
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIANCARLO GIBERTINI, VITO MARGOTTA

**Studio del tempo di sopravvivenza medio di trapianti
omoplastici di pelle in *Triturus cristatus carnifex*
Laur., in seguito ad irradiazione totale o parziale
dell'ospite**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 61 (1976), n.6, p. 645–652.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_6_645_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_6_645_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. — *Studio del tempo di sopravvivenza medio di trapianti omoplastici di pelle in Triturus cristatus carnifex Laur., in seguito ad irradiazione totale o parziale dell'ospite (*)*. Nota di GIANCARLO GIBERTINI e VITO MARGOTTA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The host-graft-versus reaction to homotransplanted skin was studied in *Triturus cristatus carnifex* Laur., in adult males and females which had received the following treatments:

- 1) total body X-ray irradiation (one dose of 1600 r).
- 2) 1600 r X-ray irradiation of the splenic area, after shielding of the remaining body surface.

In previous experiment the animals had been splenectomized at different time-intervals, after skin homotransplants: the results, compared with those presently obtained, induce us to conclude that spleen lymphocytes play an important role in immunological reaction, but also take part to the host-graft-versus reaction.

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle ricerche, che da tempo abbiamo intraprese, sui fenomeni di istoincompatibilità negli Anfibi urodeli adulti, evidenziata dalla risposta immunitaria da parte dell'ospite agli autotrapianti (Margotta, Recco e Gibertini, 1976), agli omotrapianti (Gibertini e Filoni, 1970) ed agli eterotrapianti (Filoni, Gibertini, Margotta e Catalini, 1971) di pelle nei Tritoni adulti, recentemente abbiamo rivolto il nostro interesse ad uno studio che ha per scopo quello di stabilire l'influenza ed il ruolo della milza, del timo e del midollo osseo sulla sopravvivenza di trapianti omoplastici di pelle tra Tritoni adulti.

In tale quadro, limitatamente all'influenza ed al ruolo che la milza ha sulla reazione di rigetto di omotrapianti di pelle tra Tritoni adulti, dai risultati da noi fin qui raggiunti in individui splenectomizzati chirurgicamente, prima del trapianto ed a differenti intervalli di tempo da esso (uno, cinque e dieci giorni), è emerso che l'intervallo di cinque giorni, tra splenectomia e trapianto, risulta essere il più indicato, fra quelli da noi saggiati, per il prolungamento della sopravvivenza del lembo di pelle trapiantato, rispetto a quella di omotrapianti di pelle eseguiti tra individui non splenectomizzati. Ciò è stato spiegato sostenendo che l'asportazione della milza effettuata un giorno o dieci giorni prima dei trapianti non modifica sensibilmente il loro Tempo di sopravvivenza medio, perché, rispettivamente, nel primo caso intercorre

(*) La ricerca è stata eseguita nell'Istituto di Anatomia comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta dell'11 dicembre 1976.

un tempo troppo breve, tra splenectomia e trapianto, e tale da non essere sufficiente ad annullare l'azione immunitaria della milza, mentre nel secondo caso un tempo maggiore, interposto tra splenectomia e trapianto, permette agli altri organi linfoidi di sopperire all'asportazione della milza, sostituendosi funzionalmente ad essa nella reazione di istoincompatibilità agli omotrapianti di pelle (Margotta, Gibertini e Ventura, 1976).

Nella presente ricerca vengono confrontati i Tempi di sopravvivenza media di omotrapianti di pelle effettuati su Tritoni adulti, precedentemente sottoposti ad irradiazione totale del corpo, con quelli riscontrati in omotrapianti di pelle eseguiti su Tritoni adulti, sottoposti in precedenza all'irradiazione soltanto della regione splenica, per verificare da un lato l'influenza ed il ruolo di tutti gli organi linfoidi e dall'altro l'influenza ed il ruolo della sola milza nella reazione di rigetto di omotrapianti di pelle.

MATERIALE E METODO

Sono stati effettuati trapianti omoplastici di pelle fra Tritoni adulti della specie *Triturus cristatus carnifex* Laur., di entrambi i sessi. Gli animali sperimentali sono stati divisi in due Lotti:

LOTTO I (29 omotrapianti): un lembo di pelle, proveniente da Tritoni normali, è stato trapiantato su Tritoni sottoposti, quattro giorni prima del trapianto, ad irradiazione totale del corpo.

LOTTO II (21 omotrapianti): un lembo di pelle, proveniente da Tritoni normali, è stato trapiantato su Tritoni sottoposti, tre giorni prima del trapianto, ad irradiazione della sola regione splenica, mentre il resto del corpo è stato schermato.

In totale, tra individui normali, donatori del trapianto ed individui irradiati, portatori del trapianto, sono stati utilizzati 100 Tritoni.

Gli animali, prima dell'inizio degli esperimenti, sono stati tenuti a digiuno due giorni e disinfettati con una soluzione di permanganato di potassio alla diluizione di 3 mg/l, in cui hanno soggiornato per alcune ore.

Le caratteristiche fisiche dell'irradiazione, per i due Lotti, sono state le seguenti: dose di raggi X 1600 r, 230 KV, 10 mA, distanza focale 50 cm, filtri 0,5 mm Cu + 1 mm Al, intensità 80 r/min., misurata in aria con dosimetro Gilardoni.

Gli animali, sottoposti ad irradiazione, sono stati suddivisi in gruppi di 7-9-10 per volta e posti in posizione prona.

La mortalità degli animali totalmente irradiati è stata pari a $LD_{50} = 31\%$.

I lembi di pelle, delle dimensioni di circa 6×4 mm, sono stati isolati dalla regione golare del donatore e poi trasferiti, previa una breve permanenza in soluzione sterile di Holtfreter, sulla regione dorsale destra del portatore, a metà circa tra le inserzioni dell'arto anteriore e posteriore, in una sede all'uopo precedentemente realizzata asportando la pelle dell'ospite, mediante

l'ausilio di forbicette e bisturi molto appuntiti e sottili, facendo sì che il trapianto occupasse esattamente l'area ad esso destinata ed aderisse intimamente ai tessuti dell'ospite.

Le operazioni sono state eseguite in cabina sterile.

I Tritoni, prima dell'irradiazione e dei trapianti, sono stati anestetizzati con MS 222 della Sandoz, diluito 1 : 1000.

Per tutta la durata delle esperienze, gli animali sono stati a digiuno e posti su carta bibula, imbevuta di soluzione sterile di Holtfreter, in contenitori di vetro in cabina termostatica ad umidità (89 %) e temperatura (18–20 °C) costanti.

TABELLA I

LOTTO	N. totale trapianti eseguiti	N. trapianti fissati dopo giorni dal trapianto				N. totale trapianti fissati	N. Tritoni morti per irradiazione	N. trapianti inutilizzabili
		10	20	30	50			
LOTTO I	29	5	3	5	4	17	9	3
LOTTO II ...	21	4	5	5	6	20	—	1

I lembi di pelle trapiantati sono stati fissati in liquido di Bouin in entrambi i Lotti dopo 10, 20, 30, 50 gg. dal trapianto (vedi Tabella I) ed inclusi in paraffina, previa disidratazione.

I preparati istologici sono stati tagliati, a 7 μ di spessore, secondo il piano trasversale e colorati con il metodo di Mallory-Azan.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

LOTTO I (Irradiazione totale dell'ospite).

Dopo 10 gg. dal trapianto (5 casi).

In due casi l'epidermide è normale, in altri due, pur avendo un aspetto normale per gran parte della sua estensione, in alcune zone limitate appare ispessita; solo in un caso è discontinua e presenta zaffi cellulari che si insinuano nel derma.

Lo strato dei cromatofori è normale solamente in un caso, negli altri è discontinuo e molto spesso rappresentato da ammassi melanici luminosi e pulverulenti, talora localizzati o intorno alle ghiandole oppure nelle sedi precedentemente occupate da quelle ghiandole che, nel frattempo, sono scomparse.

Le ghiandole in quattro casi sono di numero più o meno ridotte e conservano una morfologia normale, solo in un caso sono in gran parte scomparse.

Il derma è sempre normale.

L'infiltrazione ad opera dei linfociti è scarsissima in un caso (Tav. I, fig. 1), scarsa in due, più consistente nei rimanenti due casi e comunque quasi sempre limitata alla tela sottocutanea.

Dopo 20 gg. dal trapianto (3 casi).

L'epidermide appare normale, pur essendo in alcuni punti iperplastica.

Lo strato dei cromatofori è continuo, ma rappresentato da ammassi melanici di piccola o di grossa dimensione.

Le ghiandole hanno un aspetto morfologico normale, ma in due dei casi esaminati risultano ridotte di numero a circa la metà, nel terzo tale riduzione è meno sensibile.

Il derma, solo in un caso, appare non bene organizzato.

I linfociti, localizzati nel sottocutaneo, sono molto pochi in due casi (Tav. I, fig. 2) e numerosi nel terzo.

Dopo 30 gg. dal trapianto (5 casi).

L'epidermide dei cinque casi esaminati risulta normale in tre, mentre negli altri due appare qua e là ispessita.

Lo strato dei cromatofori in tre casi è continuo per gran parte della sua estensione e solo in alcune zone è rappresentato da ammassi pulverulenti; nel quarto caso è costituito da piccoli residui melanici disposti in maniera continua; nell'ultimo caso è esclusivamente formato da ammassi voluminosi.

Le ghiandole, in tre casi, sono parzialmente assenti.

Il derma ha un aspetto normale.

Pochi linfociti si osservano solamente nel sottocutaneo (Tav. I, fig. 3).

Dopo 50 gg. dal trapianto (4 casi).

L'epidermide in tre casi è normale, in uno di essi, in un tratto, si osserva uno zaffo epidermico, relativamente voluminoso, che si insinua negli strati sottostanti, fino a raggiungere il derma; nel quarto caso vi sono zone in cui lo strato epidermico risulta iperplastico.

Lo strato dei cromatofori è sempre molto discontinuo e rappresentato da residui melanici pulverulenti di media grandezza o voluminosi localizzati, in un caso, nelle sedi precedentemente occupate da ghiandole che sono scomparse.

Le ghiandole in un caso sono normali, in due in parte assenti e nel quarto caso in gran parte scomparse.

Il derma è sempre normale.

Linfociti si osservano solo nella tela sottocutanea; sono molto rari in tre casi (Tav. I, fig. 4) e presenti in un certo numero nell'ultimo caso (Tav. I, fig. 5).

LOTTO II (Irradiazione della sola regione splenica dell'ospite).

Dopo 10 gg. dal trapianto (4 casi).

In tutti i casi presi in esame l'epidermide ha un aspetto istologico sovrapponibile a quello normale e lo strato dei cromatofori è rappresentato da residui melanici discontinui e molto voluminosi.

Le ghiandole sono normali solo in un caso, in un altro sono morfologicamente normali, ma in numero lievemente ridotto e nelle sedi, occupate in precedenza da esse, si osservano ammassi melanici. Negli altri due casi il numero delle ghiandole presenti è ridotto a circa la metà.

Il derma ha sempre una struttura normale.

L'infiltrazione linfocitica è scarsa in tre casi, mentre nel quarto assume una maggior consistenza (Tav. II, fig. 6). I linfociti presenti si osservano sempre nel sottocutaneo o al confine tra derma e tela sottocutanea.

Dopo 20 gg. dal trapianto (5 casi).

L'epidermide, solo in un caso, presenta un quadro istologico normale, in tre appare qua e là ispessita ed in un altro risulta invasa da linfociti.

Lo strato dei cromatofori è sempre molto discontinuo e di esso non rimangono che ammassi melanici, più o meno numerosi, più spesso pulverulenti e meno frequentemente voluminosi.

Le ghiandole, in due casi, sono in gran parte scomparse e negli altri tre sono ridotte di numero a circa la metà. In uno di questi tre casi le ghiandole presenti non sono sempre ben distinguibili morfologicamente ed in un altro, nella sede prima occupata da esse, si riscontrano molto spesso ammassi di melanina e talora anche gruppi di linfociti.

Il derma, solo in un caso, presenta una struttura aberrante.

L'infiltrazione linfocitica, esigua in due casi (in uno localizzata fra le ghiandole e nell'altro nel sottocutaneo), diviene molto più evidente in altri due casi (in uno tra le ghiandole e nel derma, nell'altro, oltre che a livello dell'epidermide, anche fra le ghiandole, nel derma e soprattutto nella tela sottocutanea) (Tav. II, fig. 7). Nel quinto caso la presenza dei linfociti è molto cospicua solo nel sottocutaneo.

Dopo 30 gg. dal trapianto (5 casi).

L'epidermide in un solo caso presenta un quadro istologico simile al normale, in altri due, in alcune zone, è iperplastica, nei rimanenti casi ha confini non ben distinguibili e zaffi cellulari che si insinuano tra le ghiandole.

Lo strato dei cromatofori in tre casi è abbastanza continuo, negli altri due è rappresentato esclusivamente da frammenti melanici, disposti intorno alle ghiandole.

Le ghiandole in un solo caso sono presenti in numero elevato, in un altro sono numericamente ridotte alla metà ed hanno struttura normale, nei rima-

nenti molte sono scomparse e tra quelle presenti alcune hanno morfologia e confini alterati.

Il derma solo in un caso è in parte disorganizzato.

I linfociti, solo localizzati alla tela sottocutanea, sono generalmente poco numerosi in quattro casi (Tav. II, fig. 8) e solamente in uno sono presenti in maggior numero.

Dopo 50 gg. dal trapianto (6 casi).

L'epidermide in un caso ha un aspetto istologico quasi normale, in altri tre appare iperplastica in alcuni tratti e non ben distinguibile, in un quinto caso si osservano alcune zone non ben delimitabili e talora infiltrate da pochi linfociti.

Lo strato dei cromatofori, ad esclusione di un caso in cui risulta continuo con rari frammenti pulverulenti, negli altri quattro è ridotto in ammassi melanici più o meno numerosi e voluminosi.

Le ghiandole in quattro casi sono per la maggior parte assenti e nella sede precedentemente occupata da esse si notano residui melanici e linfociti (in due di tali casi le formazioni ghiandolari presenti non sono ben distinguibili); nel quinto le ghiandole sono presenti in elevato numero ed hanno un aspetto normale.

Il derma in quattro casi ha struttura normale o quasi normale; in un quinto caso il derma, per circa la metà della sua estensione, è disorganizzato ed abbondantemente infiltrato da elementi linfocitari.

I linfociti in quattro casi sono presenti principalmente nel sottocutaneo e, in minor grado, nel derma; specie in due di questi casi sono molto numerosi (Tav. II, fig. 9). In un quinto caso, l'infiltrazione linfocitica è molto cospicua sia a livello dello strato ghiandolare, sia del derma che della tela sottocutanea.

Nel sesto caso, infine, si riscontra una massiva infiltrazione linfocitica che non consente di distinguere le diverse strutture del lembo di pelle trapiantato (Tav. II, fig. 10).

DISCUSSIONE

I risultati della presente ricerca mostrano una significativa differenza se confrontati con quelli da noi già precedentemente ottenuti, riguardanti trapianti omoplastici di pelle tra Tritoni adulti normali (Gibertini e Filoni, 1970). Infatti, mentre in essi era stata riscontata, già intorno al 20° giorno dal trapianto, una consistente infiltrazione linfocitica che diveniva sempre più cospicua nei giorni successivi, fino a determinare, al 40° giorno, la completa distruzione del lembo di pelle trapiantato, nei dati qui riportati sia nel caso di portatori totalmente irradiati, che in quello di portatori sottoposti ad irradiazione della sola regione splenica, il quadro istologico dei trapianti non presenta mai, a nessuno degli stadi di fissazione esaminati, alterazioni sovrapponibili a quelle osservate nella nostra indagine, in precedenza citata.

D'altra parte, l'analisi istologica degli omotrapianti, effettuati nelle attuali esperienze, comparata con quella compiuta su omotrapianti i cui ospiti erano stati sottoposti ad irradiazione totale, ma con una dose di raggi X di 1250 r (Gibertini e Filoni, 1970), inferiore a quella somministrata in questa ricerca, mette in risalto due diversi aspetti dei risultati. Una dose sub-letale di 1250 r, pur permettendo una più lunga sopravvivenza del trapianto, rispetto ad omotrapianti tra Tritoni non trattati, non risulta altrettanto efficace sul prolungamento del Tempo di sopravvivenza medio dei trapianti eseguiti sia dopo irradiazione totale dell'ospite con una dose di 1600 r, sia dopo irradiazione, sempre con 1600 r, solamente della regione splenica.

Inoltre, nell'ambito dei risultati qui esposti ed alla luce di quelli da noi ottenuti in trapianti omoplastici i cui portatori erano stati precedentemente splenectomizzati chirurgicamente a vari intervalli di tempo (Margotta, Gibertini e Ventura, 1976), il confronto rivela una notevole sovrapponibilità dei quadri istologici dei trapianti effettuati su Tritoni splenectomizzati cinque giorni prima del trapianto (intervallo di tempo che più si avvicina, fra quelli da noi saggiati, a quello intercorso nella presente ricerca tra irradiazione della milza del portatore e trapianto) con quelli i cui portatori hanno subito l'irradiazione della sola milza.

Infine, nelle presenti esperienze sebbene fosse lecito prevedere risultati migliori per quanto concerne le condizioni istologiche dei trapianti, con particolare riferimento all'infiltrazione linfocitica, in quelli effettuati su Tritoni totalmente irradiati, rispetto a quelli eseguiti su Tritoni irradiati con la stessa dose di raggi X, ma sottoposti ad irradiazione della sola regione splenica, tuttavia la differenza, da noi osservata, non è poi risultata così rimarchevole (ad eccezione dello stadio di fissazione di 50 giorni).

La spiegazione dei risultati ottenuti in questa ricerca, alla luce anche del confronto con i nostri precedenti dati, che si riferiscono alla splenectomia chirurgica (Margotta, Gibertini e Ventura, 1976), e con quelli ottenuti da Paces Zaffaroni e Zavanella (1976), in seguito ad allotrapianti e xenotrapianti di tessuto linfoide in *Triturus cristatus* ed in *Xenopus laevis*, ci consentono di attribuire alla popolazione linfocitica della milza non solo, come è noto, un ruolo preminente nella risposta anticorpale, ma anche una notevole funzione nella « reazione agli omotrapianti », come dimostrato dallo stato dei trapianti omoplastici di pelle in questi esperimenti, in cui la milza è stata altamente danneggiata.

BIBLIOGRAFIA

- FILONI S., GIBERTINI G., MARGOTTA V. e CATALINI N. (1971) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 51, 440.
GIBERTINI G. e FILONI S. (1970) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 48, 720.
MARGOTTA V., GIBERTINI G. e VENTURA M. (1976) - « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », in corso di stampa.
MARGOTTA V., RECCO M. P. e GIBERTINI G. (1976) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, in corso di stampa.
PACES ZAFFARONI N. e ZAVANELLA T. (1976) - « Riv. Biol. », 69, 95.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite totalmente irradiato con 1600 r (Lotto I), fissato dopo 10 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 2. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite totalmente irradiato con 1600 r (Lotto I), fissato dopo 20 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 3. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite totalmente irradiato con 1600 r (Lotto I), fissato dopo 30 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 4. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite totalmente irradiato con 1600 r (Lotto I), fissato dopo 50 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 5. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite totalmente irradiato con 1600 r (Lotto I), fissato dopo 50 giorni dal trapianto. $\times 170$.

TAVOLA II

- Fig. 6. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite irradiato con 1600 r alla sola regione splenica (Lotto II), fissato 10 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 7. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite irradiato con 1600 r alla sola regione splenica (Lotto II), fissato 20 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 8. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite irradiato con 1600 r alla sola regione splenica (Lotto II), fissato 30 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 9. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite irradiato con 1600 r alla sola regione splenica (Lotto II), fissato 50 giorni dal trapianto. $\times 170$.
- Fig. 10. - Trapianto omoplastico di un lembo di pelle, effettuato su un ospite irradiato con 1600 r alla sola regione splenica (Lotto II), fissato 50 giorni dal trapianto. $\times 170$.



