

## OSSERVAZIONI SULLA OSSIFICAZIONE ETEROTOPICA DEL RENE (\*)

G. C. PERRI

SYMMARIUM. — Auctor denuo investigans in eterotopicam renum ossificationem post vasalis (arteriae et venae) pedunculi alligaturam, perpendit, istologica ratione, mutationes elementorum cellularium renalis materiae, quae efficiunt ut ossea materia enascatur.

Dall'esperimento di SACERDOTTI e FRATTIN (1901) che dimostrò la possibilità della formazione di osso nel rene in seguito a legatura del peduncolo vasale (vena e arteria), le ricerche sull'argomento si susseguirono numerose per risolvere il problema di questa ossificazione eterotopica.

Così molti autori (DONATI e MARTINI, POSKARISSKY, MAXIMOW, LIECK, ASAMI e DOCK, SAMEK e MICHELAZZI, GIULIANI, CECCARELLI, CAVALLI e LUCINESCU, SILANI, SCHULTZE, SEVERI, VILLAPÈNE, ecc.) ripeterono fondamentalmente l'esperimento di SACERDOTTI e FRATTIN con lievi modifiche, ottenendo ciascuno qualche dato nuovo, ma senza mai poter risolvere adeguatamente il problema, nè dare una spiegazione causale sufficientemente completa del fenomeno.

Mentre alcuni autori diedero importanza ai sali di calcio precipitati nei tessuti come agenti della trasformazione del connettivo in osso (SACERDOTTI e FRATTIN, POSKARISSKY, ASAMI e DOCK, ecc.) altri la esclusero (DONATI e MARTINI). Altri ancora pensarono all'influenza di spe-

---

(\*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio Antonio Pensa nella Tornata dell'8 giugno 1941.

Lavoro eseguito presso l'Istituto di Anatomia umana normale ed istologia della R. Università di Pavia.

ciali fattori come, ad esempio, a quella delle condizioni circolatorie GIULIANI, SAMEK e MICHELAZZI).

Infine altri autori ancora, avevano notato un costante rapporto topografico dell'osso con l'epitelio del bacinetto o con formazioni epiteliali neoformatesi nel parenchima renale, (secondo gli autori per proliferazione dell'epitelio dei calici) e supposero una influenza di queste cellule epiteliali neoformate sulla differenziazione del connettivo.

Questo modo di vedere prende le mosse dall'insieme delle ricerche di HUGGINS sull'ossificazione eterotopica in presenza di epitelio delle vie urinarie.

Infatti HUGGINS dimostrò che innestando mucosa vescicale in una fascia addominale del cane, si ha dopo circa 20-25 giorni dall'intervento la formazione di osso nel punto dell'innesto.

Dall'esame della letteratura potei notare che, mentre quasi tutti gli autori si sono preoccupati di studiare le condizioni di esperimento che portano alla formazione di osso, sono invece scarse le ricerche che riguardano da un punto di vista istologico, le trasformazioni dei vari elementi del tessuto renale dopo la legatura del peduncolo vasale.

Ritenni perciò opportuno istituire una serie di esperimenti in cui ripetessi fondamentalmente l'operazione di SACERDOTTI e FRATTIN per seguire a distanze di tempo sufficientemente ravvicinate le varie tappe dei processi che si susseguono nel rene operato e che conducono alla formazione dell'osso.

Dalle mie ricerche condotte su 26 conigli ho potuto trarre alcune conclusioni che ritengo degne di nota, e che espongo brevemente.

Il processo che porta alla formazione dell'osso è abbastanza complesso per le trasformazioni che subiscono i vari elementi del tessuto renale in seguito alla legatura del peduncolo vasale.

Il rene, in seguito alla interruzione della circolazione, si altera profondamente; le cellule epiteliali dei tubuli vanno rapidamente incontro a processi regressivi: degenerazione grassa, precipitazione di sali di calcio.

Mentre questi due fenomeni sono particolarmente intensi nella corticale, nella midollare manca la deposizione dei sali di calcio e si ha soltanto lo sfaldamento dell'epitelio dei tubuli retti dalla loro membrana basale così che le cellule cadono nel lume. Non tutte però le cellule dei tubuli retti subiscono questa sorte, ma alcuni di questi rimangono

normali tanto che, dopo 5 giorni dalla legatura dei vasi, vi si può notare l'esistenza di cellule epiteliali ancora vitali.

A quest'epoca sono già iniziati i fenomeni progressivi che a poco a poco si vengono a sovrapporre a quelli regressivi. Capillari cominciano a penetrare dalla rete arteriosa capsulare e dai rami dell'arteria ureterica a livello del punto di riflessione dell'epitelio dei bacineti sui calici. Tali capillari penetrando dalla periferia verso il centro dell'organo a poco a poco lo invadono tutto e ripristinano la circolazione in ogni punto del suo parenchima.

Nel frattempo tutta la sostanza corticale è a poco a poco occupata da depositi di sali di calcio che precipitano formando una specie di semicerchio attorno alla midollare.

Con l'intervento di numerosi macrofagi vengono riassorbiti abbastanza rapidamente i residui del parenchima distrutto, ed il siero trasudato; rimangono invece allo stato vitale alcune cellule epiteliali dei tubuli retti, cellule connettivali e vasi sanguigni; mentre nella corticale sono aumentati i sali di calcio.

Questi elementi si possono vedere chiaramente nella trentesima giornata dall'operazione.

In questo stadio i vasi hanno una rete capillare che è estesa radialmente dalla periferia al centro dell'organo con un decorso inverso di quello della normale circolazione del rene che si estende piuttosto dall'ilo alla periferia.

Le cellule connettivali proliferate in grande numero hanno assunto i caratteri di cellule del connettivo giovane.

Le cellule epiteliali dei tubuli retti che si sono mantenute vitali cominciano a proliferare ed in breve il rivestimento di questi tubuli diventa pluristrificato; anzi alcuni tubuli vengono trasformati in cordoni epiteliali pieni.

Importante è il fatto che queste neoformazioni epiteliali assumono dei caratteri morfologici tipici; non si tratta più come per i tubuli retti di un rivestimento epiteliale a cellule cubiche o cilindriche monostratificate, che rivestono un lume; ma bensì di vari strati di cellule epiteliali. Di queste cellule quelle degli strati più profondi sono allungate, mentre, a mano a mano che si sale verso gli strati superficiali le cellule acquistano sempre più una forma prismatica e poi appiattita.

Nell'insieme questo epitelio di rivestimento neoformato viene ad assumere le caratteristiche di quel tipico epitelio di transizione che è proprio delle grandi vie urinarie e della vescica.

Attorno a queste neoformazioni epiteliali o in vicinanza del rivestimento epiteliale del bacinetto le fibre connettivali si addensano: i vasi aumentano e le cellule del connettivo subiscono delle trasformazioni che le conducono ad assumere i caratteri degli osteoblasti.

Ad un dato momento, in più punti del parenchima si vedono comparire lamelle ossee con le rispettive lacune contenenti osteociti, circondate da osteoblasti.

Io ho potuto constatare l'inizio della presenza di osso in 40<sup>a</sup> giornata. A questo stadio l'osso era rappresentato da 7-8 lamelle di varie dimensioni, sparse nel parenchima a contatto con qualcuna delle formazioni epiteliali descritte e da una formazione ossea più grande, a contatto con l'epitelio del bacinetto. Questa formazione ossea delimitante una cavità riempita di midollo osseo con megacariociti aveva l'aspetto di una qualunque sezione di nucleo di ossificazione di un osso lungo.

Riguardo al modo di formazione, l'osso si genera in un primo tempo per trasformazione diretta del connettivo in cui si sono differenziati gli osteoblasti poi, avanzando il processo, per apposizione di nuove lamelle da parte di altri osteoblasti.

Da questo momento il connettivo prolifera, aumenta il numero dei vasi e la quantità di osso, mentre i sali di calcio che erano ravvolti nella sostanza corticale si vanno assorbendo.

Tutti questi fenomeni procedono tanto che, dopo 70 giorni dall'operazione, il rene è sostituito da un ammasso di connettivo contenente tessuto osseo, residui epiteliali e vasi mentre i depositi di calcio della corticale sono scomparsi totalmente.

Vien fatto di chiedersi a quali influenze sia legata la comparsa di tessuto osseo in queste condizioni sperimentali. Molti sono, come abbiamo visto, i fattori invocati dai vari Autori ed io ne passerò in rassegna i principali:

- 1) Influenza dei depositi di sali di calcio.
- 2) Alterazioni circolatorie.
- 3) Influenza dell'epitelio urinario.

Contrariamente a quello che pensa la maggior parte degli Autori non posso ritenere che i sali di calcio depositati possano avere una influenza diretta sulla trasformazione ossea del connettivo, perchè si tratta di una sostanza oramai inerte nei riguardi della quale l'organismo reagisce come di fronte a qualunque corpo estraneo.

È noto che il calcio per essersi utilizzato nel processo di ossificazione deve trovarsi allo stato ionico; penso perciò che i precipitati di sali di calcio della corticale potranno essere utilizzati solo quando, avvenuta la loro scissione per opera dei macrofagi e delle cellule gitanti, potrà essere liberato il calcio e portato in circolo allo stato ionico.

Più importanti sono le modificazioni circolatorie, sempre presenti in tutti i processi e accidentali e sperimentali che conducono alla neoformazione di tessuto osseo. Le modificazioni circolatorie assumono grande importanza nel determinare una evoluzione del tessuto connettivo in un senso piuttosto che nell'altro, per quanto non si possa, come fa GIULIANI, subordinare tutto il processo al solo fatto circolatorio.

Con la legatura del peduncolo vasale si provoca una profonda alterazione circolatoria: ad una imponente e veloce circolazione quale quella del rene normale, si viene a sostituire una circolazione di tipo capillare, che partendo dalla periferia giunge al centro dell'organo. Qui nei capillari dilatati il sangue ristagna e la corrente è fortemente rallentata. Circa la grande importanza della stasi venosa che si determina, sono d'accordo col GIULIANI. Infatti il rallentamento del circolo permette a tutte le sostanze che si trovano in circolo o che si producono nel tessuto, di rimanere lungamente a contatto con le cellule del connettivo ed eventualmente di influenzarle profondamente.

Veniamo ora a considerare l'influenza dell'epitelio sul tessuto connettivo. Molte ipotesi sono state fatte sul meccanismo di azione di queste formazioni epiteliali (epitelio del bacinetto, di mucosa vescicale innestate) sulla determinazione della formazione del tessuto osseo. Nell'esperimento di SACERDOTTI e FRATTIN, come sappiamo si ha la neoproduzione dai tubuli retti di formazione epiteliali. Queste neoformazioni intraviste da DONATI e MARTINI furono in seguito descritte anche da CAVALLI e LUCINESCU. D'altra parte tutti gli Autori notarono il rapporto stretto tra epitelio delle vie urinarie e formazione di tessuto osseo, sia negli innesti che in seguito a legatura del peduncolo del rene.

Io ho potuto dimostrare a tale proposito un fatto che non era mai stato messo in evidenza dai vari Autori che mi precedettero. Le cellule dei tubuli retti che nel processo regressivo non sono andate distrutte, riprendono a proliferare, perdono i caratteri citologici primitivi per assumere quelli degli epitelii di rivestimento delle grandi vie urinarie ed in particolare quelli della mucosa vescicale.

Questo fatto permette di identificare l'ossificazione eterotopica ottenuta con l'esperimento di SACERDOTI e FRATTIN con quelle ottenute invece con gli innesti di mucosa vescicale.

Che queste cellule con i caratteri morfologici e, io penso, anche metabolici di cellule della vescica urinaria, avessero influenza nel determinare la formazione dell'osso, era stato supposto da HUGGINS il quale pensò che tale influenza consistesse nella produzione di fosfatasi da parte di queste cellule epiteliali. In base alla teoria di ROBINSON circa l'azione della fosfatasi nel fenomeno dell'ossificazione, si avrebbe così una spiegazione della produzione del tessuto osseo in seno al tessuto connettivo. SEVERI sviluppò questo concetto considerando le cellule epiteliali delle vie urinarie come « organizzatori » del tessuto osseo in seno al connettivo in quanto produttrici di fosfatasi.

Tale idea però non è accettabile se si pensa che sia HUGGINS che ROBINSON e collaboratori in realtà conclusero nei loro esperimenti che la comparsa della fosfatasi in quantità discreta coincide con la comparsa degli osteoblasti e dell'osso e non la precede. Inoltre la comparsa di cellule differenziate (cellule della cartilagine ipetrofica e osteoblasti) sia nelle culture (ROBINSON) che negli innesti (HUGGINS, REGEN e WILKINS) porta ad un aumento rilevante del tasso di enzima nel tessuto in questione.

In base a questi dati io penso che la fosfatasi debba essere considerata un meccanismo enzimatico che interviene nell'ossificazione e che nel processo ha importanza fondamentale, ma che non agisce per sé stessa sul connettivo stimolandolo fin dall'inizio a differenziare le sue cellule in osteoblasti.

Per quello che riguarda l'evidente rapporto topografico tra cellule e osso, penso che questo fatto possa essere spiegato così: le cellule epiteliali che ad un dato momento proliferano, agiscono come centro di attrazione di materiali nutritizi, ed anche rappresentano col loro progressivo bisogno di metaboliti, il punto di convergenza della neopro-

duzione di vasi coi quali giungono le sostanze nutritizie. Attorno a queste cellule il tessuto connettivo viene a trovare migliori condizioni di vita, prolifera rigogliosamente e vi si addensa.

Ora non si può escludere che qualche prodotto del metabolismo di queste cellule possa influenzare il tessuto connettivo i cui elementi hanno ripreso caratteristiche embrionali e con esse una capacità elevatissima ad evolvere in un senso o nell'altro sotto uno stimolo adeguato. Questo stimolo che non credo sia dato dalla fosfatasi, per quanto ho detto sopra, non è facilmente identificabile tra i metaboliti di queste cellule.

Deve però esserci una sostanza che agisce sul tessuto connettivo per indurlo a trasformazioni così profonde e sopra tutto alla differenziazione degli osteoblasti.

Una considerazione a proposito delle varie influenze che agiscono sul tessuto connettivo deve essere fatta basandosi sui risultati anatomici che si osservano nel rene legato.

Se si tiene presente la disposizione dei depositi di calcio nel rene dopo la legatura del peduncolo, si può facilmente notare che i sali di calcio precipitano solamente ed esclusivamente nella corticale e cioè formano una fascia periferica che circonda la midollare, nella quale zona esclusivamente si ha invece la formazione di osso. Questo almeno nella grande maggioranza dei casi, se non sono state introdotte variazioni notevoli di tecnica nell'intervento.

Orbene, osservando il rene dopo la legatura del peduncolo ed il modo in cui si ripristina la circolazione sanguigna si nota che il circolo collaterale di compenso che si stabilisce ha un decorso che va dalla periferia al centro. Ci si può allora rendere conto di un fatto che ha, secondo me una grande importanza nella spiegazione del fenomeno.

I macrofagi e le cellule giganti attaccano i depositi di sali di calcio, li riassorbono e li scindono nei loro componenti che, secondo le ricerche di WELLS sono identici a quelli dell'osso normale.

Questi elementi in grande concentrazione vengono condotti nei vasi sanguigni e lentamente vengono convogliati verso il centro dell'organo. Quivi, nella rete capillare il sangue ristagna lungamente e può a lungo rimanere a contatto col tessuto connettivo giovane indifferenziato.

Si può pensare che lo stato di concentrazione piuttosto elevato in calcio e in fosforo che deriva dalla sopradetta scissione dei sali di calcio e il peculiare tipo di circolazione sanguigna siano in grado, insieme all'influenza diretta delle cellule epiteliali neoformate, ed in particolare di quel prodotto metabolico la cui natura per ora ci sfugge, di promuovere la trasformazione delle cellule connettivali in osteoblasti e del connettivo in osso.

Una volta che si è avuta la comparsa degli osteoblasti, la spiegazione del resto del fenomeno è facile in quanto che gli osteoblasti, in base alla teoria di ROBISON, sono essenzialmente dei produttori di fosfatasi. Questa, alzando il tasso di fosforo inorganico nella linfa interstiziale del tessuto, permette la precipitazione di fosfato tricalcico nel connettivo addensato e si ha così la edificazione e la calcificazione delle prime lamelle ossee.