

ACTA GENETICAE MEDICAE ET GEMELLOLOGIAE

Volumen IX

N. 1 - Ianuarii 1960

Istituto di Genetica Medica e Gemellologia «G. Mendel» - Roma
Direttore: Prof. Luigi Gedda

Sesso genetico nei mielociti neutrofili normali e patologici

Torrioli Mario¹ **Brenci Giovanni**² **Casparrini Giuseppe**³

È noto l'interesse suscitato in questi ultimi tempi dalla possibilità di dimostrazione del sesso genetico nel polinucleato neutrofilo, basandosi sullo studio delle appendici nucleari. I risultati sono ormai ben noti in letteratura e l'accordo sul valore pratico è quasi universale; è sul significato da dare a dette appendici nucleari che le opinioni sono ancora discordi. Alcuni vedono in esse un fenomeno morfologico stabile, altri un carattere dinamico, legato ai movimenti del nucleo stesso fissati in un attimo dalla brusca essiccazione su striscio. In appoggio valido a questo secondo modo di vedere stanno le nostre osservazioni a fresco con microscopio a contrasto di fase⁴ che ci hanno permesso di seguire lo svolgersi dei movimenti delle appendici stesse. Esse possono variare dalla semplice protuberanza per assumere l'aspetto di drum-stick e ritornare all'aspetto primitivo nel giro di pochi minuti. L'ipotesi più ovvia resta, per ora, che questi movimenti siano legati a differenze sessuali nel contenuto in cromatina nucleare. Altrettanto logica appare l'ipotesi di Teodori che la differenza di cromatina agisca attraverso un condizionamento della tensione superficiale della membrana nucleare.

¹ Docente.

² Metodologo statistico.

³ Studente.

⁴ M. TORRIOLI: Relazione al «Symposium Geneticae Haematologicae», Roma MCMLIX «Acta Geneticae et Gemellologiae», Supplementum secundum.

Viva dunque e sentita, nel campo ematologico, la ricerca di un carattere fisso e stabile e che possa essere rilevato con metodi tecnicamente accessibili a molti ricercatori. E questo allo scopo sia di convalidare per altra via le conclusioni sopra accennate, sia per mettere sempre più a disposizione del clinico un metodo di ricerca sicuro e di facile applicazione.

A questo proposito ci è sembrata più promettente l'ipotesi di lavoro che il differente contenuto in cromatina legato al sesso si riflettesse sul volume nucleare ed eventualmente sul rapporto nucleo-citoplasmatico.

Da un punto di vista tecnico la ben nota difficoltà fondamentale, che rende pressochè impossibile l'esatta misurazione del volume nucleare, poteva essere aggirata, se non sormontata, sostituendo allo studio volumetrico quello dei diametri nucleari su striscio secco. Una lunghissima esperienza degli ematologi ha dimostrato che un tal metodo, pur passibile di sostanziali critiche, dà in realtà risultati abbastanza costanti che anche se non sono identificabili con la realtà, variano in maniera strettamente proporzionale ad essa.

Ciò è vero su elementi estremamente sensibili alle variazioni di pressioni osmotica quali i globuli rossi, tanto più, quindi, sono considerate attendibili le misurazioni diametriche degli elementi nucleati. Venivano però ovviamente esclusi da detta metodologia di ricerca proprio i polimorfonucleati neutrofili, che per la forma bizzarra del loro nucleo, non permettevano una misurazione dei diametri e tanto meno la presunzione di un rapporto tra questi ed il volume nucleare.

Abbiamo deciso quindi di spostare la nostra attenzione dal polimorfonucleato neutrofilo al relativo mielocita. Detto elemento su striscio secco si presenta in condizioni ideali per una misurazione nucleare. Il nucleo, infatti, è voluminoso, a contorni regolari, abbastanza rotondeggiante, solo alcune volte leggermente ovoidale; già il solo fatto della presenza di un minimo accenno di lobatura nucleare fa escludere l'elemento dalla classe in questione.

Sorgeva invece la difficoltà legata al fatto che l'elemento non si trova sul sangue circolante normale; siamo così dovuti ricorrere a materiale bioptico midollare di persone sane o che presentassero una serie citoevolutiva bianca perfettamente normale. Dopo la misurazione di 2.000 elementi, mille prelevati da soggetto maschio e mille prelevati da soggetto femmina, abbiamo pensato di proseguire la ricerca su sangue periferico di malati di leucemia mieloide cronica, che, come è noto, contiene una altissima percentuale di mielociti neutrofili. Abbiamo così misurato altri mille nuclei di mielociti di leucemia mieloide cronica, 500 su malati maschi e 500 su malati femmine. Le misurazioni vennero tutte eseguite su microscopio universale Galileo proiettore, che ci permetteva la misurazione diretta su immagine reale proiettata su schermo ed ingrandita 2.000 volte. Abbiamo distribuito gli elementi misurati per classi di $\frac{1}{2}$ micron. Da notare che il mezzo micron era rappresentato sul nostro schermo da un intervallo di 1 mm, facilmente misurabile e al di sopra di ogni possibilità di errore.

Ci siamo trovati così a confrontare tra di loro quattro distinte distribuzioni:

A_0 = Maschi sani (mielociti da puntato sternale)

B_0 = Femmine sane (mielociti da puntato sternale)

A_1 = Maschi malati (leucemia mieloide cronica. - Mielociti da sangue periferico)

B_1 = Femmine malate (leucemia mieloide cronica. - Mielociti da sangue periferico)

I confronti da eseguire e i relativi significati erano i seguenti:

$\left\{ A_0 - B_0 \right\}$ = differenza dovuta al sesso (sani)

$\left\{ B_0 - B_1 \right\}$ = differenze dovute alla malattia (nelle femmine)

$\left\{ A_1 - B_1 \right\}$ = differenze dovute al sesso (malati)

$\left\{ A_0 - A_1 \right\}$ = differenze dovute alla malattia (nei maschi)

Per il confronto tra le distribuzioni viene usata la *t* di Student

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\left[\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2 + \Sigma(y - \bar{y})^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]^{1/2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)^{1/2}}$$

Distribuzione in A_0

X_i	n_i	$x_i \times n_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$n_i (x_i - \bar{x})^2$
7	5	35	-2,4	5,76	28,80
7,5	20	150	-1,9	3,61	72,20
8	89	712	-1,4	1,96	174,44
8,5	211	1793,5	-0,9	0,81	170,91
9	240	2160	-0,4	0,16	38,40
9,5	164	1558	+0,1	0,01	1,64
10	120	1200	+0,6	0,36	43,20
10,5	64	672	+1,1	1,21	77,44
11	38	418	+1,6	2,56	97,28
11,5	28	322	+2,1	4,41	123,48
12	16	192	+2,6	6,76	108,16
12,5	5	62,5	+3,1	9,61	48,05

$n = 1000$ $\bar{x} = 9,4$ $M = 9,375$ $\Sigma (x_i - \bar{x})^2 = 984,00$ $\sigma = \pm 0,991$

Distribuzione in A₁

x_i	n_i	$x_i \times n_i$	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$n_i (X_i - \bar{X})^2$
7	4	28	-2,2	4,84	19,36
7,5	19	142,5	-1,7	2,89	54,91
8	51	408	-1,2	1,44	73,44
8,5	108	918	-0,7	0,49	52,92
9	114	1026	-0,2	0,04	4,56
9,5	71	674,5	+0,3	0,09	6,39
10	56	560	+0,8	0,64	35,84
10,5	35	367,5	+1,3	1,69	59,15
11	24	264	+1,8	3,24	77,76
11,5	13	149,5	+2,3	5,29	68,77
12	5	60	+2,8	7,84	39,20

$n = 500$ $\bar{X} = 9,2$ $M = 9,200$ $\Sigma (x_i - \bar{x})^2 = 492,30$ $\sigma = \pm 0,984$

Distribuzione in B₀

X_i	n_i	$X_i \times n_i$	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$n_i (X_i - \bar{X})^2$
7	3	21	-2,3	5,29	15,87
7,5	9	67,5	-1,8	3,24	29,16
8	33	264	-1,3	1,69	55,77
8,5	121	1028,5	-0,8	0,64	77,44
9	216	1944	-0,3	0,09	19,44
9,5	242	2299	+0,2	0,04	9,68
10	174	1740	+0,7	0,49	85,26
10,5	89	934,5	+1,2	1,44	128,16
11	57	627	+1,7	2,89	164,73
11,5	37	425,5	+2,2	4,84	179,08
12	17	204	+2,7	7,29	123,93
12,5	2	25	+3,2	10,24	20,48

$n = 1000$ $\bar{X} = 9,3$ $M = 9,316$ $\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 909,00$ $\sigma = \pm 0,948$

Distribuzione in B₁

X_i	n_i	$X_i \times n_i$	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$n_i (X_i - \bar{X})^2$
7,5	3	22,5	-2,6	6,76	20,28
8	10	80	-2,1	4,41	44,10
8,5	20	170	-1,6	2,56	51,20
9	53	477	-1,1	1,21	64,13
9,5	87	826,5	-0,6	0,36	31,32
10	132	1320	-0,1	0,01	1,32
10,5	81	850,5	+0,4	0,16	12,96
11	58	638	+0,9	0,81	46,98
11,5	34	391	+1,4	1,96	66,64
12	18	216	+1,9	3,61	64,98
12,5	4	50	+2,4	5,76	23,04

$n = 500$ $\bar{X} = 10,1$ $M = 10,08$ $\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 426,95$ $\sigma = \pm 0,923$

$$t = \frac{\{ A_0 - B_0 \}}{\frac{0,1}{\sqrt{\frac{909 + 984}{1998}} \times \sqrt{\frac{1000}{2}}} = \frac{0,1}{0,0435} = 2,299 \text{ significativo al livello del } 5\%$$

$$t = \frac{\{ A_1 - B_1 \}}{\frac{0,9}{\sqrt{\frac{492,30 + 426,95}{998}} \times \sqrt{\frac{2}{500}}} = \frac{0,9}{0,06} = 15 \text{ + significativo al livello del } 1\%$$

$$t = \frac{\{ A_0 - A_1 \}}{\frac{0,2}{\sqrt{\frac{984 + 492,3}{1498}} \times \sqrt{\frac{3}{1000}}} = \frac{0,2}{0,0535} = 3,738 \text{ significativo al livello dell' } 1\%$$

$$t = \frac{\{ B_0 - B_1 \}}{\frac{0,8}{\sqrt{\frac{909 + 426,95}{1498}} \times \sqrt{\frac{3}{1000}}} = \frac{0,8}{0,0509} = 15,72 \text{ significativo al livello dell' } 1\%$$

Quanto sopra può essere trascritto nelle seguenti affermazioni:

1. Nei mielociti sani, su strisci secchi di puntato sternale esiste una differenza di diametro nucleare, legata al sesso genetico, significativa al livello del 5%. I mielociti prelevati da uomini hanno un diametro minore di quelli prelevati da donne. Tale differenza va intesa nel senso che, pur variando la distribuzione entro termini approssimativamente uguali nei due sessi, negli uomini predominano i minusvarianti e nelle donne i plusvarianti.

2. L'insorgenza della leucemia mieloide cronica mantiene la differenza tra uomini malati e donne malate. Anzi la significatività è dell'1%.

Mentre infatti la malattia in questione influisce poco sulla percentuale dei plusvarianti nell'uomo (43,5% → 40,4%) accentua la prevalenza dei plusvarianti nella donna (63,8% → 82,8%).

In attesa che le ulteriori determinazioni in corso convalidino i dati da cui queste affermazioni scaturiscono, possiamo sottolineare la loro importanza sotto un duplice aspetto. Dal punto di vista genetico, ci sembra che il metodo proposto costituisca quanto di più semplice, pratico e sicuro si possa offrire al clinico. Dal punto di vista ematologico il comportamento nei due sessi delle dimensioni nucleari apre un campo di ricerche fino ad ora poco o nulla seguito, di grandissima importanza nella patogenesi della leucemia mieloide. L'ipotesi che le cellule della leucemia mieloide siano poliploidi sarà la prima passata al vaglio sperimentale.

Riassunto

Gli AA. dimostrano una differenza nel diametro del nucleo del « Myelocyte » tra uomo e donna.

La differenza è in favore della donna con una significatività del 5% (t di « Student »).

Nella Leucemia mieloide la differenza è ancora più marcata. Questo porta all'ipotesi che in detta malattia le cellule siano poliploidi.

RÉSUMÉ

Les auteurs montrent une différence diamétrique du Nucleus du myélocyte entre homme et femme.

La différence, en faveur de la femme, est significative au niveau du 5% (t de Student).

Dans la Leucémie myeloïde la différence est encore plus marquée. Cela nous conduit à l'hypothèse, que dans la maladie les cellules soient polyplôides.

SUMMARY

The Authors report the finding of a difference in the diameter of the nuclei of myelocytes between males and females.

The diameter is greater in the females, with a significance of 5% (Student's t).

In cases of myelocytic leukemia the difference is even greater, suggesting the hypothesis that in this disease the cells may be polyploid.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser beweisen, dass ein Unterschied besteht im Kerndurchmesser der « Myelocyten » bei Mann und Frau.

Die Differenz ist zugunsten der Frau und zwar im Verhältnis von 5% (t von « Student »).

Bei der myeloischen Leukämie ist der Unterschied noch deutlicher. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Zellen bei dieser Krankheit polyploid sind.