

ACTA GENETICAE MEDICAE ET GEMELLOLOGIAE

Volumen XII

N. 2 - Aprilis 1963

Istituto di Genetica Medica e Gemellologia «G. Mendel», Roma (Italia)
Direttore: Prof. L. GEDDA

Considerazioni e Ricerche geneticistiche sul Problema degli omoinnesti *

Gedda Luigi, Gentileschi Ezio, Gentileschi Giorgio

(Omoinnesti in gemellanze di coniglio per la ricerca di gemelli monozigotici — Reazione innesto-ospite nell'omoinnesto con espianto normale, oppure trattato con radiazioni — Reazione regionale nell'autoinnesto e nell'omoinnesto fra individui di linee pure e in panmixia — Controllo al microscopio elettronico delle reazioni tissutali nell'autoinnesto e nell'omoinnesto).

Parlando a Padova sul problema degli omoinnesti, è doveroso ricordare la grande figura di un Maestro della Scuola patavina: Achille De Giovanni.

Il nostro pensiero si rivolge a Lui, come a Chi, nel tempo di una Medicina essenzialmente localistica, riprese in termini moderni il problema medico della costituzione, problema secolare perchè si riferisce al concetto ippocratico dell'unità e della globalità dell'organismo umano, parola che corrisponde, nel linguaggio medico, al concetto della individualità. A distanza di alcuni decenni, il problema dell'individualità biologica dell'organismo umano si è spostata dal settore della morfologia macroscopica, dove il De Giovanni ne aveva cercato la soluzione, ad un settore interumano com'è quello della scienza dell'eredità, ma l'anima del problema rimane pur sempre la stessa; di qui l'omaggio che mi sembra doveroso al grande Medico della Scuola che ci ospita.

Nell'ambito della Genetica, mentre lo studio del genotipo offre innumerevoli fonti di ricerca per inquadrare l'*eccitas* biologica individuale, un significato parti-

* Relazione tenuta al «Simposio Internazionale sugli Omoinnesti», Università di Padova, 6-7-8 maggio 1963.

colare viene assunto dai fenomeni della istocompatibilità come quelli che caratterizzano l'individualità delimitandola, quasi tracciando un confine, rizzando una siepe, scavando un fossato attorno alla singola individualità biologica umana. Il problema dell'omoinnesto riguarda l'attraversamento di questo confine, la possibilità di scavalcare la siepe, di gettare un ponte al di sopra del fossato.

Che il problema degli omoinnesti sia un problema di competenza genetica lo dimostrano, come spesso avviene, le eccezioni alla regola. « Such exceptions — notano giustamente Hašek e collaboratori — are the starting points for the study of the mechanism of immunological tolerance ». La regola è, come è ben noto, che l'innesto omoplastico (*a fortiori* l'eteroplastico) non è accettato. Le eccezioni sono tre: 1) l'accettazione da parte del gemello monozigotico di un omoinnesto del suo coge-mello; 2) l'accettazione di un omoinnesto reciproco da parte di animali di allevamento « inbred »; 3) l'accettazione di un omoinnesto speciale da parte di certi luoghi privilegiati dell'organismo come la cornea. Prescindiamo dal terzo caso che sta a sè, e chiediamoci perchè i gemelli monozigotici e gli animali « inbred » accettano un certo omoinnesto. La risposta scaturisce spontanea quando venga sottolineato il fatto contrapposto, e cioè che i gemelli dizigotici respingono l'omoinnesto cogemellare, così come gli animali in panmixia respingono l'omoinnesto cospecifico. Abbiamo quindi il fatto e la prova del fatto che la chiave del problema risiede nell'affinità ereditaria e cioè nella isogenicità dei gemelli monozigotici e degli animali « inbred ». Perciò i termini di *innesto autoplastico e omoplastico, isoplastico e alloplastico* (o *eteroplastico*) possono all'occorrenza essere sostituiti dai termini corrispondenti e complementari di *innesto isogenico e allogenico*, eccezione fatta per gli omoinnesti fra cogemelli monozigotici e fra animali « inbred » che sono isogenici.

1. Omoinnesti in fratrie di coniglio per la ricerca di gemelli monozigotici

Noi abbiamo avuto una prima occasione di confrontare l'omoinnesto isogenico con l'omoinnesto allogenico del coniglio effettuando un ricerca su fratrie, essendo stati aiutati da una sovvenzione del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Scopo ultimo di questa ricerca è di studiare l'esistenza, i caratteri e la metodologia diagnostica della gemellazione monozigotica in un animale comunemente gemellogenetico come il coniglio. L'indagine è motivata dal fatto che ogni ricerca sull'animale viene grandemente aiutata se può verificarsi con un controllo che non sia approssimativo, ma bensì isogenico. Delle ricerche di questo tipo intorno all'effetto delle radiazioni ionizzanti su tessuto epatico studiato al microscopio elettronico mediante controllo cogemellare furono da noi comunicate al Congresso Internazionale di Igiene e di Medicina Preventiva di Vienna (1962).

Nell'ambito della ricerca propedeutica di cui si è detto, l'individuazione dei gemelli monozigotici in seno a gemellanze indiscriminate del coniglio avviene mediante omoinnesto crociato di cute secondo gli schemi allegati (cfr. fig. 1).

Ogni membro della gemellanza viene saggiato mediante innesto crociato con ogni altro membro. Se l'innesto reciproco attecchisce nei due soggetti, si può ritenere che si tratti di conigli monozigotici e cioè aventi eguale patrimonio ereditario. Nella fig. 2 viene riportato un esempio d'innesto positivo.

Per controllo e per esperimento abbiamo anche realizzato innesti a doppio incrocio e cioè con innesto contemporaneo di espianto da cogemello monozigotico e da cogemello dizigotico come risulta dalla fig. 3. Il rifiuto dell'omoinnesto allogenico del cogemello dizigotico non ha impedito il contemporaneo attecchimento dell'omoinnesto isogenico cioè gli anticorpi sollecitati dall'omoinnesto incompatibile sono tanto rigorosamente mirati contro le caratteristiche antigeniche determinate dal diverso genotipo del donatore che l'omoinnesto contemporaneo del cogemello avente eguale genotipo non dimostra alcun segno di sofferenza.

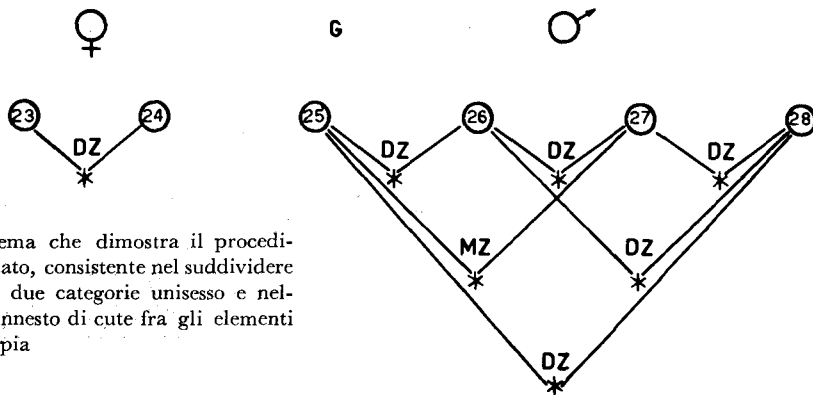


Fig. 1. Schema che dimostra il procedimento adottato, consistente nel suddividere la fratria in due categorie unisesso e nell'eseguire l'innesto di cute fra gli elementi di ogni coppia

A proposito della reazione generale che l'omoinnesto isogenico cogemellare e l'omoinnesto allogenico cogemellare provocano nel coniglio ospite, abbiamo eseguito delle ricerche elettroforetiche con i risultati indicati nella fig. 4.

La reazione all'innesto si manifesta costantemente con una diminuzione nel tasso percentuale delle albumine e con un aumento delle globuline. I valori prima dell'innesto sono indicati con le colonne scure e quelli dopo l'innesto con le colonne chiare. Questa reazione, del resto ben nota, è presente nei tre casi dell'autoinnesto, dell'omoinnesto fra individui in panmixia (e quindi allogenico) e dell'omoinnesto fra cogemelli MZ (e quindi isogenico). Una differenza che finora abbiamo notato, ma che attendiamo di controllare sopra un maggior numero di casi, è il diverso incremento della frazione γ che è massima nel caso dell'omoinnesto allogenico e minima nel caso dell'omoinnesto isogenico, come se in questo caso l'organismo, pur spostando l'equilibrio del rapporto A/G dalla media di 0,85 alla media di 0,48, non fosse nella necessità di un utilizzo così cospicuo della frazione γ -globulinica come negli altri casi di innesto.



Fig. 2. Probando con l'innesto cutaneo proveniente dal cogemello MZ: stabile attecchimento del lembo innestato



Fig. 3. Probando con doppio innesto cutaneo. Quello di sinistra, proveniente dal cogemello MZ, dimostra uno stabile attecchimento; quello di destra, invece, proveniente da un membro della stessa fratria del probando ma con diverso zigotismo, appare completamente necrotico

La ricerca della gemellazione monozigotica nel coniglio, da noi praticata su 56 individui di 15 plurigemellanze mediante la tecnica dell'omoinnesto crociato, ci ha permesso di calcolare la frequenza del fenomeno presso il coniglio domestico, la quale è del 26%. Ci ha sorpreso il fatto che questa cifra corrisponde abbastanza bene alla media di frequenza della gemellazione monozigotica nella specie umana la quale appunto oscilla fra il 26% e il 38%. Lo schema riportato nella fig. 5 traduce questa concordanza che può certamente essere fortuita, ma che potrebbe anche ricevere conferma da ulteriori ricerche. Allora si imporrebbe la domanda di fino a qual punto questa percentuale rappresenti una costante biologica: generica o specifica?

Nè si può tralasciare di mettere in risalto il fatto che nell'uomo la nascita singola è la norma, mentre nel coniglio la norma è rappresentata dalla plurigemellanza.

Le ricerche sugli omoinnesti del coniglio ci hanno guidato ad impostare altri problemi che più intimamente riguardano il problema degli omoinnesti dal punto di vista locale e cioè dell'isto-citogenetica.

Ci siamo anzitutto occupati dei problemi che accompagnano la non accettazione dell'omoinnesto come quello dell'origine dell'infiltrazione parvicellulare reattiva, se essa provenga da parte dell'ospite oppure dell'espianto ed a questo fine abbiamo provocato una depressione dei poteri d'incompatibilità nell'innesto mediante irradiazione del donatore di tessuto. Con altra ricerca abbiamo esteso lo studio delle reazioni locali alla regione dove l'omoinnesto viene praticato e precisamente studiando le modificazioni che si verificano a livello delle linfoghiandole regionali mettendo in paragone i fenomeni che si possono osservare con il microscopio ottico e con quelli del microscopio elettronico nel caso di omoinnesto fra soggetti in panmixia, di omoinnesto con utilizzazione di animali inbred e di autoinnesto.

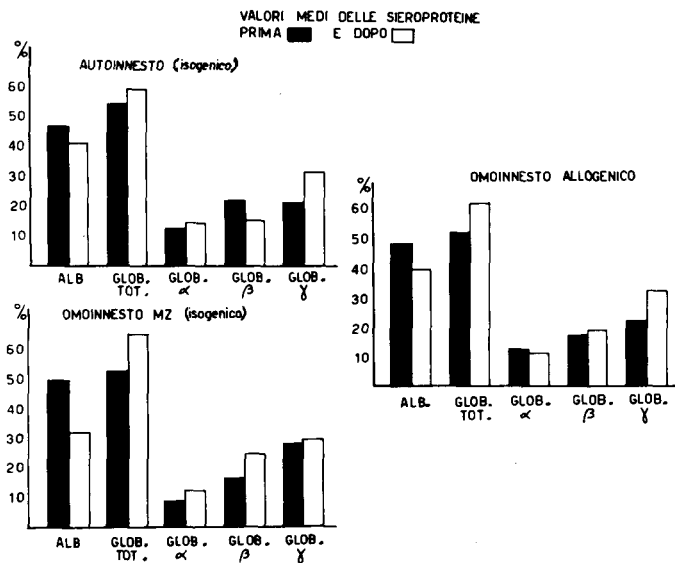


Fig. 4. Schemi relativi ai valori medi delle sieroproteine prima e dopo innesti di cute isogenici ed allogeneici

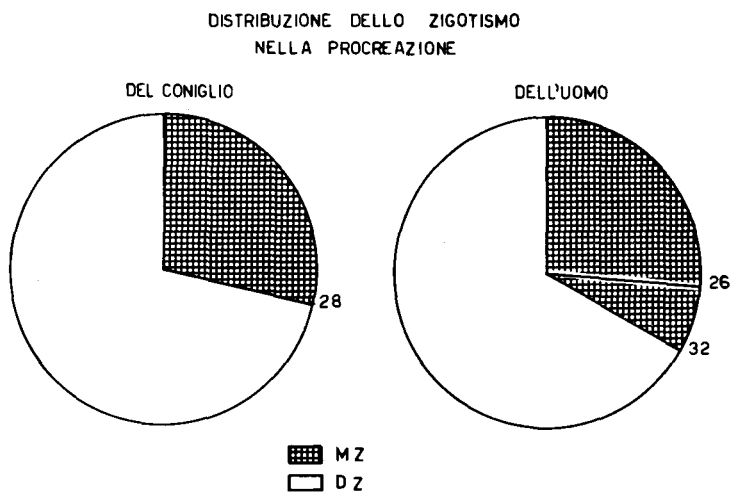


Fig. 5. La percentuale degli MZ risulta fondamentale analoga a quanto si riscontra nella specie umana

II. Reazione innesto-ospite nell'omoinnesto con espianto normale o trattato con irradiazione

Uno degli aspetti morfologicamente più caratteristici nel corso della reazione d'istoincompatibilità agli omoinnesti è dato dalla presenza di un'abbondante infiltrazione interstiziale di tipo parvicellulare.

Tale infiltrazione, osservata da Loeb nel caso di sottili fette di parenchima renale trapiantato nel sottocutaneo, è stata da questo Autore ritenuta la causa dell'eliminazione del trapianto. Da parte di AA. più recenti come Dempster e Simonsen si è cercato di dare un'interpretazione alla genesi di tale infiltrato ritenendolo come originato nel tessuto innestato per un processo di differenziazione degli elementi del sistema reticolo-istiocitario in esso presenti. A sostegno della loro tesi gli AA. suddetti adducono il fatto che esisterebbero, oltre alla presenza di numerose mitosi, forme di transizione tra gli elementi fusati, corrispondenti a cellule del reticolo in fase di riposo, ed i vari tipi di cellule rotondeggianti e poligonali che costituiscono l'infiltrato e che mostrano una netta pironinofilia del citoplasma. Una tale proliferazione di elementi cellulari che prende origine dall'organo trapiantato viene considerata come espressione di una reazione immunologica dell'innesto verso l'organismo ospite. Recentemente però altri AA. (Makinodan e coll., Fowler e West, ecc.) hanno avanzato l'ipotesi che molti dei supposti esempi di reazione del trapianto verso l'ospite siano in realtà legati alla reazione immunitaria che parte dall'organismo ospite e che è diretta verso il tessuto innestato. L'infiltrato interstiziale sarebbe pertanto prodotto dall'organismo ospite e veicolato secondariamente nel tessuto innestato.

Per poter chiarire alcuni aspetti relativi a tale problema abbiamo ritenuto utile servirci della nota proprietà delle radiazioni ionizzanti di deprimere le reazioni del reticolo-endotelio. A tale scopo abbiamo proceduto, in casi di omoinnesti di parenchima renale sec. la tecnica di Loeb, alla preventiva irradiazione del rene da innestare, con una dose di 3.000 rad.

L'esame istologico dei frammenti di parenchima renale omologo, precedentemente sottoposti ad irradiazione, ha dimostrato una scarsissima infiltrazione interstiziale, a differenza di quanto abbiamo invece osservato nei casi non irradiati. Dopo l'azione delle radiazioni ionizzanti si nota come i tubuli ed i glomeruli sono a stretto contatto gli uni con gli altri senza alcuna traccia di infiltrazione parvicellulare. La componente interstiziale non appare aumentata e risulta costituita da pochi elementi fusati e da esili capillari. Elementi d'infiltrazione costituiti da cellule rotonde ed una discreta proliferazione fibroblastica si riscontrano solo ai confini tra l'ospite ed il tessuto innestato, specie negli animali sacrificati dopo un maggior intervallo di tempo. Solo raramente è stato possibile evidenziare in seno al parenchima renale qualche focolaio di elementi mononucleati il cui citoplasma mostrava frequentemente una spiccata affinità per la pironina, indice della evoluzione in senso plasmocitario di questi elementi.

Da quanto sopra risulta evidente perciò che, per lo meno in parte, la presenza di

un infiltrato interstiziale parvicellulare nel caso di omoineesti è dovuta a elementi che si originano direttamente nell'innesto stesso. Il sistema reticolare dell'ospite sembrerebbe esplicare la sua azione sul trapianto prevalentemente per mezzo dell'infiltrazione presente alla periferia del tessuto.

Nell'ambito dei mezzi atti a deprimere le reazioni del reticolo-endotelio vogliamo ricordare a tal punto che un particolare interesse ha suscitato in questi ultimi tempi l'uso di sostanze ad azione antimitotica quale mezzo per facilitare l'attecchimento degli omoineesti. L'uso di queste sostanze si dimostra, come confermano anche ricerche al microscopio elettronico in corso in tal senso nel nostro Istituto, particolarmente utile nello studio dei processi che intervengono nel corso della reazione d'istoincompatibilità.

III. Reazione regionale nell'autoinnesto e nell'omoinnesto fra individui di linee pure (*inbred*) ed individui in *panmixia*

Per meglio definire i fenomeni che intervengono nell'organismo ospite nel corso della reazione d'istoincompatibilità agli omoineesti, abbiamo studiato le modificazioni che si osservano sia al microscopio ottico che elettronico nelle linfoghiandole regionali di animali sottoposti ad innesti di vario tipo.

a) Reazione linfoghiandolare nell'autoinnesto del coniglio e nell'omoinnesto fra topi inbred.

Descriviamo dapprima le modificazioni linfonodali nel corso di autoinnesti di cute nel coniglio e di omoineesti cutanei fra topi inbred.

I reperti istologici a carico del tessuto linfatico sono in entrambi i casi fondamentalmente analoghi.

La normale architettura della ghiandola linfatica appare sempre conservata; la corticale presenta follicoli poco evidenti, di tipo solido; l'architettura vascolare dei follicoli è scarsa e rappresentata da esili capillari. Il tessuto linfo-reticolare diffuso è costituito da elementi di tipo reticolare nelle cui maglie sono allogati numerosi linfociti; rarissime le plasmacellule. Nella midollare i seni linfatici sono chiaramente evidenti e contengono rare emazie, linfociti e scarse cellule del rivestimento endoteliale, alcune delle quali in attività fagocitaria (cfr. fig. 6).

I cordoni linfatici sono sottili e risultano costituiti da cellule reticolari e linfociti (cfr. fig. 7).

b) Reazione linfoghiandolare nell'omoinnesto di coniglio e nell'omoinnesto fra topo inbred e topo di panmixia.

Abbiamo inoltre studiato il quadro istologico dei linfonodi regionali in caso di omoineesti di cute nei conigli e di omoineesti cutanei fra topi inbred e topi non selezionati. In quest'ultimo caso i topi non selezionati costituivano gli animali donatori, mentre i recettori erano rappresentati dai topi inbred.

I quadri istologici da noi osservati presentano reperti che, se per molti dati si so-

vrappongono, differiscono per altri, a seconda che trattasi di linfonodi regionali del coniglio, o del topo inbred. I reperti comuni ad entrambi gli animali sono i seguenti.

A carico della corticale i follicoli linfatici appaiono modicamente aumentati di volume, con differenziazione in alcuni di essi di una zona centrale con le caratteristiche del « centro chiaro ». Questo è costituito in genere da elementi con nucleo lievemente fusato o rotondeggiante, con cromatina disposta in un delicato reticolo e con nucleolo ben evidenziabile. Il citoplasma di tali elementi non è mai molto abbondante e spesso si espande in sottili prolungamenti filiformi. Le mitosi costituiscono un reperto molto frequente. La componente vascolare del nodulo non mostra alterazioni riferibili a brusche modificazioni della permeabilità delle sue pareti, come plasmorragie o spiccato edema perivasale. Mancano egualmente note di danno cellulare a carico degli elementi circostanti. L'insieme del quadro istologico depone quindi per un'attiva proliferazione delle cellule del reticolo centronodulare anche se in grado non spiccato e non uniformemente distribuita nell'ambito della linfoghiandola. L'alterazione fondamentale si riscontra invece a carico del tessuto linforeticolare diffuso, in seno al quale si nota una spiccata proliferazione di elementi a contorni rotondeggianti od ovalari, con scarso citoplasma debolmente pironinofilo e nucleo rotondeggiante, con cromatina lievemente più densa che nelle cellule reticolari, con evidente nucleolo. Il nucleo occupa in tali cellule una posizione in genere lievemente eccentrica. Alla debole pironinofilia del citoplasma si accompagna un lieve aumento della sua basofilia. Tra queste cellule si riscontrano linfociti di piccole e medie dimensioni (cfr. fig. 8). I cordoni linfatici, evidenti solo nella parte centrale della midollare a causa della notevole iperplasia della sostanza linforeticolare diffusa, dimostrano un lieve aumento numerico delle plasmacellule con assenza dei tipici elementi cellulari in attiva proliferazione nelle altre zone della linfoghiandola. A carico dei seni si riscontra la presenza di elementi della sponda desquamati e proliferanti nel lume, insieme a numerose emazie e linfociti.

Nei linfonodi in cui la necrosi dell'innesto è già in atto, i reperti sono caratterizzati da una minore evidenza dei noduli linfatici della corticale rispetto alla fase precedente. A carico del tessuto linforeticolare diffuso può riscontrarsi anche in questa fase, specie all'inizio del processo che condurrà alla necrosi del lembo cutaneo, la presenza dell'attiva proliferazione di elementi descritta precedentemente, ma generalmente, specie se il trapianto è in stato avanzato di eliminazione, si ha una riduzione del tessuto linforeticolare diffuso che ritorna ad essere costituito da linfociti con intercalate le normali cellule del reticolo.

Il reperto di maggiore interesse, in questa fase, è costituito dalle modificazioni dei cordoni linfatici della midollare. In essi infatti le plasmacellule, che negli stadi precedenti erano andate aumentando, si riscontrano in assoluta prevalenza, tanto da costituire la quasi totalità delle cellule che formano i cordoni linfatici (cfr. fig. 9).

Con il verificarsi della perdita di vitalità da parte del lembo di cute innestato si nota a carico dei seni linfatici una rilevante iperplasia degli elementi del rivestimento endoteliale. I seni appaiono infatti stipati da elementi fusati, con citoplasma che si espande in filamenti che si anastomizzano con quelli di altre cellule dello stesso tipo.

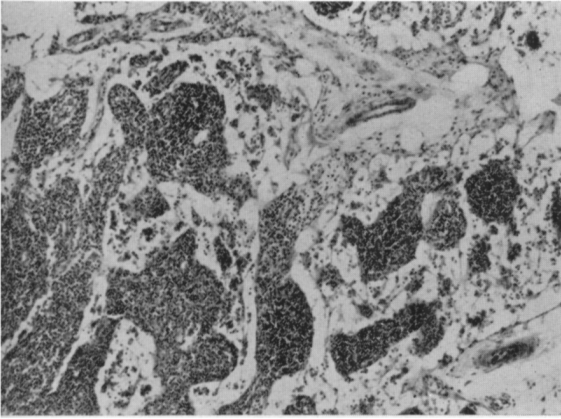


Fig. 6. Seni linfatici caratterizzati dalla presenza di qualche cellula reticolare desquamata, da emazie e linfociti

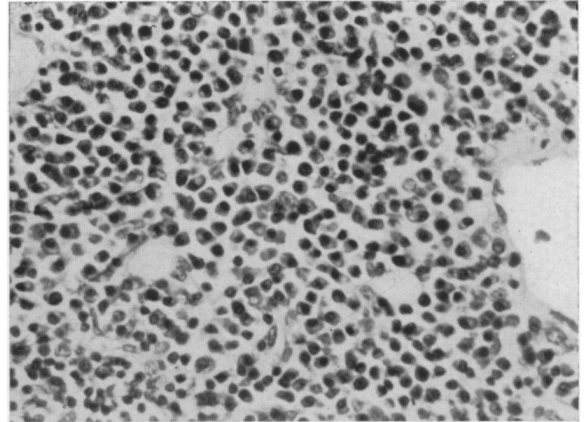


Fig. 9. I cordoni linfatici risultano costituiti in prevalenza da plasmacellule

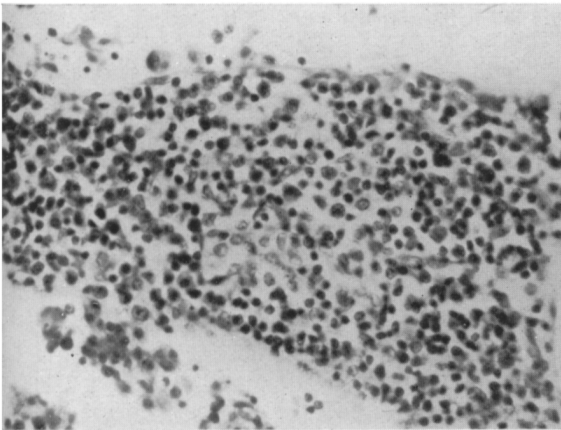


Fig. 7. I cordoni linfatici sono costituiti da linfociti e cellule del reticolo

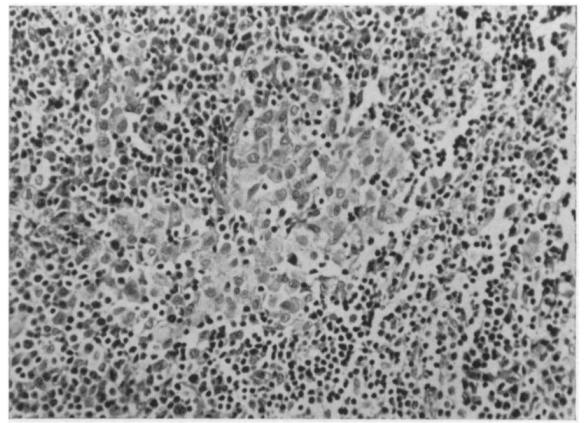


Fig. 10. Linfonodo di coniglio in caso di omoinnesto di cute. Differenziazione di agglomerati di cellule epitelioidi

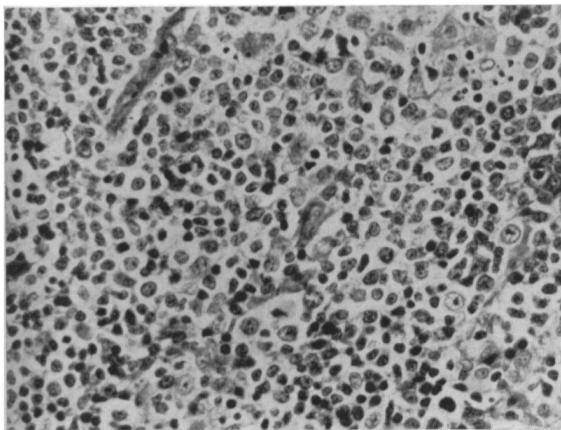


Fig. 8. Spiccata proliferazione di elementi di tipo reticolare

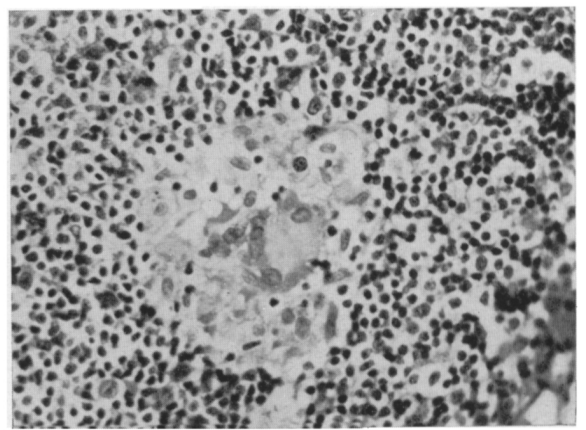


Fig. 11. Linfonodo di coniglio in caso di omoinnesto di cute. Cellula gigante plurinucleata

Alcuni di questi elementi divengono globosi, assumono una tonalità più eosinofila, trasformandosi in fagociti.

Le differenze tra le due categorie sono rappresentate da alcuni reperti osservati nei linfonodi del coniglio che non trovano riscontro nei linfonodi dei topi inbred. Nel primo caso si è talora infatti osservata la proliferazione, in seno al tessuto linforeticolare, di aggregati micronodulari costituiti da elementi poligonali, con abbondante citoplasma eosinofilo aventi i caratteri delle cellule epitelioidi (cfr. fig. 10); in alcuni punti si osserva persino la differenziazione di cellule giganti plurinucleate (cfr. fig. 11). Questi reperti, come si è detto, sono invece costantemente assenti nei linfonodi di animali inbred.

IV. Reperti al microscopio elettronico

Nel quadro delle ricerche sulla reazione d'istoincompatibilità abbiamo ritenuto utile approfondire i dati ottenuti al microscopio ottico mediante un accurato studio comparativo al microscopio elettronico al fine di meglio stabilire le modificazioni che intervengono sul piano ultrastrutturale durante tale processo.

L'esame al microscopio elettronico delle sezioni ultrasottili dei linfonodi tributari in caso di autoinnesto di cute ha permesso di evidenziare degli elementi cellulari, che per le loro caratteristiche morfologiche, sono stati attribuiti alla serie linfocitaria ed identificati come linfoblasti, grandi e piccoli linfociti. L'analisi citologica del linfoblasta ci mostra come questa cellula presenti una forma rotondeggiante, a limiti netti, con nucleo voluminoso, centrale, rotondeggiante con nucleolo ben evidente: si notano alcune volte delle dentellature in cui s'invagina il citoplasma.

Nel citoplasma la componente ergastoplasmatica è scarsamente rappresentata da qualche lamella, mentre numerosi appaiono i granuli di Palade, sparsi inegualmente. I mitocondri sono evidenti intorno al nucleo, spesso voluminosi, ma anche piccoli e di forma varia (cfr. fig. 12). Sono presenti anche cellule con caratteri intermedi tra la cellula linfoblastica ed il linfocita; l'evoluzione verso i grandi ed i piccoli linfociti avviene per una progressiva diminuzione delle dimensioni cellulari, dovute in parte alla riduzione dei diametri nucleari, ma soprattutto a quella della massa citoplasmatica. La cromatina nucleare si fa più densa e più omogenea ed il nucleo si impiccolisce; il citoplasma si presenta sempre più povero di organuli. Nei grandi e piccoli linfociti il nucleo presenta forma per lo più rotondeggiante con sostanza nucleare più omogenea e di densità maggiore di quella dei linfoblasti. Il citoplasma è ricco di granuli di Palade mentre l'apparato del Golgi e l'ergastoplasma sono praticamente assenti. I mitocondri, che tendono a riunirsi ad un polo della cellula dove il citoplasma è relativamente più ampio sono in genere grandi, con creste bene evidenti.

L'analisi delle sezioni ultrasottili dei linfonodi tributari in caso di omoinnesti cutanei, prelevati durante il periodo di iniziale attecchimento, dimostra la presenza di cellule appartenenti alla serie reticolare. Infatti questi elementi cellulari si presentano di forma rotondeggiante od ovalare il cui nucleo appare voluminoso, chiaro, a

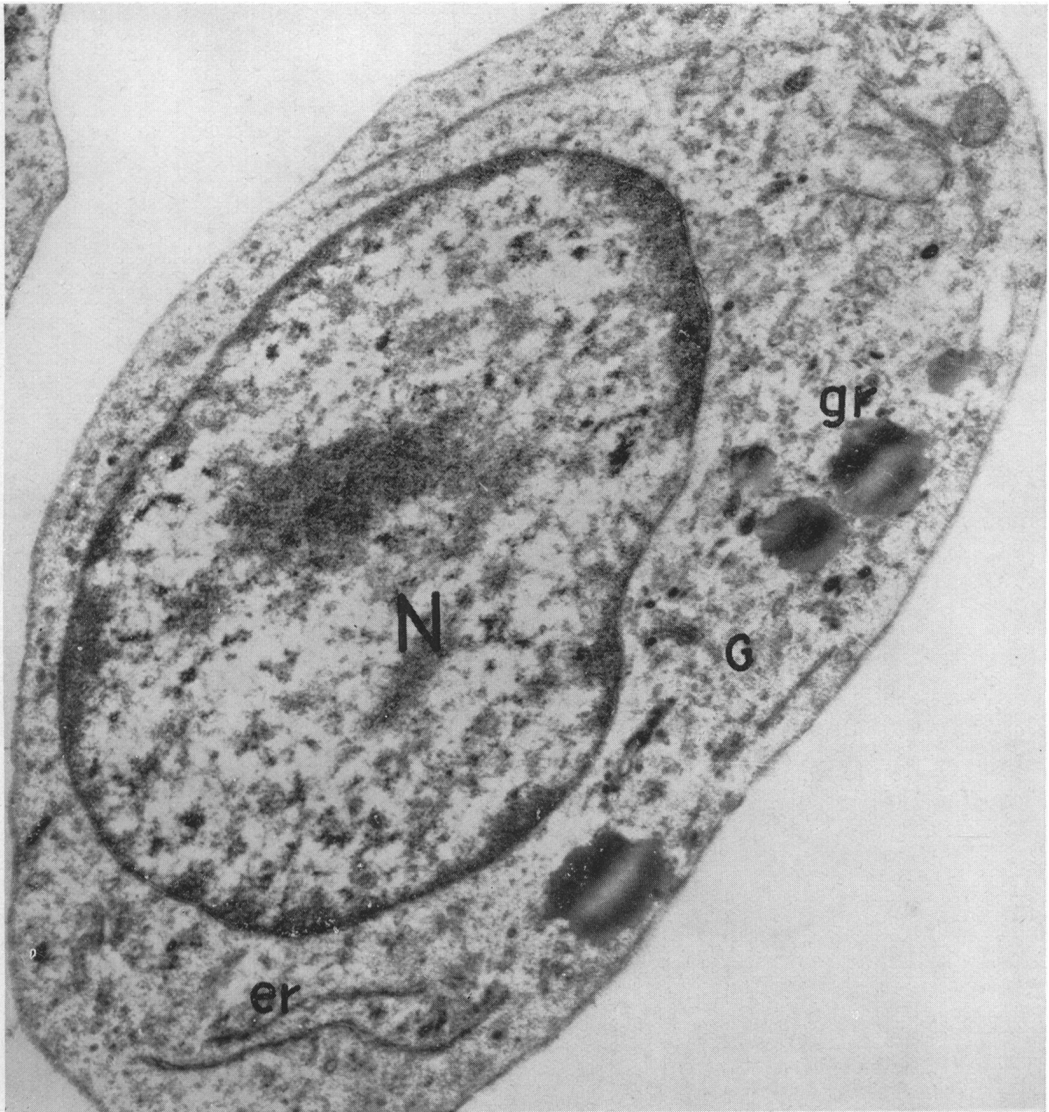


Fig. 12. Elettromicrografia di una sezione di linfonodo in caso di autoinnestto. Cellula della serie linfocitaria

La cellula presenta una forma ovalare, il citoplasma rivela l'ergastoplasma ridotto a qualche filamento (er), delle inclusioni lipodiche a forma stellata (gr), dei granuli di acido ribonucleico dispersi e la zona del Golgi (G). Il nucleo (N) assume anch'esso una forma ovalare



Fig. 13. Elettromicrografia di una sezione di linfonodo in caso di omoinnesto
Cellula reticolare con nucleo eccentrico (N), rispetto al citoplasma in cui si osservano mitocondri (m),
vescicole (v), ed apparato del Golgi (G)

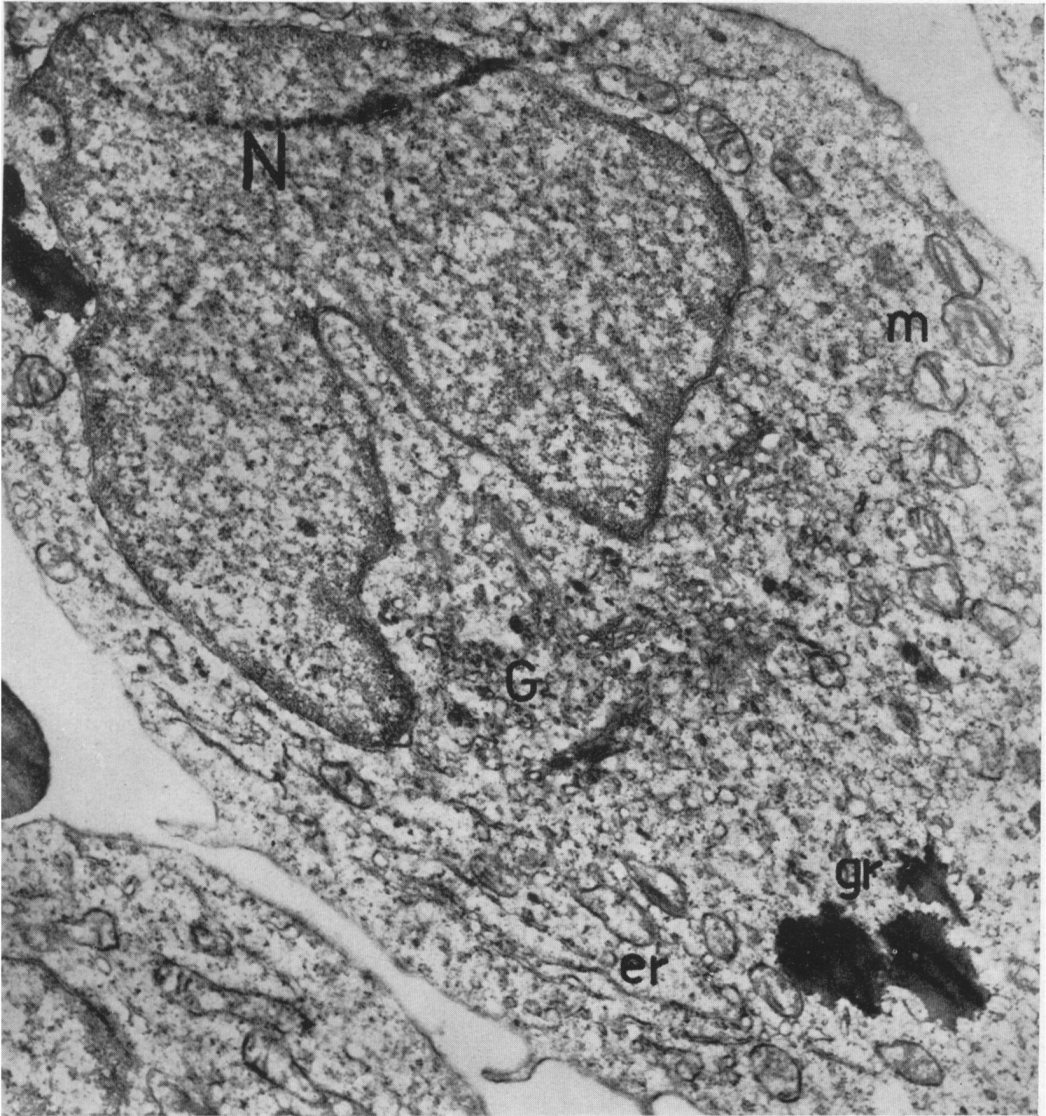


Fig. 14. Elettromicrografia di una sezione di linfonodo al VI giorno in caso di omoimnesto. Cellula reticolare caratterizzata da un grande nucleo e da un citoplasma abbondante, in cui si notano mitocondri (m), ed inclusioni lipidiche (gr); è presente il reticolo endoplasmico (er) e l'apparato del Golgi (G) che è molto sviluppato («arcoplasma»)

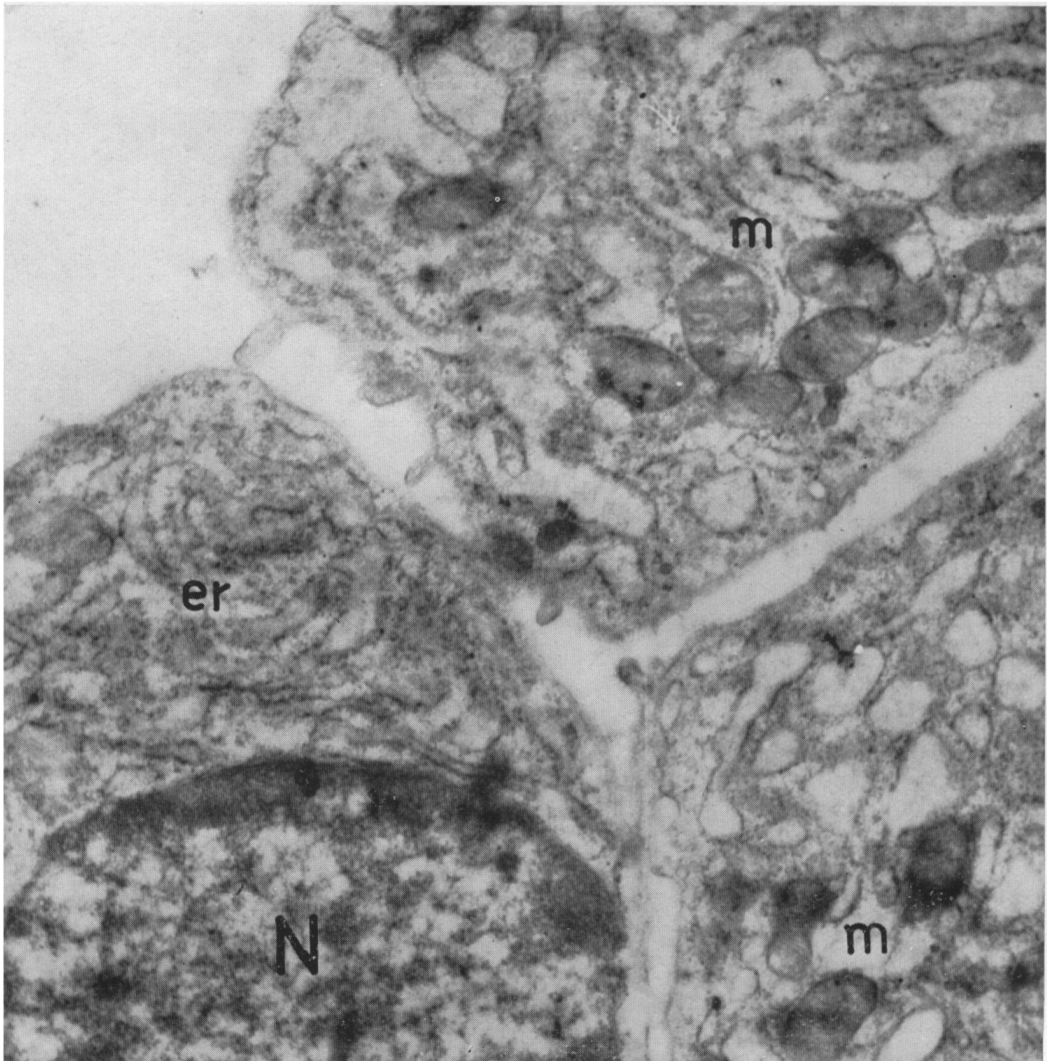


Fig. 15. Elettromicrografia di una sezione di linfonodo al X giorno in caso di omoincesto Plasmacellule mature i cui citoplasmi rivelano le membrane ergastoplasmatiche che appaiono sia sotto forma di lamelle poco dilatate, sia con l'aspetto dei «sacchi ergastoplasmatici»

contorni irregolari, circondato da un citoplasma abbondante con piccoli mitocondri e ricco di granuli di acido ribonucleico, responsabili della pironinofilia riscontrata al microscopio ottico. L'apparato di Golgi è molto sviluppato (cfr. fig. 13).

Nei prelievi effettuati a distanza di due giorni si nota che la proliferazione reticolare presenta, all'analisi con il M. E., aspetti citologici abbastanza tipici della cellula reticolare in atteggiamento plasmocitario; infatti il nucleo sempre grande, assume una posizione eccentrica rispetto al resto della cellula. Nel citoplasma, inoltre, mentre l'apparato di Golgi assume una notevole estensione tanto da essere definito col termine di « arcoplasma », si nota in alcune cellule la presenza dell'ergastoplasma in forma di lamelle disposte nella parte periferica del protoplasma (cfr. fig. 14); in altre cellule esso è ancora più sviluppato costituendo lamelle dilatate che delimitano tipici « sacchi ergastoplasmatici ».

Con il sopravvenire della necrosi del trapianto si osserva che la maggior parte degli elementi presenti nei cordoni linfatici ha assunto la tipica morfologia delle plasmacellule. Il nucleo appare infatti in posizione tipicamente polare, propria della cellula plasmocitaria, mentre il citoplasma presenta un grande sviluppo delle lamelle ergastoplasmatiche fino ad occupare la quasi totalità di esso.

I componenti ergastoplasmatici sono ampiamente rappresentati nelle loro più importanti caratteristiche; infatti le membrane intracitoplasmatiche, che decorrono parallelamente e concentricamente al nucleo e che appartengono alla varietà rugosa, appaiono sia sotto forma di lamelle poco dilatate, sia con l'aspetto di « sacchi ergastoplasmatici »; inoltre lo spazio delimitato dalle membrane appare sia a struttura canalicolare che tubulare, quando le membrane sono parallele, o strettamente rappresentate, oppure a struttura lacunare contenente una sostanza omogenea, o finemente granulari. Le particelle che compongono le membrane sono caratterizzate da una densità elevata e da una struttura opaca; esse costituiscono i granuli di Palade o « particelle opache » di Sjostrand ed Hanson (cfr. fig. 15).

V. Considerazioni e conclusioni

Le ricerche condotte nell'Istituto Mendel intorno alle quali abbiamo riferito permettono di giungere ad alcune considerazioni e conclusioni.

Una prima considerazione riguarda la possibilità che viene offerta non solo in sede di microscopia ottica, come fin qui si è fatto, ma anche in sede di microscopia elettronica, di distinguere le reazioni istogene d'incompatibilità verso l'omoinnesto, da quelle di accettazione dell'omoinnesto su terreno isogenico.

Questa possibilità si verifica in sede di paragone dell'omoinnesto consueto su ospite allogenico con l'omoinnesto su ospite isogenico, quale può avvenire praticando degli autoinnesti, oppure degli innesti fra conigli monozigotici, oppure fra topi inbred. Le nostre osservazioni al microscopio elettronico riguardano soltanto il confronto fra la reazione dei linfonodi regionali nel caso dell'omoinnesto fra conigli non selezionati e autoinnesto sui medesimi conigli.

Bisogna però osservare che la perfetta equivalenza dei conigli monozigotici e dei topi inbred, in quanto materiale isogenico, si riduce al caso di topi inbred a loro volta gemelli monozigotici, perchè i gemelli monozigotici rappresentano un grado d'identità biologica più alto della semplice linea pura prodotta mediante *inbreeding*. Infatti, a prescindere dal caso degli inbred di sesso diverso, i gemelli monozigotici non solo hanno un patrimonio ereditario equivalente dal punto di vista qualitativo e cioè sono isogenici, ma il loro patrimonio ereditario è equivalente per il contemporaneo sviluppo nel tempo, cioè essi sono isogenici e isocronici secondo il concetto di cronassia del gene esposto da Gedda alla Seconda Conferenza Internazionale di Genetica Umana (Roma, 1961). Nei gemelli monozigotici la fenogenesi dei caratteri si sviluppa contestualmente creando delle situazioni fenotipiche relative agli effetti primari e secondari del gene e relativi agli effetti interazionali esattamente corrispondenti, mentre nei soggetti isogenici, ma non isocronici, il terreno dell'ospite può risultare alquanto diverso per il diverso stadio fenogenetico interazionale e per altre condizioni relative allo sviluppo del genotipo nel tempo. Perciò non solo in sede umana, ma anche rispetto agli animali da esperimento, il materiale cogemellare monozigotico deve essere considerato l'optimum, anche nei confronti del materiale non cogemellare offerto dalle linee inbred. Senza dire che queste ultime non sono mai al completo riparo da evenienze mutative a livello gametico e quindi da allogenicità relativa, mentre nella gemellanza monozigotica, se mutazione vi fu a livello gametico, questa si ripercuote egualmente sui due gemelli senza alterarne la condizione di isogenicità. Perciò i gemelli monozigotici, e soltanto essi, possono offrire allo studio sperimentale dell'omoinnesto isogenico la condizione sperimentale del *coeteris paribus*.

Da un punto di vista generale bisogna anche dire che il rapporto di isogenicità fra ospite ed autoinnesto, come anche fra ospite ed omoinnesto isogenico, produce delle reazioni di accettazione ben diversa dalle reazioni di incompatibilità dell'omoinnesto allogenico le quali però non possono essere purificate al 100% dalle reazioni di incompatibilità perchè includono sempre una quota parte di reazioni di istoincompatibilità relative alle proteine dell'ospite e dell'innesto variamente degradate per il fatto traumatico e quindi non più isogeniche.

Tenendo conto di queste considerazioni, le nostre ricerche permettono di concludere:

1. Le reazioni di non accettazione a livello generale di un innesto allogenico non impediscono la contestuale accettazione locale di un innesto isogenico come le esperienze di innesto cogemellare monozigotico e cogemellare dizigotico contemporanei nel coniglio dimostrano.

L'accettazione o il rifiuto di un omoinnesto tra cogemelli di coniglio permette di individuare la presenza di cogemelli monozigotici i quali sono reciprocamente isogenici ed isocronici. La percentuale degli individui gemelli monozigotici nelle gemellanze del coniglio ha corrisposto al 28%.

2. L'omoinnesto di tessuto renale da cane a cane dimostra la nota reazione infiammatoria che denuncia l'inizio della non accettazione. Quando però il cane fornitore

dell'espianto venga prima trattato con radiazioni ionizzanti, l'infiltrazione si manifesta solo in parte e sembra provenire dall'ospite. Perciò vi è motivo di pensare che la reazione infiammatoria parvicellulare non dipenda nè solo dall'innesto nè solo dall'ospite, ma da entrambe le fonti, per cui quando si vogliono deprimere le reazioni di isto-incompatibilità, come talora può essere suggerito dalla pratica, occorre influire con mezzi idonei abbassando la reattività tanto sull'individuo ospite, quanto sull'individuo donatore dell'innesto.

3. Lo studio dei linfonodi regionali nell'omoinnesto di cute nel coniglio, paragonati con i linfonodi dell'autoinnesto, dimostra una vivace reazione del tessuto linforeticolare che inizia fin dai primi giorni quando l'omoinnesto è ancora vitale e che è caratterizzata, fra l'altro, da una progressiva pironinofilia del citoplasma. In uno stadio successivo corrispondente alla eliminazione del lembo di cute si osserva nei linfonodi una netta prevalenza degli elementi plasmocitari nei cordoni linfatici. Tali quadri successivi corrispondono a quelli che si osservano nelle linfoghiandole di animali trattati con inoculazione locale di sostanze dotate di sicura proprietà antigene. Tale quadro citologico sarebbe quindi l'equivalente morfologico della reazione immunologica generale.

4. L'omoinnesto fra topi maschi della linea inbred C₅₇ BL₆ (forniti dalla Ditta Aرسال di Pomezia) dimostra accettazione dell'innesto e con ciò l'isogenicità reciproca dell'ospite e del donatore rispetto ai geni dell'istocompatibilità. L'omoinnesto inbred (isologo = isoinnesto) presenta delle reazioni tissutali equivalenti a quelle dell'autoinnesto. L'omoinnesto da topo non selezionato su topo inbred (omoinnesto allogenico) permette di dimostrare l'assenza di una reazione linfonodale istiocitaria di tipo epitelioida che talora caratterizza la reazione ospite-innesto nell'omoinnesto allogenico del coniglio, facendo pensare che si tratti di una reazione non caratteristica dell'omoinnesto allogenico e quindi non necessaria, ma sovrapposta per caratteristiche genetiche, o altre, dell'ospite, o dell'espianto.

Infine vorremmo concludere nello spirito dell'inizio, sottolineando come il problema della « costituzione » che Achille De Giovanni aveva intuito e cercato d'inquadrare attraverso le cosiddette « combinazioni » appaia oggi, ancor più di allora, come un problema biologico fondamentale. Se gli uomini sono diversi di fronte al rendimento e alla malattia, la ragione consiste nella diversità della loro struttura, cioè nella loro costituzione.¹

Mentre però la struttura nel rapporto tronco-arti non ci dava che scarse combinazioni per ordinare in esse la casistica umana normale e patologica, ben più adeguata ci appare la struttura a livello delle molecole. La Genetica, che va dilatando le sue conoscenze nel campo dell'eredità molecolare, può in molti casi suggerire una spiegazione del come la costituzione molecolare del singolo individuo prenda origine dalla costituzione dei suoi genitori.

Tale concezione genetica e dinamica della costituzione è un metodo valido per abbracciare potenzialmente tutte le qualità che caratterizzano l'individualità biologica del singolo organismo umano. In queste x^n combinazioni molecolari nelle

quali si risolve il problema della struttura costituzionale, la formula genotipica della istocompatibilità è altamente indicativa e caratteristica. È indicativa perchè è talmente raro il caso dell'accettazione spontanea di un omoinnesto, che questo fatto fornisce un'idea efficace del come sia individualizzata la costituzione e cioè quasi irripetibile anche se si partisse, il che di gran lunga non è, da questo unico dato biologico. D'altro lato il rifiuto dell'innesto omoplastico allogenico che ha come contrapposto l'accettazione dell'innesto autoplastico e dell'omoplastico isogenico è altamente caratterizzante del fatto che la costituzione riconosce se stessa e, per dirla con Burnet, protegge la sua integrità.

Anche in biologia le difese sono problemi di frontiera. Perciò ogni operatore che, per ragioni di ricerca o di cura, cerca di vincere o di utilizzare queste difese, può meditare sul fatto che egli lavora sulla linea di confine della costituzione umana.

Riassunto

Gli Autori descrivono i risultati ottenuti dai loro studi riguardanti la reazione d'istoincompatibilità agli omoinnesti, l'origine della infiltrazione parvicellulare e le modificazioni linfonodali regionali tributari di un innesto di cute.

L'accettazione o il rifiuto di un omoinnesto tra cogemelli di conigli permette di individuare la presenza di cogemelli MZ. Per quanto riguarda l'infiltrazione parvicellulare che si nota nel caso di omoinnesti di rene, si può supporre che essa derivi, secondo le ricerche degli Autori condotte deprimendo mediante irradiazione l'innesto, sia dall'innesto che dall'ospite.

Lo studio dei linfonodi regionali nell'omoinnesto di cute nel coniglio, dimostra una vivace proliferazione di tessuto linforeticolare che inizia fin dai primi giorni quando l'innesto è vitale; in uno stadio successivo corrispondente all'eliminazione dell'innesto si osserva una netta prevalenza degli elementi plasmocitari nei cordoni linfatici.

L'omoinnesto fra topi della linea inbred C₅₇ BL₆ dimostra l'accettazione dell'innesto con reazioni tissutali equivalenti a quelle dell'autoinnesto.

L'omoinnesto da topo non selezionato su topi inbred permette di dimostrare l'assenza di una reazione linfonodale istiocitaria di tipo epiteloide, che talora si osserva nella reazione nell'omoinnesto allogenico del coniglio; si tratterebbe di una reazione sovrapposta e non legata quindi a fenomeni d'istoincompatibilità.

Bibliografia

- MEDAWAR P. B. e GIBSON T.: *Quart. Microscop. Science*, 89: 239, 1948.
LOS B L.: *J. Med. Research*, 37: 229, 1977.
— KING H. D. e BLUMENTHAL H. T.: *Biol. Bull.*, 84: 1, 1943.
— *The biological basis of Individuality*. Springfield, 1945.
ROGERS B. O.: *Plast. and Reconstr. Surg.*, 5: 269, 1950.
DARCY D. A.: *Nature, London*, 163: 98 1949.
SIMONSEN M.: *Acta path. microbiol. scand.*, 32: 36, 1953.

- DEMPSTER W. J.: Brit. Med. J., 1041, 1951.
BJORNEBOE M. e GORMSEN H.: Acta path. et microbiol. scandinav., 20: 649, 1943.
BING J., FRAGRAES A. e THORELL B.: Acta phisiol. Scandinav., 10: 282, 1945.
GEDDA L., GENTILESCHI E. e GENTILESCHI G.: Ricerche sperimentali mediante omoinnesto di rene in merito alla cosiddetta reazione innesto-organismo ospite. Atti II Conferenza Internazionale di Genetica Umana, 1961.
— — — Sulla struttura istologica dei linfonodi regionali negli omoinnesti di cute. Nota preliminare. Atti II Conferenza Internazionale di Genetica Umana, Roma 1961.
— — — Étude sur la réaction histologique de la greffe homoplastique du rein après irradiation. Dritter Internationaler Kongress für Hygiene und Präventivmedizin. Wien, 27-30 Mai 1962.
FRAGRAEUS A.: Acta Med. Scandin., 103: 3, 1948.
BENASSI G.: Boll. I.S.M., 29: 258, 1950.
SCHLECTER P. e BENASSI G.: Boll. Ist. Sieroterap. Mil., 29: 263, 1950.
GRANBOULAN N.: Rev. Hémat.: 15: 52, 1960.
BRAUNSTEIN H., FELLINGER K. e PAKESCH F.: Blood, 8: 916, 1953.
UNDRIZ E.: Helv. et Med. Acta, 5: 548, 1938.

RÉSUMÉ

Les Auteurs décrivent les résultats obtenus par leurs études concernant la réaction de l'histocompatibilité aux homogreffes, l'origine de l'infiltration parvicellulaire, et les modifications lymphonodulaires régionales tributaires d'une greffe de peau.

L'acceptation ou le rejet d'une homogreffe entre jumeaux lapins permet d'individuer la présence de jumeaux monozygotiques. En ce qui concerne l'infiltration parvicellulaire, remarquée dans le cas d'homogreffes de rat, l'on peut supposer — d'après les recherches des Auteurs conduites par une dépression de la greffe moyennant rayonnement, — qu'elle soit originée, soit de la greffe, soit de l'hôte.

L'étude des nodules lymphoïdes régionaux dans l'homogreffe de peau chez le lapin présente une prolifération élevée du tissu lympho-

réticulaire, commençant dès les premiers jours, lorsque la greffe est viable; dans les stades successifs correspondants à l'élimination de la greffe, l'on observe une nette prévalence des éléments plasmocytaires dans le cordon lymphatique.

L'homogreffe entre souris de la ligne *inbred* C₅₇ et BL₆ démontre l'acceptation de la greffe avec des réactions tissurelles équivalentes à celles de l'homogreffe.

L'homogreffe d'un souris non sélectionné sur des souris *inbred* permet de démontrer l'absence d'une réaction lymphonodulaire histiocytaire de type épithélioïde que l'on peut observer parfois dans la réaction à l'homogreffe allogénique chez le lapin; il s'agirait d'une réaction superposée et, par conséquent, non liée à des phénomènes d'histocompatibilité.

SUMMARY

The Authors describe the results obtained by their studies concerning the reaction of histocompatibility to homografts, the origin of parvicellular infiltration and regional lymphonodular modifications due to a skin graft.

The acceptance or reject of a homograft in

rabbit twins makes it possible to establish the presence of MZ twins. As for the parvicellular infiltration, noticed in the case of kidney homografts, according to the researches of the Authors, who have depressed the graft by means of irradiation, it may be assumed that it is origi-

nated either from the graft, or from the host.

The study of regional lymph-nodes in the skin homograft in rabbit shows an evident proliferation of the lymphoreticular tissue starting in the very early days, when the graft is viable; in a subsequent stage corresponding to the graft's elimination there is a clear prevalence of plasmocytary elements in the lymphatic cords.

The homograft in mice of the inbred line C₅₇ BL₆ shows the graft's acceptance by tis-

sural reactions equivalent to the ones of the autograft.

The homograft from random mouse on inbred mice shows the absence of a histiocytary lymphonodular reaction of the epithelioid type, which may be observed sometimes in the reaction to the allogenic homograft in the rabbit; it would be then a subsequent reaction not related to histocompatibility phenomena.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. beschreiben die Ergebnisse ihrer Forschungen über die histologischen Inkompatibilitätsreaktionen auf Homotransplantationen, den Ursprung der parvizellulären Infiltration und die Veränderungen der diesbezüglichen umliegenden Lymphknötchen bei einer Hauttransplantation.

Das Angehen bzw. Abstossen eines Homotransplantations unter Kaninchenpaarlingen lässt den Schluss auf evtl. EZ zu. Die Verf., welche ihre Untersuchungen unter Depression des Transplantat mittels Bestrahlung durchführten, glauben, dass die bei Nieren-Homotransplantation beobachtete parvizelluläre Infiltration sowohl vom Transplantat als vom Gastorganismus ausgeht.

Die Untersuchung der umliegenden Lymphknötchen bei Homotransplantation in Kaninchen zeigt eine lebhafte Wucherung des Lymphoretikulargewebes, die schon in den allerer-

sten Tagen, wenn das Transplantat vital ist, beginnt. Im nächsten Stadium bemerkt man zugleich mit dem Abstossen des Transplantats ein deutliches Überwiegen der plasmocytären Lymphsträngenelemente.

Die Homotransplantation unter Mäusen der Linie « inbred C₅₇ BL₆ » beweist, dass das Transplantat unter den gleichen Hautreaktionen angeht, wie bei Autotransplantation.

Die Homotransplantation von einer nicht selektionierten auf eine « inbred » Maus gestattet den Beweis des Ausbleibens einer epithelioiden, hystozyten Lymphknötchenreaktion, wie man sie manchmal bei der Reaktion auf allogene Homotransplantation beim Kaninchen beobachtet. Es würde sich dabei also um eine hinzukommende und nicht um eine an histologische Inkompatibilitätsphänomene gebundene Reaktion handeln.