

58. A. ASCENZI, V. MARINOZZI e DARIA STEVE-BOCCIARELLI. — **Apparecchiatura e tecnica microradiografica per lo studio del tessuto osseo (con particolare riferimento al tessuto osseo spongioso).**

Riassunto. — Vengono descritte le caratteristiche tecniche di una apparecchiatura per ricerche microradiografiche su tessuto osseo.

E' fatto particolare riferimento agli accorgimenti da usare per la preparazione di sezioni di osso spugnoso (normale e patologico) da sottoporre all'indagine microradiografica.

L'esposizione si chiude con una dimostrazione dei primi risultati ottenuti.

Résumé. — Les Auteurs décrivent les caractéristiques techniques d'un appareil destiné aux recherches microradiographiques sur le tissu osseux.

Ils s'entretiennent aussi particulièrement sur les modalités de préparation des sections d'os spongieux (normal et pathologique) à soumettre à l'analyse microradiographique.

Le travail se termine par une démonstration des premiers résultats obtenus.

Summary. — The technical features of an instrument for microradiographic research on bone tissue are described.

Special emphasis is laid on the techniques for preparing sections of spongy bone (normal or pathologic) to be examined microradiographically.

The explanation closes with an illustration of the first results which have been obtained.

Zusammenfassung. — Nachstehend werden die technischen Eigenschaften eines Geräts für mikro-radiographische Forschungen auf dem Knochengewebe beschrieben.

Eine besondere Bezugnahme findet man auf die Vorbereitung von Sezierungen schwammiger Knochen (normaler und pathologischer Art) vor, welche dann einer eingehenden mikro-radiographischen Untersuchung unterzogen werden.

Abschliessend wird eine Veranschaulichung der ersten, bisher erzielten Ergebnisse gebracht.

Le ricerche sulla struttura dei tessuti a mezzo della istoradiografia hanno avuto un notevole incremento in questi ultimi anni. La metodica si è rivelata particolarmente vantaggiosa per gli studi sulla distribuzione dei sali minerali nell'osso.

E' merito di ENGSTRÖM e WEGSTEDT ⁽¹⁾ di aver posto le basi teoriche e pratiche della istoradiografia applicata allo studio del tessuto osseo, utilizzando la radiazione X capace di essere assorbita elettivamente dal calcio e, quindi, dalla sola frazione inorganica. Il metodo permette anche il rilievo quantitativo del calcio.

Il successivo lavoro di AMPRIMO e ENGSTRÖM ⁽²⁾ indica le possibilità di sviluppo della presente metodica e porta un contributo decisivo alle nostre conoscenze sulle modalità generali che presiedono ai processi di apposizione e di riassorbimento del tessuto osseo (primario e secondario).

Questi primi risultati hanno trovato conferma ed ulteriore ampliamento in ricerche sistematiche concernenti sia l'osso normale [AMPRIMO ⁽³⁾, LACROIX ⁽⁴⁾, VINCENT ⁽⁵⁾], che l'osso patologico [ENGELDT ⁽⁶⁾, ENGELDT, ENGSTRÖM e ZETTERSTRÖM ⁽⁷⁾, HOLMSTRAND ⁽⁸⁾].

Anche noi ci siamo recentemente occupati del metodo istoradiografico ed abbiamo tentato di applicarlo allo studio del comportamento dello scheletro nelle emopatie, limitandoci, per ora, ad un'analisi qualitativa.

Lo scopo della presente nota è quello di fornire alcuni ragguagli sugli accorgimenti tecnici da noi seguiti sia nell'allestimento dell'apparecchiatura radiologica, sia nella preparazione del materiale da esaminare.

APPARECCHIATURA RADIOLOGICA.

La sorgente di raggi X era data da un tubo Machlett tipo AEG 50 T, con finestra di berillio dello spessore di circa 1 mm. La tensione da applicarsi al tubo per avere un fascio di raggi X per la massima parte della lunghezza d'onda atta ad assicurare un assorbimento selettivo da parte del Calcio (3,06 Å), fu determinata per tentativi dai risultati ottenuti in varie radiografie fatte con diverse tensioni. Essa sembra essere — se la targa fornita dalla Casa che ha costruito l'alimentazione del tubo è corretta — notevolmente superiore ai 6000 V suggeriti dai vari autori che hanno eseguito analoghe radiografie con lo stesso tipo di tubo. Il tempo di posa, mantenendo la corrente del tubo a 15 mA, variò da 15 a 75 minuti, a seconda dello spessore delle sezioni.

Le lastre usate furono le Kodak spectroscopic plates 548, il cui potere risolutivo è superiore ad 1 micron.

La cameretta nella quale veniva posta la lastra e la sezione di osso

per l'esposizione ai raggi X è riprodotta nelle figure 1 e 2; la fig. 3 rappresenta in sezione la medesima camera e ne dà i particolari costruttivi. La sezione di tessuto osseo veniva tenuta pressata contro la lastra da un sottilissimo strato di cellophan (15 micron), la cui aderenza veniva assicurata da una continua aspirazione dal basso [cf. SHERWOOD ⁽⁹⁾]. Con questo dispositivo la lastra veniva a trovarsi a 53 mm. dalla macchia focale del tubo, la quale ha il diametro di 5 mm. Per uno strato di osso dello spessore di 30-50 micron, l'indefinizione dell'immagine dovuta alle condizioni geometriche non dovrebbe essere superiore a 3-5 micron [ENGSTRÖM e WEGSTEDT ⁽¹⁾]; e, dato che il potere risolutivo della lastra non supera

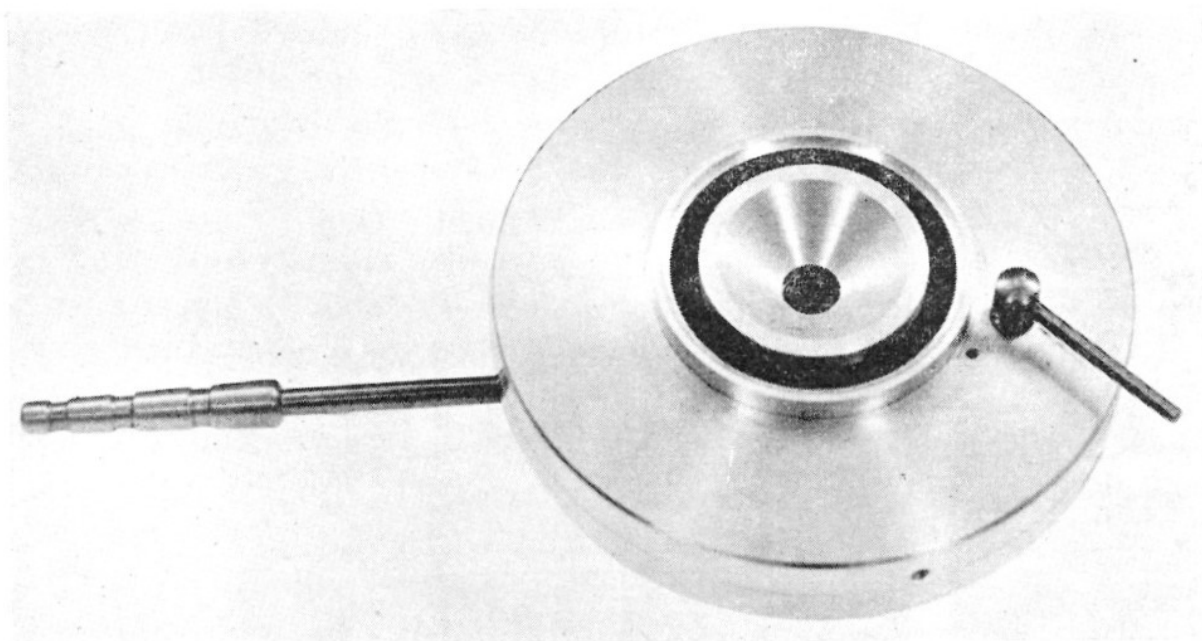


Fig. 1. - Camera microradiografica.

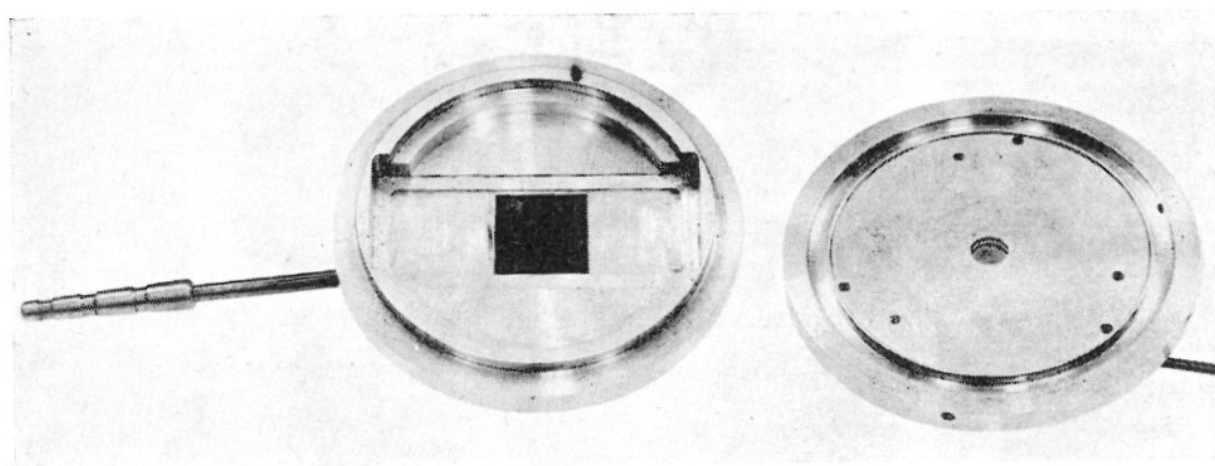


Fig. 2. - Camera microradiografica aperta.

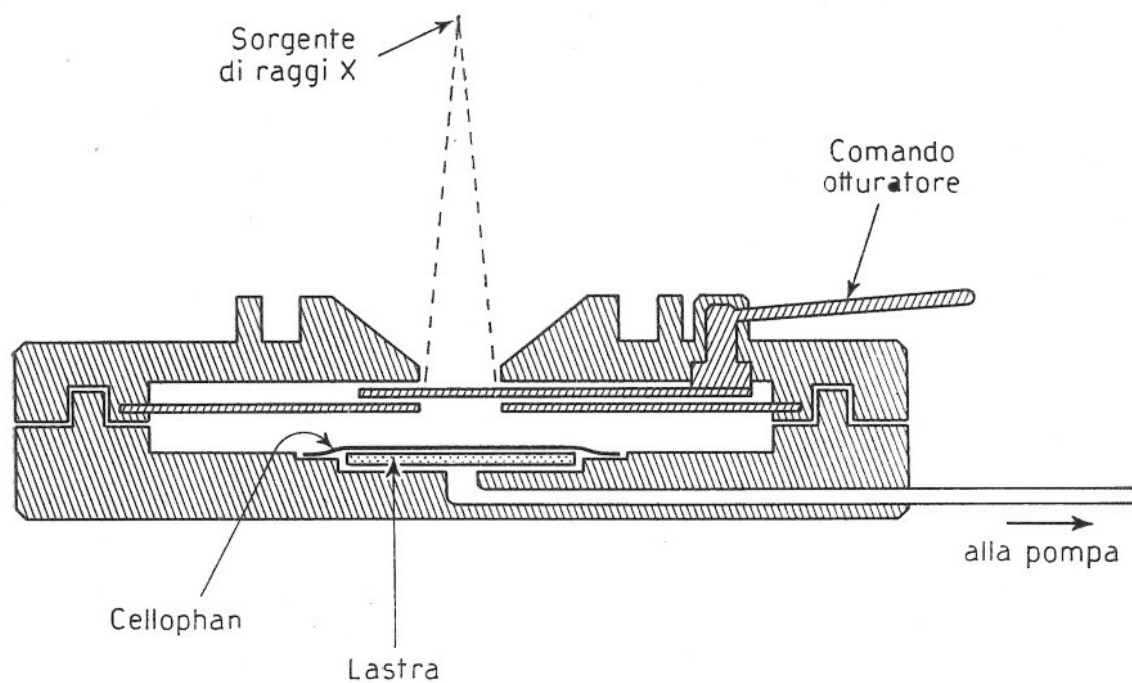


Fig. 3. - Sezione della camera microradiografica con i particolari costruttivi.

il micron, la indefinizione dovrebbe essere quella presentata dalla immagine, se si astrae dalla presenza di radiazione diffusa.

Sulle lastre da noi ottenute infatti si può valutare che sia stato raggiunto un potere risolutivo di almeno 3 micron.

PREPARAZIONE DEL MATERIALE DI STUDIO.

Con questo titolo intendiamo fare riferimento alle modalità tecniche da realizzarsi per l'allestimento delle sezioni.

E' noto che, quando si tratta di osso compatto, la preparazione di sezioni di tessuto intero (non decalcificato) non necessita di trattamenti preliminari. L'osso secco, ovvero previamente fissato in alcool o in formolina, viene segato in tavolette dello spessore di 2-3 mm., quindi sottoposto a progressiva erosione con carta vetrata e polvere di smeriglio, fino a raggiungere lo spessore voluto, cioè di 30-50 μ . Gli accorgimenti da tener presenti sono ben noti e sono stati recentemente perfezionati ad opera di HAMMARLUND-ESSLER (¹⁰).

E' possibile, così, ottenere delle sezioni di spessore costante; condizione questa indispensabile per una esatta valutazione dei reperti istoradiografici; soprattutto quando si intendano eseguire determinazioni quantitative.

Se il materiale di studio è rappresentato da osso spugnoso o da osso

patologico, sede di gravi processi di riassorbimento (osteoporosi) si rende necessario aumentare previamente la compattezza del tessuto per poterne ricavare delle sezioni sottili.

A tal fine si ricorre all'inclusione in resina acrilica e, nella fattispecie, in metacrilato di metile [VINCENT (5)].

Questa operazione preparatoria incontra non lievi difficoltà per la frequenza con la quale si verifica l'inclusione di bolle d'aria nella resina, durante il processo di polimerizzazione. Ne deriva l'inconveniente di una inclusione non omogenea e porotica. Per ovviarlo sono stati escogitati vari espedienti tra i quali ricorderemo l'apparecchiatura proposta da JOWSEY (11).

Abbiamo potuto renderci conto che tali espedienti, talora alquanto complessi, non sono necessari quando vengano tenuti presenti alcuni particolari accorgimenti.

Le prime fasi della tecnica da noi impiegata, salvo pochissime varianti, sono conformi a quelle proposte da VINCENT (5). I frammenti di osso spugnoso, dello spessore di 3-4 mm., prelevati da materiale fissato in formalina o in alcool a 70°, erano accuratamente disidratati attraverso la *serie degli alcool* e quindi passati per 2-3 ore in *cloroformio* e, successivamente, in *toluolo*. Il successivo passaggio in *metacrilato di metile* (*monomero*) era protratto per circa 12 ore, cambiando la sostanza almeno due volte. Dopo permanenza di qualche ora in *metacrilato di metile* con 1% di *benzoin-perossido*, i frammenti venivano posti in una capsulina di vetro contenente *metacrilato di metile prepolimerizzato*, in misura sufficiente a ricoprirli completamente. La capsula era lasciata per 5-12 ore a temperatura ambiente prima di completare la polimerizzazione.

Questa è la fase più delicata della preparazione in quanto lo sviluppo delle bolle non è prevedibile, nè controllabile. I migliori risultati li abbiamo ottenuti ponendo le capsuline su una superficie calda (a 40-45°) dopo averle coperte con una lastra di vetro. Ciò si otteneva, in pratica, mettendo le capsule sul piano di una stufa termostatica ad acqua, regolata a 45-48°.

Con questo sistema siamo riusciti ad ottenere ottime inclusioni sia di osso spugnoso svuotato del midollo osseo, sia di osso spugnoso completo di tutti i tessuti molli (cfr. fig. 4), come poteva esigere la natura delle nostre ricerche. Infatti dovendo trattare materiale patologico, si voleva evitare che manipolazioni traumatizzanti come quelle comunemente impiegate per la rimozione del midollo, potessero recar danno ad eventuali zone del frammento osseo che non fossero completamente calcificate.

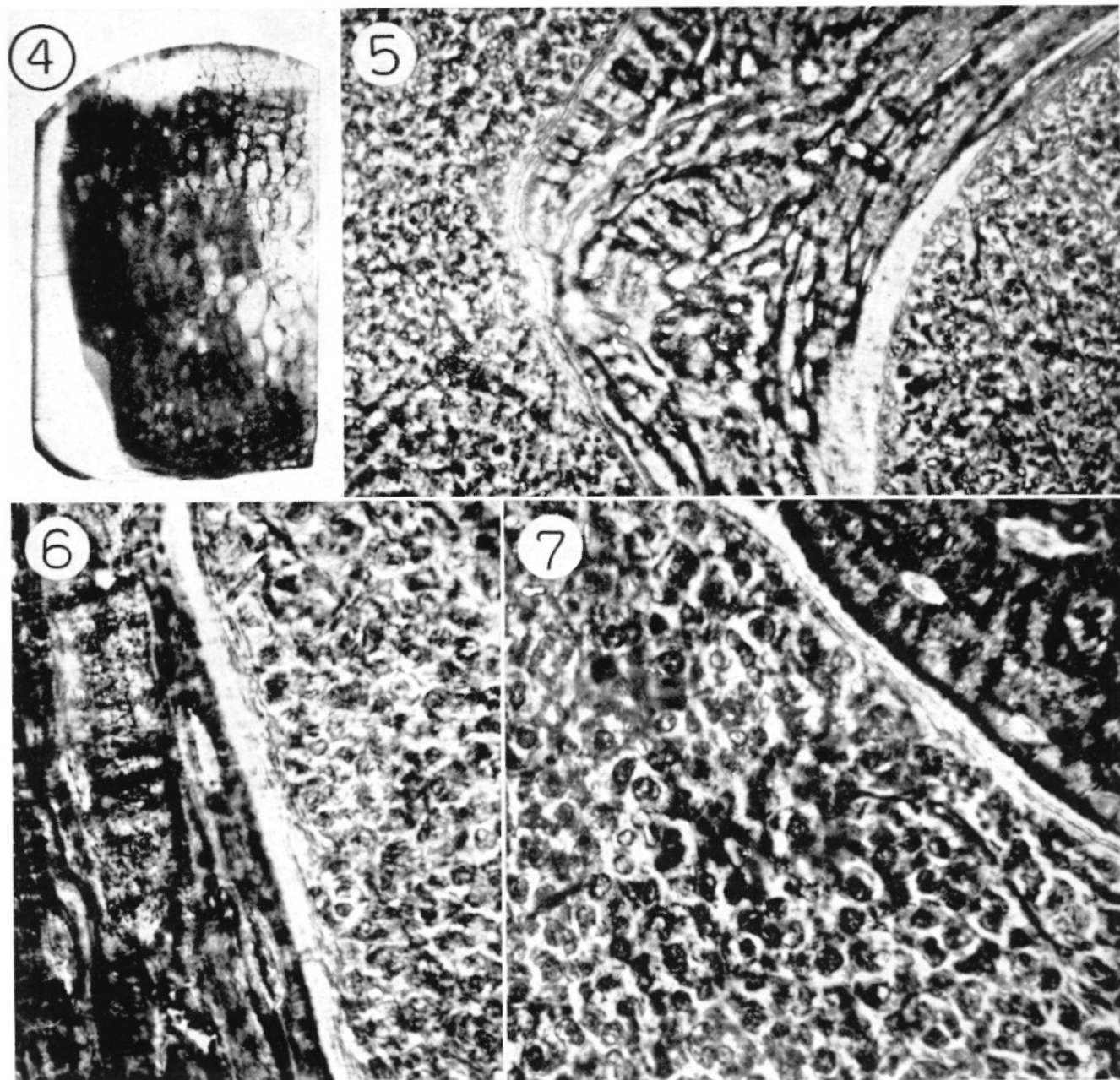


Fig. 4. - Tassello di osso spugnoso (completo di midollo) incluso in metacrilato di metile. Ingr. 4 $\times$.

Fig. 5. - Tessuto spugnoso di corpo vertebrale. Trabecola ossea circondata da elementi midollari. Ingr. 170 $\times$.

Fig. 6. - Tessuto osseo spugnoso. Trabecola con midollo adiacente. Ingr. 480 $\times$.

Fig. 7. - Midollo osseo con segmento di trabecola. L'aspetto non omogeneo del tessuto midollare, in alcuni punti, è da riferire a difetti di polimerizzazione del metacrilato. Ingr. 480 $\times$.

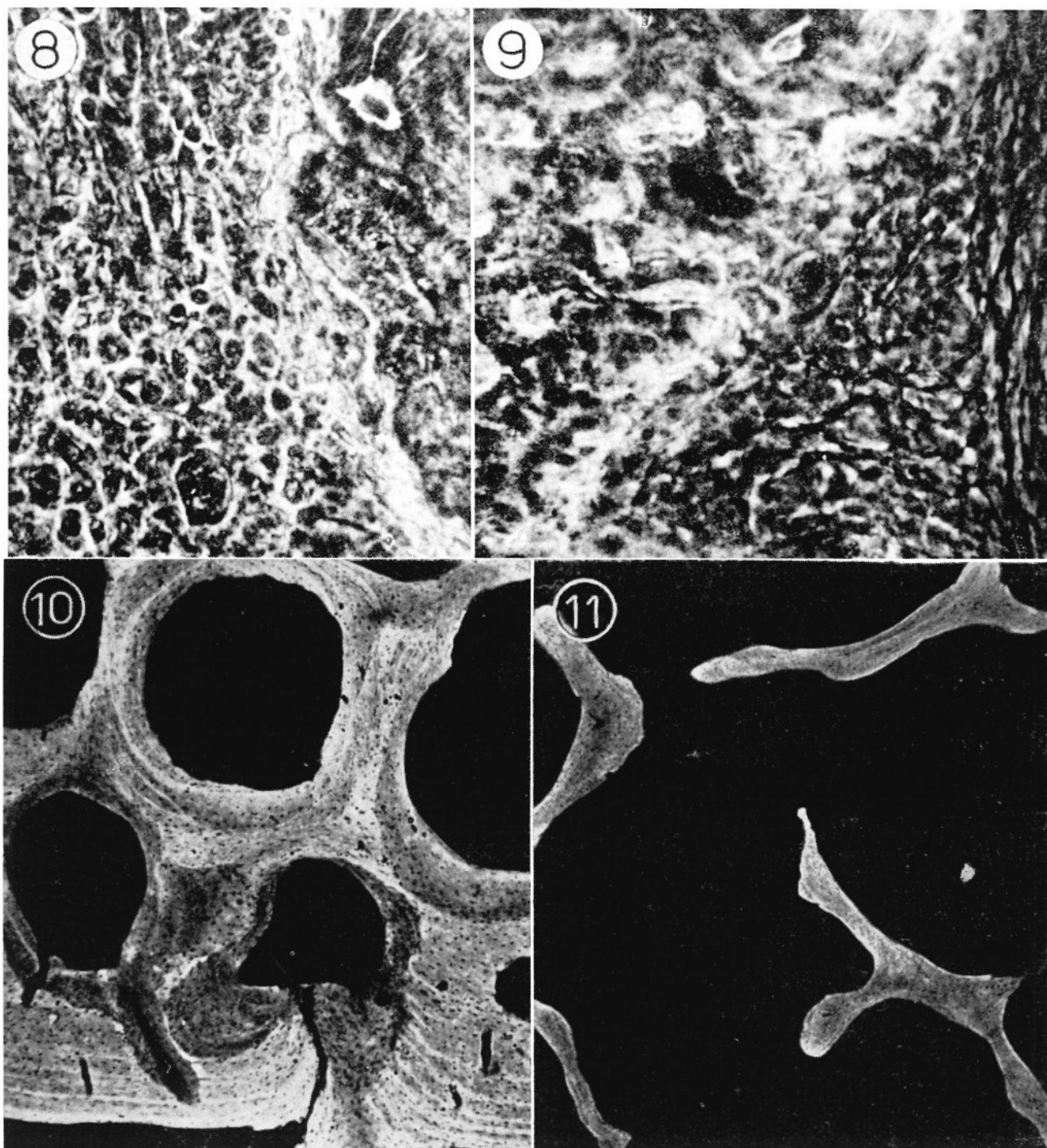


Fig. 8. - Nel midollo osseo interposto fra due trabecole ossee si riconosce una grossa cellula verosimilmente interpretabile come un megacariocito. Ingr. 480 $\times$.

Fig. 9. - Morbo di Recklinghausen. In prossimità di una trabecola osteide si riconosce bene la struttura fibrosa del midollo. Ingr. 480 $\times$.

Fig. 10. - Microradiogramma. Ingr. 100 $\times$. Spiegazione nel testo.

Fig. 11. - Microradiogramma. Ingr. 31 $\times$. Spiegazione nel testo.

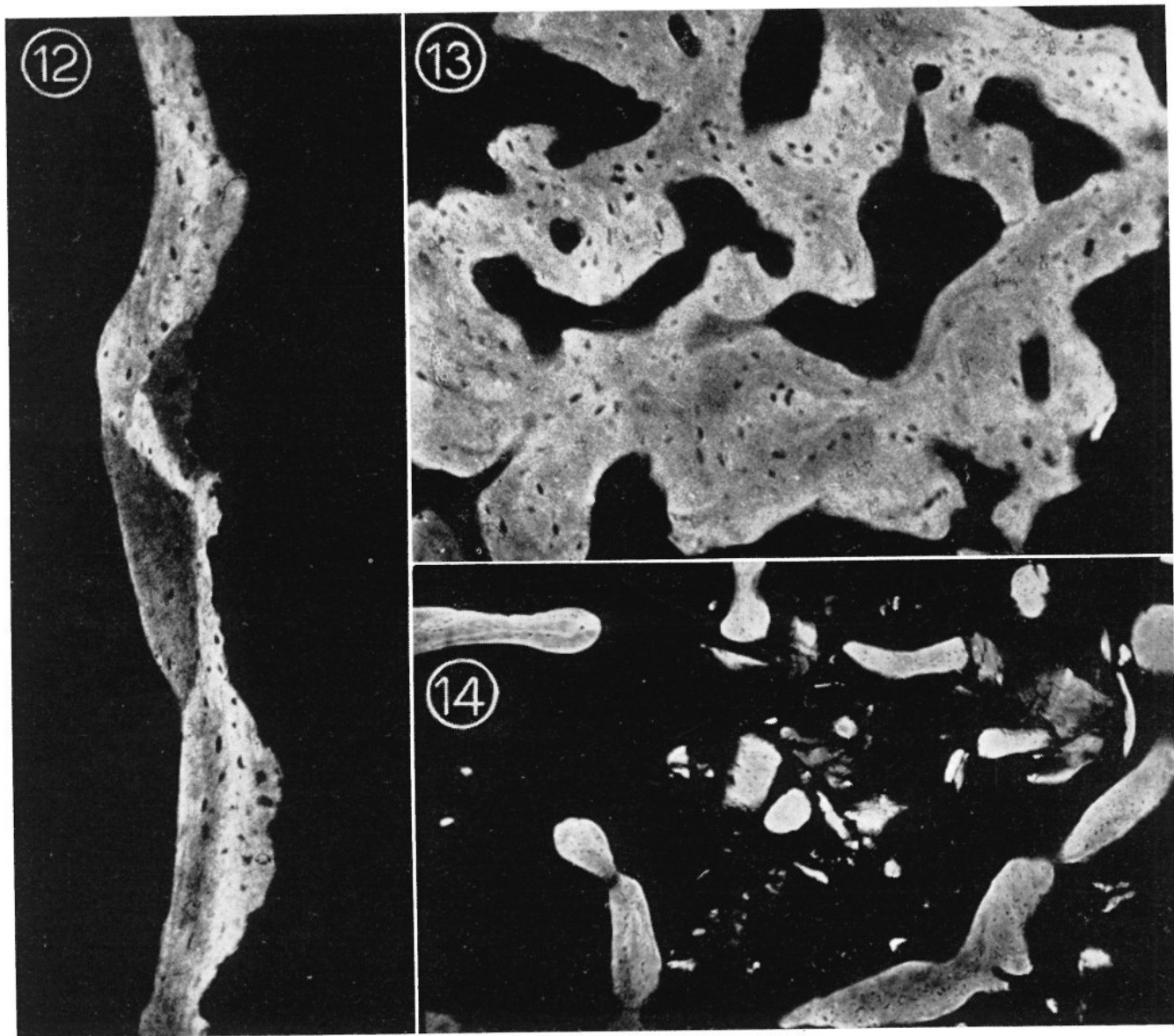


Fig. 12. - Microradiogramma. Ingr. $107 \times$. Spiegazione nel testo.

Fig. 13. - Microradiogramma. Ingr. $107 \times$. Spiegazione nel testo.

Fig. 14. - Microradiogramma. Ingr. $37 \times$. Spiegazione nel testo.

Durante la permanenza della capsula sulla stufa si produce una opacizzazione della lastra che la ricopre come per condensazione, sulla stessa, dei vapori del metacrilato. In qualche caso il fenomeno dà origine alla formazione di gocce che, successivamente, ricadono nella capsula. Questa evenienza, però, non comporta alcuna seria conseguenza.

Dopo 12-24 ore il metacrilato è completamente polimerizzato negli strati profondi ma, in superficie, può residuare un sottilissimo strato liquido. Può anche avvenire che il metacrilato, durante la polimerizzazione, subisca una tale contrazione che la parte superficiale del frammento rimanga scoperta. In tal caso bisogna aggiungere qualche goccia del prepolimero.

La polimerizzazione veniva completata *dentro* la stufa a 45-48°.

Una volta avvenuta la polimerizzazione i frammenti venivano distaccati dalle capsule dopo che queste erano state poste per qualche minuto in acqua fredda (con aggiunta di ghiaccio).

Dopo aver tolto l'eccesso di metacrilato mediante una comune sega da traforo, si procedeva ad una grossolana limatura delle due superfici, in maniera da orientare definitivamente il pezzo.

Durante questa operazione la posizione del pezzo può essere utilemente controllata immergendo l'inclusione in *xilolo*.

I frammenti, così preparati ed attaccati su una lastra di vetro con balsamo, venivano ulteriormente assottigliati fino allo spessore voluto, mediante erosione con polveri abrasive.

L'operazione deve essere compiuta su ambedue le superfici in modo che la sezione che ne residua corrisponda allo strato medio del frammento osseo. Questo accorgimento riveste la massima importanza quando si debbano impiegare frammenti di osso spugnoso « in toto » (comprendente, cioè, anche il midollo) al fine di evitare gli artefatti connessi con la penetrazione, negli strati superficiali del midollo, delle piccole schegge ossee prodotte dalla sega durante il prelievo del frammento.

Crediamo opportuno segnalare i buoni risultati che abbiamo conseguito con l'osservazione in *contrasto di fase* di sezioni così preparate e montate in balsamo del Canada. L'idea ci era stata suggerita dalla possibilità offertaci, dalla metodica da noi realizzata, di ottenere sezioni nelle quali i rapporti osteo-midollari sono perfettamente conservati.

Diamo nelle figure 5, 6, 7, 8, 9 alcuni saggi dei risultati ottenuti. Come si vede essi consentono chiari ed utili ragguagli sulle relazioni intercedenti fra le trabecole ossee e gli elementi midollari.

Vorremmo ancora aggiungere che la presente tecnica lascia intravedere la possibilità di ulteriori sviluppi nei riguardi di indagini combinate con il microscopio elettronico.

RISULTATI.

Ci limitiamo, per ora ad una esemplificazione dei risultati ottenuti, presentando la documentazione illustrativa di alcune tra le numerose microradiografie eseguite. Queste fanno essenzialmente riferimento al tessuto osseo trabecolare (normale e patologico) finora poco studiato e del quale intendiamo occuparci nel corso delle nostre prossime ricerche.

La fig. 10 corrisponde al microradiogramma di una sezione degli strati più interni di una calotta cranica pertinente ad un caso di anemia mediterranea. Risalta evidente la struttura lamellare del tessuto, propria dell'osso secondario. Come è regola in questo tipo di osso (cfr. AMPRINO e ENGSTRÖM), la calcificazione delle lamelle di recente apposizione non si verifica in un sol tempo, ma evolve per gradi. Quindi i segmenti più trasparenti del microradiogramma (di tonalità più scura) sono quelli di recente formazione, mentre quelli più opachi (di tonalità biancastra o bianco-grigiastra) corrispondono a zone di deposizione più antica.

Nella fig. 11 è riportato il microradiogramma di una sezione di tessuto spugnoso prelevato da un corpo vertebrale. Anche qui è riconoscibile la struttura lamellare.

L'istoradiogramma riportato in fig. 12 vuole dimostrare le vicissitudini di una trabecola ossea in un caso di leucemia. A due tratti di recente apposizione lungo i margini, rispettivamente, destro e sinistro fa riscontro lungo il versante inferiore del margine destro una erosione del tutto irregolare dell'osso, quivi fortemente calcificato. Trattasi di un segmento in cui l'osso sta subendo un processo di riassorbimento. E' noto che l'indagine microradiografica ha rivelato come al livello istologico la distruzione della frazione minerale si verifichi in maniera netta (non per gradi, cioè non per alisteresi) insieme alla matrice osseinica.

La fig. 13 corrisponde all'istoradiogramma di una sezione di osso in preda ad osteomielosclerosi. Gli spazi midollari risultano estremamente ridotti per la presenza di tessuto osseo con i caratteri dell'osso primario. Questo si riconosce, oltre che per l'assenza di qualsiasi struttura lamellare, per l'aspetto varicoso e l'irregolare distribuzione degli osteociti e, soprattutto, per l'aspetto omogeneo della calcificazione. Risulta infatti acquisito che l'osso primario non calcifica per gradi, come quello secondario, ma assume immediatamente la quantità massimale dei sali di calcio.

Con la fig. 14 s'intende mettere in risalto gli artefatti tecnici ai quali si può andare incontro quando, lavorando su ossa spugnose dalle quali non è stato rimosso il midollo, la sezione da sottoporre all'inda-

gine microradiografica, corrisponde ad una delle superfici del frammento dal quale si è ricavata la sezione stessa. In tale evenienza piccole scheggie di osso isolate a seguito del procedimento di segatura, vengono ad incastonarsi nel midollo. Così nella figura, accanto a trabecole normalmente configurate, si vedono gli spazi midollari abbondantemente ricolmi di frammenti delle dimensioni più varie.

RINGRAZIAMENTO - Sentiamo il dovere di porgere alla Prof.ssa NELLA MORTARA l'espressione della nostra più viva riconoscenza per la preziosa collaborazione prestataci nell'allestimento dei microradiogrammi.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Fisica e Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ENGSTRÖM A. e WEGSTEDT L. - Acta radiol., Stockh., 35: 343 (1957).
 - (²) AMPRINO R. e ENGSTRÖM A. - Acta anat., 45: 1 (1952).
 - (³) AMPRINO R. - Z. Zellforsch., 37: 144 (1952).
 - (⁴) LACROIX P.: *The histological remodelling of adult bone. An autoradiographic study*, in « Bone structure and metabolism », Ciba Found. Symposium - Churchill Ed., London, 1956.
 - (⁵) VINCENT J.: *Recherches sur la constitution de l'os adulte*; (Thèse de l'Université de Louvain). - Arscia Ed., Bruxelles, 1953.
 - (⁶) ENFELDT B. - Cancer, 7: 813 (1954).
 - (⁷) ENFELDT B., ENGSTRÖM A. e ZETTERSTRÖM R. - J. Bone & Joint Surg., 36-B: 634 (1954).
 - (⁸) HOLMSTRAND K. - Acta orthop. scand., Suppl. N. XXVI, (1957).
 - (⁹) SHERWOOD H. F. - Rev. sci. Instrum., 18: 80 (1947).
 - (¹⁰) HAMMARLUND-ESSLER E. - Acta odontol. scand., 13: 167 (1955).
 - (¹¹) JOWSEY J. - J. sci. Instrum., 32: 159 (1955).
-