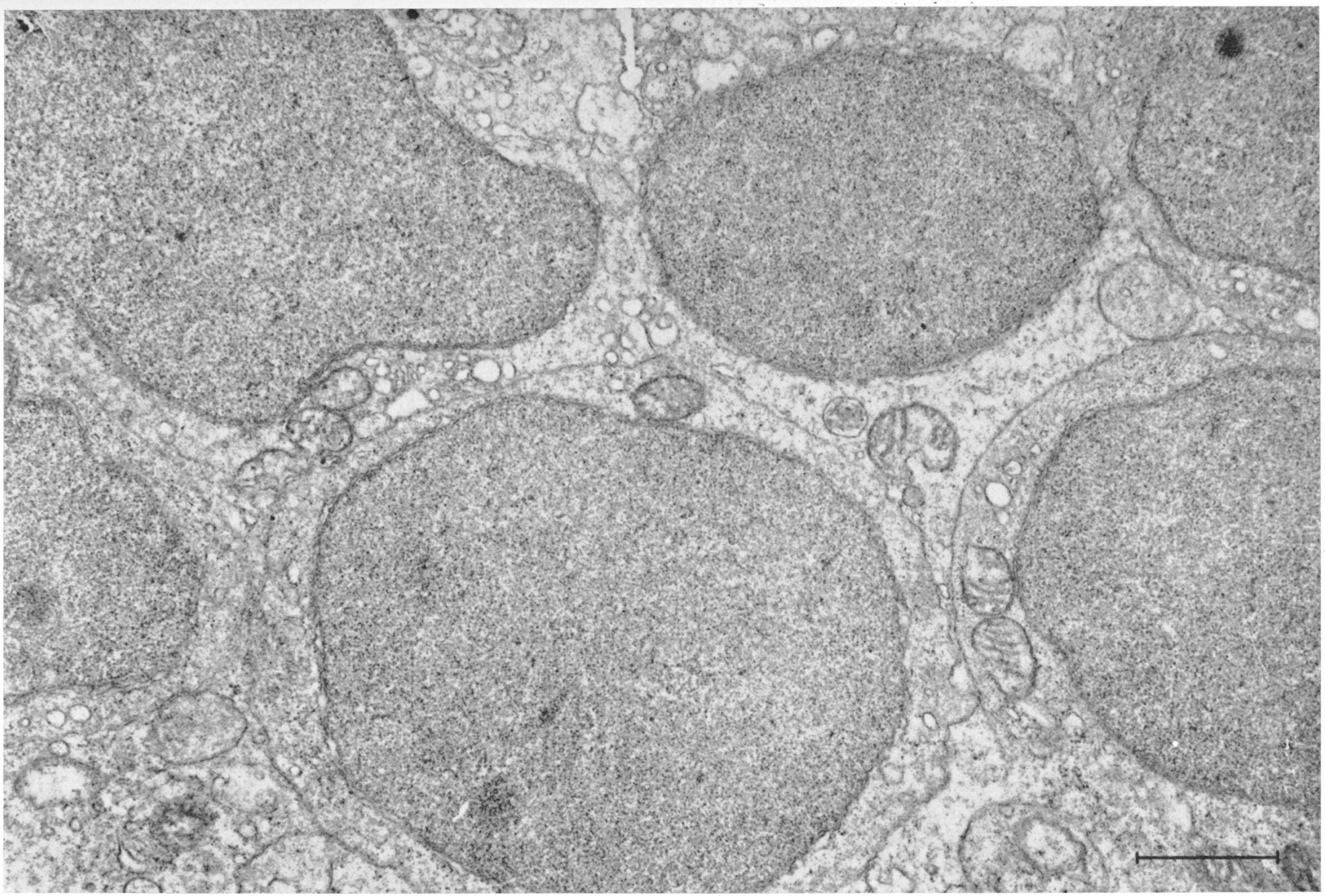


Fig. 1 — Nella sezione ultrasottile di *linfonodo normale* sono presenti cellule linfatiche, fra le quali si riconosce un linfoblasto, un grande linfocito e un piccolo linfocito (x 20.000).

Fig. 2 — *Linfoblasto normale*: si osserva nel nucleo una struttura cromatinica che tende a divenire omogenea e nel citoplasma, di debole densità, mitocondri, scarso reticolo endoplasmico, numerosi granuli di Palade (x 18.000).

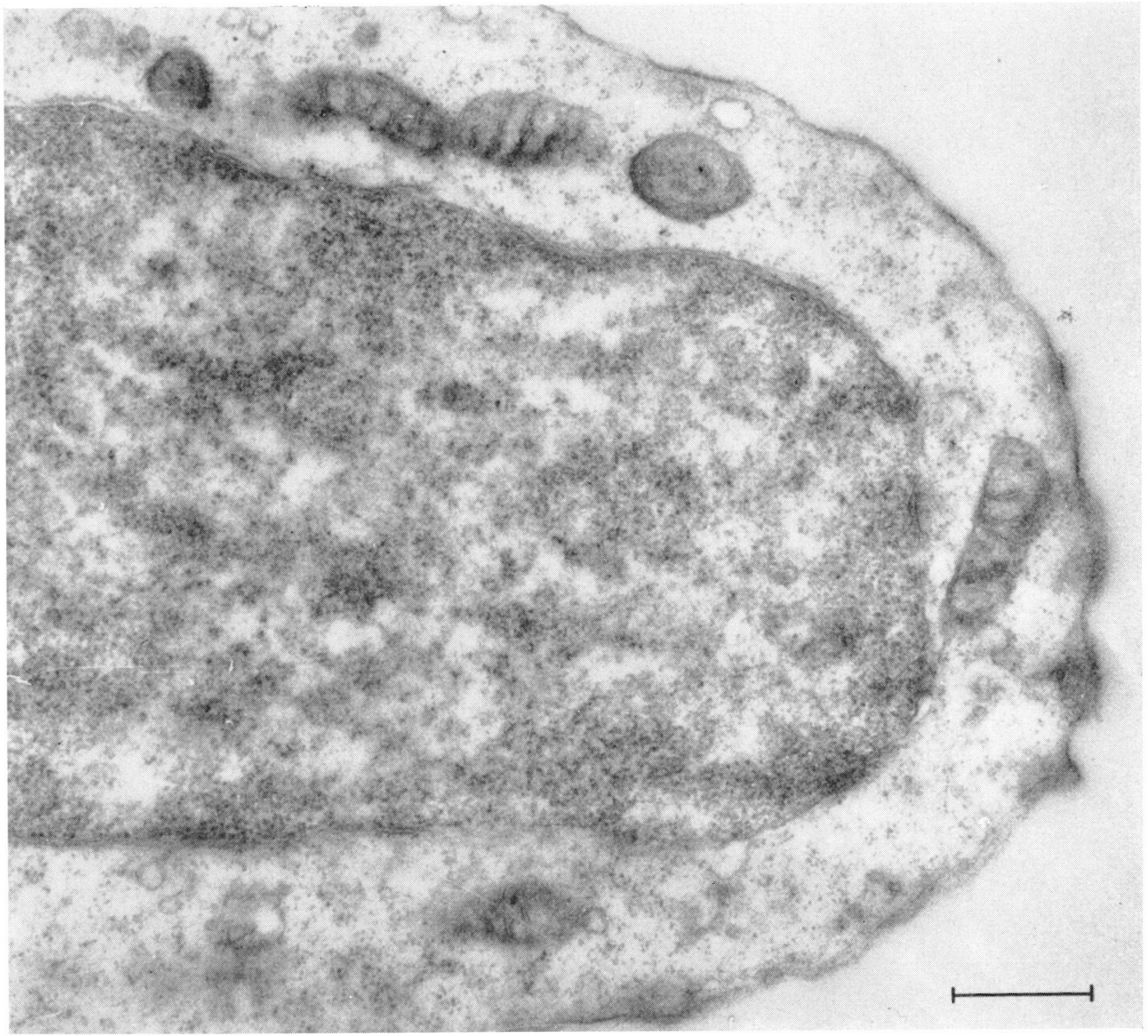


Fig. 2

Fig. 3 — *Grande linfocito normale*: si nota nucleo a cromatina omogena, nucleolo piccolo, citoplasma tenue, con un mitocondrio, alcune vescicole ergastoplasmiche e granuli di Palade (x 20.000).

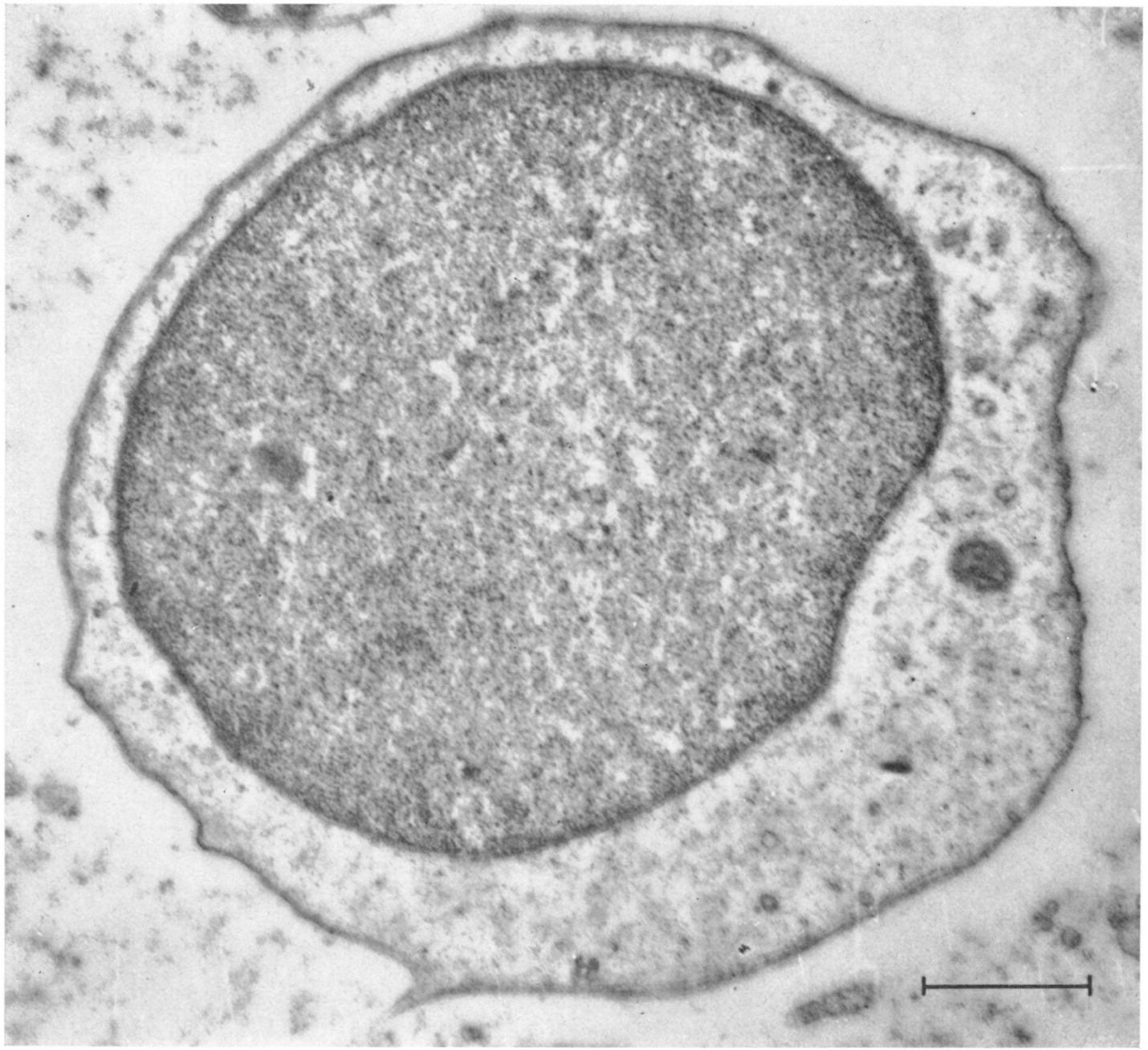


Fig. 3

Fig. 4 — Nella sezione ultrasottile di *linfonodo di leucemia linfoide cronica* si osserva campo di cellule linfatiche a morfologia normale o con lievi alterazioni (x 8000).

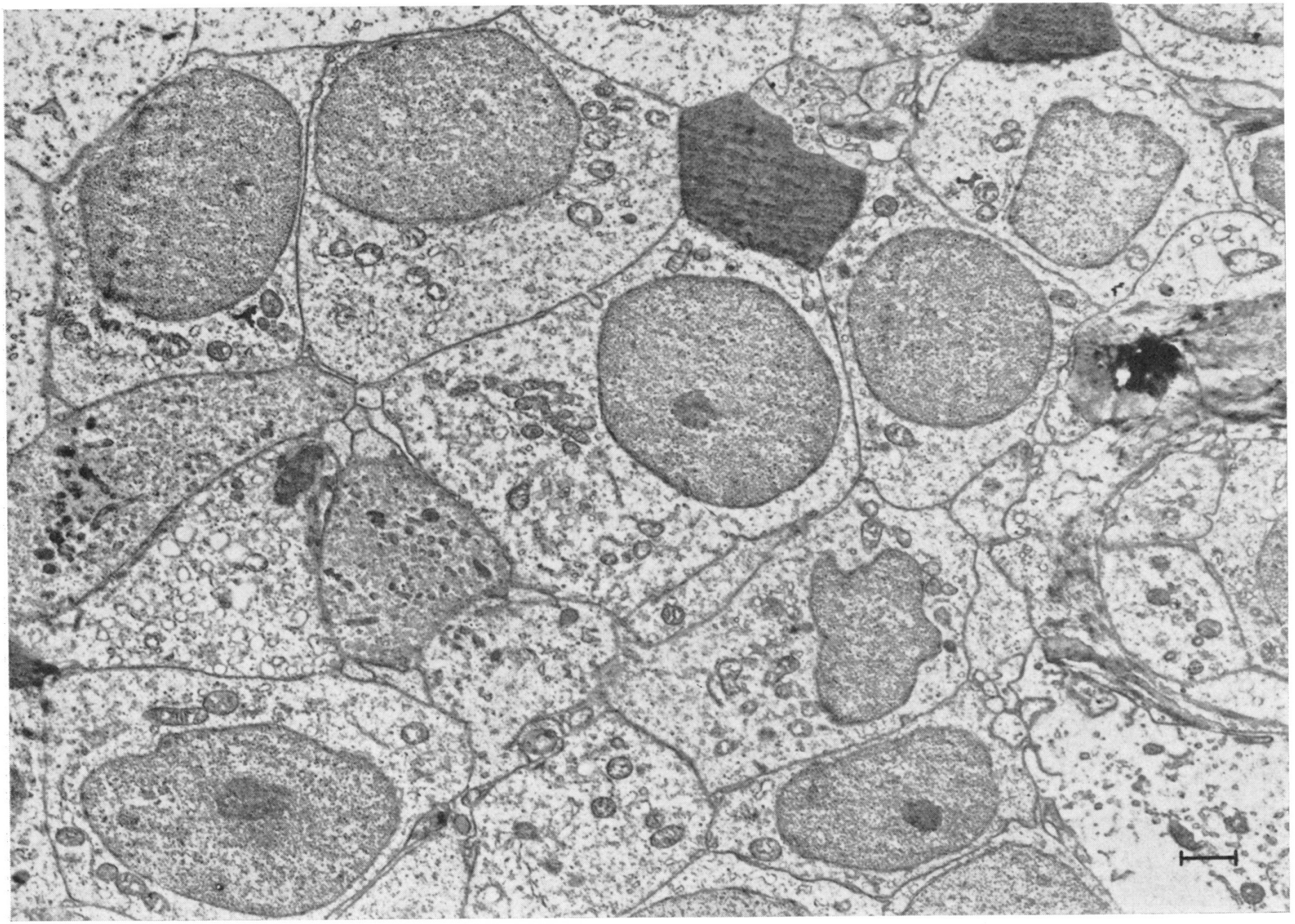


Fig. 4

Fig. 5 — *Leucemia linfoide cronica*: *linfoblasto,* con nucleo di forma irregolare: nel piano della sezione appaiono due lobi nucleari, ciascuno con nucleolo, citoplasma piuttosto ampio con reticolo endoplasmico abbastanza sviluppato, apparato di Golgi visibile, numerosi granuli di Palade e mitocondri piuttosto piccoli (x 20.000).

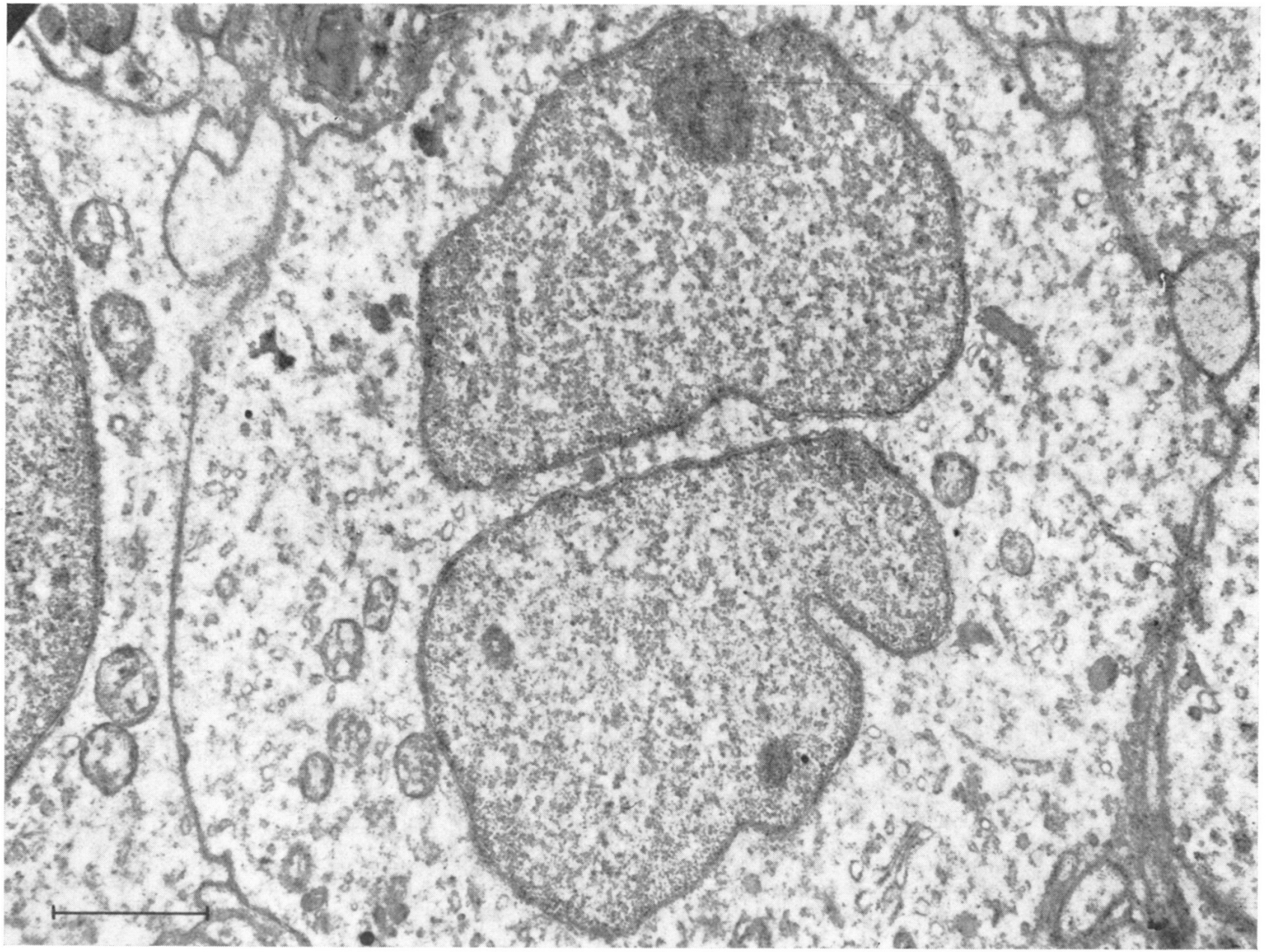


Fig. 5

Fig. 6 — *Leucemia linfoide cronica*: *Grande linfocito,* con nucleo di forma ovale, a margini irregolari, con nucleolo grande, e con citoplasma piuttosto ampio. Un mitocondrio è penetrato in una insenatura del nucleo (x 20.000).



Fig. 6

Fig. 7 — *Leucemia linfoide cronica*: *Linfoblastro*. Nel nucleo si osserva un nucleolo grande, a struttura granulare compatta (x 53.000).

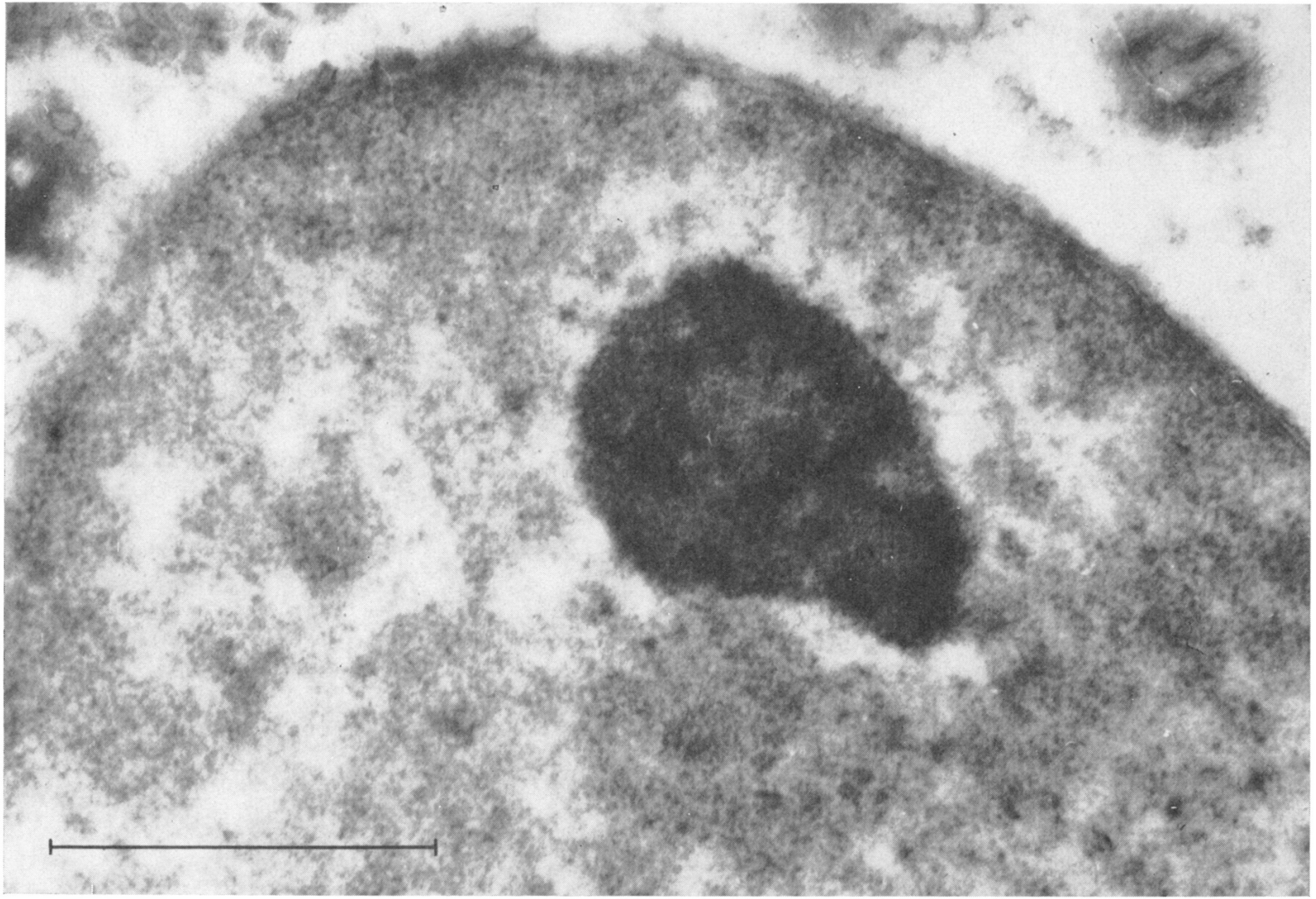


Fig. 7

Fig. 8 — *Leucemia linfoide cronica*: *Grande linfocito,* con numerosi mitocondri nel citoplasma, ad un polo della cellula (x 20.000).

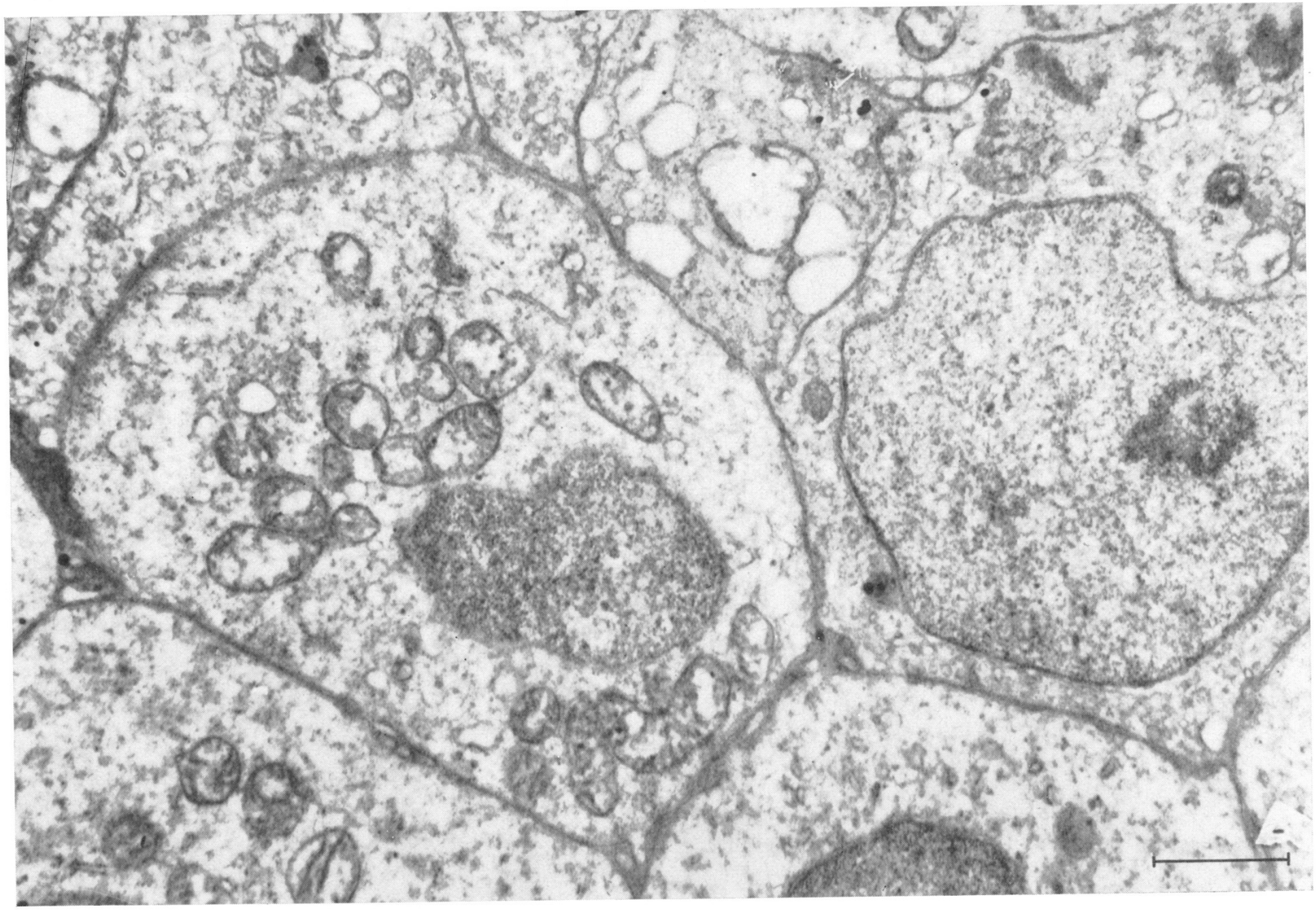


Fig. 8

Fig. 9 — *Cellula pre-Sternberg*. Si osservano tre zone del nucleo di grandi dimensioni e di forma molto irregolare, con presenza di nucleoplasma a distribuzione ineguale, di nucleoli a struttura filamentosa e di inclusioni (x 53.000).

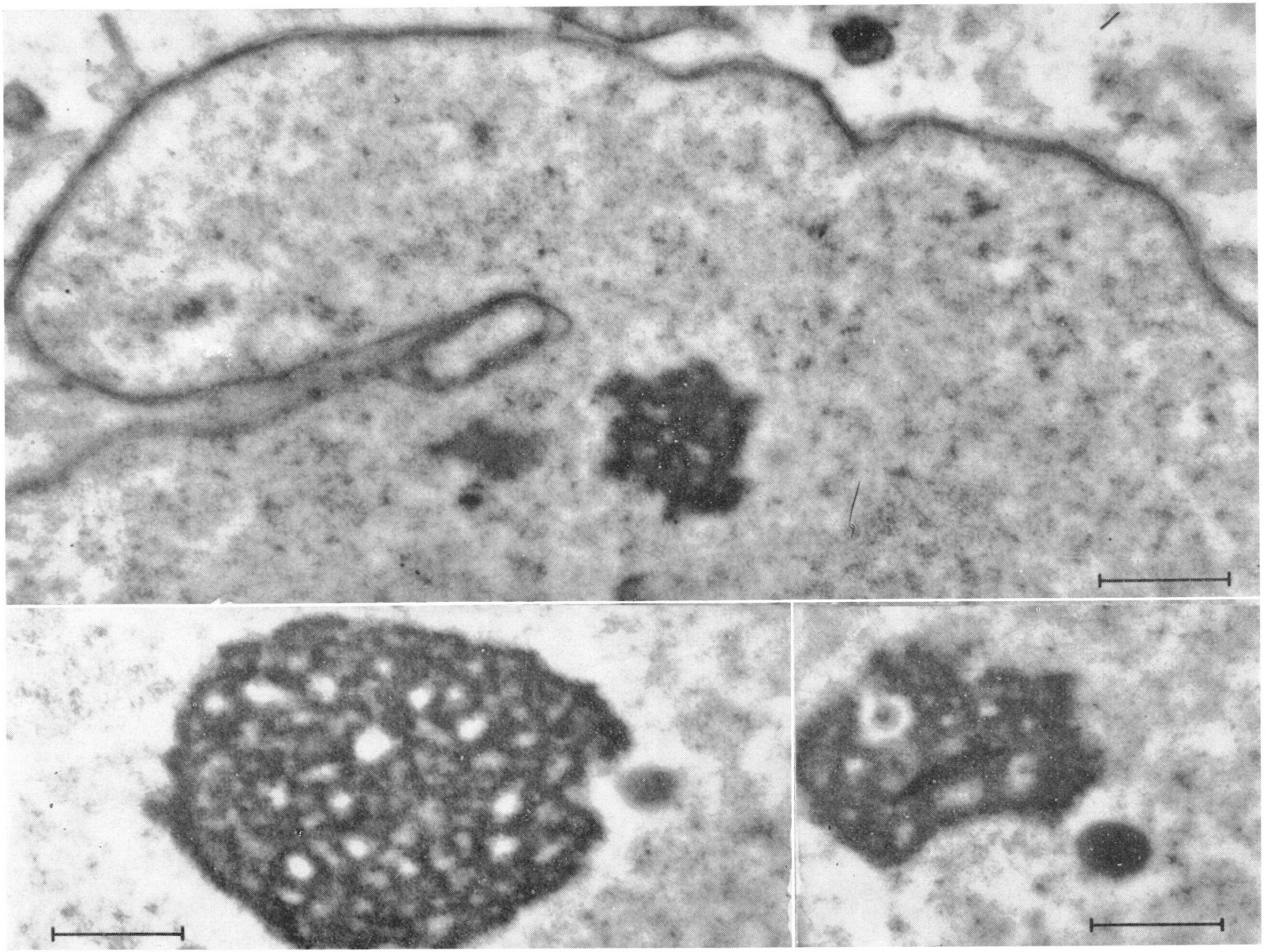


Fig. 9

Fig. 10 — *Cellula pre-Sternberg*: Nel nucleo, di voluminose dimensioni, si osservano invaginazioni citoplasmatiche con presenza di pseudo-inclusioni. Il nucleolo è disposto a contatto con la doppia membrana nucleare (x 19.000).

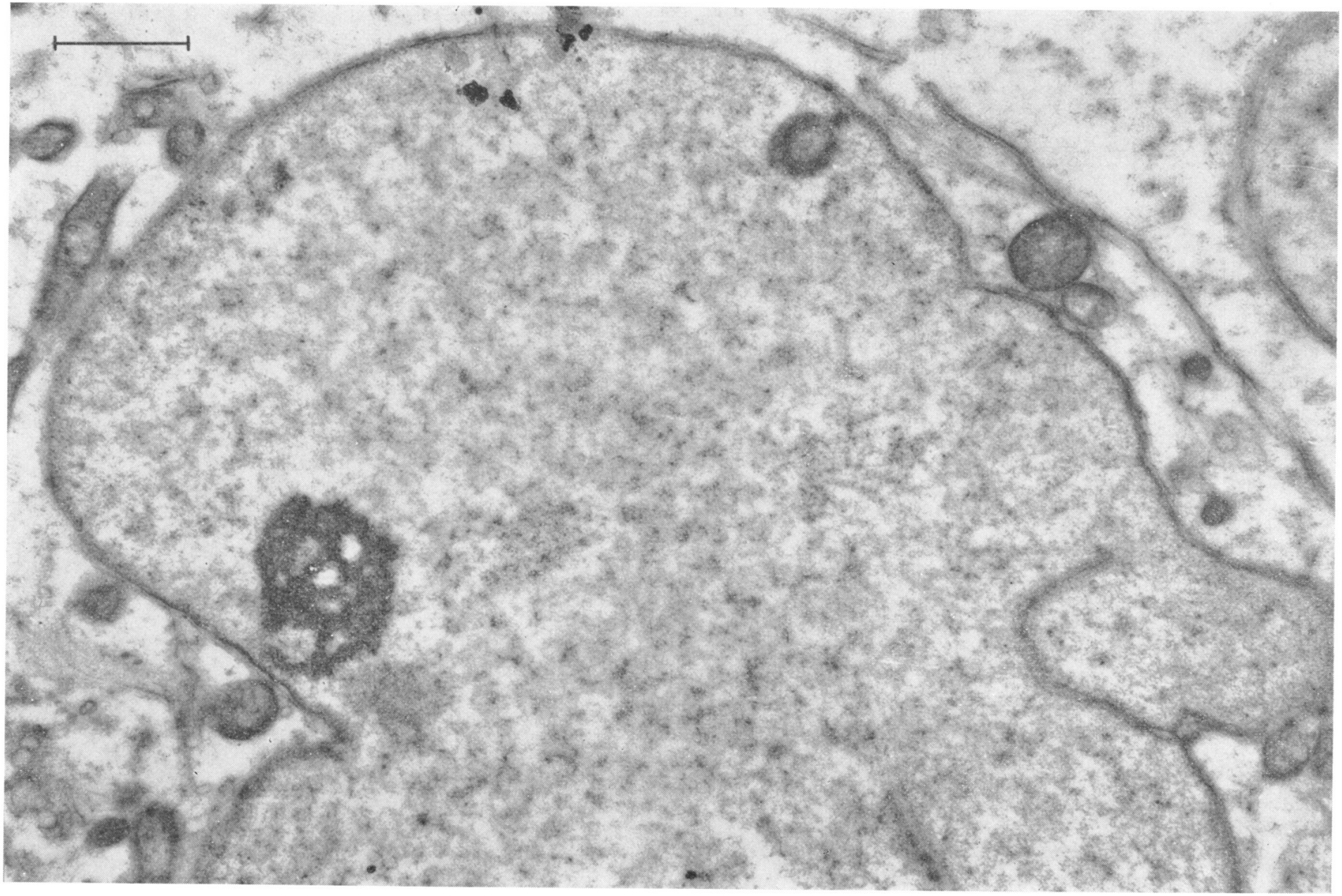


Fig. 10

Fig. 11 — *Cellula pre-Sternberg*: La sezione interessa un polo del nucleo, dove si nota una proiezione citoplasmatica connessa alle anfrattuosità della superficie nucleare (x 20.000).

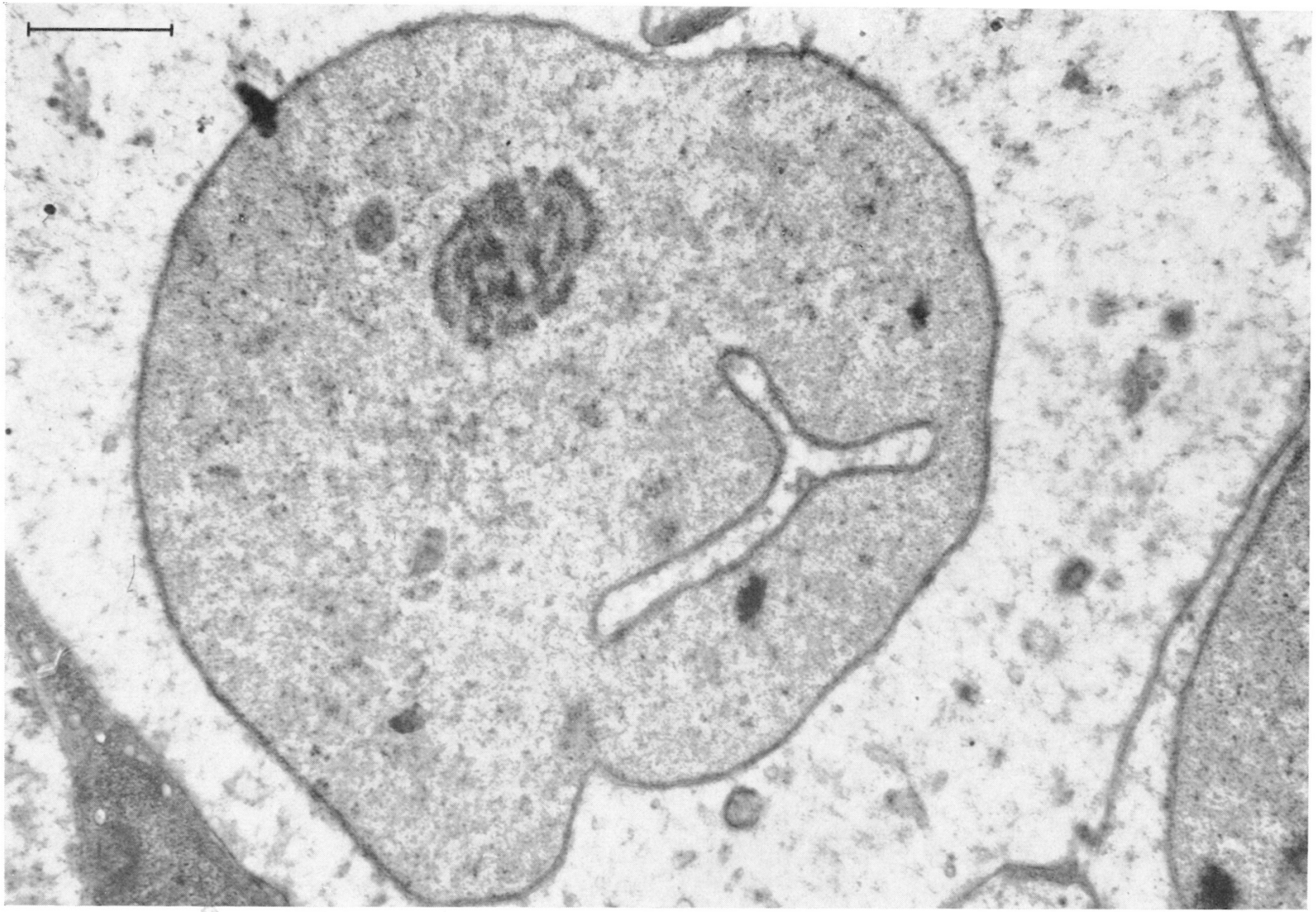
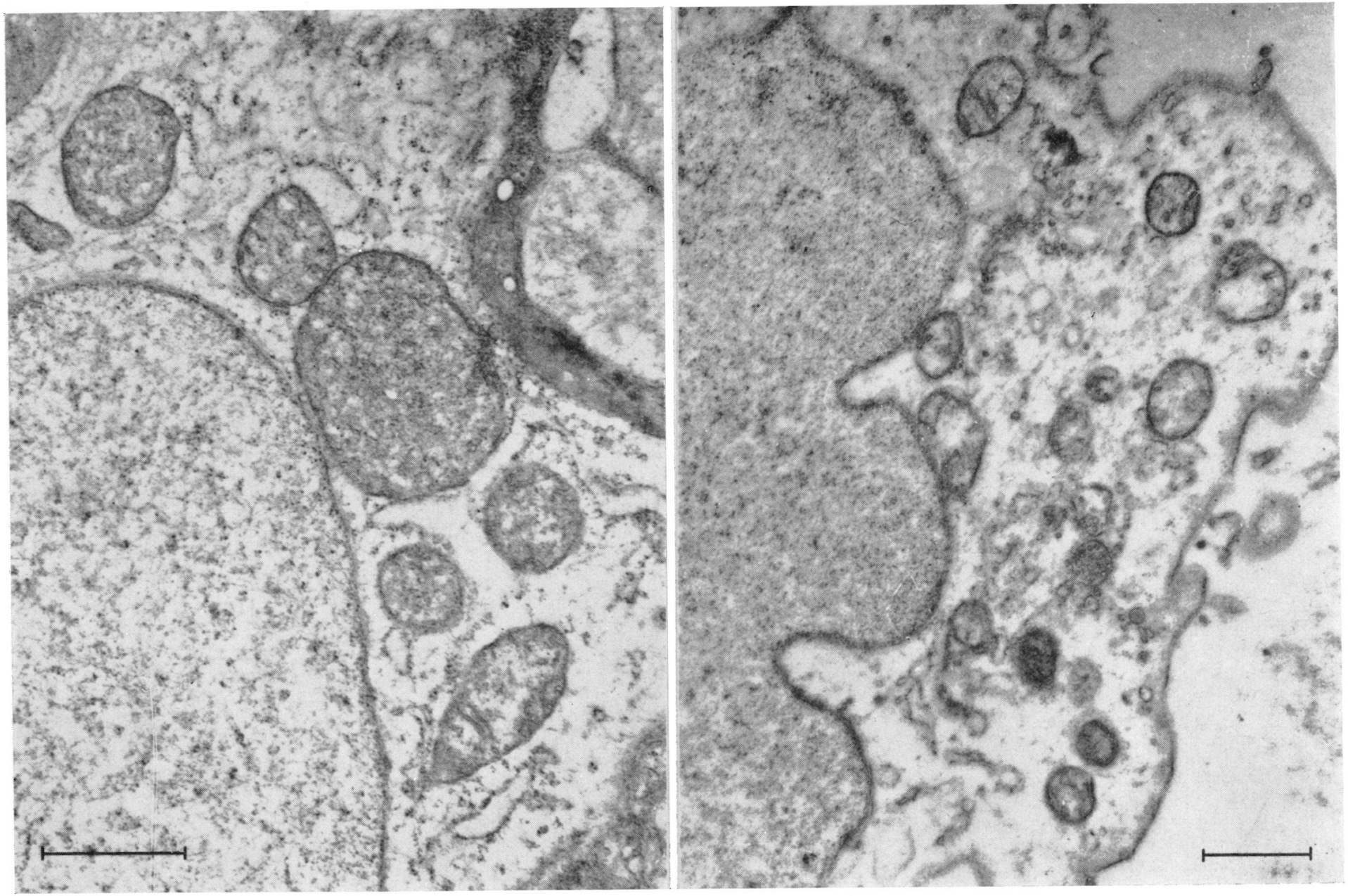


Fig. 11

Fig. 12 — *Cellula pre-Sternberg*: in dettagli del citoplasma si nota presenza di mitocondri di grandezza varia, di reticolo endoplasmico, di numerosi granuli di Palade e di un esteso apparato di Golgi.
A) x 20.000. B) x 16.000.



A B

Fig. 12

Fig. 13 — *Cellula pre-Sternberg in fagocitosi.* Si nota nel citoplasma presenza di un eritrocito in via di disfacimento (x 20.000).



Fig. 13

Fig. 14 — *Cellule di Sternberg* a piccolo ingrandimento (x 6.000).

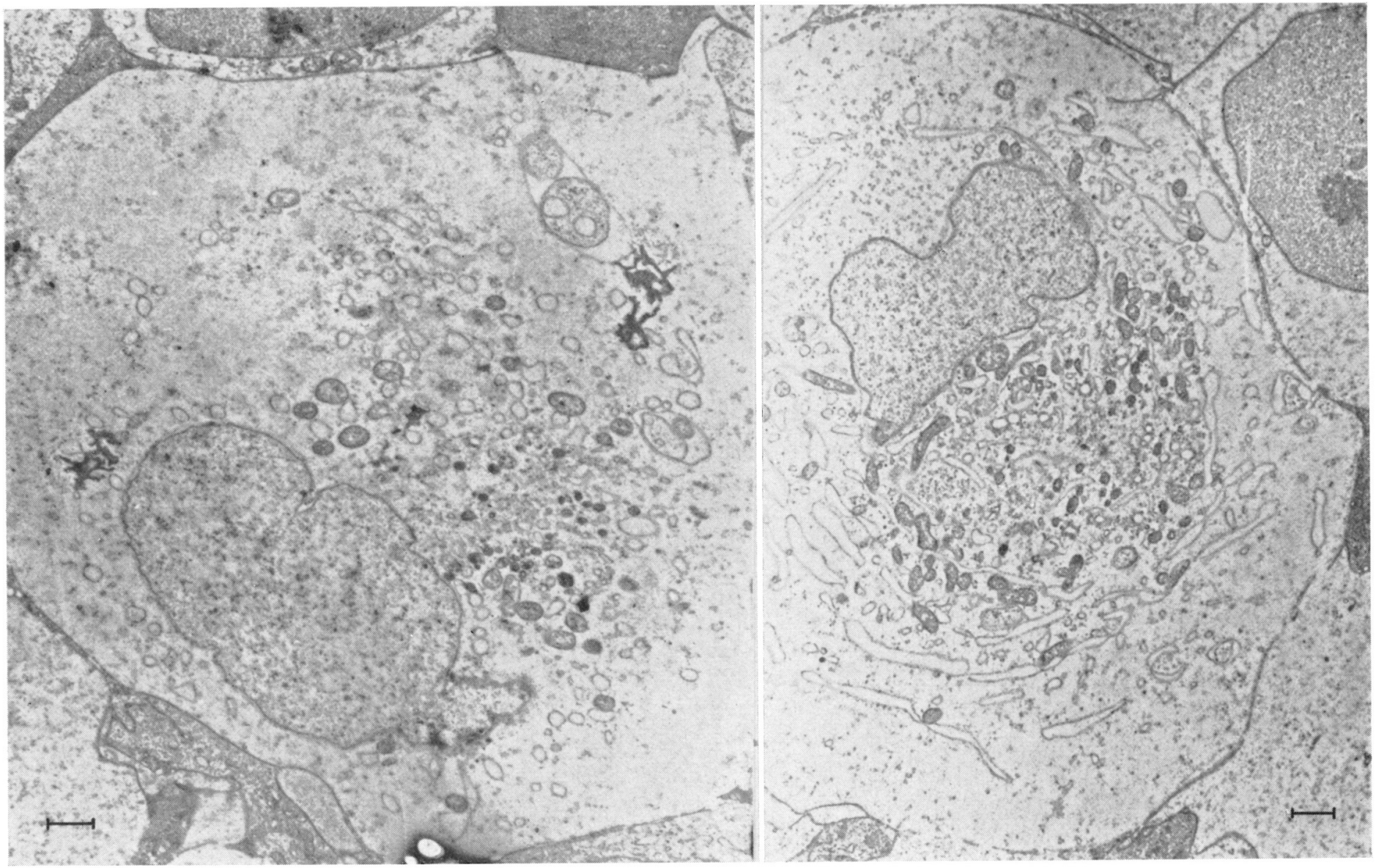
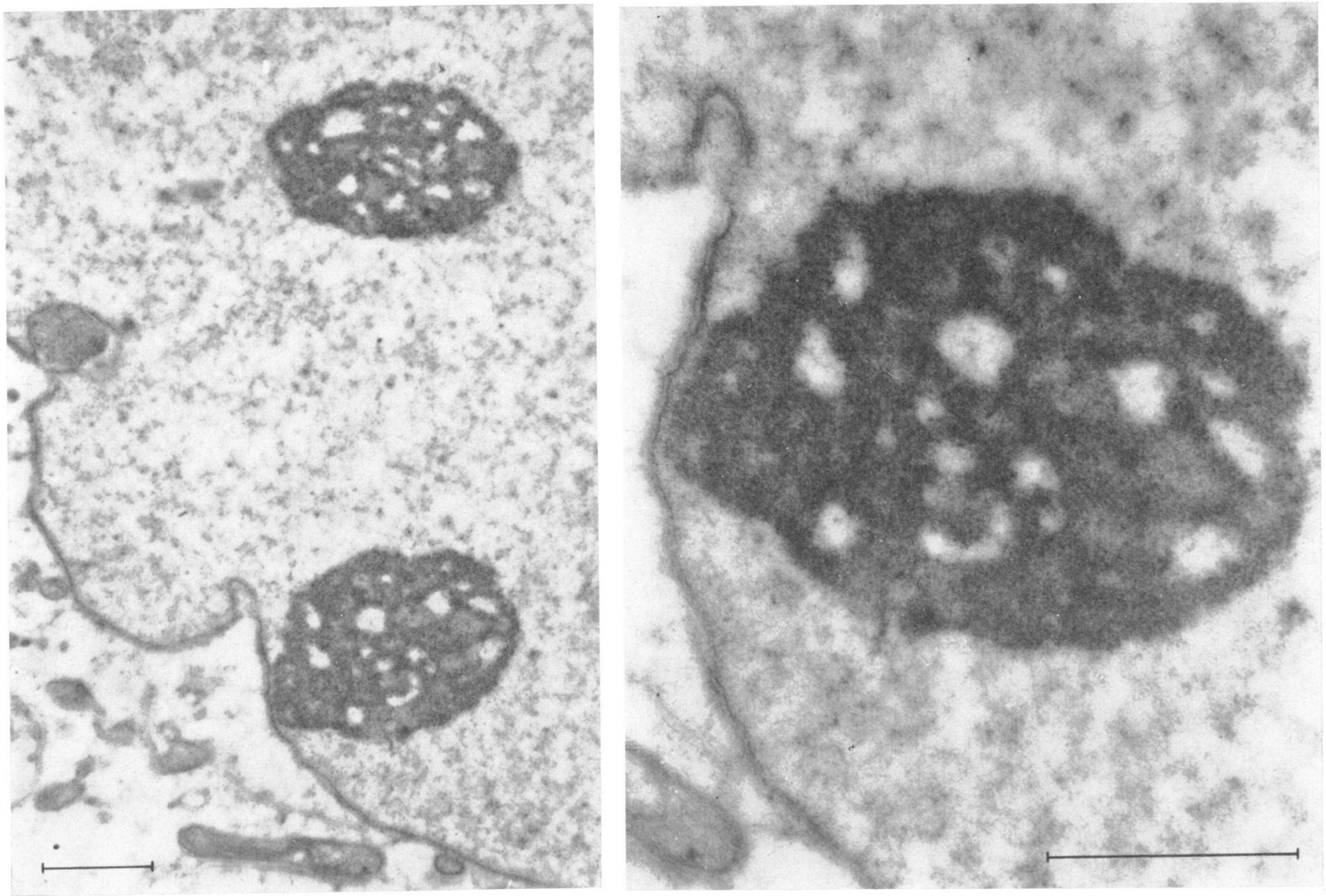


Fig. 14

Fig. 15 — *Cellula di Sternberg*. A) - Nel nucleo si osserva la irregolare distribuzione del nucleoplasma con aree chiare e scure, la presenza di una pseudo-inclusione mitocondriale, e di due nucleoli filamentosi, uno dei quali è a contatto della doppia membrana nucleare (x 16.000). B) - A maggiore ingrandimento si nota la struttura del nucleolo e i rapporti con le membrane nucleari (x 36.000).

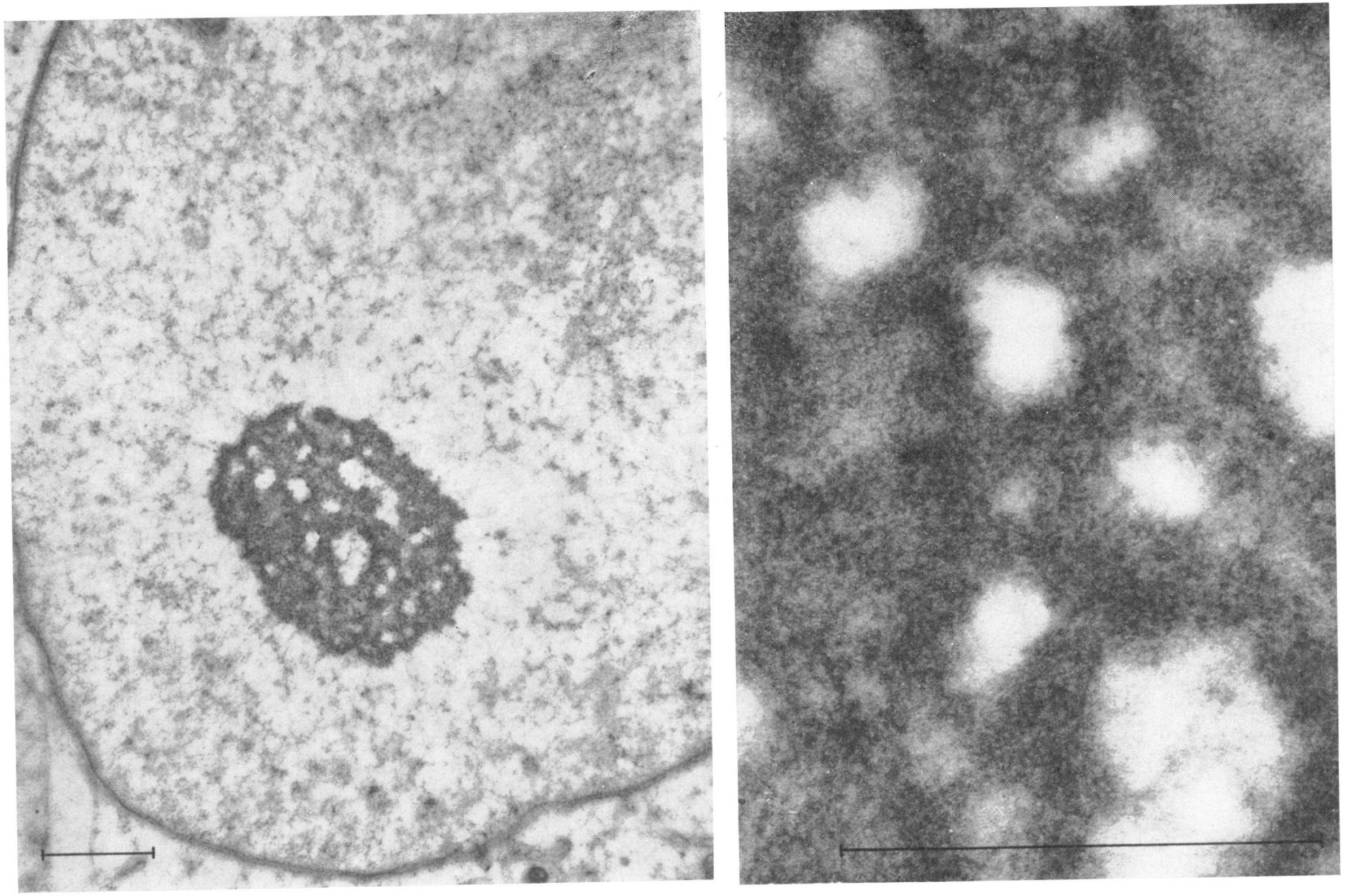


A

Fig. 15

B

Fig. 16 — *Cellula di Sternberg*. A) - Dettaglio del nucleo, contenente un nucleolo a struttura filamentosa, con parti amorfe (x 16.000). B) - A forte ingrandimento si osserva la composizione granulare del nucleolonema (x 70.000).



A

Fig. 16

B

Fig. 17 — *Cellula di Sternberg*. Nel citoplasma si osserva un ricco reticolo endoplasmico di forma lamellare, e numerosi granuli di Palade, che in un punto appaiono anche addensati (x 20.000).

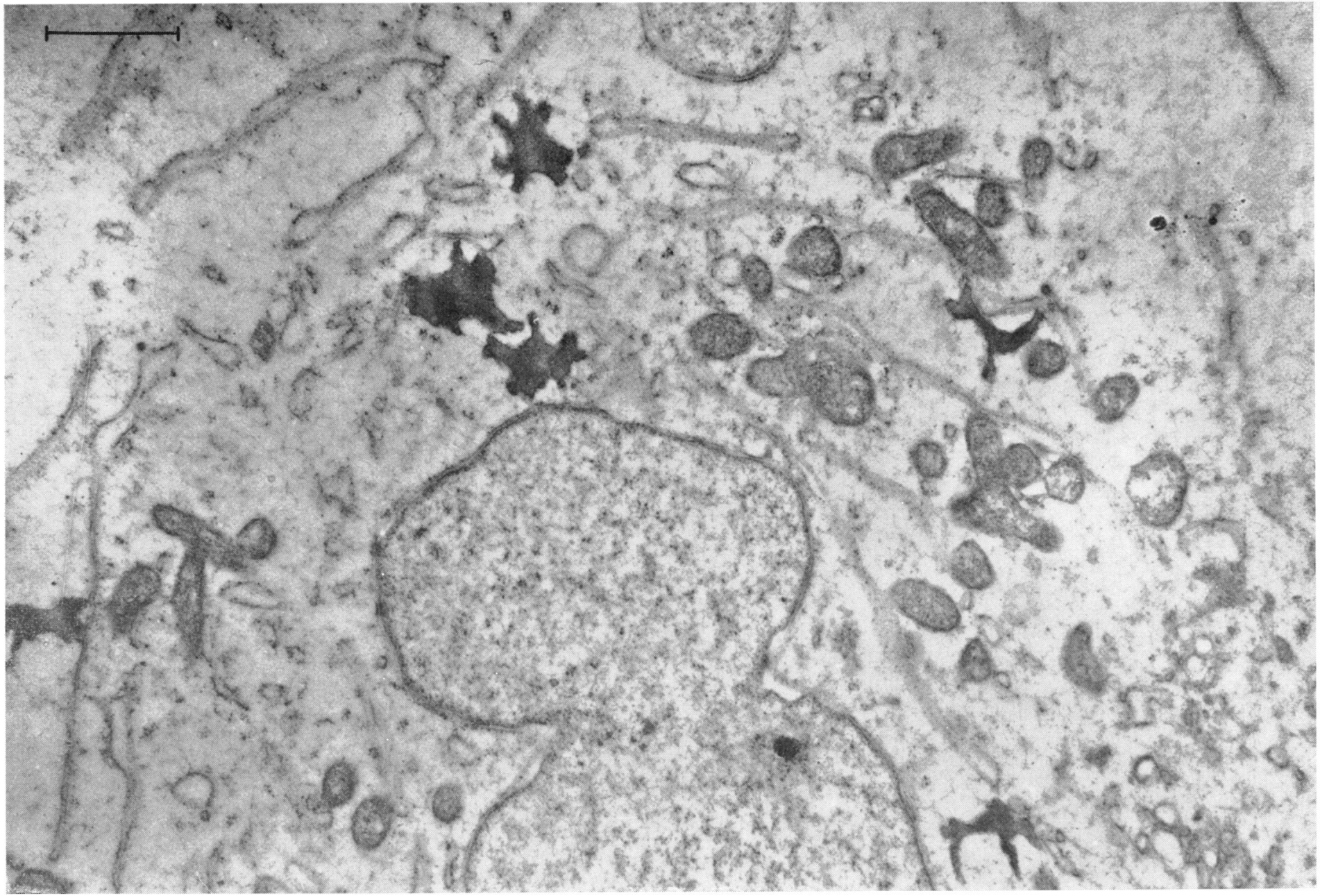


Fig. 17

Fig. 18 — *Cellula di Sternberg*. Nel citoplasma presenza di microcorpi e mitocondri, abbondante reticolo endoplasmico di forma lamellare, e numerosi granuli di Palade, che in un punto appaiono anche addensati (x 20.000).

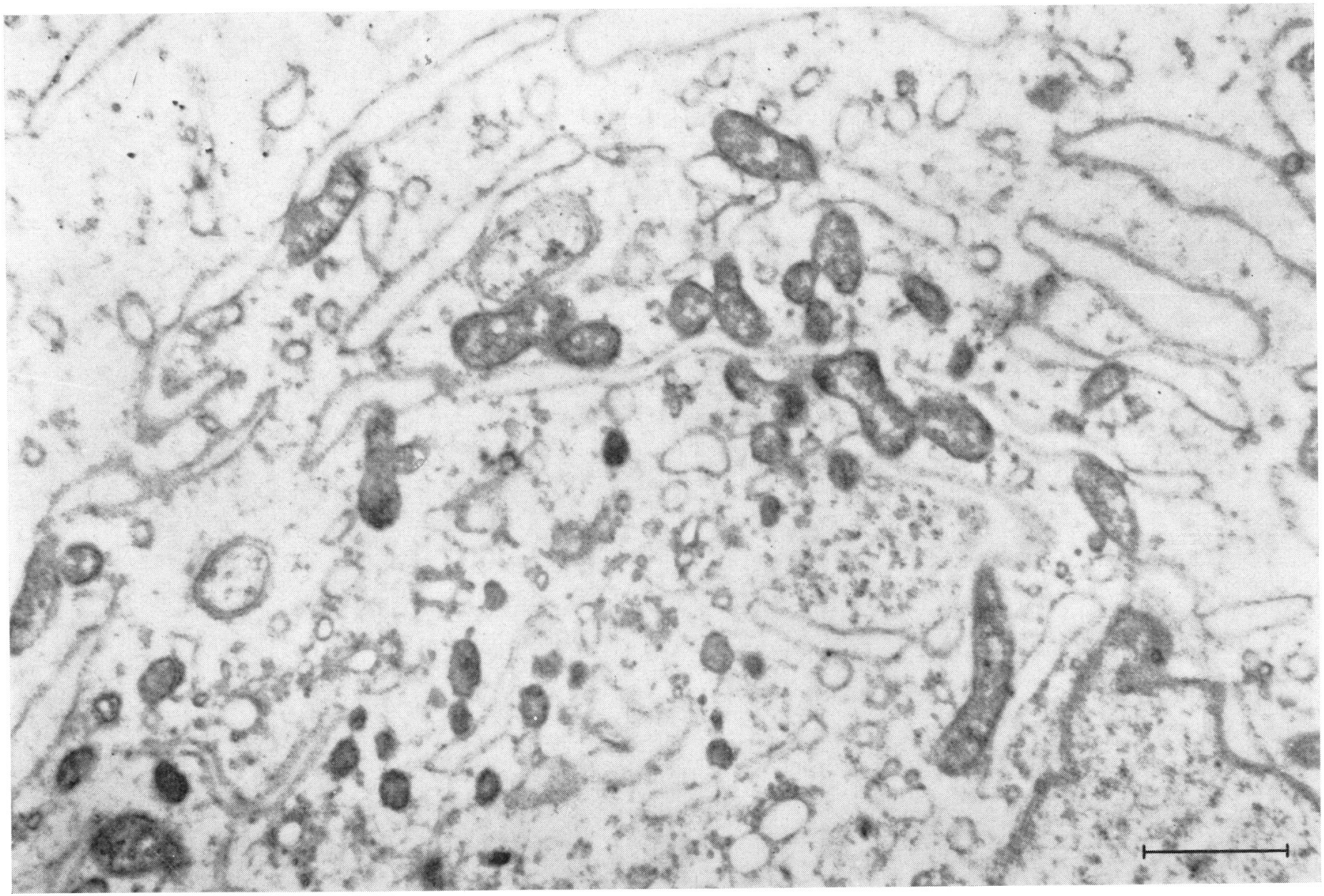


Fig. 18

Fig. 19 — *Cellula di Sternberg* in attività macrofagica. Si osserva un eritrocito in avanzata fase di distruzione, con distacco di frammenti (x 20.000).

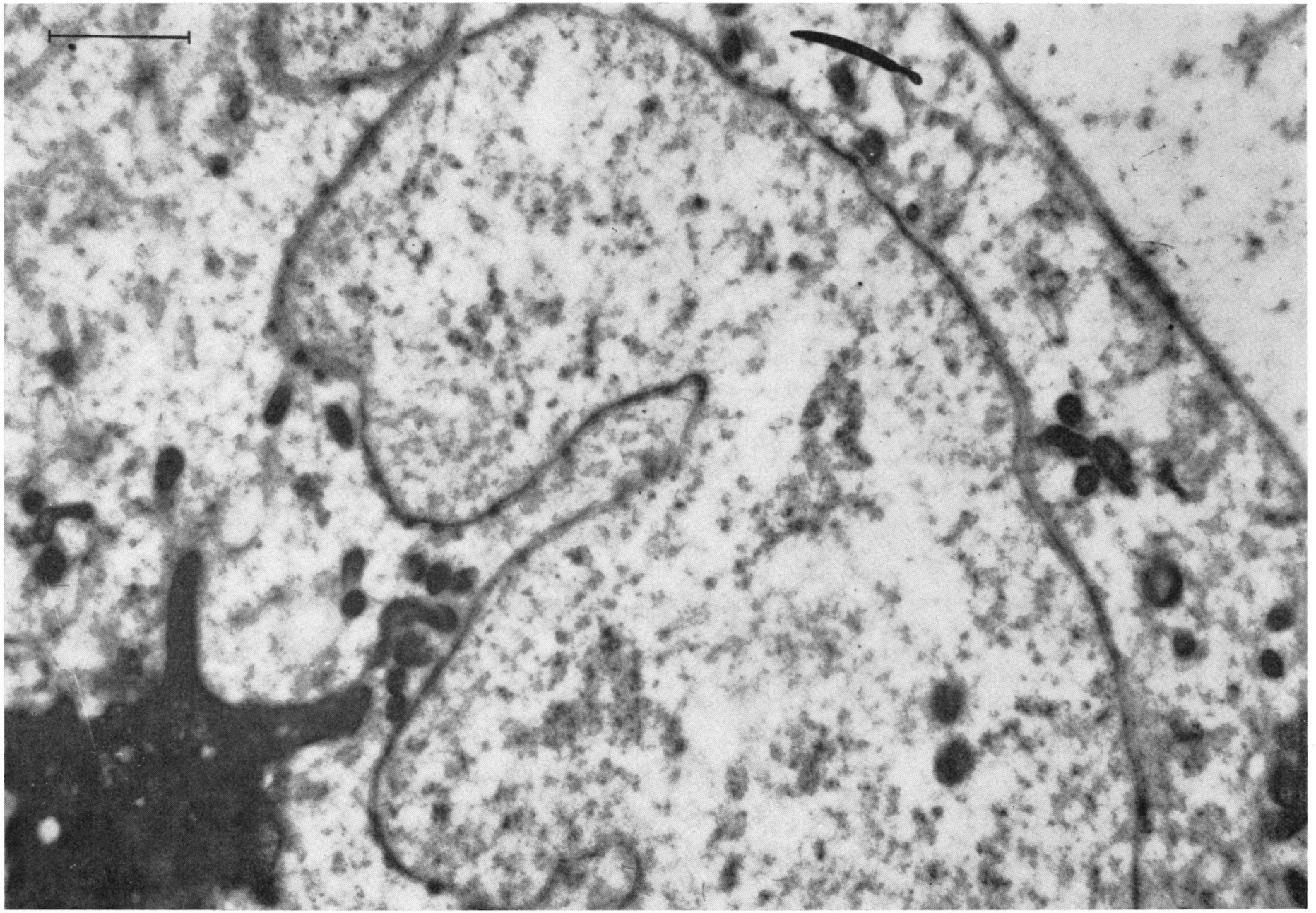


Fig. 19

Fig. 20 — *Cellula linfosarcomatosa,* con aspetto tigrato del nucleo, per differenziazione del nucleoplasma in aree chiare e scure. Nel citoplasma mitocondri rigonfi, scarso reticolo endoplasmico e numerosi granuli di Palade (x 20.000).



Fig. 20

Fig. 21 — *Cellula linfosarcomatosa*: si osserva in due punti il distaccarsi della membrana nucleare esterna, con formazione di ampie sacche. Il citoplasma appare povero di organuli (x 20.000).



Fig. 21

Fig. 22 — *Cellula linfosarcomatosa*: il nucleo è di aspetto tigrato, con voluminoso nucleolo. La doppia membrana nucleare appare scollata in un punto, con formazione di un vacuolo internucleocitoplasmatico. Il citoplasma, ampio, contiene mitocondri di varia forma e grandezza, e scarso reticolo endoplasmico (x 20.000).

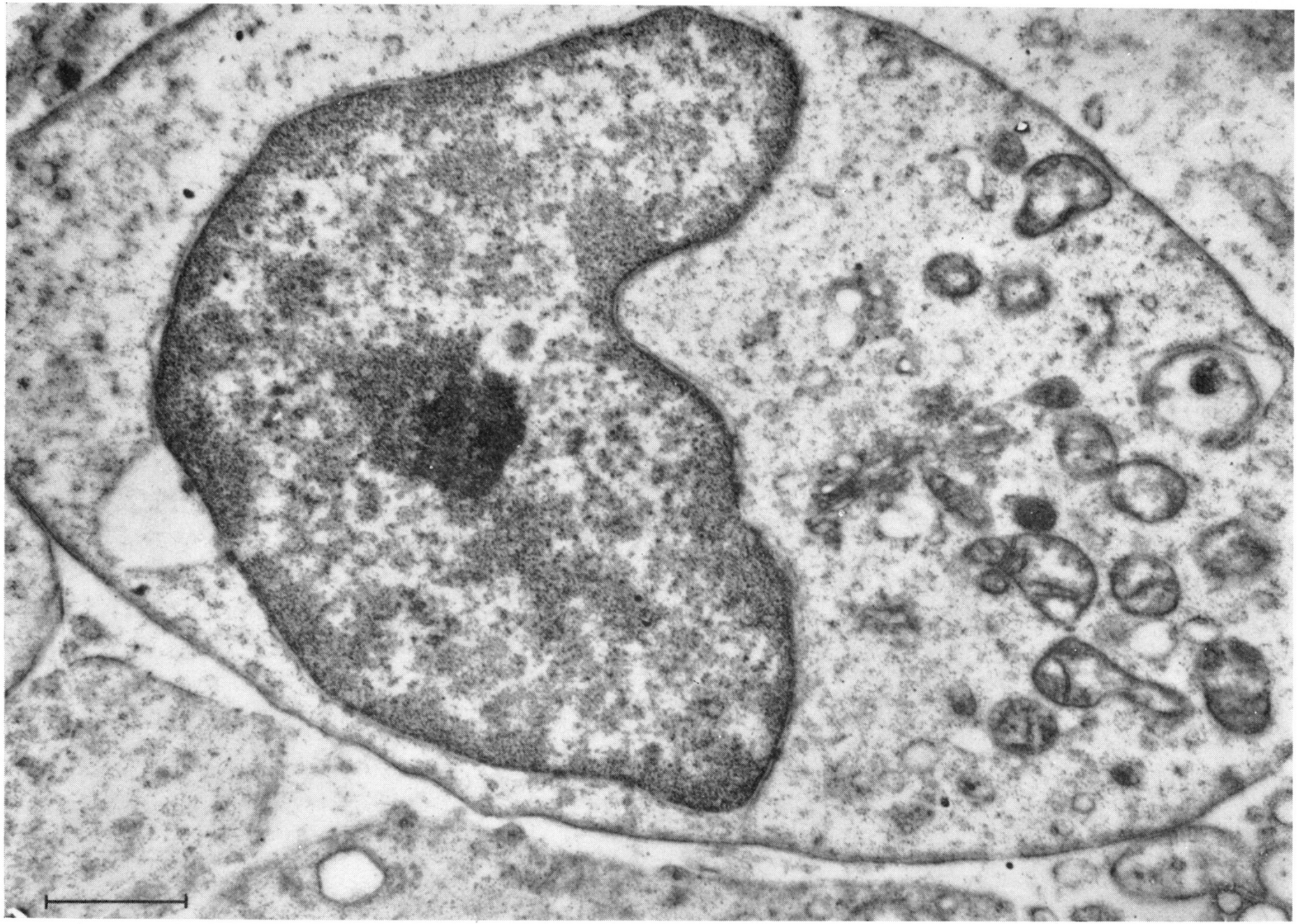


Fig. 22

plasma. L'apparato di Golgi è limitato alla presenza di poche vescicole e talora si possono trovare uno o due centrioli tipicamente cilindrici. Sparsi irregolarmente intorno al nucleo sono sempre bene evidenti numerosi mitocondri, spesso voluminosi, ma talora anche molto piccoli, di forma varia, oblunga, ovale, rotondeggiante.

L'evoluzione dei linfoblasti verso i grandi e i piccoli linfociti, avviene gradualmente, con modificazioni ultrastrutturali poco appariscenti, tanto che negli stadi intermedi per molti elementi è difficile precisare la fase di maturazione a cui appartengono.

Si ha, innanzitutto, una progressiva diminuzione delle dimensioni cellulari, dovute in parte alla riduzione dei diametri nucleari, ma soprattutto alla massa citoplasmatica che può limitarsi ad un piccolo orlo.

La cromatina nucleare si fa progressivamente più densa e più omogenea, e il nucleolo s'impicciolisce, fino anche a scomparire. Il citoplasma diviene sempre più povero di organuli.

Diamo ora una breve descrizione delle principali caratteristiche dei grandi e dei piccoli linfociti, che consentono di differenziarli tra loro.

Nei grandi linfociti (fig. 3) il nucleo, che conserva una forma rotonda, presenta una o due invaginazioni, strette e talora molto profonde, tali da dividere il nucleo in due o più porzioni [Watanabe (4)]. In queste incisure nucleari penetra il citoplasma, e spesso profondamente un mitocondrio. La sostanza nucleare è d'aspetto più omogeneo, e a densità maggiore dei linfoblasti. Appare ancora visibile un nucleolo, in genere piccolo e compatto. Il citoplasma è ricco in granuli di Palade, ma l'apparato di Golgi è scomparso, o è ridotto a pochissime vescicole, e così anche il reticolo endoplasmico, che è assente o molto scarso. I mitocondri, che tendono a riunirsi ad un polo cellulare, dove il citoplasma è relativamente più ampio, sono in genere grandi, e come ha precisato Bernhard (5), più di quelli dei granulociti: le creste sono bene evidenti, e talora contengono dei corpuscoli rotondi.

I piccoli linfociti si distinguono dai grandi, oltre che per le dimensioni della cellula, per una maggiore compattezza del nucleoplasma, che talora, in alcune zone, tende a condensarsi, e per una maggiore povertà del citoplasma in organuli, tanto che bene evidenti appaiono soltanto i mitocondri, particolarmente voluminosi, e i granuli di Palade.

Abbiamo osservato solo raramente nelle cellule linfatiche normali la presenza delle particolari formazioni descritte da Low e Freeman (6), e indicate come vacuoli composti. Inoltre non abbiamo constatato granuli azzurrofili, che come ha segnalato Palade, appaiono di dimensioni inferiori ai mitocondri. Ciò in armonia con il fatto che nei preparati per apposizione di linfonodi non si osserva nei linfociti presenza di

granulazioni azzurrofile, che si riscontrano invece nei grandi linfociti circolanti.

In un recente studio, Granboulan (7) ritiene che il piccolo linfocito non sia una cellula da considerare giunta alla fase finale di maturazione. Infatti in questo elemento vi è un rapporto nucleo-citoplasmatico molto alto, un elevatissimo contenuto di A D N nucleare, presenza, anche se incostante, di un piccolo nucleolo e soprattutto mancanza di una differenziazione del citoplasma, che contiene inoltre in maniera dispersa numerosi granuli di A R N, che sostengono la basofilia plasmatica.

In effetti queste sono tutte caratteristiche proprie delle cellule giovani non ancora differenziate, ma d'altra parte, è da osservare che per questa linea cellulare non sono note forme in fase più avanzata di maturazione, e neppure è dimostrata la trasformazione dei linfociti in altri tipi cellulari, come è supposto da Yoffey (8).

In via di ipotesi si dovrebbe ammettere che si tratti di particolari espressioni morfologiche di attività funzionali non ancora accertate.

Leucemia linfoide cronica.

L'osservazione al microscopio elettronico di sezioni ultrasottili di linfonodi di malati di leucemia linfoide cronica (fig. 4) ha rivelato quadri nell'insieme uniformi, composti tutti da elementi linfatici che in parte erano a morfologia normale, e in parte presentavano modificazioni di grado modico e limitato ad alcuni costituenti cellulari. Si è avuto quindi un comportamento monotono, che si ripeteva uguale in tutti gli esami.

Le cellule linfatiche costituite in prevalenza da grandi e piccoli linfociti, sono apparse di forma e dimensioni nei limiti della norma, o solo lievemente più irregolari e più grandi (figg. 5-6).

Il nucleo, in genere di forma abbastanza conservata, ha solo raramente rivelato l'aspetto irregolare, convoluto e complesso segnalato da Low e Freeman (6). Il nucleoplasma è apparso con le caratteristiche delle corrispondenti cellule normali, e soltanto in alcuni elementi era modicamente più denso, o irregolarmente distribuito con zone più chiare, come già segnalato da Goodman e coll. (9) e da Folli e coll. (10).

Una modificazione più frequente si è avuta a carico dei nucleoli, che sono apparsi alquanto voluminosi e a struttura compatta (fig. 7).

Il citoplasma, in molti elementi abbastanza esteso, si è mostrato anche relativamente più dotato di organuli. Rispetto alla cellula normale è da rilevare soprattutto un numero maggiore di mitocondri di varia taglia, con prevalenza dei grandi, che spesso sono apparsi rigonfi

a matrice chiara e con frammentazione delle creste (fig. 8). Questa alterazione mitocondriale è stata anche osservata da Di Mayorca e coll. ([11]) e da Folli e coll. ([10]) nei linfociti presenti nel sangue di malati di leucemia linfoide cronica. Inoltre è risultato alquanto più ricco pure il reticolo endoplasmico, specialmente vescicolare e talora si sono osservati vacuoli, anche di grandi dimensioni, contenenti una sostanza di debole densità elettronica.

Nel complesso quindi nei linfonodi della leucemia linfoide cronica gli elementi cellulari linfatici hanno presentato una ultrastruttura sostanzialmente normale o con alcune variazioni di modico grado.

Granuloma maligno.

Nel granuloma maligno ci siamo proposti di studiare soprattutto l'ultrastruttura delle cellule giganti di Sternberg e degli elementi istiocitari da cui esse derivano, attraverso le forme di passaggio, rappresentate dalle cellule, che quindi indichiamo come pre-Sternberg. Una tale trasformazione patologica, chiaramente accertata negli studi di citologia al microscopio ottico, è stata anche osservata da Frajola e coll. ([12]) con il microscopio elettronico.

Per le nostre ricerche era quindi necessario tessuto granulomatoso particolarmente ricco dei suddetti elementi, e a questo proposito ben nota è la diversità di reperti anche in casi di granuloma maligno nella stessa fase evolutiva, ma ancor più in stadi diversi e dopo trattamenti vari.

Fra i casi esaminati a tal fine, abbiamo particolarmente utilizzato il materiale linfogangliare proveniente da un giovane di venti anni, malato da pochi mesi, e che presentava localizzazioni latero-cervicali: in linfonodi prelevati biopticamente, era presente un tessuto granulomatoso in fase attiva di evoluzione, ricco in cellule pre-Sternberg e giganti di Sternberg, con tutte le caratteristiche morfologiche a loro proprie, come appariva evidente nei preparati istologici praticati con la tecnica ordinaria e in quelli citologici ottenuti per apposizione.

Nelle sezioni ultrasottili, abbiamo potuto riconoscere la presenza di cellule con le caratteristiche di quelle istiocitarie, la maggioranza con alterazioni che stavano a denotare una trasformazione in una determinata direzione. Infatti si sono potute osservare tutte le possibili forme di transizione tra le cellule istiocitarie e quelle giganti di Sternberg, attraverso lo studio delle cellule pre-Sternberg. Queste sono apparse contraddistinte da un aumento netto delle dimensioni e da evidenti alterazioni.

Il nucleo (figg. 9, 10, 11), voluminoso, presenta una configurazione molto irregolare, talora mostruosa. Rimane evidente la doppia membrana nucleare, ma nell'interno la cromatina mostra una irregolare distribuzione con formazione di ammassi talora estesi, inframmezzati da zone più chiare.

Spesso si trovano una o più inclusioni nucleari, che ci sono sembrate di particolare interesse. Soltanto alcune di esse, situate in vicinanza del bordo del nucleo, appaiono costituite da gocce di lipidi, da frammenti di ergastoplasma e di mitocondri, e, per la presenza di una doppia membrana, sono quindi da ritenere come invaginazioni citoplasmatiche, e pertanto da considerare come pseudo-inclusioni del tipo di quelle descritte da Leduc e Wilson ([13]) in cellule giganti di un epatoma trapiantabile del topo e poste in rapporto ad una alterazione della superficie nucleare. La maggioranza delle inclusioni, invece, da noi constatate nelle cellule pre-Sternberg, sono di grandezza varia e irregolarmente distribuite, a distanza dalla membrana nucleare, e quindi certamente non da esse limitate. Risultano prive di una struttura interna, e non siamo in grado di indicarne la natura e la derivazione, anche se per molte ci è sembrata nucleolare.

Vi è sempre presenza di uno o più nucleoli nettamente ipertrofici, che però oltre a questo carattere costante, mostrano una struttura filamentosa, reticolare, con nucleolonema a composizione granulare più sviluppata, a circonvoluzioni ampie e con estese zone di parte amorfa. Vari nucleoli sono disposti a contatto con la doppia membrana nucleare fino a raggiungere con essa un'intima connessione.

Il citoplasma (figg. 12-13) è ampio, con profonde invaginazioni nell'interno del nucleoplasma, e contiene un numero vario, ma in genere non abbondante, di organuli. Il reticolo endoplasmico appare più o meno vistoso in alcuni elementi, mentre in altri è scarso o quasi assente. Molte lamelle sono orlate esternamente da granuli di Palade, che si presentano anche in grande numero dispersi nel citoplasma: probabilmente sono questi che addensandosi danno luogo ai corpi granulari, di circa 0,2 μ descritti da Braunsteiner ([14]). I mitocondri sono sempre presenti, e molti di aspetto ancora normale. Altri invece appaiono più grandi, rigonfi, anche fino al punto di non riconoscersi più la presenza di creste. In tali casi può essere difficile distinguerli dai vacuoli, spesso numerosi in queste cellule, ma che sono in genere piccoli, e talora piccolissimi, e non sono contornati da doppia membrana. L'apparato di Golgi è spesso visibile, e talora anche esteso.

Le cellule pre-Sternberg, anche se marcatamente patologiche, han-

no potere macrofagico, e più spesso nel loro interno si riconoscono eritrociti, più raramente anche linfociti. Pertanto molte delle formazioni presenti in questi citoplasmi sono costituite dai detriti di materiale fagocitato, e sono quindi di origine extracellulare. Inoltre vi sono spesso deposizioni di grasso, che talora si dispongono a formare stelle lipidiche.

Attraverso questi elementi di passaggio si arriva alla cellula di Sternberg, che è di dimensioni tali da giustificare la denominazione di gigante e ovviamente al microscopio elettronico può essere osservata intera solo a ingrandimenti bassi (fig. 14).

Il nucleo è grande, plurilobato, circondato da una doppia membrana, e si presenta a contorni molto irregolari, spesso frastagliati, con dentellature ed incisioni. Conserva nell'insieme l'aspetto chiaro delle cellule istiocitarie, ma il nucleoplasma tende, come nelle c. pre-Sternberg, ad addensarsi in aree più scure di grandezza e forma varia. Soltanto raramente si osservano inclusioni nucleari, mentre proiezioni citoplasmatiche sul nucleo, connesse alle sue anfrattuosità, si incontrano con frequenza.

I nucleoli sono molto grandi, costituiti da granuli fini del diametro medio di circa 150 Å, regolarmente addensati a formare filamenti che si distribuiscono a reticolo o a gomitolo, in cui spiccano aree chiare di parte amorfa. Non sono contornati da membrana, ma talora da un maggiore addensamento di materiale, a forma di cercine. Hanno sede diversa e spesso si dispongono a contatto con la membrana nucleare (figg. 15-16).

Il citoplasma è abbondante e ricchissimo di formazioni, distribuite però in apparente disordine (figg. 17-18). Colpisce spesso la esistenza di una zona di aspetto amorfo, talora anche abbastanza estesa, che non è di facile interpretazione, ma potrebbe essere dipendente da processi degenerativi, e corrispondere quindi ad aree di necrosi. Nel resto del citoplasma si incontrano numerosissimi microcorpi (microbodies), che appaiono come corpicciuoli rotondi, densi, contornati da una membrana singola, e talora riuniti a grappoli. Da Rouiller e Bernhard ([15]) essi sono interpretati come precursori dei mitocondri, e quindi come segno di un'attiva e accelerata loro produzione. D'altra parte sono anche presenti numerosi mitocondri di grandi dimensioni, talora di forma allungata o rigonfi. Il reticolo endoplasmico è in genere molto sviluppato, e appare più spesso sotto forma di sacche allungate e irregolarmente schiacciate, di dimensioni varie, disposte in circonvoluzioni intorno al nucleo o raccolte in grovigli di canalicoli. La superficie esterna è disseminata di granuli di Palade, che peraltro si incontrano anche sparsi in abbondanza. L'apparato di Golgi, nettamente visibile è di tipo micro-

vescicolare. In numero e grandezza varia, sono presenti deposizioni di grasso, di forma rotondeggiante, o a clava, o a stella. Si trovano infine vacuoli in prevalenza piccoli.

La cellula di Sternberg conserva ancora l'attività macrofagica dei suoi precursori, che si manifesta chiaramente con la presenza abbondante di inclusioni citoplasmatiche, di provenienza extracellulare, costituite da materiale vario, derivato dal disfacimento degli elementi fagocitati (fig. 19).

Riteniamo quindi che con le moderne tecniche di microscopia elettronica siano chiarite quasi tutte quelle formazioni apparse di oscura natura e quindi inclassificabili alle prime osservazioni [André e coll. ([16]), Braunsteiner e coll. ([14]), Frajola e coll. ([12])], e che si possono riferire a mitocondri straordinariamente piccoli, a microvescicole golgiane a sviluppo anomalo o a detrito di materiale fagocitato. Pertanto ci sembra che in complesso nell'ultrastruttura delle cellule di Sternberg non vi siano elementi specifici, ma soltanto delle alterazioni, spesso anche molto pronunciate, dei comuni costituenti cellulari: fra queste di particolare attenzione stimiamo meritevoli le lesioni nucleari, che sono già presenti nelle cellule pre-Sternberg, e gli organuli numerosi e complessi, che si trovano nel citoplasma delle cellule giganti di Sternberg e che non sono visibili con il microscopio ottico.

Nei linfonodi invasi dal tessuto granulomatoso maligno abbiamo riscontrato con varia frequenza granulociti neutrofili ed eosinofili a morfologia normale: lo stesso abbiamo osservato per i plasmociti, che hanno presentato, come di norma, una rete concentrica di canalicoli più o meno ripieni di sostanza fioccosa, indice della ricchezza di ergostoplasma di questi elementi ed espressione morfologica della loro attività secretrice.

Anche l'ultrastruttura delle cellule linfatiche non ha mostrato sostanziali modificazioni e questo ci sembra una ulteriore prova che nel granuloma maligno gli elementi linfatici non partecipano direttamente al processo morboso, che investe invece le cellule istiocitarie.

Linfosarcoma.

Lo studio della ultrastruttura dei linfonodi linfosarcomatosi ci ha consentito di osservare varie alterazioni nucleari e citoplasmatiche, in complesso però meno accentuate di quelle constatate nelle cellule di Sternberg.

Accanto ad un'aliquota di cellule ad ultrastruttura normale o subnormale, la grande maggioranza delle cellule neoplastiche hanno rive-

lato caratteristiche morfologiche tali da poterle considerare come linfoblasti atipici.

Nelle cellule linfosarcomatose, il nucleo pur di forma irregolare ha conservato spesso l'aspetto rotondeggiante od ovoidale delle cellule linfatiche, e soltanto raramente ha acquistato una forma triangolare, trapezoidale o vagamente rapportabile ad altre figure geometriche. Il nucleoplasma non è apparso più uniformemente distribuito, ma mostra aree chiare e scure, di ampiezza e distribuzione irregolare, che conferiscono nell'insieme al nucleo un aspetto tigrato (fig. 20). Costante la presenza di uno o due nucleoli, ipertrofici, ad ultrastruttura però ai limiti della norma.

A carico della doppia membrana nucleare, in molte cellule, abbiamo osservato anche in più punti uno scollamento della membrana esterna, che si distaccava dalla interna costituendo una sacca a forma di mezzaluna internucleocitoplasmatica, talora anche molto ampia, priva di qualsiasi struttura interna (fig. 21).

Per questa formazione non ci sembra accettabile l'ipotesi che non si tratti di una extroflessione della membrana esterna nucleare, ma di un mitocondrio, eccessivamente rigonfio, che si è andato ad addossare a detta membrana. Del resto il formarsi di vacuoli iuxtanucleari, da rigonfiamento dello spazio perinucleare, si osserva in molte cellule sia spontaneamente che per fenomeni di autolisi o di ipotonia [Policard e Bessis ([17])], e anche negli elementi della serie linfatica in condizioni normali. Si tratta quindi di variazioni nella intensità dello stesso fenomeno, che appare in modo più cospicuo nelle cellule linfosarcomatose.

Il citoplasma della maggioranza delle cellule linfosarcomatose è risultato relativamente povero di organuli, che in genere non hanno rivelato profonde alterazioni (fig. 22). I mitocondri, spesso in numero modicamente maggiore che di norma, sono apparsi di grandezza molto varia, e accanto ad alcuni piccolissimi, se ne sono incontrati altri grandi, spesso con segni di degenerazione vacuolare. Il reticolo endoplasmatico e la zona golgiana solo raramente sono risultati estesamente sviluppati, mentre sempre si è osservata una grande ricchezza di granuli di Palade, sparsi in tutto il citoplasma.

Pertanto le alterazioni ultrastrutturali di queste cellule neoplastiche sono state in genere di entità limitate, tanto da non riuscire agevole, con l'osservazione al microscopio elettronico, porre la diagnosi di linfosarcoma, come è possibile nei preparati istologici e citologici.

Inoltre dette modificazioni sono apparse soltanto a livello dei linfoblasti, mentre i grandi e i piccoli linfociti hanno in genere conservato una morfologia normale. Con relativa frequenza invece nelle cellule istio-

citarie di questi linfonodi abbiamo osservato un nucleo a contorni più irregolari e con cromatina ancora meno densa che di norma, e nel citoplasma presenza di numerosi mitocondri rigonfi.

In conclusione con le nostre indagini sull'ultrastruttura delle cellule linfatiche abbiamo inteso di fare un punto su ciò che si osserva al microscopio elettronico nei processi morbosi da noi considerati. In questi non abbiamo ottenuto reperti di particolare rilievo, anche se abbiamo potuto bene studiare la fine morfologia di formazioni citoplasmatiche altrimenti non visibili con il microscopio ottico. Perciò si resta forse delusi di avere osservato solo alterazioni dei componenti cellulari più o meno vistose, ma prive di specificità. Siamo però d'avviso che ulteriori progressi si possano conseguire con le nuove metodiche, che consentono di utilizzare anche per la microscopia elettronica le tecniche di istochimica e l'impiego di enzimi capaci di digerire selettivamente determinate sostanze.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Fisica.

Roma — Istituto di Semeiotica medica dell'Università e Istituto di Radiologia medica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

(1) Palade G. E. - J. exp. Med., 95: 285 (1952).
(2) Sjöstrand F. - Phys. Techn. Res., 3: 341 (1956).
(3) Bernhard W. e Granboulan N. - Symp. Ciba Found.: « Cellular aspects of immunity », 92 (1960).
(4) Watanabe Y. - J. Electron Microscopy, 5: 46 (1957).
(5) Bernhard W., Haguenau F. e Leplus R. - Rev. Hémat., 10: 267 (1955).
(6) Low F. N. e Freeman J. A. - Electron Microscopic Atlas of Normal and Leukemic Human Blood, Mc Graw-Hill Book Comp., New York (1958).
(7) Granboulan N. - Rev. Hémat., 15: 52 (1960).
(8) Yoffey J. M. e Courtice F. C. - Lymphatics Lymph and Lymphoid Tissue - Harvard Univ. Press, Cambridge (1956).
(9) Goodman J. R., Reilly E. B. e Moore R. E. - Blood, 12: 428 (1957).
(10) Folli G. e Onida L. - Atti 61 Congr. Soc. it. Med. II Relaz., 290 (1960).
(11) Di Majorca G. P., Lanzavecchia G. L. e Coultre A. - Rend. Ist. lombardo Sci. Lett., V, 90: 559 (1956).
(12) Frajola W. J., Greider M. H. e Bouroncle B. A. - Ann. New York Acad. Sci., 73: 22 (1958).
(13) Leduc E. H. e Wilson J. W. - J. biophys. biochem. Citology, 6: 427 (1959).
(14) Braunsteiner H., Fellinger K. e Pakesch F. - Blood, 12: 278 (1957).
(15) Rouiller C. e Bernhard W. - J. biophys. biochem. Citol., 2: 355 (1956).
(16) André R., Dreyfus B. e Bessis M. - Présse Med., 63: 967 (1955).
(17) Policard A. e Bessis M. - Exp. Cell Res., 11: 490 (1956).