
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIANCARLO GIBERTINI, SERGIO FILONI

**Trapianti di pelle in Tritoni adulti. I. Effetto
dell'irradiazione e successiva inoculazione di milza
eterologa sulla fase di rigetto di omotrapianti in
Triturus cristatus carnifex Laur**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.6, p. 720–726.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_6_720_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Trapianti di pelle in Tritoni adulti. I. Effetto dell'irradiazione e successiva inoculazione di milza eterologa sulla fase di rigetto di omotrapianti in Triturus cristatus carnifex Laur* (*). Nota di GIANCARLO GIBERTINI e SERGIO FILONI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The reject phase consequent to skin homografts was investigated in adult newts.

The acceptor newts were divided in three groups: untreated control animals; irradiated newts (1250 r; 2450 r); irradiated newts (2450 r) successively injected with a spleen suspension obtained from the skin donor animal.

It was concluded that the inoculation of heterologous spleen cells results in the survival of lethally irradiated newts and in the general acceptance of skin homografts.

We maintain that the injected lymphocytes substitute the acceptor lymphoid system preserving their immunological specificity so that they recognize as biochemically compatible the transplanted skin, which in fact does not degenerate.

Fino a qualche tempo fa non era stata dimostrata la capacità della risposta immunitaria negli Anfibi, tant'è vero che si riteneva che non esistesse rigetto nei trapianti omoplastici di Anfibi urodeli (Dawson 1920; Collins e Adolph 1926; Reis 1926, 1930). Un contributo fondamentale al problema immunologico negli Anfibi, fu portato da Anderson (1933), che per primo descrisse fenomeni degenerativi ed infiltrazione linfocitica in seguito a trapianti di pelle fra specie differenti di Urodeli.

In seguito a questo risultato, c'è stato un rinnovato interesse nello studio dei problemi della filogenesi della risposta immunitaria, che è stata seguita in diversi Vertebrati a sangue freddo: nei Teleostei (Kallman e Gordon 1957, 1958; Hildemann 1957, 1958; Hildemann e Haas 1960; Cooper 1964), negli Anuri (Hildemann e Haas 1959, 1961, 1962; Volpe 1964, 1965; Simnet 1964, 1965), nei Rettili (Hildemann 1962).

Per quanto riguarda le ricerche sulla risposta immunologica degli Urodeli, i risultati ottenuti a proposito degli omotrapianti nei Tritoni, sono tra loro piuttosto contrastanti (Pizzarello e Wolsky 1960; Squadroni e Wolsky 1962; Erickson 1962; Cohen 1965, 1966). Filoni e Margotta (1969) in seguito ad omotrapianti di segmenti di midollo spinale fra tritoni adulti, hanno messo in evidenza una reazione di istoincompatibilità da parte dell'ospite che si manifesta nei riguardi di neuroni differenziati, ma non nei confronti degli elementi nervosi indifferenziati.

Da tutti gli studi fino ad ora compiuti, risulta evidente che i trapianti omoplastici di pelle, negli Anfibi, hanno un tempo di sopravvivenza piut-

(*) Il lavoro è stato eseguito nell'Ist. di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta del 13 giugno 1970.

tosto breve; in particolare, negli omotrapianti cutanei tra Anfibi urodéli è stato fissato intorno al 20° giorno l'inizio dei processi degenerativi del trapianto stesso (Forte 1959).

Accertata l'esistenza dei fenomeni immunologici nei trapianti, diversi Autori hanno intrapreso ricerche con l'intento di ottenere un prolungamento, il più duraturo possibile, del periodo di attecchimento del trapianto stesso: a tale scopo sono state utilizzate diverse tecniche, intese tutte ad abbassare la risposta immunologica dell'animale ospite (Argyris 1968; Ballantyne e coll. 1969; Charlemagne e Houillon 1968; Cohen 1968; Dolejšková e Nouza 1967; Howard e coll. 1968; Schwartz 1967; Wheeler 1970), tra le quali anche i raggi X, proprio negli Anfibi urodéli (Cohen 1966 *a*, *b*, *c*). Queste tecniche, pur avendo l'effetto di prolungare il periodo di attecchimento del trapianto, grazie all'abbassamento momentaneo della risposta anticorpale, non raggiungevano lo scopo fondamentale di annullare la capacità di risposta immunologica dell'animale ospite. Dal momento che, sui Mammiferi, sono stati compiuti con successo esperimenti di trasfusioni di sospensioni omologhe od eterologhe di midollo osseo, milza, tessuto embrionale, di donatori non irradiati in animali massivamente irradiati (Jacobson 1952; Lorenz 1952; Main e Prehn 1955; Lindsley e coll. 1955; Ford e coll. 1956; Gengozian 1957; Kaplan 1957); ed essendo altresì noto che il danno provocato dai raggi X, sul tessuto linfoide, può completamente, o quasi, distruggere la capacità di risposta immunologica di questo tessuto, abbiamo pensato di utilizzare questi dati allo scopo di realizzare l'annullamento dell'incompatibilità tra donatore ed ospite, in omo- ed eterotrapianti di pelle, tra Anfibi urodéli. In questa prima indagine sono stati presi in esame trapianti omoplastici tra *Triturus cristatus carnifex*, e a tale scopo è stato irradiato con dose letale, l'animale ospite, al quale è stata successivamente inoculata una sospensione di milza eterologa, prelevata dall'animale che avrebbe in un secondo tempo donato il trapianto di pelle.

MATERIALE E METODI.

Sono stati usati 96 tritoni adulti (*Triturus cristatus carnifex* Laur.), di sesso maschile, suddivisi secondo le seguenti modalità di trattamento:

Lotto I (13 tritoni): trapianti omoplastici di un lembo di pelle prelevato dalla regione sottomascellare del donatore e posta in sede dorsale dell'ospite non trattato.

Lotto II (12 tritoni): trapianti omoplastici di un lembo di pelle prelevato dalla regione sottomascellare del donatore e posto in sede dorsale nell'ospite precedentemente irradiato con dose subletale di raggi X (1250 r).

Lotto III (22 tritoni): trapianti omoplastici di un lembo di pelle prelevato dalla regione sottomascellare del donatore e posto in sede dorsale dell'ospite precedentemente irradiato (2450 r) ma non iniettato con sospensione di cellule spleniche.

Lotto IV (31 tritoni) (Tabella I): trapianti omoplastici di un lembo di pelle prelevato dalla regione sottomascellare del donatore e posto in sede dorsale dell'ospite precedentemente irradiato (2450 r) ed inoculato con una sospensione di cellule spleniche provenienti dal donatore.

Sono stati inoltre usati 18 tritoni, sottoposti solo ad un'irradiazione di 2450 r, per determinare la mortalità a questa dose critica (78 %).

In tutti i casi il lembo di pelle era di circa 6×4 mm.

TABELLA I.

Animali operati: n° 31 (*)			
N° animali sperimentali	Dose di raggi X (r)	Inoculazione milza dopo irradiazione (ore)	Fissazione dopo trapianto (giorni)
2	2450	24	20
2	2450	24	23
2	2450	24	30
4	2450	12—24	33
1	2450	24	35
5	2450	12—24	47
4	2450	24	60
2	2450	24	67
4	2450	12—24	77

(*) n° 5 animali sono morti nel corso dell'esperimento.

La preparazione della sospensione di milza veniva eseguita dopo disaggregazione in Holtfreter, con il metodo già descritto da uno di noi (Gibertini, 1967), e quindi iniettata o per via intracardiaca o per via intraperitoneale. Tutte le operazioni venivano effettuate in cabina sterile.

Le caratteristiche fisiche dell'irradiazione erano le seguenti: 180 KV, 6 mA, distanza focale 50 cm, filtro di 3 mm Al, intensità 75 r/min., misurata in aria con dosimetro Gilardoni. I tritoni venivano sottoposti ad irradiazione in gruppi di 2-10 alla volta, posti in posizione prona, previa anestesia con MS 222 (1 : 1000).

Tutti gli animali, a partire dal momento del trapianto, sono stati mantenuti in cabina termostatica a 18° C.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Lotto I:

A soli 20 giorni dal trapianto, nei casi esaminati, si riscontra già una marcata vasodilatazione al livello del derma lasso ed una notevole infiltrazione linfocitica sia nella zona centrale che periferica del trapianto. L'epidermide, in alcuni punti iperplastica, non mostra segni di degenerazione. A 25

giorni dall'operazione, aumenta l'infiltrazione dei linfociti che raggiunge anche l'epidermide e mentre alcune ghiandole sono infiltrate, altre presentano un aspetto istologico normale. A 30 giorni, (Tav. I, fig. 2) le ghiandole, sia mucose che granulose, o sono invase da linfociti o sostituite da residui melanici. A 40 giorni, l'epidermide appare pressoché sostituita da cellule linfocitiche; gli elementi ghiandolari sono indistinguibili e si osservano notevoli accumuli melanici.

Dopo 60 giorni, la zona del trapianto è occupata da epidermide neoformata derivata dalla proliferazione della pelle dell'ospite che circonda il trapianto, ormai completamente degenerato.

Lotto II:

Dopo 20 giorni dal trapianto, lo strato epidermico, oltre che alquanto appiattito, presenta, in alcuni casi, una modesta infiltrazione linfocitica che però non si estende nel sottostante strato del derma. Dopo 30 e dopo 45 giorni (Tav. I, fig. 3) mentre in alcuni casi (4) l'epidermide appare infiltrata da linfociti, in altri (2) tale infiltrazione è assente. Alcune ghiandole sono normali mentre altre sono state sostituite da linfociti e da residui melanici. Nel derma si riscontra una cospicua vasodilatazione.

Lotto III:

Di un totale di 22 tritoni, ne sono sopravvissuti solo 7 essendo gli altri 15 morti entro i primi 30 giorni dal trapianto. Pertanto la mortalità, alla dose di 2450 r è risultata del 68 % circa. Dopo 20 giorni, a parte un caso in cui il trapianto è in piena fase degenerativa, l'infiltrazione linfocitica è limitata. A 30 giorni, (Tav. II, fig. 4), si osserva qualche rara ghiandola scomparsa, l'epidermide può considerarsi normale, mentre il derma compatto appare alquanto ispessito. Si nota vasodilatazione.

Lotto IV:

Dopo 20 giorni dal trapianto: l'aspetto dell'epidermide è perfettamente normale e priva di qualsiasi infiltrazione linfocitica; lo stato delle ghiandole mucose e granulose è sovrapponibile a quello dei controlli, così come normale si presenta il derma.

Dopo 30 giorni dal trapianto: in uno dei due casi esaminati, pur non essendo presenti cellule linfocitiche infiltrate, il trapianto non presenta un aspetto perfettamente sovrapponibile a quello dei controlli, mentre nell'altro caso l'aspetto generale del lembo di pelle trapiantata è del tutto normale.

Dopo 33 giorni dal trapianto: l'epidermide, le ghiandole, sono normali, e non si nota la presenza di linfociti né nello strato epidermico né nel sottostante derma. Alcuni residui melanici (meno numerosi che negli stadi precedenti) sono localizzati nel derma compatto.

Dopo 35 giorni dal trapianto: il frammento di pelle appare perfettamente conservato e le cellule pigmentate hanno ricostituito uno strato continuo.

Dopo 47 giorni dal trapianto: ad eccezione di un caso, in cui l'epidermide non è ben distinguibile e le ghiandole presentano tra di loro qualche spazio vuoto occupato da linfociti, negli altri 4 casi esaminati, le ghiandole, le cellule pigmentate ed il derma presentano un aspetto normale (Tav. II, fig. 5), mentre l'epidermide appare assottigliata.

Dopo 60 giorni dal trapianto: lo strato epidermico si presenta ben delimitato, le ghiandole hanno un aspetto normale e non è presente alcuna infiltrazione linfocitica; poco frammentato appare lo strato delle cellule pigmentate e si notano scarsi residui melanici nel derma compatto, che peraltro si presenta normale.

Dopo 67 giorni dal trapianto: l'epidermide è perfettamente conservata, lo strato dei cromatofori è continuo e non si riscontra alcun residuo melanico nel derma compatto. Non sono presenti linfociti e ben conservate appaiono le ghiandole mucose e granulose.

Dopo 77 giorni dal trapianto: epidermide, ghiandole, cellule pigmentate, derma hanno un aspetto normale e sempre assenti risultano i linfociti. (Tav. II, fig. 6).

DISCUSSIONE.

Fase di rigetto degli omotrapianti. - Dai risultati della nostra indagine sui trapianti omoplastici di pelle in *Triturus cristatus* adulto, appare evidente che l'ospite manifesta una reazione di istoincompatibilità che determina il rigetto del lembo di pelle trapiantato.

Le fasi con cui si realizza questa risposta immunitaria, sono fondamentalmente simili a quelle messe in evidenza da Cohen (1966) in *Diemictylus viridescens*. Infatti, la risposta immunologica inizia a partire dal 20° giorno post-operatorio, con moderata infiltrazione linfocitica, che diviene via via più cospicua nei giorni successivi, fino a provocare la completa distruzione del trapianto intorno al 40° giorno.

Pertanto, i nostri dati, in accordo con quelli di Anderson (1933), Forte (1959), Cohen (1966 a, b, c; 1968 a, b) e contrariamente a quanto riportato da Dawson (1920), Collins e Adolph (1926) e Reis (1926), dimostrano che in caso di trapianto omoplastico di pelle in Anfibi urodela, esiste incompatibilità tra donatore ed ospite.

Effetto dei raggi X sulla fase di rigetto degli omotrapianti. - I nostri dati dimostrano che già ad una dose di 1250 r si ha, nel *Triturus cristatus*, una notevole inibizione del processo di infiltrazione linfocitica: infatti, mentre nei controlli l'omotrapianto a 40 giorni dalla operazione è in fase di totale degenerazione, nei trapianti di tritoni irradiati, esaminati 45 giorni dopo, non è riscontrabile, nella maggior parte dei casi, invasione di linfociti, ed anche laddove essa è presente non raggiunge mai il grado osservato nei controlli.

Ad una dose più elevata di raggi X, 2450 r, che per tritoni non sottoposti a trapianti si è dimostrata letale nella misura del 78 % dei casi, la presenza di linfociti nei trapianti è ancor più raramente riscontrabile; tuttavia la risposta

immunitaria dell'ospite non si può considerare completamente annullata. Non è stato possibile, in questi casi, eseguire l'esame istologico del trapianto oltre il 30° giorno post-operatorio, in quanto gli animali venivano a morire.

Effetto dei raggi X sulla fase di rigetto degli omotrapianti dopo inoculazione di milza eterologa. — I risultati riguardanti questa parte dell'esperimento, dimostrano chiaramente che in seguito ad inoculazione di milza in tritoni irradiati con 2450 r, gli omotrapianti di pelle persistono inalterati fino al termine dell'esperimento ed in tutti i casi esaminati (ad eccezione di uno, in cui 47 gg. dopo l'operazione alcune zone del trapianto risultano occupate da linfociti) non è riscontrabile alcuna infiltrazione di cellule linfocitiche.

Da tali dati si può ritenere che l'immissione di linfociti di derivazione splenica determini nell'ospite letalmente irradiato, e quindi con il proprio sistema linfoide irrimediabilmente danneggiato, la ricostituzione di un nuovo sistema linfoide, che, oltre a permettere la sopravvivenza dell'animale ad una così forte dose di radiazioni, consente un attecchimento dell'omotrapianto sino al 77° giorno, limite massimo osservato nella presente ricerca.

Il fatto che l'attecchimento perduri fino al termine del nostro esperimento, si può spiegare ammettendo che i linfociti provenienti dallo stesso individuo, che avrebbe poi donato il trapianto, una volta immessi nell'animale ospite, il cui sistema linfoide è stato distrutto, conservino la loro specificità immunologica e pertanto siano in grado di riconoscere come biochimicamente compatibile il lembo di pelle trapiantato, che appunto non viene distrutto.

BIBLIOGRAFIA.

- ANDERSON R. L., « Univ. Pittsburgh. Bull. », 30, 20 (1933).
 ARGYRIS B. F., « Transplantation », 6, 449 (1968).
 BALLANTYNE D. L., JR., UHLSCHMID G. K. e CONVERSE J. M., « Transplantation », 7, 274 (1969).
 CHARLEMAGNE J. e HOUILLON, CH., « C. R. Acad. Sci », 267, 253, Paris 1968.
 COHEN N., « Amer. Zool. », 5, 227 (1965).
 COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 157 (1966 a).
 COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 173 (1966 b).
 COHEN N., « J. Exp. Zool. », 163, 231 (1966 c).
 COHEN N., « J. Exp. Zool. », 167, 37 (1968).
 COLLINS H. H. e ADOLPH E. F., « J. Morph. », 42, 473 (1926).
 COOPER E. L., « Transplantation », 2, 2 (1964).
 DAWSON A. B., « J. Morph. », 34, 487 (1920).
 DOLEJŠOVÁ V. e NOUZA K., « Fol. Biol. (Praha) », 13, 367 (1967).
 ERICKSON R. P., « Transpl. Bull. », 30, 137 (1962).
 FILONI S. e MARGOTTA V., « Acta Embryol. Experim. », 169 (1969).
 FORTE C., « Monitore Zool. Ital. », 67, 130 (1959).
 FORD C. E., HAMERTON J. L., BARNES D. W. H. e LOUTIT J. F., « Nature », 177, 452 (1956).
 GENGOZIAN N., URSO I. S., CONGDON C. C., CONGER A. D. e MAKINODAN T., « Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. », 96, 714 (1957).
 GIBERTINI G., « Riv. Biol. », 60, 3 (1967).
 HILDEMAN W. H., « Ann. N. Y. Acad. Sci. », 64, 775 (1957).
 HILDEMAN W. H., « Immunology », 1, 46 (1958).

- HILDEMANN W. H., «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 97, 139 (1962).
 HILDEMANN W. H. e HAAS R., «J. Immunol.», 83, 478 (1959).
 HILDEMANN W. H. e HAAS R., «J. Cell. and Comp. Physiol.», 55, 277 (1960).
 HILDEMANN W. H. e HAAS R., «Evolution», 15, 267 (1961).
 HILDEMANN W. H. e HAAS R., *Symposium on Mechanisms of Immunological Tolerance*, Praga: «Czechoslovakia Acad. Sci.», 35-54 (1962).
 HOWARD R. J., DOUGHERTY S. F. e MERGENHAGEN S. E., «J. Immunol.», 101, 301 (1968).
 JACOBSON L. O., «Cancer Research», 12, 315 (1952).
 KALLMAN K. D. e GORDON M., «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 71, 305 (1957).
 KALLMAN K. D. e GORDON M., «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 73, 599 (1958).
 KAPLAN H. S., HIRSCH B. B., BROWN M. B. e NAGAREDA C. S., «Radiation Res.», 7, 325, (1957).
 LINDSLEY D. L., ODELL T. T. e TAUSCHE F. G., «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 90, 512 (1955).
 LORENZ E., CONGDON C. C. e UPHOFF D. E., «Radiology», 58, 863 (1952).
 MAIN J. M. e PREHN T. R., «J. Natl. Cancer Inst.», 15, 1023 (1955).
 PIZZARELLO D. J. e WOLSKY A., «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 87, 45 (1960).
 REIS K., «C. R. Soc. Biol.», 94, 349 (1926).
 REIS K., «Roux' Arch. Entw-mech.», 122, 494 (1930).
 SCHWARTZ R. S., «Trasplantation», 5, 1215 (1967).
 SIMNETT J. D., «Exp. Cell. Res.», 33, 232 (1964).
 SIMNETT J. D., «J. Cell. and Comp. Physiol.», 65, 293 (1965).
 SQUADRONI J. e WOLSKY A., «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 99, 386 (1962).
 VOLPE E. P., «J. Exp. Zool.», 157, 179 (1964).
 WEELER H. B., DE FRONZO A. e CORSON J. M., «Trasplantation», 9, 78 (1970).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Aspetto istologico della pelle normale di *Triturus cristatus carnifex* (regione sotto-mascellare). $\times 150$.
 Fig. 2. - Lembo di pelle trapiantato omoplasticamente e fissato dopo 30 giorni.
 Le ghiandole sono notevolmente infiltrate di linfociti ed alcune sono sostituite da residui melanici. $\times 150$
 Fig. 3. - Lembo di pelle trapiantato omoplasticamente in ospite irradiato (1250 r) e fissato dopo 45 giorni.
 Si nota una moderata invasione linfocitica che interessa anche le ghiandole. $\times 150$

TAVOLA II.

- Fig. 4. - Lembo di pelle trapiantato omoplasticamente in ospite irradiato (2450 r) e fissato dopo 30 giorni.
 L'infiltrazione linfocitica è scarsa, ma la maggior parte delle ghiandole è degenerata e sono presenti numerosi residui melanici. $\times 150$
 Fig. 5. - Lembo di pelle trapiantato omoplasticamente in ospite irradiato (2450 r) e successivamente inoculato con sospensione di milza del donatore, e fissato dopo 47 giorni.
 I linfociti sono assenti, le ghiandole intatte, lo spessore dello strato epidermico molto limitato. $\times 150$
 Fig. 6. - Lembo di pelle trapiantato omoplasticamente in ospite irradiato (2450 r) e successivamente inoculato con sospensione di milza del donatore e fissato dopo 77 giorni.
 L'aspetto istologico della pelle è sovrapponibile a quello dei controlli (confronta fig. 1). $\times 150$



