

31. G. GRAMICCIA - F. NAVAIO — Sulla possibile sopravvivenza di tessuto placentare umano su membrana corion-allantoidea di pollo.

**Riassunto.** — Gli AA. hanno notato la sopravvivenza di tessuto placentare umano a termine per almeno cinque giorni su membrana corion-allantoidea di pollo.

Sono descritte le modificazioni della membrana corion-allantoidea, in seguito a questi trapianti, risultando in essa, a varia distanza di tempo, la formazione di perle epiteliali cheratinizzate, perle di origine corion-allantoidea.

Gli AA. eseguiti gli stessi esperimenti con frammenti di fegato umano hanno notato il non attecchimento e la completa degenerazione di questo tessuto. La membrana corion-allantoidea risponde a questi ultimi trapianti con un'intensa reazione mieloide, interessante gli elementi della serie rossa e bianca dell'embrione di pollo. Non vengono notate invece in questo caso perle epiteliali.

**Résumé.** — Les AA. ont remarqué la survivance temporaire de tissu allantoïde du poulet.

Ils décrivent les modifications de la membrane chorion-allantoïde à la suite de ces transplantations, après lesquelles, à des intervalles de temps différents, ils ont observé la formation d'îlots épithéliaux keratinisés, produits par la même membrane.

Les AA., ayant effectué les mêmes expériences avec des fragments de foie humain, ont remarqué l'absence de toute adhésion et la complète dégénération de ce tissu. La membrane chorion-allantoïde répond à ces dernières transplantations par une intense réaction myéloïde intéressant les éléments des séries rouge et blanche de l'embryon de poulet. Par contre, en ce cas, on ne remarque pas d'îlots épithéliaux.

**Summary.** — The authors have found that human placental tissue survives for at least five days on the chorion-allantoic membrane of the chick.

The changes of the chorion-allantoic membrane following the transplants after different time periods are described. These consist in the formation of epithelial keratinised pearls of chorion-allantoic origin.

When analogous transplantation experiments were carried out with human liver it was found that the transplants did not take and that the tissue completely degenerated. The chorion-allantoic membrane reacted to

these transplants with an intense myeloid reaction in which the elements of the white and red series of the chick embryo are affected. Epithelial pearls were not formed in this case.

**Zusammenfassung.** — Die V. V. haben das Überleben von menschlichen Plazentargewebe auf Chorion - Allantoismembrane von Hühnern, für die Dauer von mindestens 5 Tagen, beobachtet.

Es werden die durch die Transplantation hervorgerufenen Veränderungen der Chorion-Allantoismembrane beschrieben: nach verschiedenen Zeitabständen entstehen cheratinisierte Epithelialperlen, Perlen, die von der Chorion-Allantois herkommen.

Bei der Ausführung der gleichen Experimente mit Teilen von Menschenleber haben die V. V. beobachtet, dass dieses Gewebe nicht gedeiht und völlig degeneriert. Die Chorion-Allantoismembrane übt mit diesen letzteren Transplantationen eine intensive myeloische Reaktion aus, die Elemente der roten und weissen Reihe des Hühnerembryo betrifft. In diesem Falle werden keine Epithelialperlen beobachtet.

---

Sono note esperienze di vari AA. i quali hanno tentato di trapiantare frammenti di tessuti eterologhi su membrana corion-allantoidea di pollo. Ci limiteremo a citare solo due che hanno maggiore riferimento al presente lavoro.

HUXLEY e MURRAY (1925) <sup>(1)</sup> hanno accuratamente descritto la reazione della membrana ch<sup>a</sup> di pollo ai trapianti. Essi hanno notato, trapiantando tessuti embrionali di pollo, ispessimento generale della membrana, indipendentemente dalla sopravvivenza o meno del tessuto trapiantato, ispessimento dello strato mesenchimale e iperplasia e stratificazione dello strato epiteliale esterno, che può talvolta corneificarsi come l'epidermide di adulto (non costantemente e in punti vari), formazione di «perle epiteliali» consistenti di epitelio stratificato racchiudente in corpicciuoli sferici degli strati concentrici di cheratina, spesso connesse con l'epidermide (!) co-a mediante trave epiteliali, oppure direttamente apposte sullo strato epiteliale esterno nel mesenchima.

Altre cellule epiteliali distaccate, gli AA. hanno trovate nel tessuto mesenchimale, talvolta in strati, proprio sotto l'epitelio esterno. Il loro aspetto secondo gli AA., sembra indicare che c'è stata una rapida proliferazione irregolare di cellule distaccate dalla superficie interna dell'epidermide (!); talvolta questi sono costituiti di cellule interamente cheratinizzate. L'epi-

telio interno della membrana reagisce meno, divenendo in alcuni punti meno appiattito, talvolta pluristratificato, raramente forma delle pieghe.

GOODPASTURE e Coll. (1938) (2), hanno ottenuto per primi la sopravvivenza di tessuti umani sulla membrana co-a. di pollo, e precisamente di frammenti di pelle di adulto (per 8-10 giorni: per 14 giorni in un caso successivo) e di membrane fetali.

Nei trapianti di pelle umana hanno notato la fusione quasi perfetta dello epitelio umano con quello dello strato esterno della membrana ch. all. nei punti marginali del trapianto; invece dove lo strato ectodermico del ch. all. è in contatto con il corion del trapianto, il primo tende a scomparire (come linea continua) e ad aggregarsi in piccole isole dell'apparenza spesso di perle epiteliali che in seguito cheratinizzano (gli AA. suppongono che la ipercheratosi del tessuto impiantato — nel caso di un trapianto di pelle di un uomo di 70 anni — abbia favorito ancor più la cheratinizzazione di tali perle epiteliali). Invece tessuti mesodermici (muscolo, milza, cartilagine, pelle presa sui cadaveri) tendono, dopo interruzione della membrana ectodermica, ad affondarsi nel mesoderma della membrana, ove vengono parzialmente riassorbiti, mentre l'ectoderma si riforma al di sopra di essi. Nei casi di trapianti in perfetta conservazione nei quali il collagene e i fibroblasti del corion, son venuti in contatto col tessuto fibroso - mesodermico dell'ospite, è avvenuta una fusione o intreccio delle fibrille collagene e dei fibroblasti del trapianto e quelli dell'ospite. C'è la stessa affinità tra questi due tipi di tessuti che tra i due tipi di epitelio.

Talvolta avviene una considerevole iperplasia del tessuto fibroso della membrana sotto l'impianto di pelle, e i fibroblasti si estendono rapidamente entro aree di infiammazione o di degenerazione nel corion e lungo i margini sotto l'epitelio del trapianto, accompagnati da vasi sanguigni della membrana. Quando non v'è infezione, non v'è generalmente o v'è poca iperplasia mieloide nel mesoderma della membrana, e i polinucleati che migrano fuori dei vasi sanguigni, rapidamente migrano sotto o dentro il corion dello impianto.

Essi hanno infine notato un tentativo di vascolarizzazione dei frammenti di pelle trapiantati, da parte di vasellini del corion-allantoide neoformati, i quali tenderebbero ad unirsi ai capillari del derma cutaneo. Essi non hanno potuto però mai osservare una effettiva circolazione di globuli rossi embrionali di pollo dei capillari dell'a pelle umana trapiantata.

\* \* \*

Nel corso di alcune ricerche protozoologiche, abbiamo tentato anche noi il trapianto di tessuti umani (fegato di adulto e placenta a termine) su

membrana co-a. di pollo. Non abbiamo ottenuto i desiderati risultati parasitologici; ma i reperti dei trapianti ci sono sembrati abbastanza interessanti, da farne oggetto dell'a presente nota.

#### MATERIALE E TECNICA:

Sulle uova di pollo, al 9° - 10° giorno di incubazione, fu aperta sterilmente una finestra di circa 1 cm<sup>2</sup> con la tecnica altrove descritta (3) e sulla finestra mediante una miscela calda di vasellina e paraffina, fu applicato un coprioggetti sterile, attraverso il quale si potè seguire sia la vitalità dell'embrione, sia le modificazioni macroscopiche dei tessuti impiantati.

Un pezzetto di fegato umano fu ottenuto in seguito ad una operazione di colecistectomia, la placenta in occasione di parti fisiologici. Ambedue i tipi di tessuti furono asetticamente tagliati in fettine sottili di circa 1/2 cm. di lato, lavati in Tyrode e applicati sulla membrana co-a. entro 1/2 ora dal loro prelevamento. Dopo eseguito il trapianto, le uova rinchiuse con il coprioggetti che era stato momentaneamente tolto, furono riposte in termostato a 37,5 C°. Della placenta si utilizzarono frammenti della porzione villosa.

Nei giorni successivi, il prelievo dei pezzi per farne preparati microscopici veniva eseguito allargando la finestra già aperta sul guscio, incidendo con la forbicina la membrana co-a. a poca distanza dal frammento trapiantato, introducendo attraverso questa incisione, una spatolina di celluloido sotto la membrana co-a. e poi, mantenendo così sollevato il tratto di membrana su cui era l'impianto, tagliando tutto attorno con una forbicina. Si fissavano poi con 4 spilli i bordi del frammento di membrana ritagliata sulla spatolina di celluloido, e così, immobilizzato e disteso, il pezzo di membrana con su aderente il frammento trapiantato veniva immerso in liquido fissatore. Si evitava in tal modo ogni arricciamento o alterazione dei rapporti tra membrana e trapianto. Il fissaggio avveniva in Zenker-formolo; le sezioni furono colorate con ematossilina-eosina.

#### ESPERIENZE

Furono fatte tre serie di esperienze: una prima serie trapiantando su 4 uova frammenti di fegato umano di adulto; e due serie di 5 e di 11 uova rispettivamente sulle quali furono trapiantati frammenti di villi coriali di placenta umana e termine.

#### TRAPIANTI DI FEGATO UMANO

Dei trapianti di fegato, uno fu prelevato dopo 48 h., uno dopo 96 h., e due dopo 144 h. Esaminando i singoli reperti si nota una reazione dell'a membrana co-a. che può assumere due aspetti diversi.

Macroscopicamente in tutti i pezzi trapiantati, si notò un progressivo raggrinzimento e un rimpicciolimento, il colore del frammento si fece scuro nerastro, come una crosta. La membrana co-a. formò progressivamente un cerchio biancastro ispessito tutt'attorno al frammento trapiantato, il quale sembrò affondarvisi progressivamente.

I. — Quando non si notano segni di inquinamento batterico l'epitelio esterno della membrana co-a. rimane continuo e può proliferare e divenire pluristratificato, ma non forma mai aderenza intima con il tessuto epa-

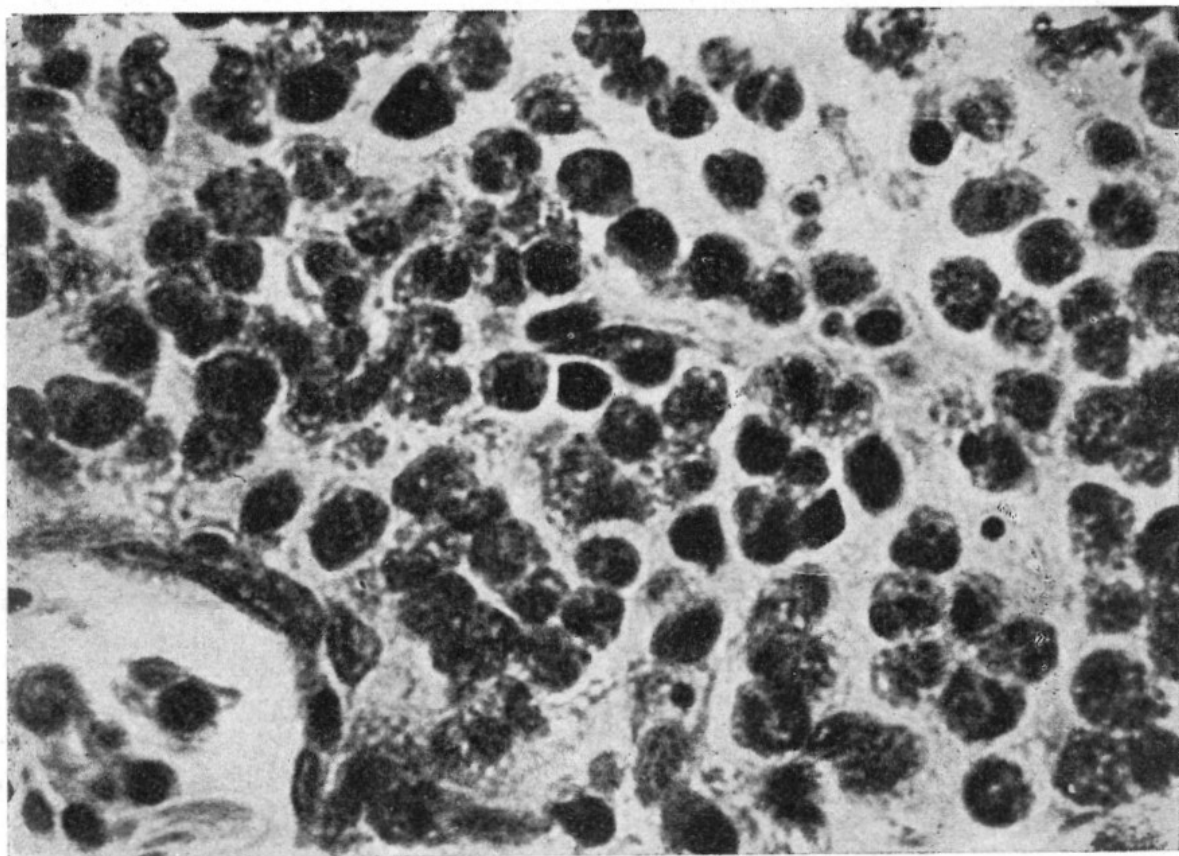


Fig. 1.

Trasformazione mieloide del mesenchima del co-a. in seguito ad impianto di fegato umano.

tico trapiantato, dal quale resta separato da un piccolissimo spazio, salvo in alcuni punti che appaiono ricomati da fibrina di origine embrionale nella quale sono contenuti alcuni elementi cellulari che probabilmente vi provengono per diapedesi. Il mesenchima è ipertrofico specialmente ai margini del pezzo impiantato, è molto riccamente vascolarizzato, e in qualche parte si nota una trasformazione mieloide dei suoi elementi cellulari; sembra trattarsi di vero tessuto ematopoietico in tutte le sue fasi di sviluppo, nelle due serie bianca e rossa. (fig. 1).

II. — Quando si notano segni di inquinamento batterico l'epitelio esterno scompare completamente e si forma uno strato piuttosto spesso di infil-

trato parvicellulare misto a fibrina che dal mesenchima della membrana co-a. va ad aderire ed infiltrare per una certa profondità il tessuto epatico trapiantato. Anche in questo caso si nota una ricca vascolarizzazione del mesenchima, e in alcuni tratti una trasformazione mieloide delle cellule mesenchimali per lo più attorno ai piccoli vasellini capillari, probabilmente neoformati. In nessuno dei due casi si nota formazione di perle epiteliali. In ambedue i casi il tessuto epatico trapiantato, appare in via di degenerazione o già completamente degenerato a seconda della minore o maggiore lunghezza del periodo di trapianto.

#### TRAPIANTI DI TESSUTO PLACENTARE

I trapianti di placenta furono eseguiti in due serie. I pezzi trapiantati furono poi prelevati in ragione di uno-due alla volta, dopo 24, 48, 96, e 144 ore dall'impianto sulla membrana. Descriviamo qui i risultati delle osservazioni dei pezzi prelevati a varia distanza di tempo dal trapianto.

L'aspetto macroscopico dei pezzi di placenta trapiantati ha mostrato un lieve rimpicciolimento progressivo dei pezzi, un incupimento del loro colore; i pezzi al 5° giorno avevano un aspetto esterno di piccole croste.

La membrana co-a. forma un cerchio biancastro attorno al pezzo, che tende ad affondarvisi.

L'aspetto microscopico varia a seconda delle giornate e precisamente:

##### *I giorno:*

*Reazioni della membrana corion-allantoidea.* — Si osserva una proliferazione dell'ectoderma, il cui epitelio si fa pluristratificato nei punti in cui il pezzo trapiantato non aderisce perfettamente alla membrana, quasi l'ectoderma tendesse a riempire e pareggiare gli spazi. Le cellule epiteliali proliferate hanno diversa grandezza, sono più pallide, mononucleate e con citoplasma abbondante e irregolare, con tendenza alla cheratinizzazione.

Nessuna alterazione nello strato mesenchimale se si eccettua un certo ispessimento con una debole proliferazione ai bordi del pezzo trapiantato o nei punti in cui vi è minore aderenza fra il pezzo trapiantato e la membrana co-a. In tali punti si nota anche una maggiore vascolarizzazione. Lo strato epiteliale interno è inalterato.

*Reazione del tessuto trapiantato.* — I globuli rossi, le cellule stromatiche, appaiono ben colorati, come pure le membrane vasali. Si nota una certa proliferazione del sincizio che sembra formare in alcuni punti delle gemmazioni; però quest'ultimo quadro si vede anche in sezioni di placenta di controllo, non trapiantata.

*II giorno:*

*Reazioni della membrana corion-ovuloidica.* — L'epitelio esterno della membrana co-a. si frammenta, e sulla linea sulla quale si trovava originariamente l'epitelio stesso, si vengono a formare delle isole o perle epiteliali, le quali risultano formate dal ripiegamento su loro stessi, e dalla fusione, dei frammenti di epitelio residuati. Tali perle di piccole dimensioni mostrano infatti uno strato epiteliale esterno piuttosto appiattito o cilindrico, che ha tutti i caratteri dell'epitelio esterno originale della membrana co-a. e uno

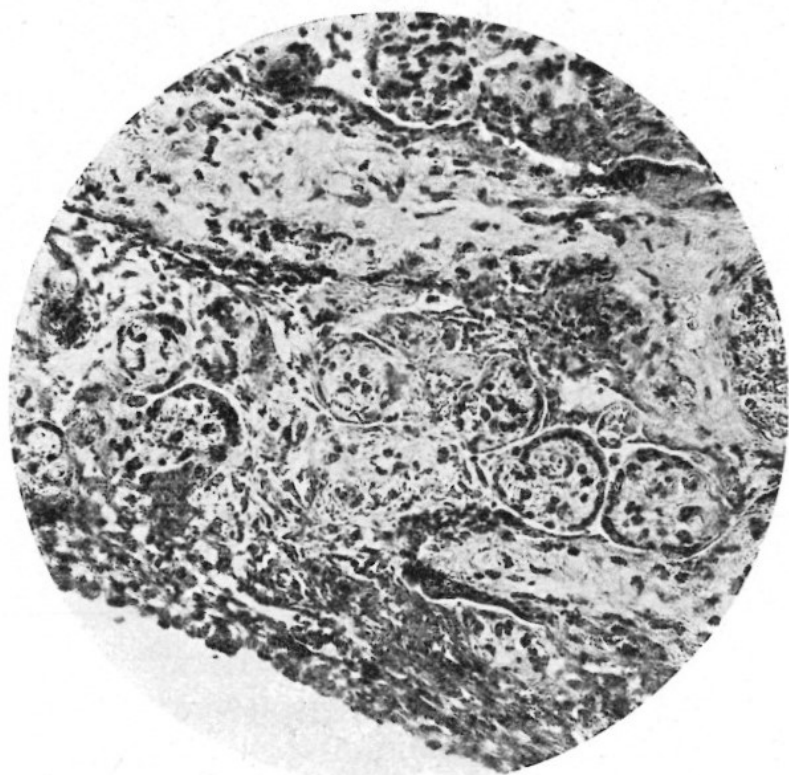


Fig. 2.

Perle di piccole dimensioni. In alto il tessuto trapiantato.

strato epiteliale interno, ammassato, i cui elementi sono quelle stesse cellule epiteliali proliferate, descritte nei reperti del 1 giorno, e che si distinguono per il maggior pallore e la irregolarità e abbondanza del citoplasma, nel quale sono spesso presenti anche dei vacuoli irregolari. (fig. 2).

Il mesenchima appare più ricco di cellule, e si nota un netto tropismo di cellule mesenchimali piccole e fusate verso il tessuto trapiantato, attraverso l'epitelio interrotto e gli spazi intervillosi del frammento di placenta più aderenti alla membrana co-a.

Lo spessore dello strato mesenchima è fortemente accresciuto ai bordi del pezzo trapiantato, laddove viene a formarsi un cercine, ricoperto da epitelio continuo e iperplastico, che tende ad innalzarsi sui bordi stessi.

*Reazione del tessuto trapiantato.* — Il tessuto trapiantato è perfettamente conservato e colorato in tutti i suoi elementi costitutivi, ivi compresi gli strati di fibrinoide e i globuli rossi. Il sincizio appare leggermente ipertrofico.

*III e IV giorno:*

Il carattere principale dei reperti in questi giorni è l'accentuarsi della iperplasia dei frammenti dello strato epiteliale esterno della membrana co-a., particolarmente evidente ai bordi del trapianto, nonchè dello strato mesen-



Fig. 3.

Globi cheratinizzati.

chimale; in uno dei pezzi al IV giorno si è notato che il mesenchima e lo strato epiteliale esterno, avevano completamente circondato il frammento trapiantato, il quale tuttavia presentava i caratteri istologici di un tessuto perfettamente vitale.

*V giorno:*

*Reazione della membrana corion-allantoidea.* — L'aderenza al pezzo trapiantato è perfetta. C'è da notare che l'epitelio esterno si è in massima parte frammentato e forma una linea largamente interrotta nella zona di contatto con la placenta, lungo di essa le isole o perle epiteliali hanno in parte raggiunto dimensioni notevolmente più grandi. In tali isole che hanno assunto l'aspetto di veri globi cheratinizzati (fig. 3), si distingue una zona

esterna di epiteli cubico o appiattito più compatto, e una zona interna in cui l'epitelio pluristratificato è composto da cellule di aspetto spugnoso, spesso vacuolizzate, grosse e alquanto irregolari. Talvolta, nell'interno delle perle più grosse, che possono raggiungere anche considerevoli dimensioni, si trova del materiale ematico umano (globuli rossi più o meno alterati e conglutinati) (fig. 4). Ciò conferma quanto abbiamo già accennato circa l'evoluzione di tali perle; in particolare: L'epitelio esterno della membrana co-a. ha

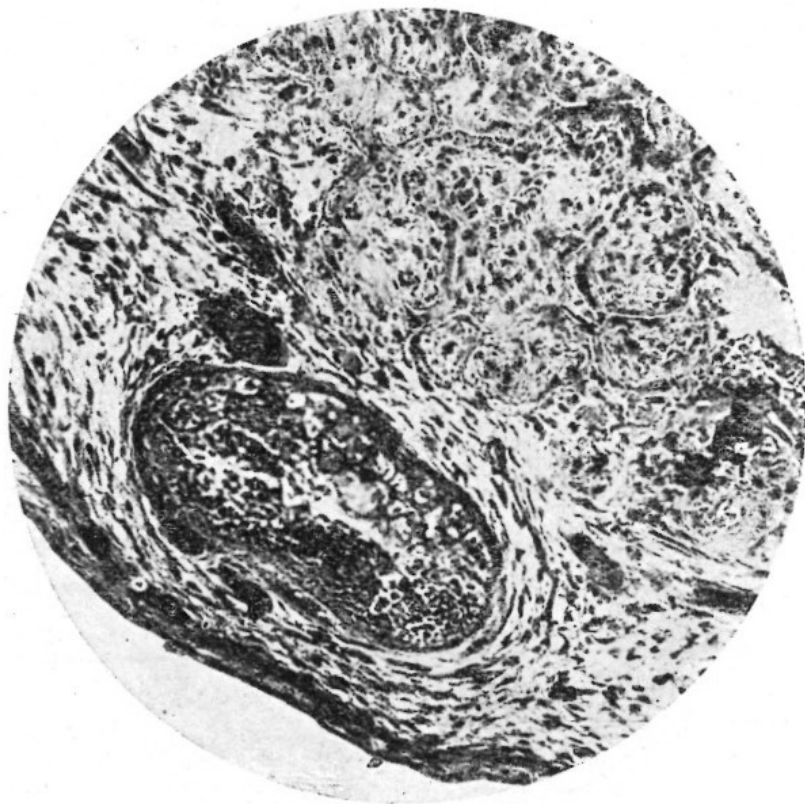


Fig. 4.

Globo cheratinizzato con materiale ematico umano nell'interno.

proliferato sotto lo stimolo del pezzo trapiantato dando luogo alla formazione delle grosse cellule epiteliali vacuolizzate etc. La proliferazione, è stata più forte nei punti in cui originariamente il contatto con il pezzo era meno stretto, punti nei quali talvolta si trovava sangue umano stravasato; l'epitelio si è interrotto, alcuni frammenti si sono ripiegati su se stessi, richiudendosi poi alle estremità e inglobando quindi le porzioni di epitelio proliferato e piccoli grumi di sangue cui l'epitelio stesso aveva aderito (fig. 4).

La proliferazione dell'epitelio esterno appare evidente ai bordi del trapianto, in tali punti esso, infatti, tende a risalire alla superficie del pezzo stesso, dando l'impressione che il trapianto si stia affondando nella membrana co-a.

Il mesenchima della membrana co-a. appare ispessito lungo i bordi del trapianto e si infila o tende ad infiltrarsi con piccole gettate cellulari

verso il tessuto trapiantato, girando attorno alle perle epiteliali ed insinuandosi nelle discontinuità dello strato epiteliale. Per quanto riguarda l'origine delle interruzioni dello strato epiteliale si è più portati a credere che esse siano in dipendenza di fenomeni reattivi o litici dovuti alla presenza del trapianto, che non alla reazione proliferativa ed invadente del mesenchima, poichè tali interruzioni si possono notare anche dopo sole 24 ore dal trapianto, quando non è ancora visibile una netta modificazione (proliferazione) del mesenchima al di sotto dell'esplanto.

Lo strato epiteliale interno non appare alterato se si eccettua in qualche tratto, una tendenza delle cellule a farsi più cubiche che appiattite.

*Reazioni del pezzo trapiantato.* — Si nota che la superficie esterna dell'impianto è parzialmente degenerata, soprattutto il fibrinoide e i globuli rossi, mentre lo stroma e il sincizio appaiono ben conservati e colorati. Gli spazi intervillosi sono in alcune zone riempiti da piccoli elementi granulosi e mal colorabili, che non sappiamo interpretare meglio che come elementi degenerativi e prodotti di cariolisi probabilmente di globuli bianchi placentari.

#### CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

1. — Non tutti i tessuti umani si prestano ad essere coltivati su membrana co-a.; nel nostro caso i frammenti di fegato hanno degenerato, quelli di placenta hanno mostrato istologicamente che potevano sopravvivere in ottime condizioni per almeno 5 giorni.

E' verosimile che questa maggiore sopravvivenza sia dovuta in parte almeno alla costituzione istologica della placenta, che, attraverso gli spazi intervillosi permette una migliore assunzione delle sostanze nutritive plasmatiche provenienti dall'uomo.

2. — Le reazioni della membrana co-a. si sono mostrate diverse a seconda che si fosse trapiantato fegato o placenta, e precisamente:

a) per quanto riguarda l'epitelio esterno, esso ha mostrato di reagire attivamente alla presenza del trapianto di placenta, con fenomeni di iperplasia, di frammentazione, e formazione di perle epiteliali di varia grandezza. Invece in presenza di frammenti di fegato esso ha risposto o scomparendo totalmente, o con una limitata iperplasia senza frammentazione e senza formazione in nessun caso di perle epiteliali, a seconda che fossero avvenuti fenomeni di inquinamento batterico oppure no.

b) per quanto riguarda lo strato mesenchimale, esso pure ha reagito in modo diverso; quando si trattava di frammenti di fegato, si è notata una vascolarizzazione molto più intensa del mesenchima che non quando si trattava di frammenti di placenta, e inoltre una trasformazione netta-

mente mieloide emopoietica di una parte delle cellule mesenchimali; invece nei trapianti di placenta vi è stato un minore aumento della vascolarizzazione e non si è notata nessuna metaplasia mieloide; qui invece più intensa è stata la migrazione di cellule mesenchimali verso il tessuto trapiantato.

c) l'epitelio interno della membrana co-a. è rimasto praticamente invariato in tutti e due i casi, o ha mostrato alterazioni di poco conto, tali che non è il caso di trarne delle conclusioni nette.

3. — In nessuno dei due casi si è potuta notare una vascolarizzazione di origine embrionale nell'interno dei pezzi trapiantati. La nutrizione dei tessuti sopravvissuti deve perciò essersi svolta attraverso scambi nutritivi plasmatici.

4. — Il diverso comportamento dello strato epiteliale esterno della membrana co-a. rispetto ai due tipi di tessuti trapiantati, fa pensare che la frammentazione dell'epitelio e la formazione di perle epiteliali non sia un fenomeno degenerativo (così come lo è la scomparsa assoluta dell'epitelio in alcuni casi di trapianti di fegato) ma un fenomeno reattivo abbastanza specifico (già notato da altri AA. <sup>(2)</sup> in caso di trapianti di altri tipi tessuti), e che può essere messo in relazione sia con la condizione di sopravvivenza del tessuto trapiantato (una specie di indice di sopravvivenza) sia con alcuni eventuali fenomeni induttivi particolari che certi tessuti sono capaci di provocare su detto epitelio.

5. — La trasformazione mieloide di porzioni del mesenchima della membrana co-a. può essere considerato come un fenomeno che si verifica solo in alcuni trapianti di particolari tipi di tessuti (in questo caso il fegato) indipendentemente dalla sopravvivenza del tessuto stesso, forse per particolari influenze ormoniche; e così pure la maggiore o minore entità della vascolarizzazione reattiva della stessa membrana.

6. — La sopravvivenza della placenta su membrana co-a. per 5 giorni non è stata accompagnata da nessun particolare fenomeno di alterazione strutturale che non sia riportabile alle condizioni eccezionali in cui il tessuto è venuto a trovarsi; in particolare non è stata notata alcuna alterazione della differenziazione istologica e citologica normale della placenta (villi) a termine. Non si sono notati fenomeni di proliferazione cellulare nel tessuto trapiantato se si eccettui un lieve accenno di iperplasia di dubbia interpretazione dello strato sinciziale.

Roma: Istituto Superiore di Sanità; Laboratorio d. Parassitologia, 1949.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) MURRAY, H. A.; HUXLEY, J. S.; COHN, A. E.: J. Exper. Med., 42: 275-290, Sept. 1925,
- 2) GOODPASTURE, E. W.; POLK, A.; BUDDINGH, G. J.: Am. J. Path., 14: 71-86, Jan. 1938.
- 3) GRAMICCIA G.: « Rend. Ist. Sup. San. »: 11-I-193 - n. 6, 1948.