

13. V. CASORATI, C. SILVAGNI e D. STEVE-BOCCIARELLI. — **Ultrastruttura del muscolo della corda vocale di cavia.**

Riassunto. — Nel presente lavoro si studia al microscopio elettronico il muscolo vocale di cavia al fine di rendersi ragione delle caratteristiche strutturali di questo muscolo dotato di una attività del tutto particolare. L'elevato numero di mitocondri disposti anche in catene e provvisti di molte cristalline, il reticolo sarcoplasmatico di Sjöstrand largamente rappresentato, i sarcomeri brevi (circa 1,4 micron) e la presenza nel sarcolemma di un ricco sistema caveolo-vescicolare fanno riscontrare nel muscolo vocale le caratteristiche morfologiche di muscolo rapido dotato di una attività metabolica notevolmente elevata.

Summary. — The structure of the muscle of the guinea pig vocal cord was studied at the electron microscope, in order to relate its morphology to the peculiar activity of this organ. The observed characteristics in this kind of muscle, that is, many mitochondria, often in serial disposition, an abundant sarcoplasmic reticulum, short sarcomeres (about 1,4 micron) and a sarcolemma provided with a system of vesicles and caveola, clearly correspond to that of a high frequency muscle having a very high metabolic activity.

E' noto che la fibrocellula muscolare consta di una parte contrattile e di una non contrattile. La prima è rappresentata da miofibrille costituite da miofilamenti primari e secondari che si alternano con costante regolarità dando luogo a quel complesso di bande e strie esaurientemente descritto da HUXLEY ⁽¹⁾ e BENNETT ⁽²⁾.

Viene chiamato sarcomero il segmento della miofibrilla compreso fra due bande zeta: la sua lunghezza varia nei diversi muscoli striati secondo le necessità funzionali dei medesimi. I muscoli atti a contrarsi frequentemente (muscoli rapidi), come quelli delle ali degli insetti ⁽³⁾, hanno sarcomeri lunghi da uno a due micron mentre i muscoli lenti presentano sarcomeri lunghi anche dieci-quindici micron. Nella contrazione, infatti il muscolo si accorcia in ragione inversa alla lunghezza dei sarcomeri che lo compongono (dal 4% nei muscoli rapidi al 40% nei muscoli lenti).

I miofilamenti, al microscopio elettronico, si differenziano in spessi (120 Å) o primari e sottili (60-70 Å) o secondari: i primi distano tra loro

circa 300 Å, fra gli altri invece vi è un intervallo di circa 200 Å. In sezioni trasversali ciascun miofilamento primario appare circondato da 6 miofilamenti secondari ⁽¹⁾.

La parte non contrattile o sarcoplasma è costituita dalla matrice sarcoplasmatica, dai mitocondri, dal reticolo sarcoplasmatico di Sjöstrand o sistema tubulare, dai corpi lipidici sarcoplasmatici e dall'apparato del Golgi.

Secondo BENNETT ⁽⁴⁾ la matrice sarcoplasmatica è un fluido acquoso nel quale sono disciolte proteine solubili come miogeno e mioglobina e nel quale si riconoscono formazioni rotondeggianti di grandezza variabile da 10 a 100 Å rapportabili a granuli di glicogeno.

I mitocondri disposti fra le miofibrille possono avere forma rotondeggiante od ovalare; nel loro interno sono disposte in numero variabile cristelle che, nella parte terminale, contraggono intimi rapporti con la membrana mitocondriale. Talvolta i mitocondri sono isolati, talvolta riuniti in catene lunghe anche 15-20 micron. Variano in numero e dimensioni nei differenti muscoli; nei muscoli rapidi, ad esempio, essi sono più numerosi, più grandi e più ricchi di cristelle che nei muscoli lenti. Si deve comunque tener conto che immagini, ad un esame superficiale, riferite ad un solo mitocondrio molto grande (anche 5 micron di lunghezza) si sono rivelate, ad un attento esame condotto su sezioni seriate, come appartenenti a più elementi mitocondriali strettamente ravvicinati ⁽⁵⁾. I mitocondri sono generalmente ritenuti la sede di accumulo del glicogeno e la sede dei processi biochimici di recupero.

Il sistema sarcotubulare di Sjöstrand, disposto lungo le miofibrille, rappresenta l'elemento di trasporto dell'impulso nervoso tra la placca motrice e le miofibrille stesse.

L'apparato del Golgi, nelle cellule muscolari, è largamente rappresentato. Esso è prevalentemente disposto, come di consueto, in corrispondenza dei poli nucleari e sembra che non contragga rapporti con il sistema sarcotubulare.

Il sarcolemma — membrana che riveste la fibrocellula muscolare striata — è costituito da una limitante esterna ed una limitante interna. La limitante esterna, a decorso piuttosto regolare, presenta brevi interruzioni o stomi: a contatto del versante che guarda lo spazio intercellulare si osserva costantemente uno strato granulare piuttosto denso riferibile alla membrana basale. La limitante interna, invece, non è disposta come una membrana cilindroidale liscia, ma presenta, di tanto in tanto, tunnels o invaginazioni, per lo più poco profonde, chiamate « caveole intracellulari » ⁽⁶⁻¹¹⁾. Adese al versante intracellulare della limitante interna e sparse nel citoplasma si trovano formazioni circolari o ellittiche, a pareti sottili, a contenuto amorfo, della grandezza di circa 400-500 Å: tali elementi,

Abbreviazioni nelle didascalie delle figure

M	=	Mitocondri	RS	=	Reticolo sarcoplasmatico
C	=	Caveole	Mi	=	Miofilamenti
V	=	Vescicole	Z	=	Linea Z
Nu	=	Nucleo	N	=	Linea N
No	=	Nucleolo	Mn	=	Membrana nucleare
Pc	=	Picciolo della vescicola	Si	=	Spazio intercellulare
Sa	=	Sarcolemma	Gr	=	Granuli di Glicogeno
Li	=	Limitante interna	Mf	=	Miofibrille
Le	=	Limitante esterna	Sr	=	Sarcomero
MB	=	Membrana basale	Fi	=	Fibra collagene
Cr	=	Criste	S	=	Stomi

Fig. 1. — Aspetto generale di una sezione longitudinale del fascio muscolare: si individuano numerose miofibrille (Mf), catene mitocondriali e mitocondri isolati (M). 5.000 x.

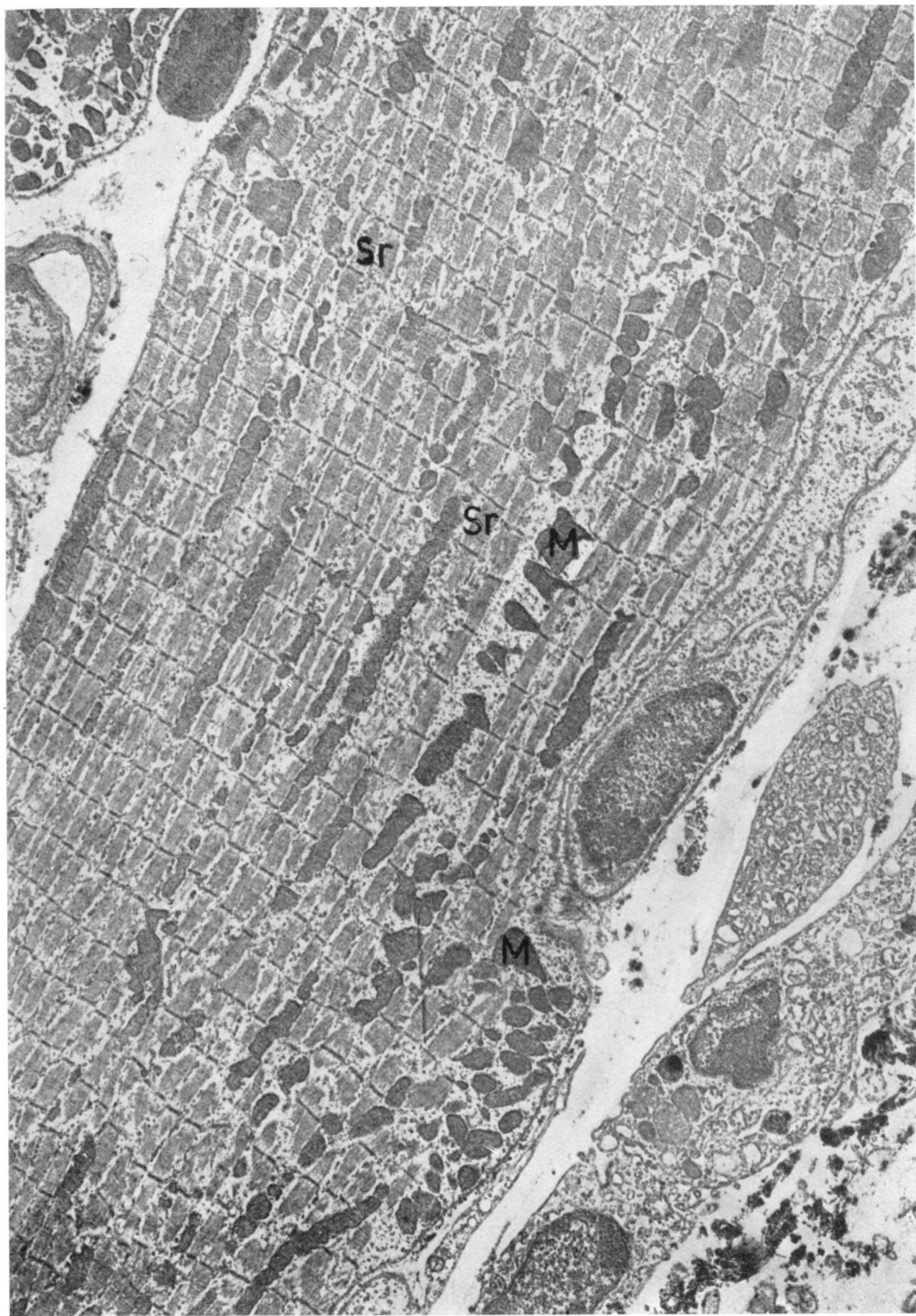


Fig. 2. — Con migliore definizione appaiono distinti i numerosi mitocondri e tra le fibrille l'abbondante reticolo sarcoplasmatico. 16.000 x.

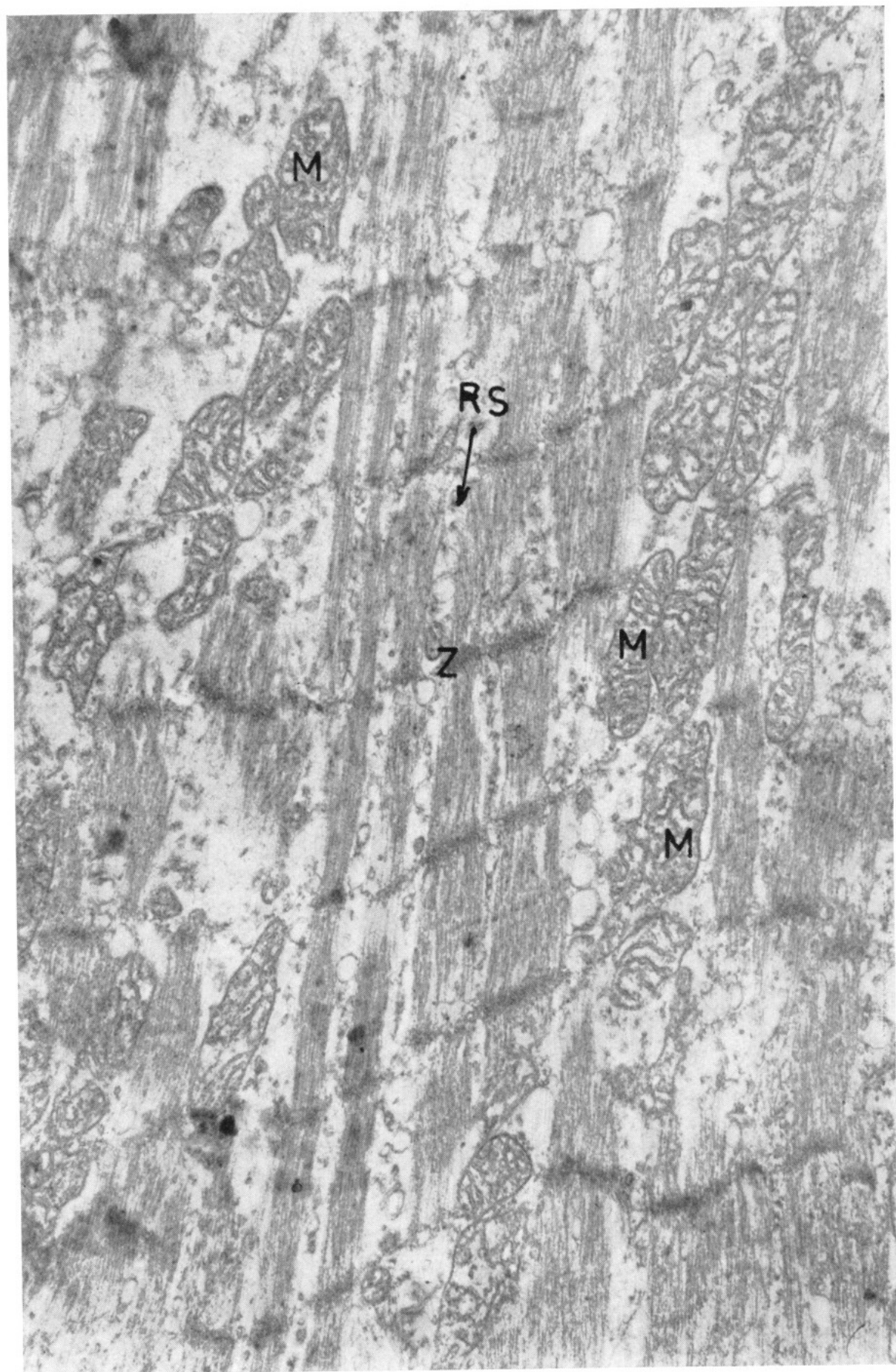


Fig. 3. — A forte ingrandimento appare il sistema di tubuli che costituisce il reticolo sarcoplasmatico (RS). 40.000 x.

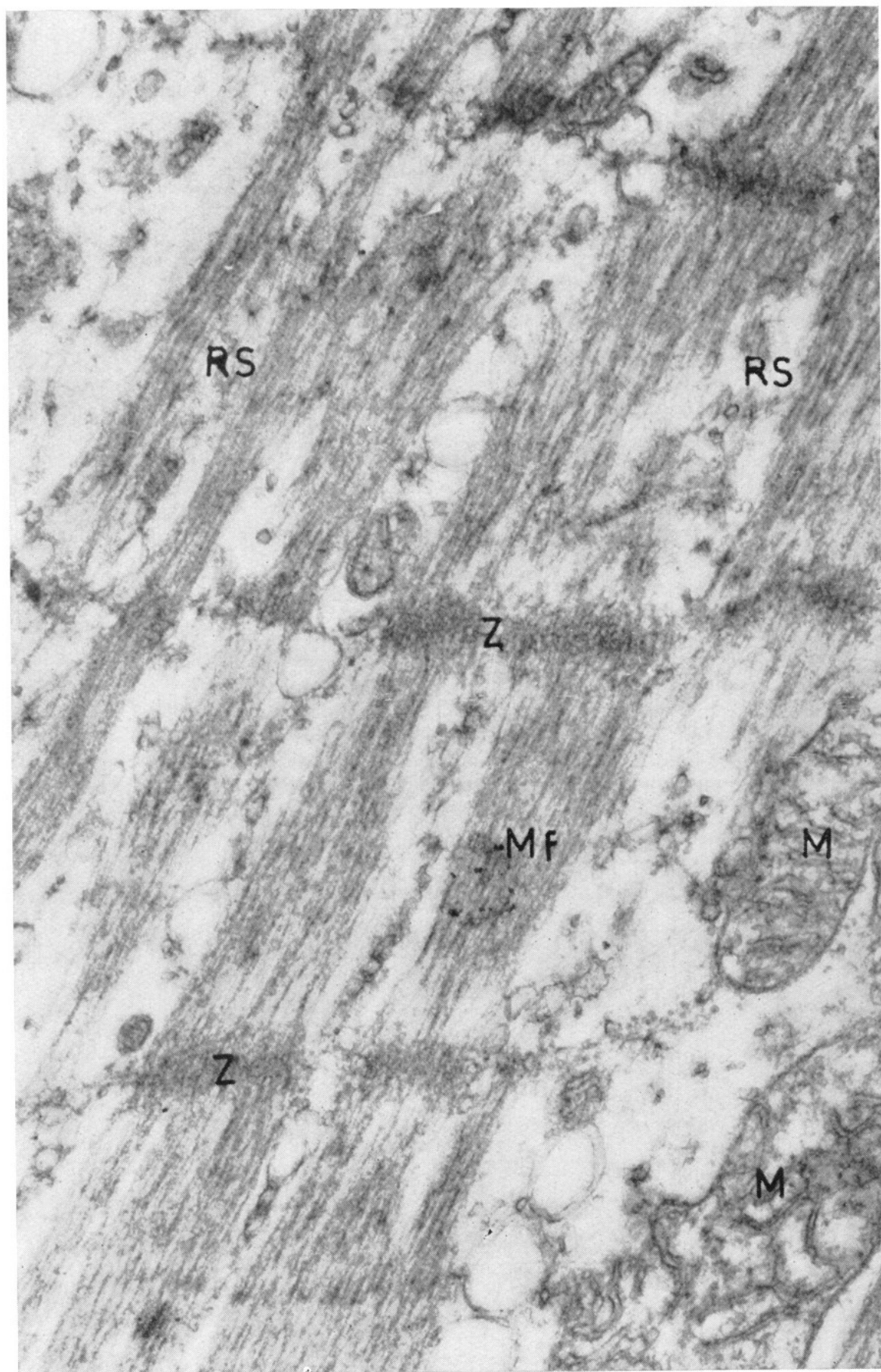


Fig. 4. — A fortissimo ingrandimento è possibile distinguere l'alternanza, nella composizione della singola miofibrilla, di miofilamenti primari o spessi e secondari o sottili. 80.000 x.

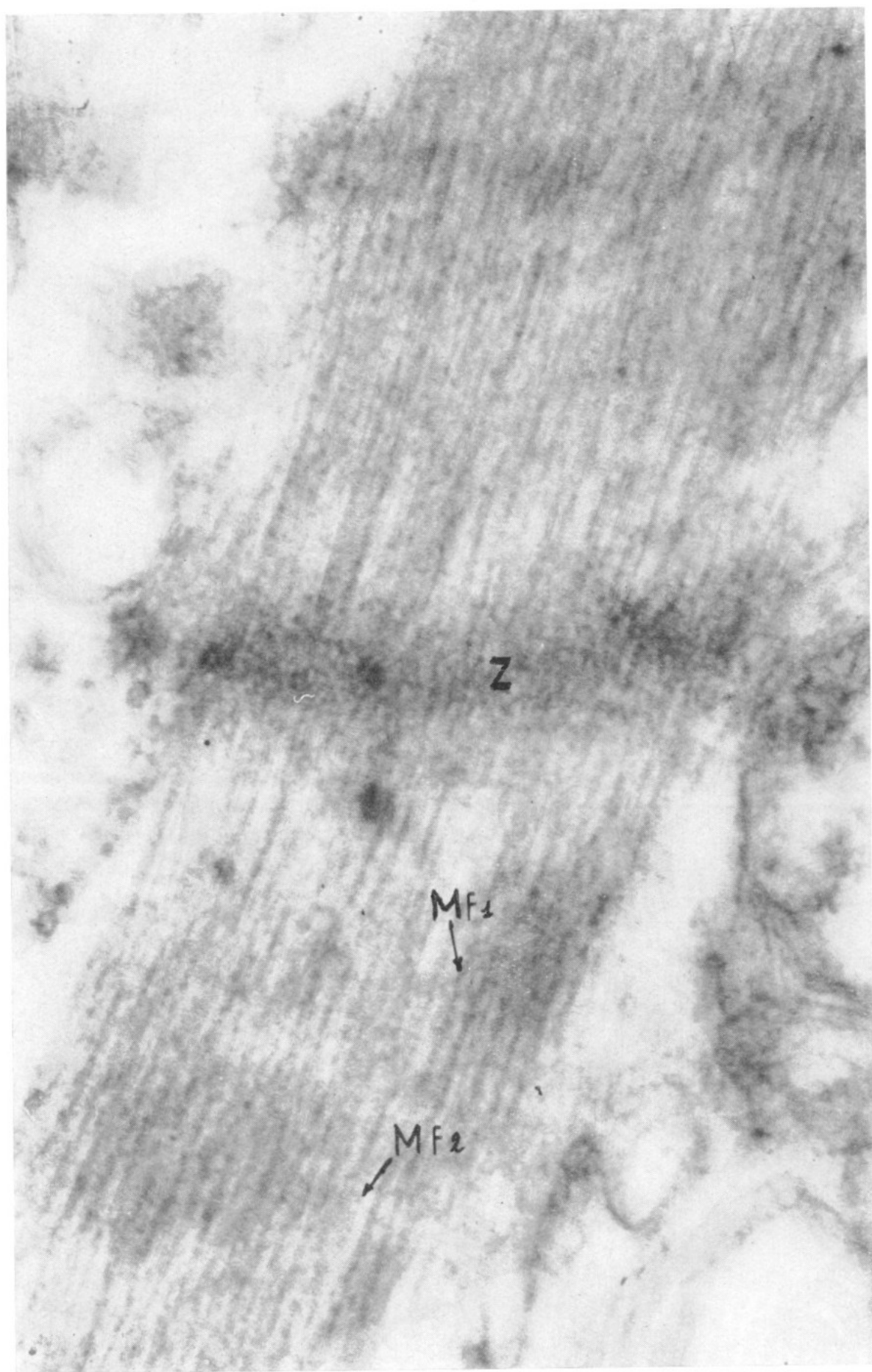


Fig. 5. — Come la figura precedente: l'alternanza dei miofilamenti appare qui meno chiara essendo la sezione leggermente obliqua; il muscolo è completamente rilassato. 40.000 x.

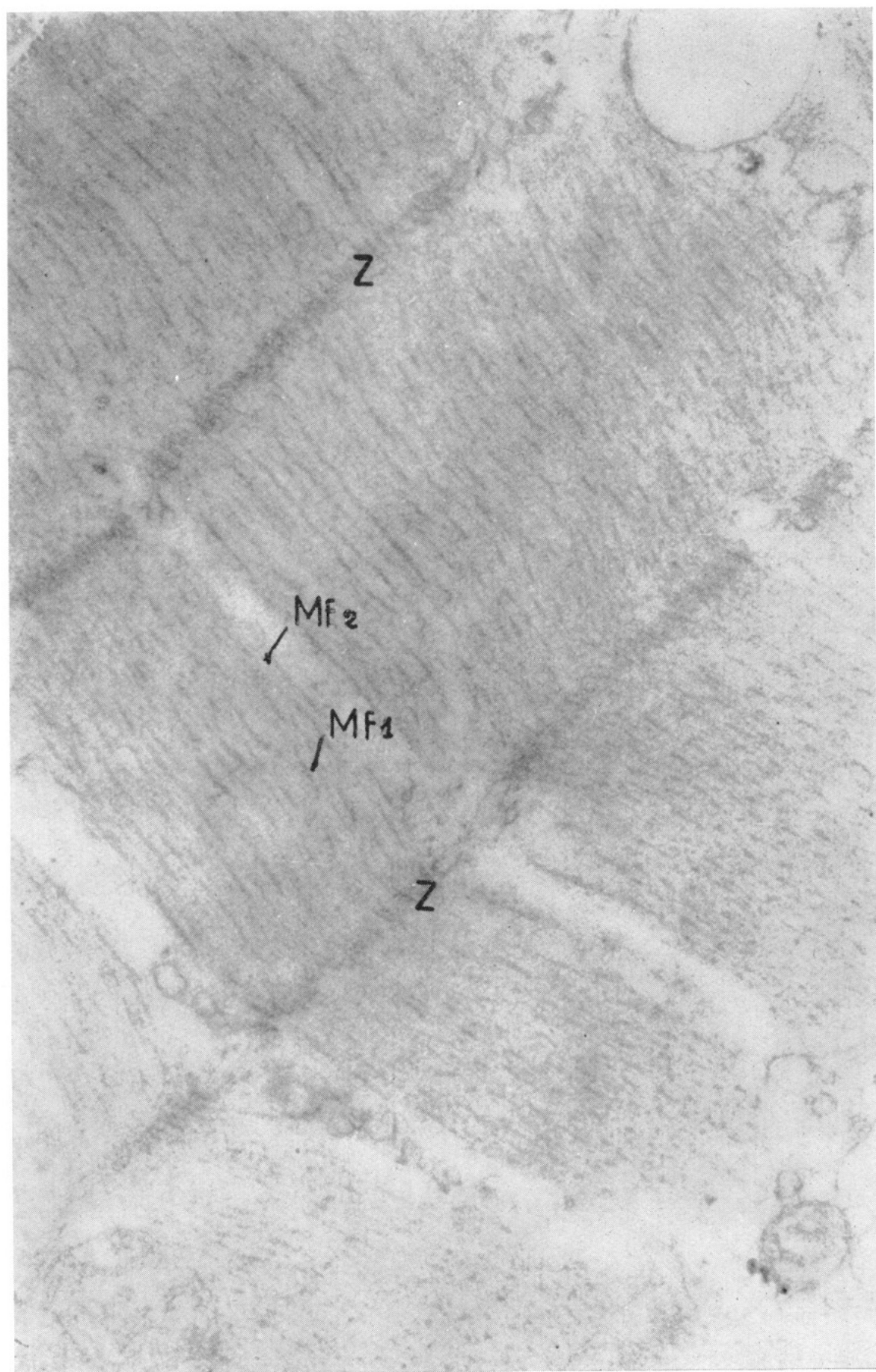


Fig. 6. — In prossimità delle bande Z si individua, ma appena accennata, la banda N: detta banda è qui evidente, il che mostra che il muscolo è contratto. 40.000 x.

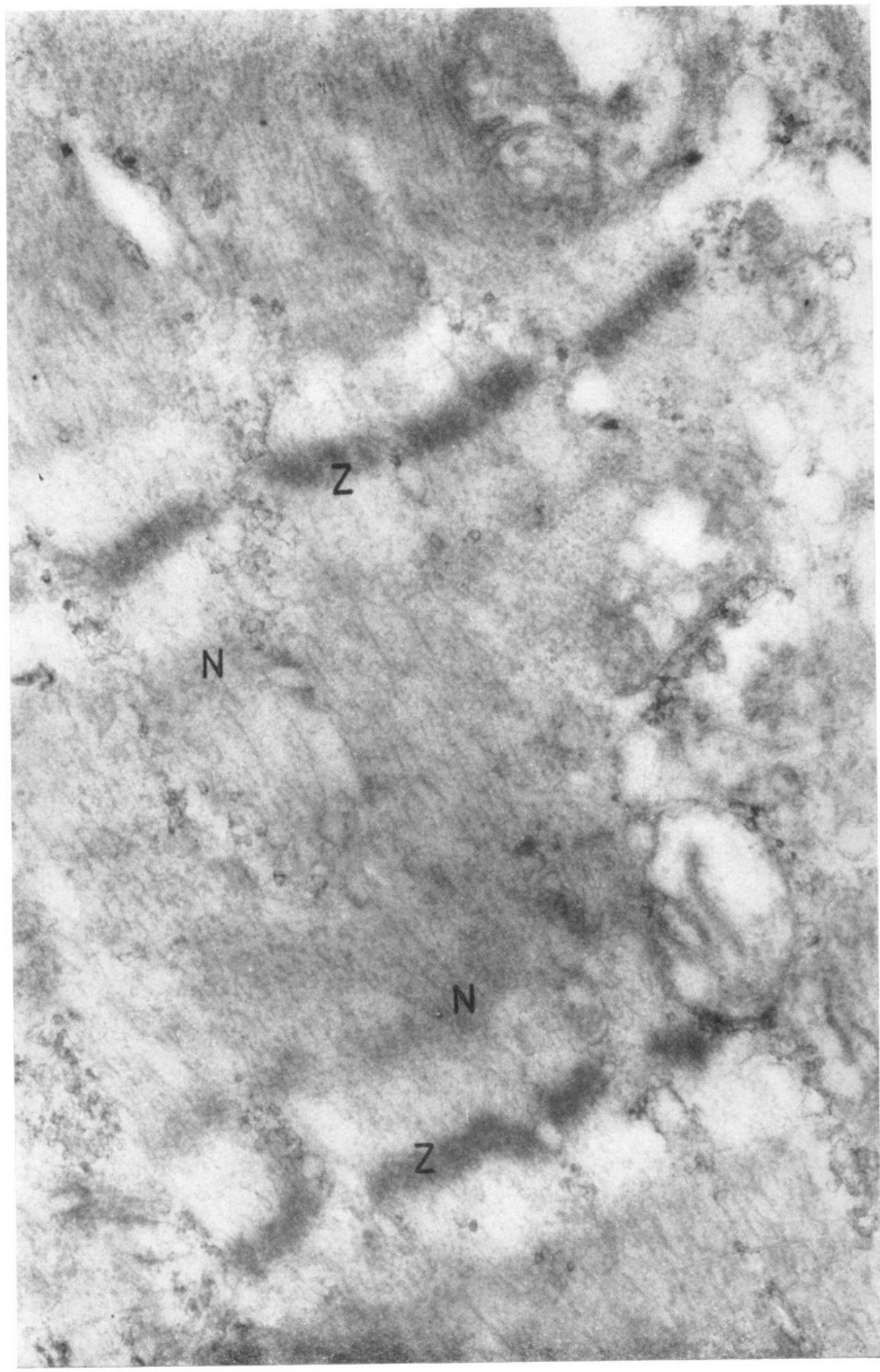


Fig. 7. — Gruppi di mitocondri (M): essi hanno forma rotondeggiante, ovalare o allungata. 40.000 x.

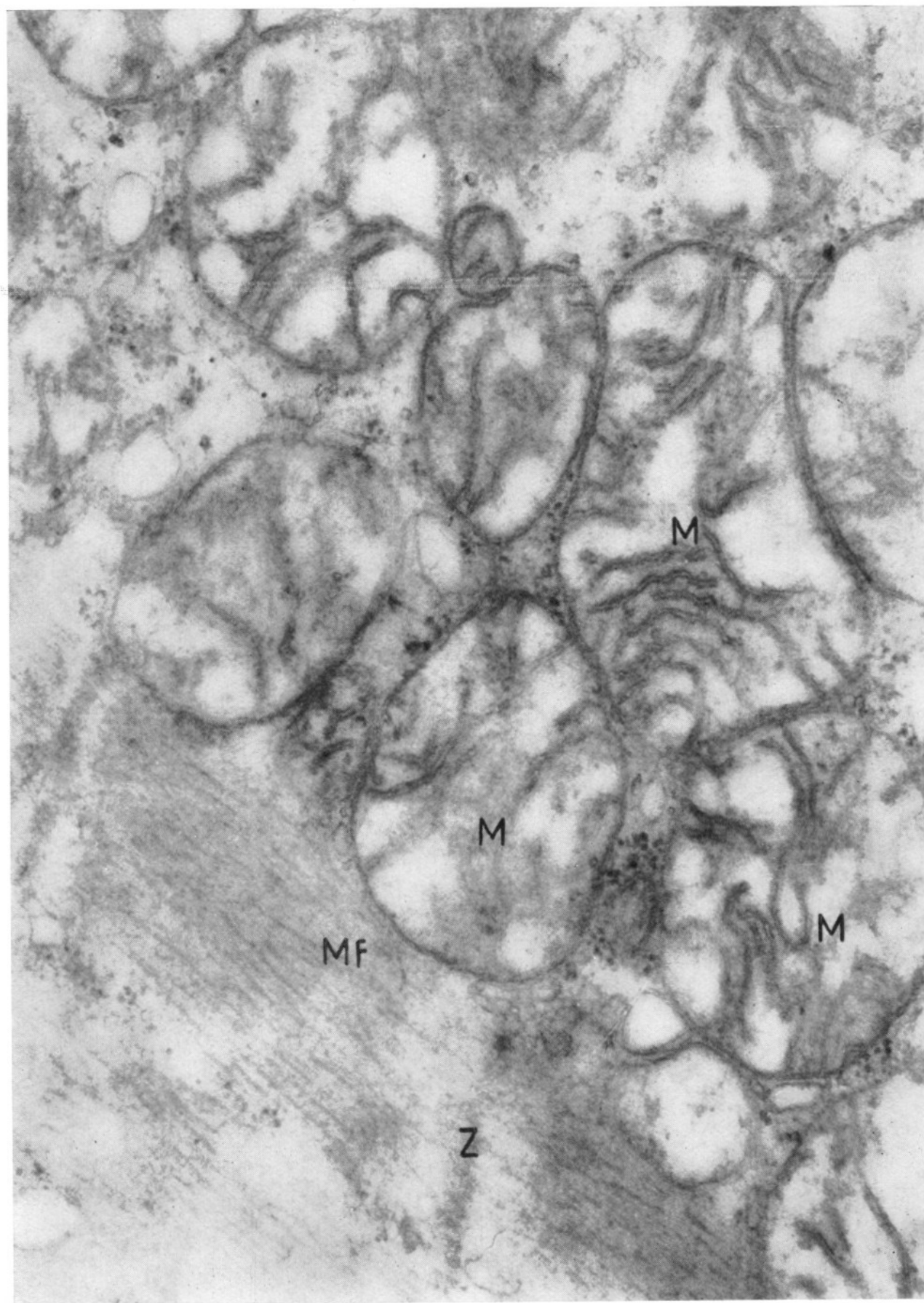


Fig. 8. — Serie di mitocondri tra le miofibrille. 40.000 x.

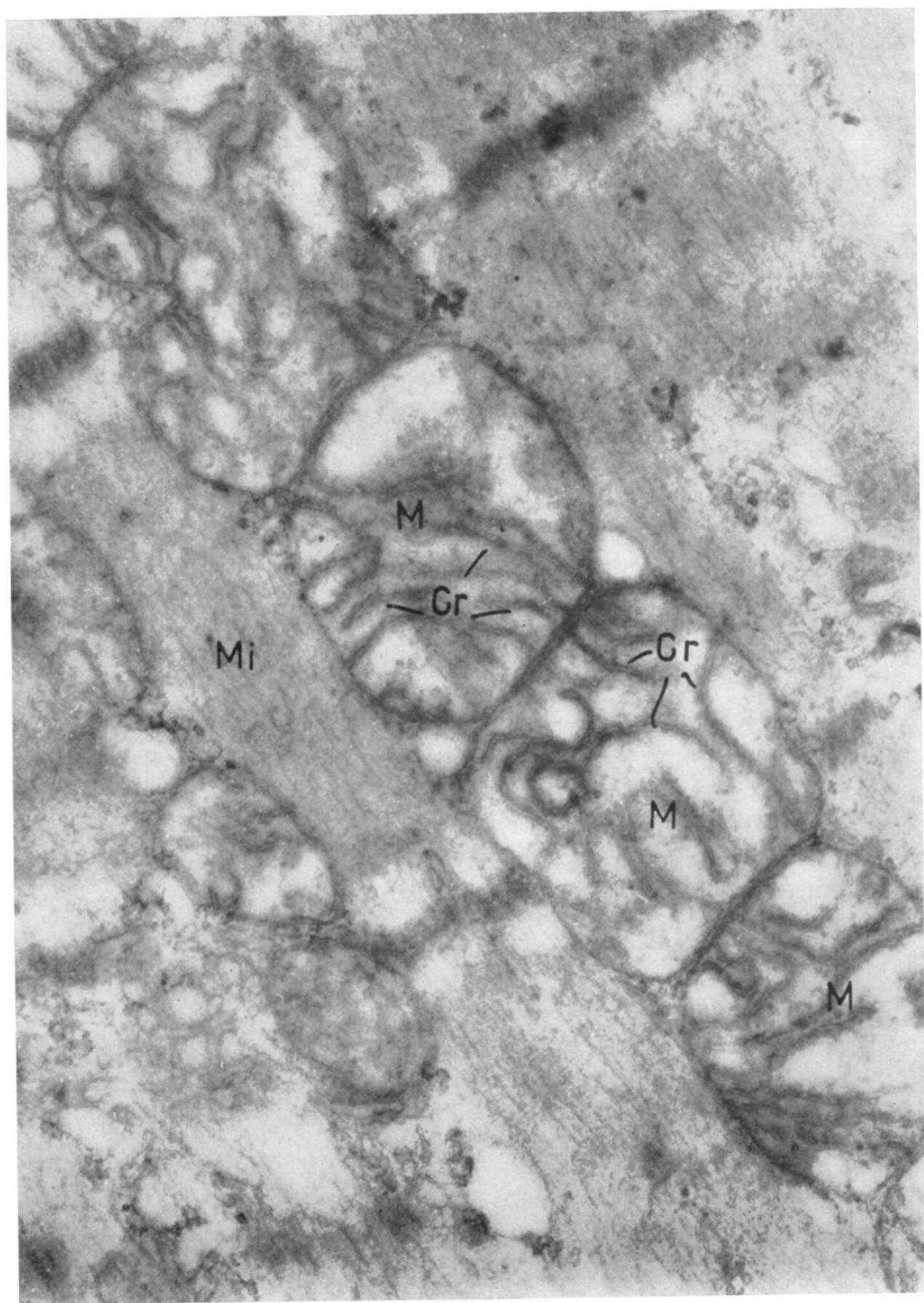


Fig. 9. — Mitocondri che, in lunghezza, sembrano occupare lo spazio compreso fra 6-7 sarcomeri e un grosso nucleo (Nu) con relativo nucleolo (No). 16.000 x.

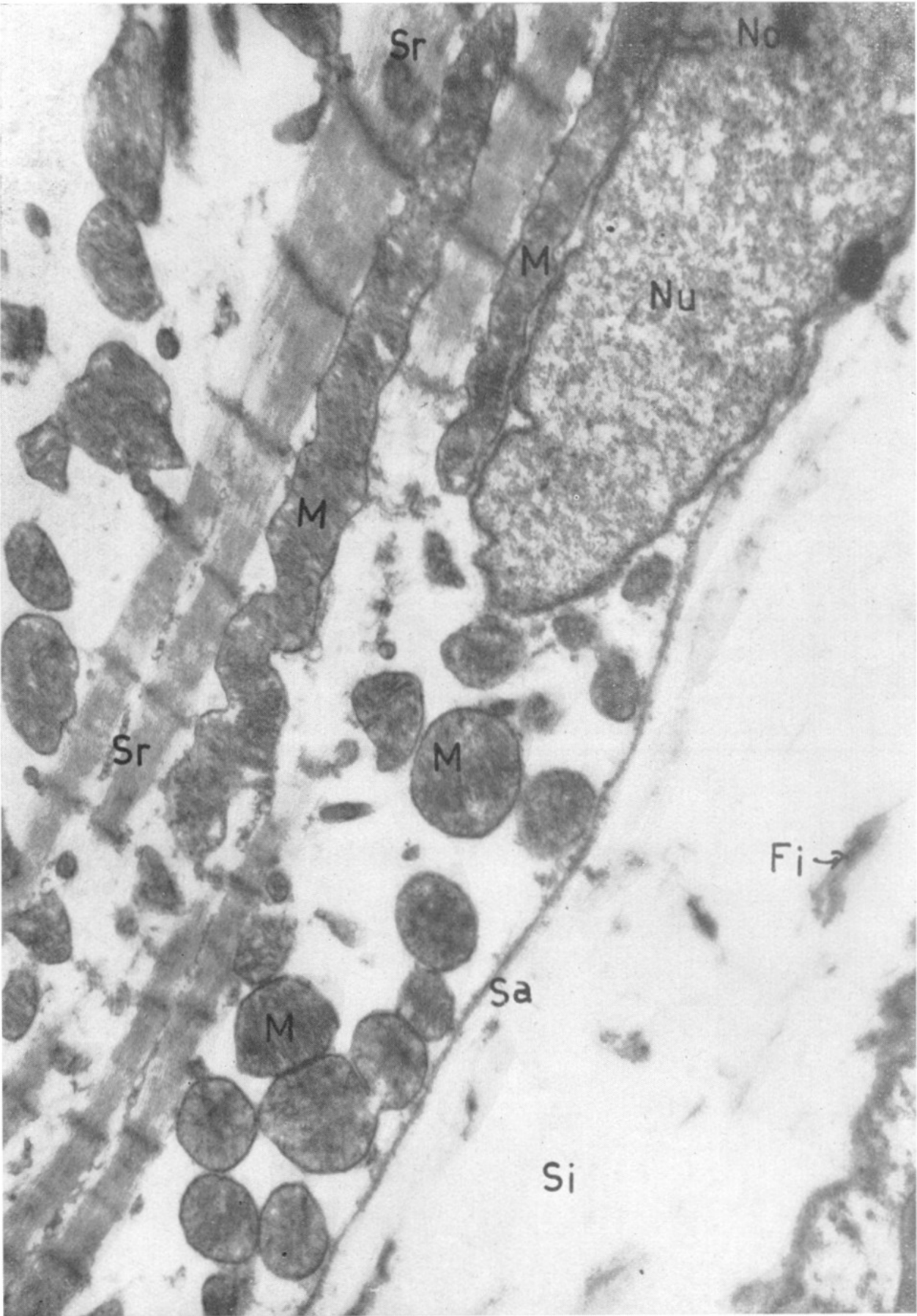


Fig. 10. — Le criste (Cr) sono numerose: Il mitocondrio qui rappresentato (fig. 9) ne mostra circa 20. Le criste contraggono rapporti, nella loro parte terminale, con la membrana mitocondriale. Sul sarcolemma numerose vescicole e caveole (C). 40.000 x.

V. CASORATI, C. SILVAGNI, D. STEVE-BOCCIARELLI - Ultrastruttura del muscolo della corda vocale di cavia.

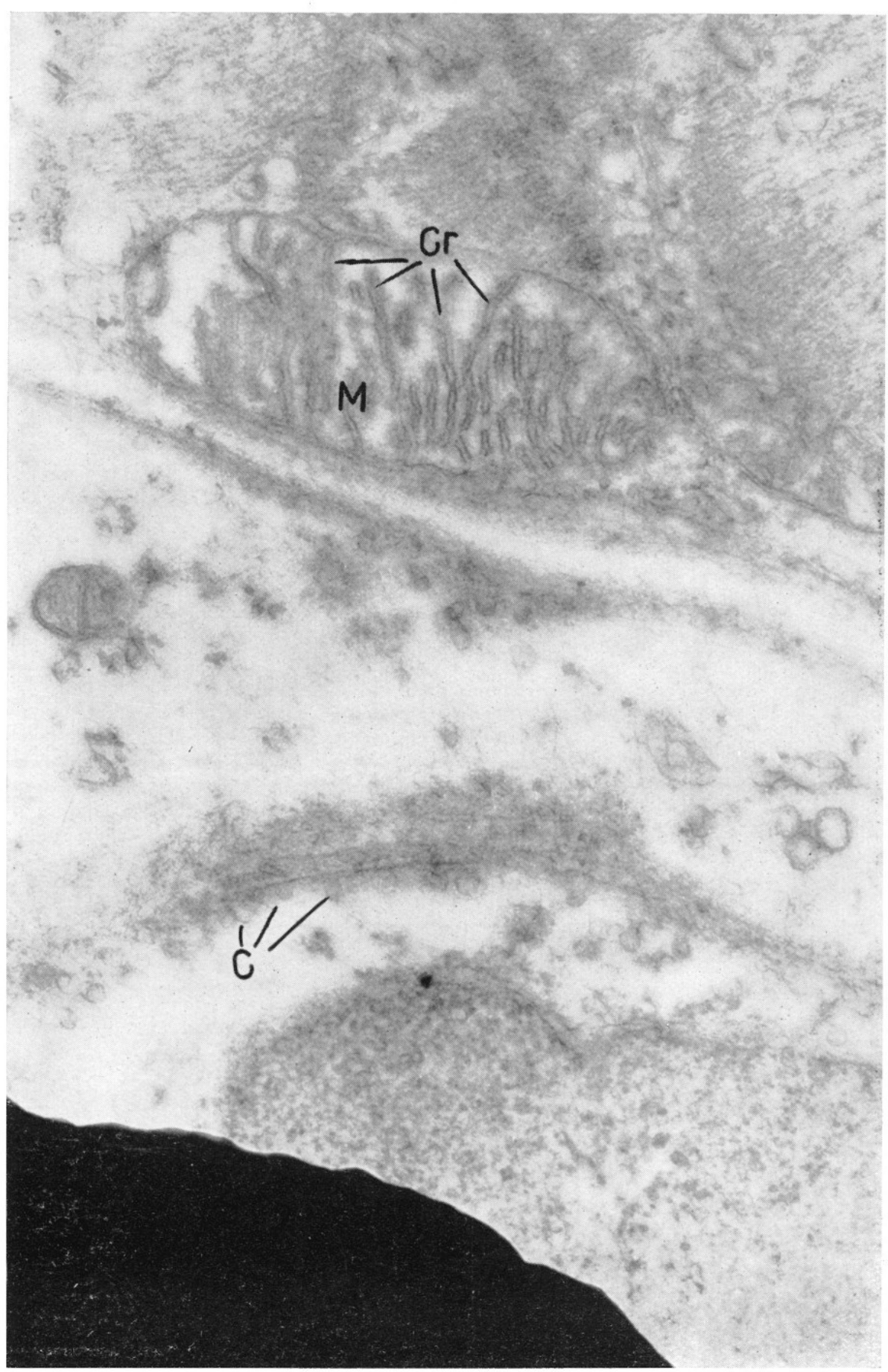


Fig. 11. — Aggregati di mitocondri, anch'essi provvisti di numerose criste e in prossimità di essi numerosi granuli (Gr), forse addensamenti di glicogeno. 40.000 x.

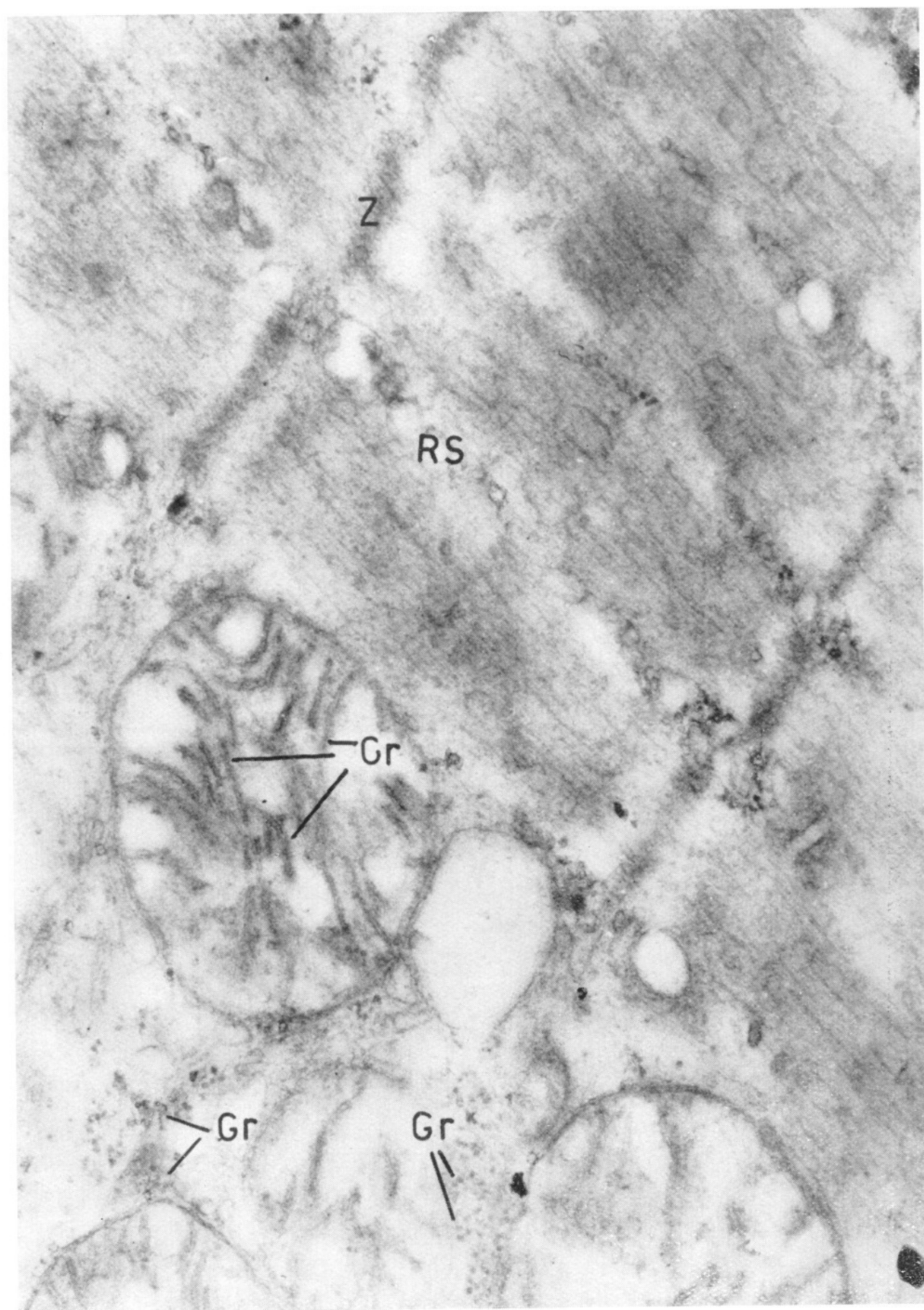


Fig. 12. — E' qui chiaramente dimostrata la struttura del sarcolemma (Sa). (Li) limitante interna, (Le) limitante esterna, separate da uno spazio chiaro dello spessore circa doppio delle precedenti. Una fibra collagena Fi aderisce alla limitante esterna. 80.000 x.

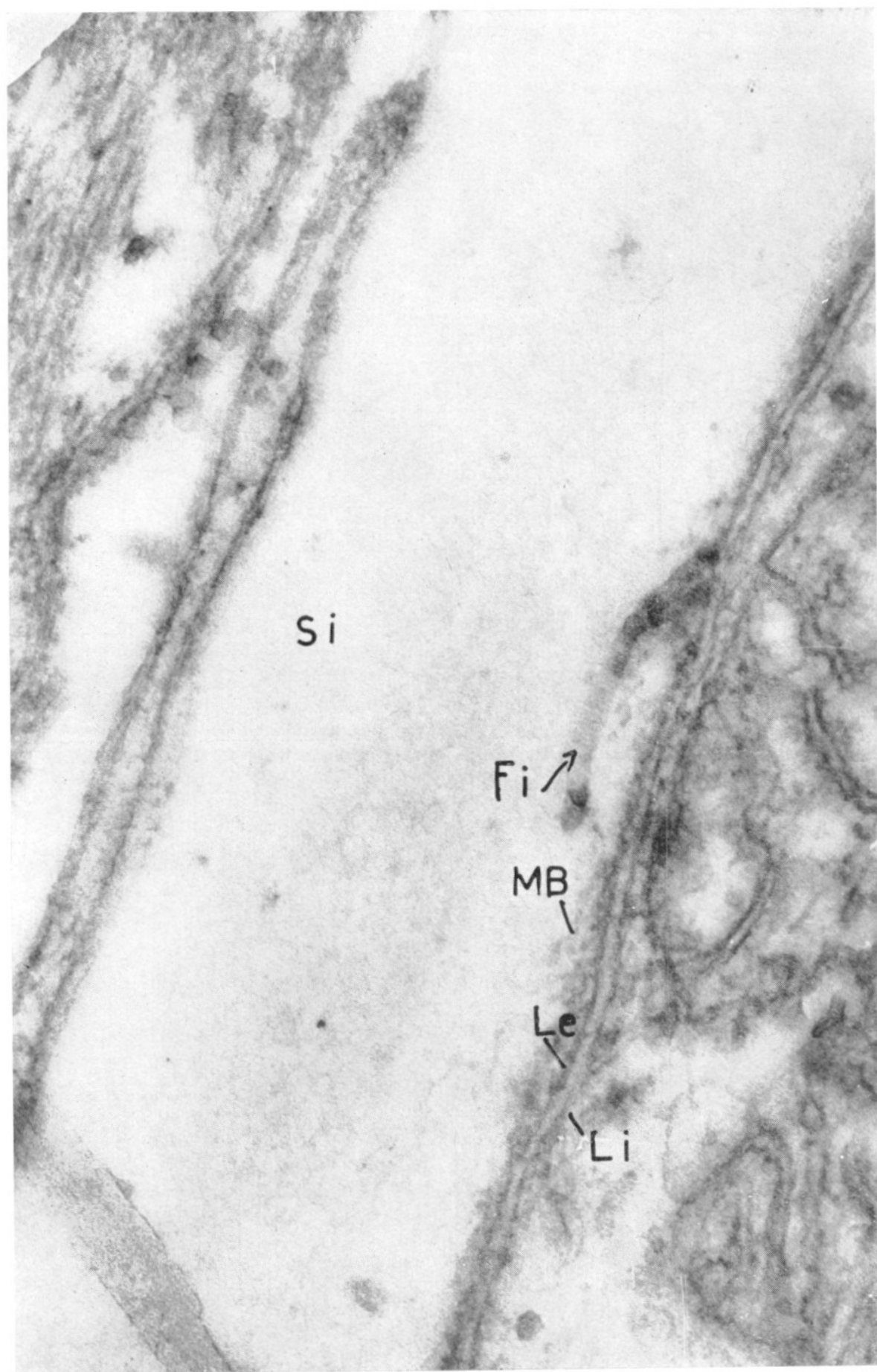


Fig. 13. — Come si può qui chiaramente osservare, il versante della limitante interna (Li) che guarda lo spazio intercellulare (Si) è ricoperta costantemente da uno strato similgranulare rappresentante la membrana basale. Sono qui chiaramente visibili numerose caveole (C). 40.000 x.

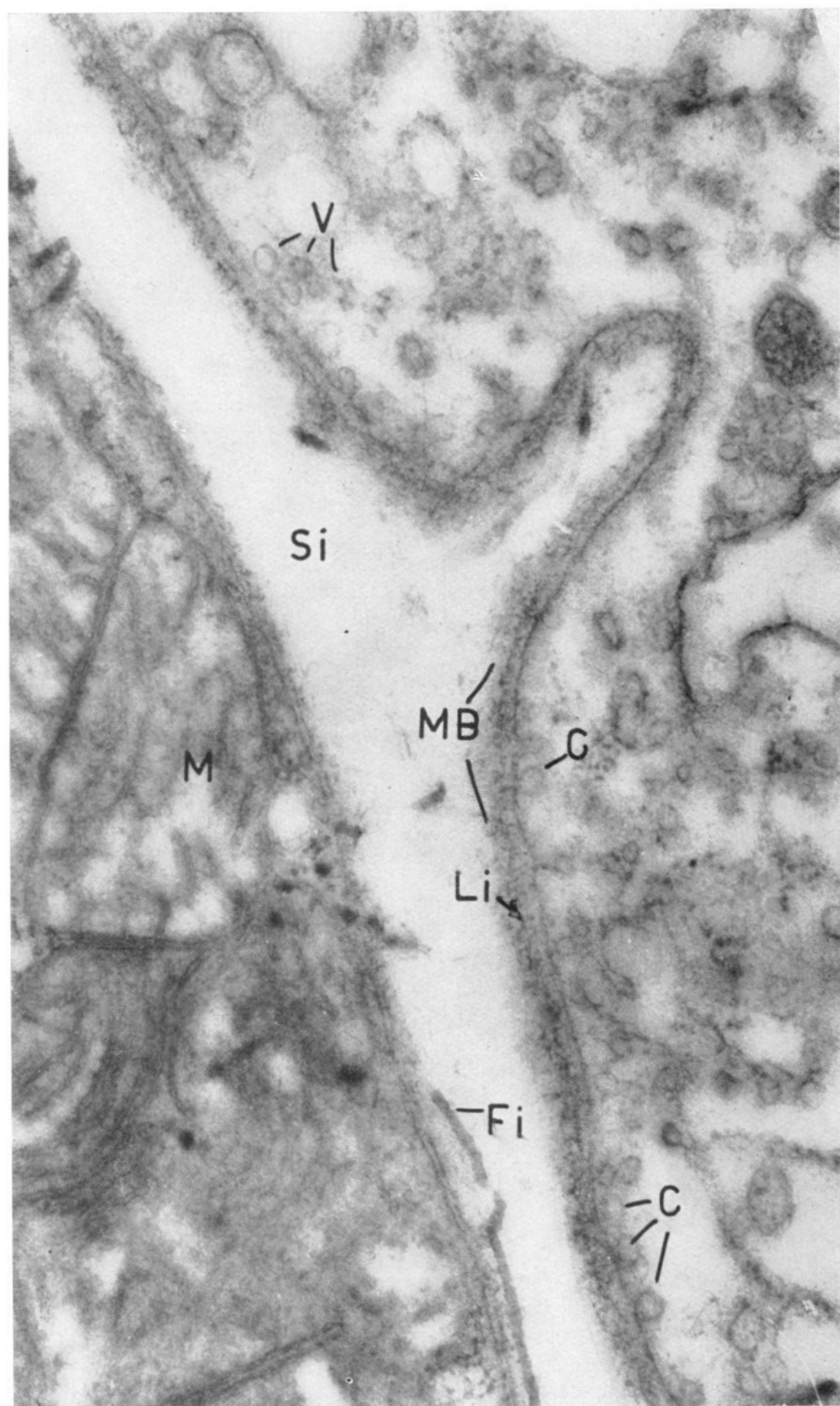


Fig. 14. — La limitante esterna, anche se non molto frastagliata, presenta numerosi stomi (S). La limitante interna, invece, presenta invaginazioni più o meno pronunciate chiamate caveole (C). 40.000 x.

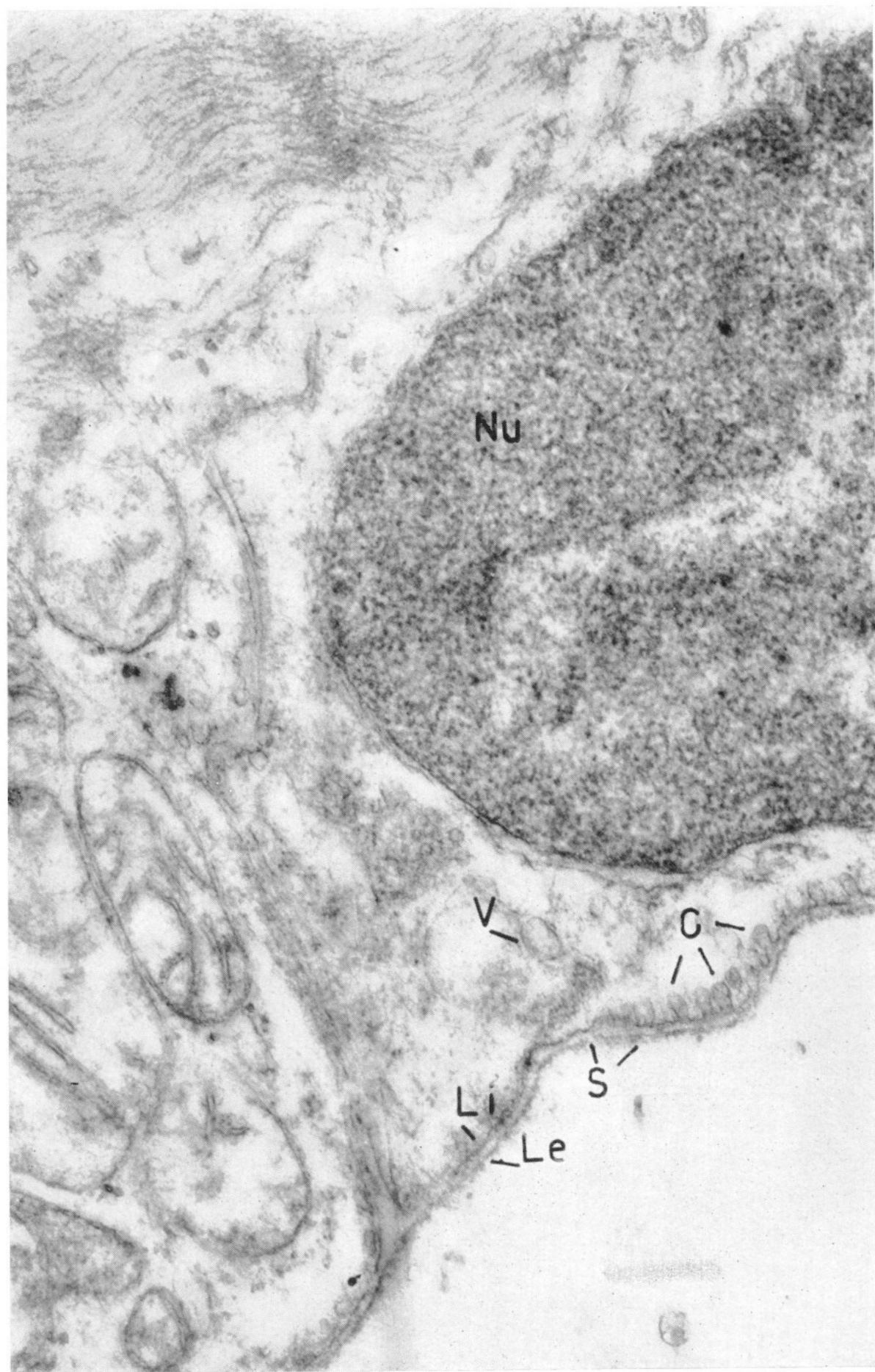


Fig. 15. — Ingrandimento fotografico della precedente: si notano caveole in vario atteggiamento funzionale. 140.000 x.

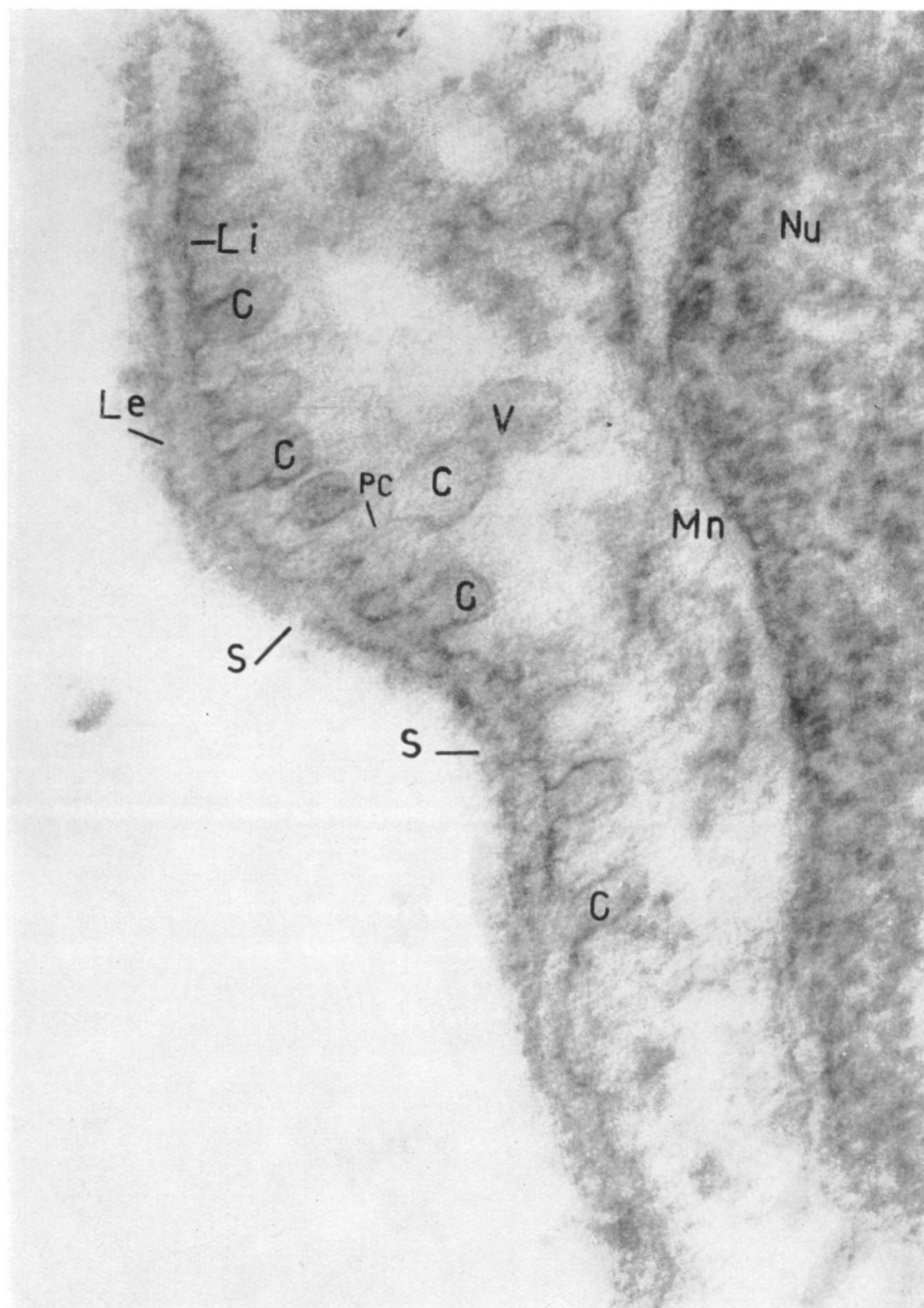


Fig. 16. — Oltre le caveole, si possono osservare numerose vescicole che sono probabilmente caveole chiuse e procedenti verso l'interno del citoplasma.
80.000 x.

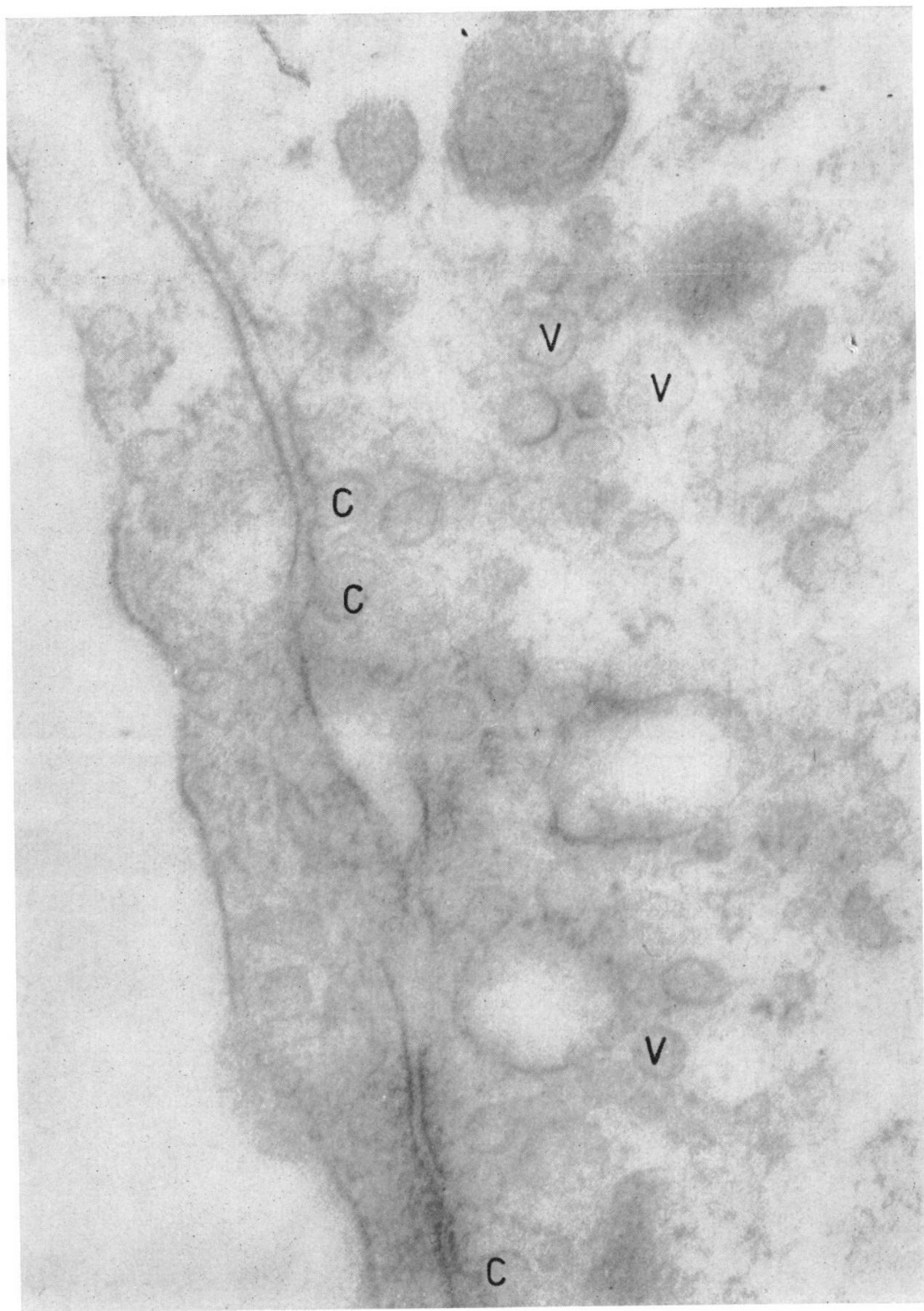
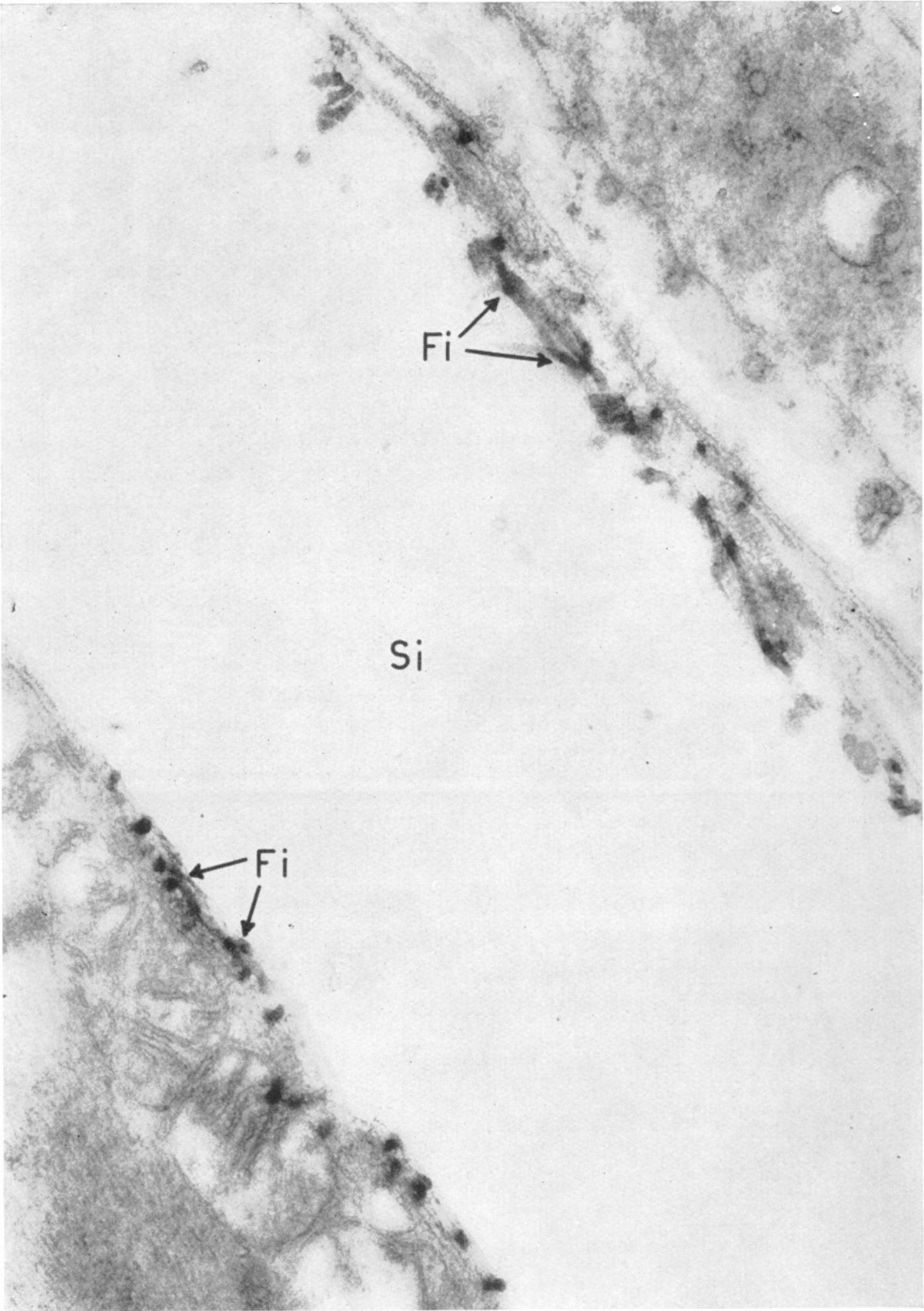


Fig. 17. — Sono particolarmente visibili, nello spazio intercellulare (Si), numerose fibre collagene (Fi) intensamente colorate dall'acido fosfotungstico.



detti vescicole pinocitiche, non sarebbero altro che caveole chiuse e distaccate dalla limitante interna dalla quale hanno avuto origine. Il significato loro normalmente attribuito è quello di trasporto di sostanze dallo spazio intercellulare all'interno della cellula e viceversa, secondo uno schema proposto da BENNETT (¹²) nel 1956, che osservazioni di vari AA. (¹³⁻¹⁶) al m.e., su sezioni sottili di diverse membrane cellulari, sembrano confermare.

SCOPO DELLA RICERCA.

Le teorie fisiologiche riguardanti la funzione dell'organo vocale sono la teoria mioelastica e la teoria neurocronassica. Nella fonazione, secondo la prima teoria, le corde vocali, tese e raffrontate dai muscoli estrinseci ed intrinseci della laringe, sarebbero sollecitate a vibrare dalla corrente aerea spinta in alto dal mantice toracico; secondo la teoria neurocronassica, invece, esse vibrerebbero attivamente in maniera sincrona agli impulsi nervosi a partenza corticale.

Non essendo definito, come risulta da quanto sopra detto, quale sia realmente il meccanismo di azione delle corde vocali, abbiamo pensato che alla soluzione di questo problema potesse anche contribuire la conoscenza della più fine struttura del muscolo vocale.

MATERIALE E TECNICA.

Abbiamo condotto le ricerche su materiale prelevato e trattato secondo la tecnica già descritta in un precedente lavoro (²¹), salvo un'anestesia degli animali con nembuthal per via intraperitoneale in ragione di circa 3 mg per ogni 100 gr di peso corporeo e salvo una fissazione assai più breve delle precedenti (45 minuti), ed una colorazione con acido fosfotungstico al 5% e acetone al 45% fatta direttamente sulle sezioni.

RISULTATI.

Le osservazioni condotte su numerose sezioni ultrasottili permettono di rilevare quanto segue:

1) nel muscolo vocale di cavia la lunghezza media dei sarcomeri è di 1,4 micron (fig. 1, 2). Le miofibrille hanno una larghezza che va da 0,5 a 2 micron ed i miofilamenti sono di due tipi, spessi e sottili, rispettivamente dello spessore di 60-70 e di 20-30 Å, in disposizione alternata

(fig. 3, 4). Le bande N del sarcomero, visibili quando il muscolo è contratto, per lo più non compaiono, o sono molto ridotte (fig. 5).

2) I mitocondri sono in numero e dimensioni notevolmente grandi e di forma ovalare, allungata o rotondeggiante (fig. 6, 7). Spesso si riscontrano in file di lunghezza pari a quella di 7-8 sarcomeri (fig. 8) o anche disposti in doppie file ed in gruppi (fig. 9). Le criste sono in numero molto elevato (15-18) (fig. 10-12) e molto ravvicinate (fino a una diecina per micron): esse sono spesse circa 100 Å.

3) Il reticolo sarcotubulare è presente in grande quantità. Nella maggior parte dei nostri fotogrammi lo si può notare, disposto in colonne continue, negli spazi intermiofibrillari (fig. 1-11).

4) Il sarcolemma presenta la struttura da Robertson definita « trilaminata » costituita da due linee — limitante interna ed esterna — dello spessore di circa 60-70 Å ciascuna, fra le quali è interposta una banda meno densa e di spessore circa doppio (fig. 13). La limitante esterna nel versante che guarda lo spazio intercellulare appare ricoperta da uno strato similgranulare rappresentante la membrana basale (fig. 14).

Ad un attento studio la limitante esterna si presenta pressochè regolare ma interrotta nella sua continuità da stomi (fig. 15); la limitante interna invece mostra un disegno frastagliato per delle invaginazioni, alcune più, altre meno pronunciate (caveole) (fig. 14-17).

All'esame del versante citoplasmatico della limitante interna si notano, oltre alle sporgenze dovute alle sopradescritte caveole, elementi rotondi od ellittici, della grandezza di circa 600 Å, ancora uniti alla limitante interna da un picciolo più o meno esile. Gli stessi elementi, ormai distaccati dalla limitante interna, si vedono sparsi nel citoplasma specie in prossimità delle formazioni contrattili e del nucleo (fig. 14-17).

5) Nello stesso spazio intercellulare, in prossimità del sarcolemma, si osservano numerose formazioni allungate riunite in fasci, fortemente colorate dall'acido fosfotungstico, riferibili a fibre collagene (fig. 18).

6) L'apparato del Golgi è ben riconoscibile in prossimità dei nuclei. Sparsi nella matrice sarcoplasmatica vi sono molti granuli densi (granuli di glicogeno) del diametro di circa 100 Å.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

Il muscolo vocale di cavia presenta una struttura simile a quella dei muscoli capaci di lavorare ad alta frequenza (muscoli delle ali degli insetti).

I sarcomeri relativamente corti consentono contrazioni brevi ma ra-

pide: l'abbondanza di mitocondri, il loro considerevole volume e, nel loro interno, l'elevato numero di cristelle, riconosciute come il deposito del patrimonio energetico ed enzimatico, denotano un'attività metabolica di alto grado.

Per quanto concerne i dati da noi ottenuti sullo spessore dei miofibrilli, dobbiamo rimarcare che essi possono essere, ma solo per piccole frazioni, inesatti. Infatti l'acido fosfotungstico, con il quale abbiamo trattato le sezioni al fine di rendere più evidenti alcuni elementi, può, soprattutto se usato in soluzioni concentrate, alterare le formazioni per le quali ha affinità, ingrossandole lievemente.

Riteniamo d'altra parte che la costituzione del sarcolemma, e in particolare la presenza così evidente delle caveole ed i vari aspetti della loro connessione con la limitante interna, abbiano nel nostro studio una chiara documentazione. L'ipotesi di Bennett, infatti, che esse costituiscano il sistema di trasporto di sostanze attraverso la parete cellulare, sembra confermata, almeno sulla base morfologica, secondo lo schema seguente:

Le sostanze contenute nello spazio intercellulare, dopo aver attraversato la limitante esterna passando attraverso gli stomi sopra descritti, verrebbero a contatto con la limitante interna: quest'ultima si introfletterebbe in più punti a dito di guanto formando le caveole: l'orificio di queste caveole, una volta che esse abbiano raggiunto un certo volume, si chiuderebbe dando origine a vescicole, e le vescicole si distaccerebbero dalla membrana plasmatica per disporsi nel citoplasma della cellula ed ivi portare, aprendosi, le sostanze captate dallo spazio intercellulare.

Più recentemente tuttavia è stata avanzata l'ipotesi che il sistema caveolo-vescicolare abbia il compito di trasportare dall'esterno all'interno della cellula ioni che, una volta raggiunte le miofibrille, ne stimolerebbero la contrazione. Se così fosse, l'abbondanza di vescicole denoterebbe, nel muscolo vocale, la possibilità di un forte trasporto di ioni con conseguente capacità del muscolo a contrarsi frequentemente nell'unità di tempo.

D'altro canto la particolare abbondanza di reticolo sarcoplasmatico — ritenuto mediatore di impulsi nervosi tra la placca motrice e le miofibrille — che si riscontra nel muscolo vocale indica per detto muscolo una particolare attitudine alla conduzione di impulsi nervosi.

Ci è grato ricordare l'aiuto che ci è stato dato dai tecnici A. Chiozzotto, F. Piccirilli, F. Tangucci, N. Tomassini, F. Valente.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) HUXLEY H. E. e HANSON J. - Structure and function of muscle, edit. Boorne H. C. New York, Academic Press (1960) pag. 183.
 - (²) BENNETT H. S. - Structure and function of muscle, edit. Boorne H. C. New York, Academic Press (1960) pag. 137.
 - (³) EDWARDS G. A., RUSKA H., SOUZA SANTOS P. e VALLEJO FREIRE A. - J. biophys. biochem. Cytol. 2 Suppl., 143 (1956).
 - (⁴) BENNETT H. S. - Rev. modern Phys., 394 (1959).
 - (⁵) ANDERSSON-CEDERGREN E. - Ultrastructure Res., Suppl. 1: 161 (1959).
 - (⁶) YAMADA E. - J. biophys. biochem. Cytol., 1: 443 (1956).
 - (⁷) MARK J. S. T. - Anat. Record., 123: 473 (1956).
 - (⁸) PALADE G. E. - J. biophys. biochem. Cytol., Suppl. 2: 85 (1956).
 - (⁹) MOORE D. H. e RUSKA H. - J. biophys. biochem. Cytol., 3: 261 (1957).
 - (¹⁰) FAWCETT D. W. e SELBY C. C. - J. biophys. biochem. Cytol., 4: 63 (1958).
 - (¹¹) PORTER K. R. e PALADE G. E. - J. biophys. biochem. Cytol., 3: 269 (1957).
 - (¹²) BENNETT H. S. - J. biophys. biochem. Cytol., Suppl. 2: 99 (1956).
 - (¹³) ODOR D. L. - J. biophys. biochem. Cytol., Suppl. 2: 103 (1956).
 - (¹⁴) HAMPTON J. C. - Acta anatomica, 32: 262 (1958).
 - (¹⁵) WISSIG S. L. - Anat. Record., 130: 467 (1958).
 - (¹⁶) ALKSME J. F. - J. exptl. Physiol., 44: 51 (1959).
 - (¹⁷) ROBERTSON J. D. - J. Physiol. (London), 140: 58 (1957).
 - (¹⁸) ROBERTSON J. D. - Anat. Record, 130: 440 (1958).
 - (¹⁹) MANNI E. - Rev. Laring. Otol. Rhinol., 81: 468 (1960).
 - (²⁰) PHILPOTT D. E. e SZENT-GYÖRGYI A. - Biochem. biophys. Acta, 18: 177 (1955).
 - (²¹) BOCCIARELLI STEVE D. e CASORATI V. - Rend. Ist. sup. Sanità, 22: 619 (1959).
-