

Alterazioni Cromosomiche dei Leucociti Indotte nel Bambino da Irradiazioni Diagnostiche

(Nota preliminare)

L. Massimo, M. G. Vianello, F. Dagna-Bricarelli

È noto da tempo che le irradiazioni ionizzanti possono provocare effetti deleteri sulla cellula vivente e indurre mutazioni, soprattutto nell'uomo, negli animali superiori e nelle piante. Tuttavia solo studi recenti hanno permesso di stabilire che tali danni possono essere provocati anche da dosi di raggi relativamente piccole.

Numerose ricerche di importanza basilare sugli effetti delle varie dosi di raggi X sulle cellule sono stati condotti dapprima in culture di vari tessuti di animali e piante, in seguito su tessuti umani solidi e infine su culture di leucociti.

I lavori di Bender et al. (1-2), di Böök, Fraccaro et al. (5), di Puck (13), della scuola di Edinburgo (6), di Chu et al. (7), di Ohnuki et al. (12), di Nakanishi e Makino (11) hanno permesso di stabilire i vari tipi delle alterazioni cromosomiche: frammentazioni di cromatidi, cromosomi dicentrici, tricentrici, ad anello, di morfologia anomala, delezioni, traslocazioni e grosso modo la dose di raggi necessaria per indurli.

In seguito sono sorte tutta una serie di segnalazioni sulle alterazioni cromosomiche in soggetti che avevano subito trattamenti con raggi X o con isotopi radioattivi od erano stati esposti incidentalmente ad irradiazioni atomiche; infine, più recentemente, di individui che erano stati solo sottoposti ad esami diagnostici radiologici [Bloom e Tjio (4), Conen et al. (8), Stewart e Sanderson (14)].

Nei nostri casi le ricerche cromosomiche sono state eseguite su una o due culture di leucociti, secondo il metodo di Moorhead et al. (10), lievemente modificato, nei bambini più grandi e secondo il micrometodo usato nel nostro laboratorio in quelli della prima infanzia. Noi abbiamo considerato solo le lesioni indotte nel linfocita, senza occuparci di quelle nelle cellule germinali, ben più importanti per la specie. I soggetti sono stati scelti a caso tra i pazienti dei reparti della Clinica Pediatrica, che avevano subito varie irradiazioni a scopo diagnostico preferibilmente sull'addome, per esami dell'apparato digerente o urinario, e sullo scheletro. Per ogni bambino abbiamo esaminato circa un centinaio di mitosi in buone condizioni e ci siamo attenute alla classificazione delle alterazioni di Buckton et al. (6). In tutti i casi

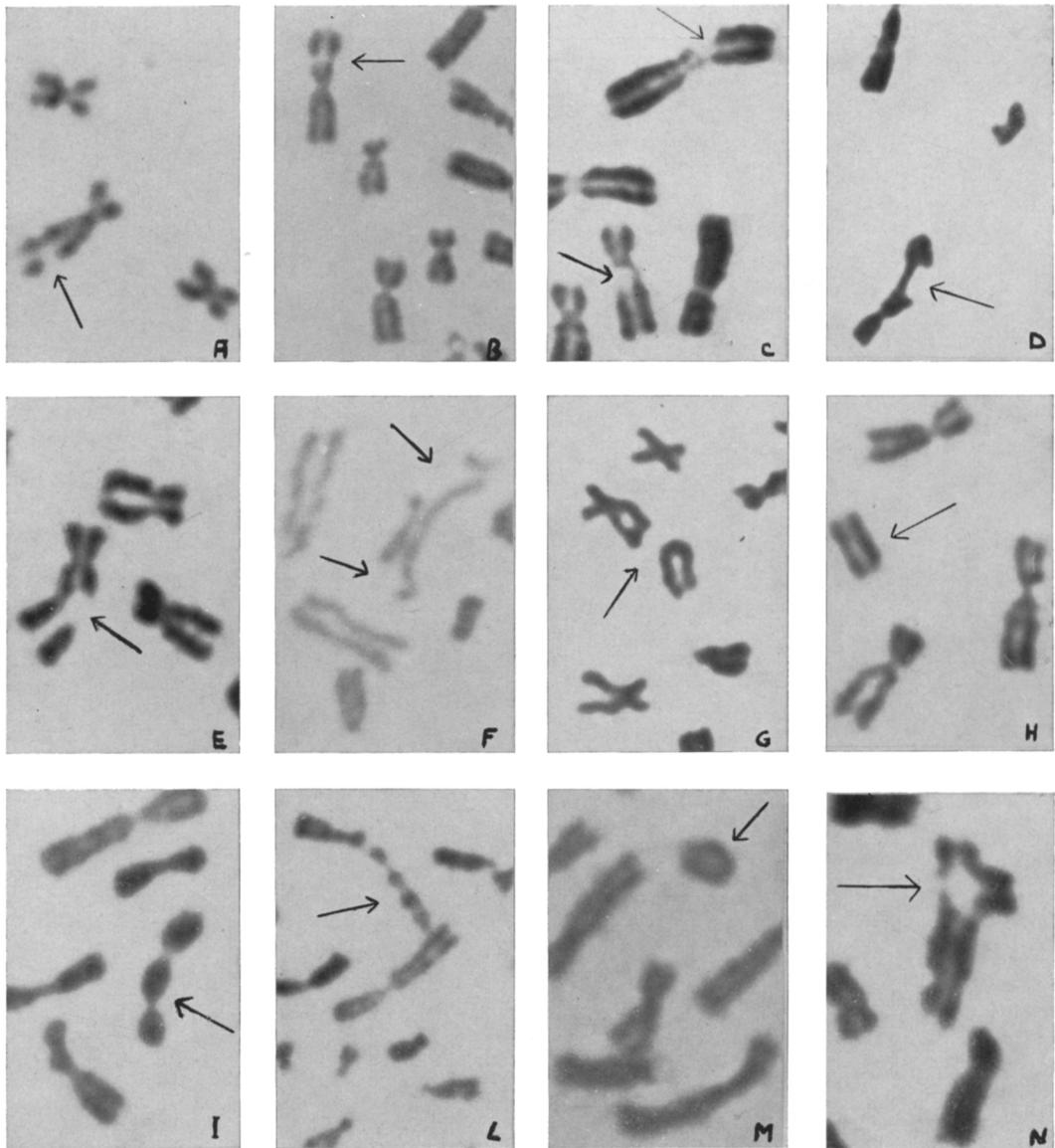


Fig. 1. Vari tipi di aberrazioni cromosomiche osservate nei casi descritti. A-B-C: lesioni acromatiche di uno o di entrambi i cromatidi caratterizzate da discontinuità della cromatina che lascia scoperto ma intatto il filamento proteico (chromatid gap e isochromatid gap degli Autori di lingua inglese).

D-E-F: frammentazione di uno o di due cromatidi interessanti sia la cromatina che il filamento proteico (chromatid break).

G: cromosoma frammentato della coppia N. 4. La frammentazione ha dato origine ad un cromosoma delecto e ad un frammento in cui la cromatina alle due estremità prossimali si è fusa.

H: frammenti senza centromero.

I: cromosoma dicentrico.

L: cromosoma tricentrico (a rosario).

M: cromosoma ad anello.

N: cromosomi riuniti con ponti che inducono a sospettare che avvengano interscambi di segmenti cromatidici tra un cromosoma e l'altro

abbiamo osservato solo lesioni definite temporanee. Abbiamo calcolato dalle radiografie approssimativamente la quantità di milli-Roentgen presi dai singoli pazienti, basandoci sulle indicazioni di Tubiana (15), Beraud e Bastide (3), Fossati (9).

Riferiamo in sintesi le caratteristiche dei singoli pazienti:

Caso I: B. Alfredo di a. 9, affetto da nanismo, grave deficit intellettivo, piccole malformazioni (radice del naso appiattita e allargata, epicanto, ipertelorismo, cute iperpigmentata, ipercheratosica). Sono state praticate radiografie dello scheletro, torace e pielografia discendente per un totale di 13.895 mr. in 350 giorni. Il prelievo di sangue per l'esame cromosomico è stato effettuato 60 giorni dopo l'ultima esposizione. Il cariotipo è risultato maschile normale 46/XY. Di 106 cellule esaminate 12 presentavano aberrazioni (11,32%) che potevano essere classificate come 9 lesioni acromatiche in un cromatide, 2 in due isocromatidi, 3 frammentazioni di uno o due cromatidi, un cromosoma ad anello, 2 cromosomi con delezione.

Caso II: N. Angelo di a. 3, affetto da tetralogia di Fallot. Venivano eseguiti i seguenti esami radiologici: telecardiogrammi, esofagografia e angiocardigrafia in un periodo di 42 giorni per un totale di 1030 mr. Il prelievo di sangue per le ricerche cromosomiche è stato effettuato 36 giorni dopo l'ultima irradiazione. Il cariotipo è risultato maschile normale (46/XY), di 111 cellule esaminate 14 presentavano alterazioni (12.61%), ossia 9 lesioni acromatiche di uno o due cromatidi, 2 cromosomi dicentrici, 2 cromosomi ad anello, 1 mitosi triploide ed 1 tetraploide.

Caso III: G. Rita di 14 anni. Affetta da endocardite mitralica reumatica, frequentemente in stato di scompenso. Durante i 2 anni e 4 mesi di ricovero venivano praticati vari telecardiogrammi, una scopia cardiaca ed una chimografia per un totale di 20.500 mr. Il prelievo è stato eseguito 20 giorni dopo l'ultimo telecardiogramma ed oltre un anno dall'esame chimografico. Di 150 cellule esaminate 66 presentavano alterazioni (44%), tra cui 42 lesioni acromatiche interessanti uno o due cromatidi, 14 frammentazioni cromatidiche, 2 cromosomi dicentrici e 2 non completamente dicentrici, uno di morfologia anomala, uno a rosario, 3 frammenti senza centromero, una cellula tetraploide. Cariotipo 46/XX.

Caso IV: C. Assunta di 9 anni. Affetta da cistite acuta ricorrente. Sono stati eseguiti esami radiologici delle vie urinarie (pielografia endovenosa e ascendente), che mettevano in evidenza a sinistra doppia pelvi con doppio uretere, impiegando in totale 1405 mr. in 18 giorni. Il prelievo di sangue per lo studio cromosomico era effettuato 4 giorni dopo l'ultima irradiazione. Di 196 cellule esaminate 31 presentavano alterazioni (15,81%), consistenti in 23 lesioni acromatiche interessanti uno o due cromatidi, 10 frammentazioni cromatidiche, 4 cromosomi dicentrici, 1 tricentrico, 1 cellula tetraploide. Cariotipo 46/XX.

Caso V: C. Angela di anni 3 e 2/12. Affetta da cistopielite. Venivano praticati i seguenti esami radiologici: torace, cistografia e pielografia endovenosa, per un totale di 1650 mr. in 20 giorni. Il prelievo era effettuato 18 giorni dopo l'ultima irradiazione. Di 127 cellule esaminate 5 presentavano alterazioni, consistenti in 6 lesioni acromatiche e 1 cromosoma ad anello; una mitosi era tetraploide. Cariotipo 46/XX.

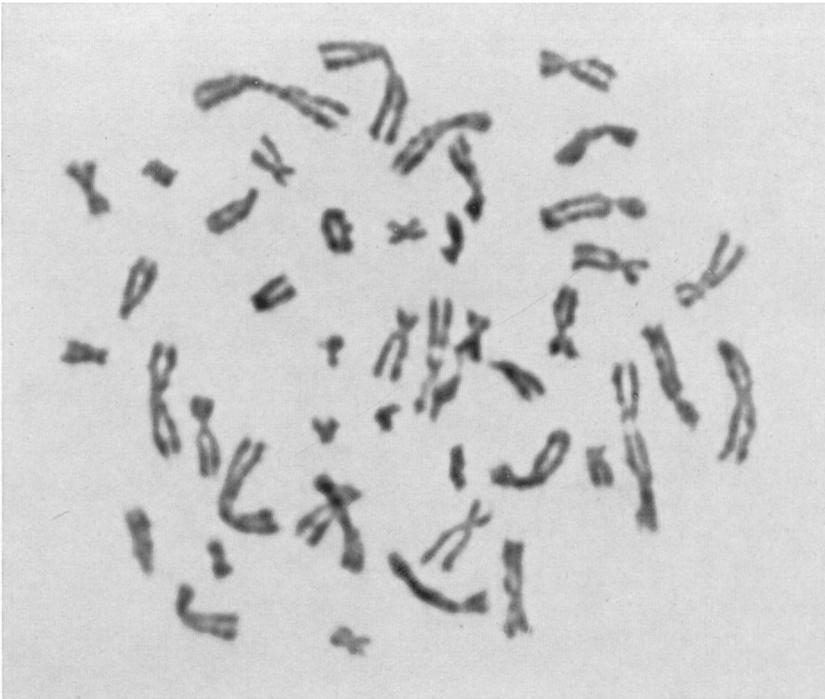


Fig. 2. Mitosi presentante lisi cromosomica e numerose lesioni

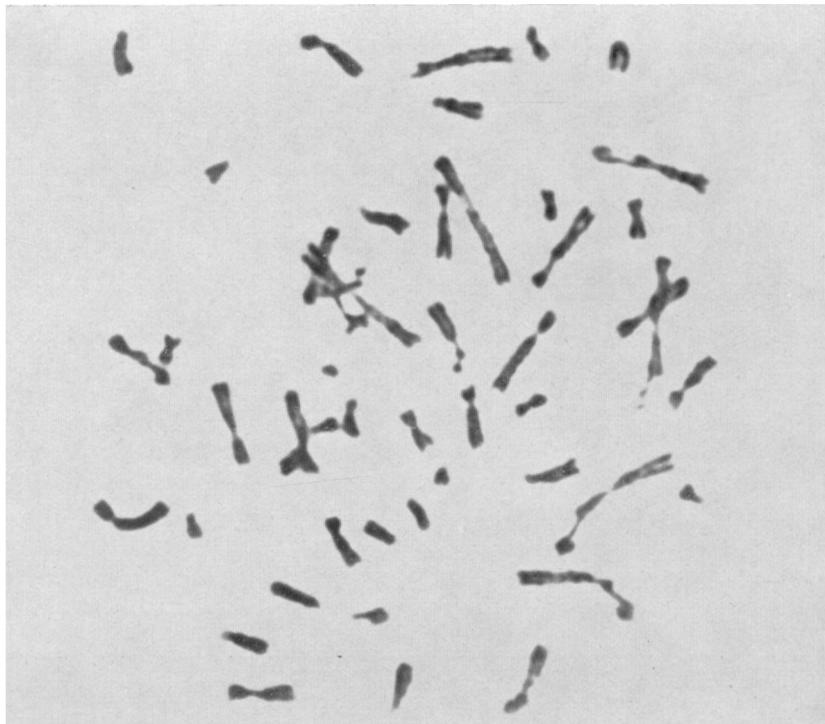


Fig. 3. Mitosi con numerosi tipi di alterazioni
(lesioni acromatiche, frammentazioni, fusione della cromatina)

Caso VI: P. Andreina di anni 1 e 8/12. Grave deficit intellettivo (Q.P.M. = 42), malformazioni di grado modesto: viso asimmetrico con occhi ipertelorici situati su piani orizzontali diversi, micrognatia, fronte sfuggente, padiglioni auricolari malformati con impianto basso, naso aquilino a base ristretta, palato ogivale, collo tozzo

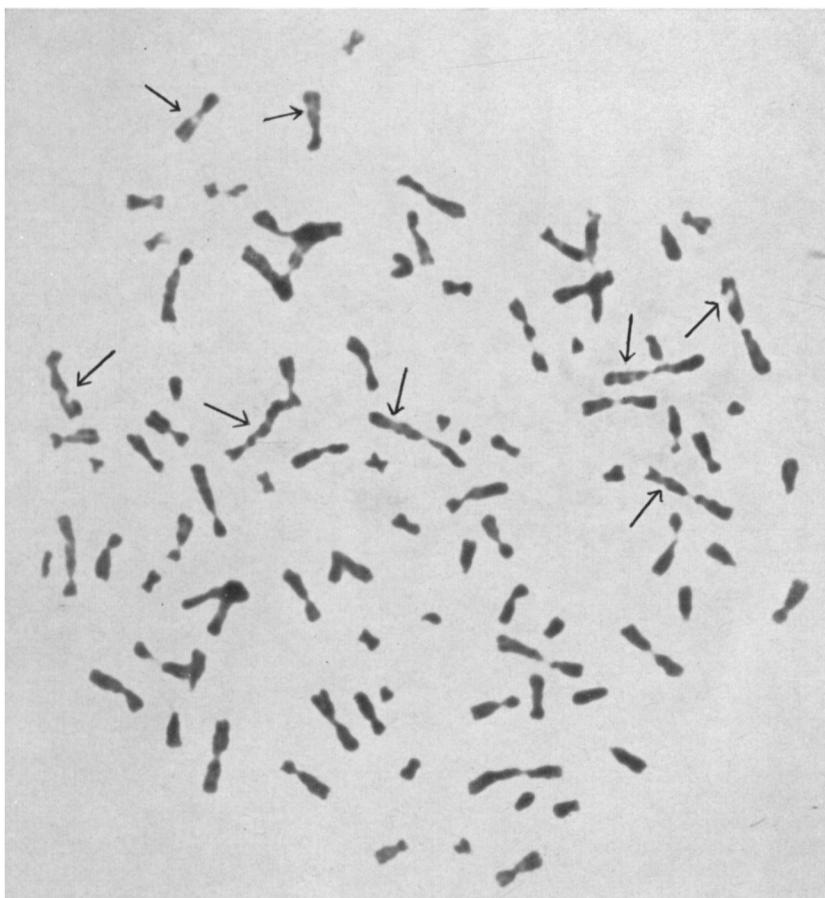


Fig. 4. Mitosi tetraploide con numerose lesioni

senza pterigium, aumento della cifosi toracica e della lordosi lombare, clinodattilia, sindattilia tra il II e il III dito dei piedi, ipertrofia del clitoride. Sesso cromatinico positivo. Le ricerche cromosomiche dimostravano trattarsi di sindrome di Turner con mosaicismo sessuale XO/XX. Venivano eseguiti i seguenti esami radiologici: scheletro, tomografia del torace, telecardiogramma, per un totale di 1290 mr. in 57 giorni. Il prelievo di sangue per la cultura di leucociti era effettuato 15 giorni

dopo l'ultima irradiazione. Di 117 cellule esaminate 10 presentavano alterazioni (8,54%) consistenti in 12 lesioni acromatiche interessanti uno o due cromatidi; una cellula era triploide.

Caso VII: M. Marzia di anni 10. Presenta tipica sindrome di Turner con mosaicismismo sessuale XO/XX: sviluppo intellettuale e somatico normali, daltonismo, epicantero, padiglioni auricolari molto piccoli e introflessi, palato ogivale, pterigium colli, torace piramidale a scudo con escavazione a imbuto, capezzoli retratti, clinodattilia,

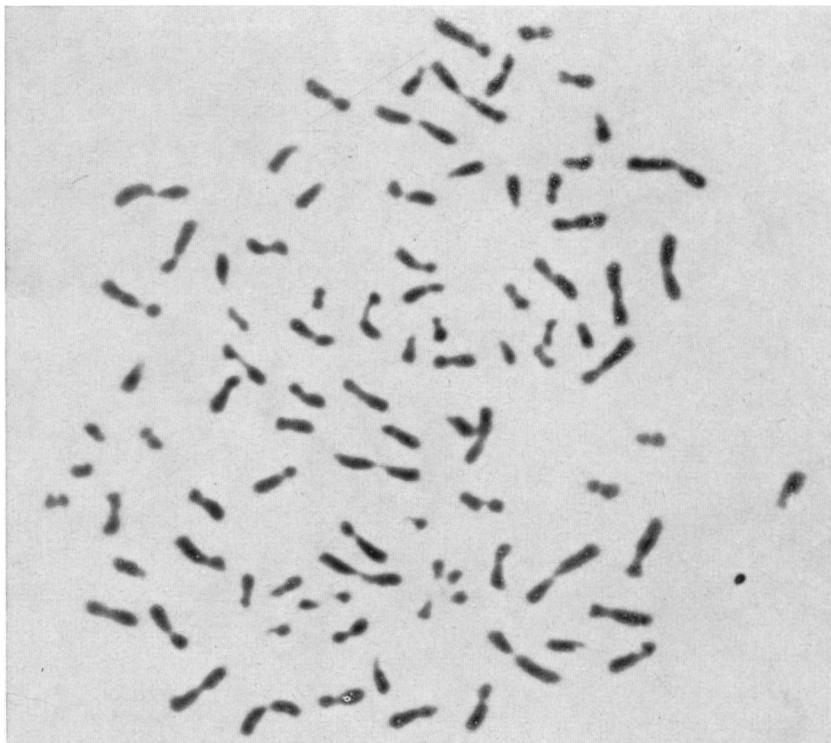


Fig. 5. Mitosi tetraploide da endoreduplicazione

linfedema piede sinistro, coartazione dell'aorta, apparato genitale femminile con caratteristiche infantili e utero notevolmente ipoplasico. Sesso cromatinico negativo. A scopo diagnostico venivano eseguiti vari esami radiologici tra cui l'angiocardiografia, la linfografia dell'arto inferiore sinistro, lo scheletro e la pielografia endovenosa, per un totale di 4270 mr. in 33 giorni. Il prelievo di sangue per la cultura era effettuato un giorno dopo l'ultima irradiazione. Di 111 cellule esaminate 14 presentavano alterazioni (12,61%) consistenti in 13 lesioni acromatiche e un cromosoma dicentrico; 2 cellule erano triploidi.

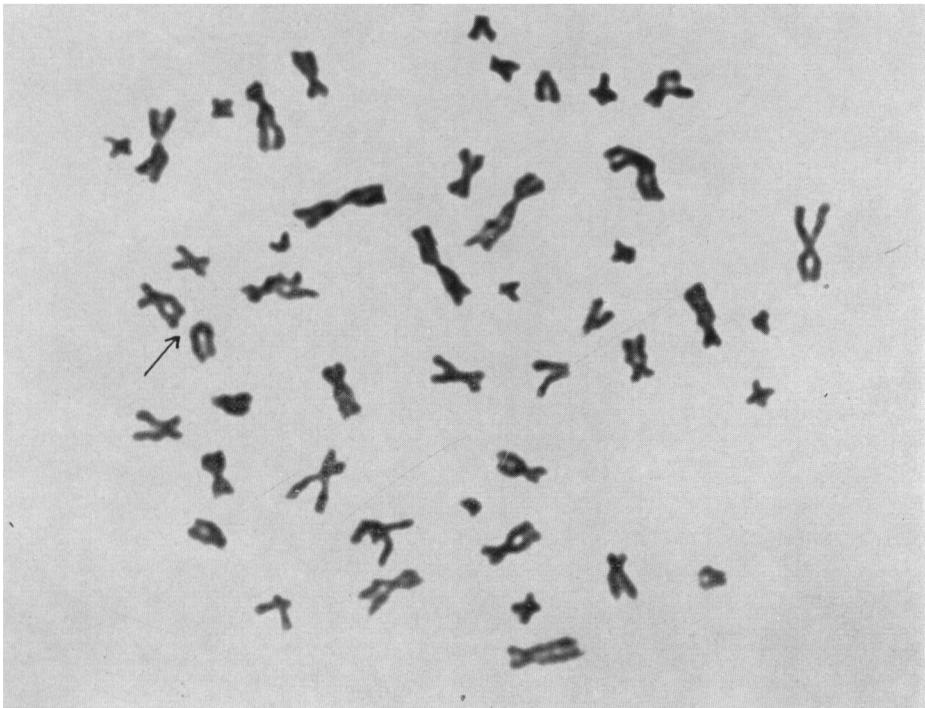
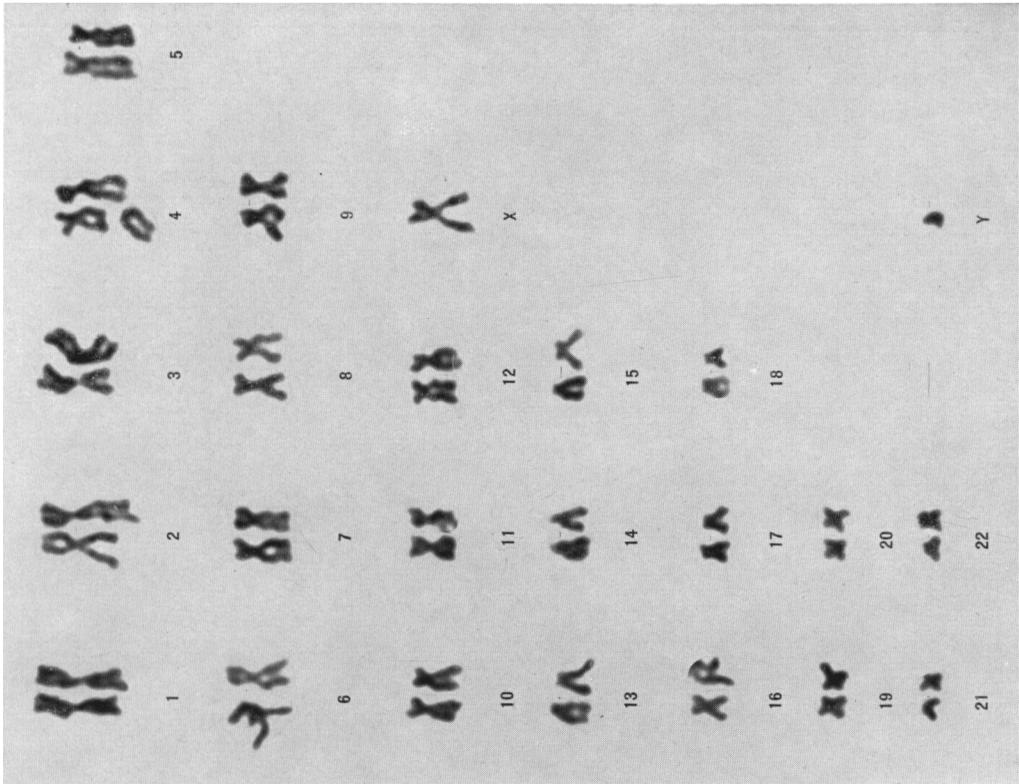


Fig. 6. Mitosi e cariotipo contenente il cromosoma della coppia N. 4, commentato nella Fig. 1, G



Fig. 7. Mitosi e cariotipo con numerose aberrazioni (frammentazione di un cromosoma della coppia N. 13 e addensamenti irregolari della cromatina sui cromatidi)

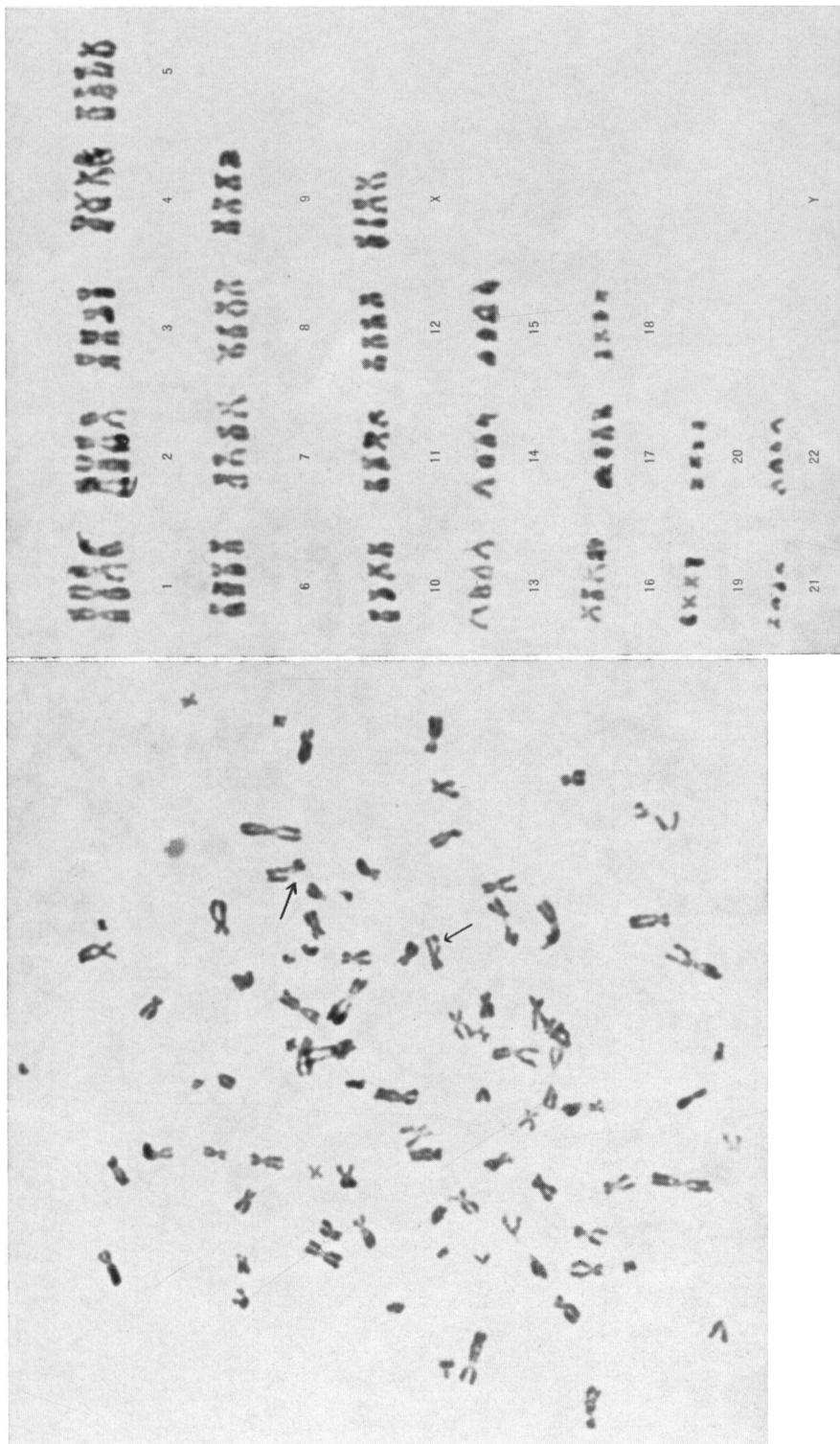


Fig. 8. Mitosi e cariotipo di cellula tetraploide per mancata divisione citoplasmatica

Caso VIII: G. Ezio di anni 8. Dalla prima infanzia presenta un grave deficit della funzione urinaria su base malformativa e oligofrenia. All'età di 4 anni era stato sottoposto in altro Istituto ad intervento chirurgico con asportazione di valvole uretrali congenite. In tale occasione erano stati eseguiti degli esami radiologici che non ci è stato possibile valutare. Successivamente all'età di 6 anni nel nostro Istituto sono state praticate altre radiografie dell'apparato urinario per un totale di 6770 mr. in un periodo di 19 mesi. Le ricerche cromosomiche, dimostranti un cariotipo maschile normale (46/XY), sono state eseguite 49 giorni dopo l'ultima esposizione. Di 100 mitosi osservate 23 presentavano alterazioni, consistenti in 24 lesioni acromatiche di uno o due cromatidi, 6 frammentazioni di cromatidi, 1 cromosoma dicentrico.

Caso IX: S. Silvano di 1 anno e 6/12. Quadro globale di ritardo psico-motorio con segni di spasticità a netta prevalenza destra; asimmetria del cranio, malformazione cutanea in regione fronto-parietale sinistra, cutis laxa, ipertelorismo, epicanto, strabismo convergente, padiglioni auricolari malformati con impianto basso. Sono state eseguite varie radiografie (torace, scheletro, pielografia discendente) per un totale di 1690 mr. in 9 giorni; il prelievo di sangue è stato effettuato 7 giorni dopo l'ultima irradiazione. Cariotipo maschile normale 46/XY. Sono state esaminate solo 75 cellule in quanto la maggior parte presentava una lisi cromosomica diffusa, di queste 32 avevano aberrazioni (42,66%) consistenti in 27 lesioni acromatiche interessanti uno o due cromatidi, 8 frammentazioni, 2 cromosomi dicentrici; 7 mitosi erano poliploidi.

Caso X: S. Antonio di 14 anni. Affetto da sindrome di Franceschetti: occhi orientati in senso antimongoloide, impianto basso delle orecchie con atresia congenita dei condotti uditivi, accartocciamento e ipoplasia dei padiglioni. Ipoacusia notevole bilaterale. Agenesia del massiccio mastoideo. Schisi posteriore del 1° arco sacrale. Q.I. = 77. Cariotipo 46/XY. Venivano eseguiti in un periodo di 260 giorni vari esami radiologici (scheletro, tra cui più volte il cranio in varie proiezioni, torace) per un totale di 12.700 mr. Il prelievo era effettuato 62 giorni dopo l'ultima irradiazione. Di 112 mitosi esaminate 91 presentavano aberrazioni consistenti in 79 lesioni acromatiche di un solo cromatide, 50 di due isocromatidi, 54 frammentazioni cromatidiche, 43 frammenti senza centromero, 4 cromosomi dicentrici, 1 cromosoma ad anello, 2 cromosomi riuniti con ponti che inducono a sospettare che possano avvenire interscambi di segmenti di cromatidi tra un cromosoma e l'altro; 21 mitosi erano poliploidi.

Non essendoci stato possibile esaminare i cromosomi dei pazienti presentati prima che fossero stati sottoposti alle irradiazioni, abbiamo considerato come controlli un gruppo di 19 bambini, 10 normali e 9 mongoloidi con trisomia 21, di età variante da 6 mesi a 14 anni, che non avevano mai subito irradiazioni nè avevano sofferto recentemente di malattie virali. Abbiamo riscontrato lesioni cromosomiche di tipo temporaneo nel 3,6% delle cellule esaminate e la frequenza di 0,4% mitosi poliploidi, valori nettamente inferiori a quelli dei 10 bambini considerati in questa ricerca.

Osservando i nostri dati appare evidente che aberrazioni cromosomiche riferibili alle precedenti irradiazioni X subite per esami diagnostici erano presenti in tutti i bambini esaminati a questo proposito. Si può notare che, indipendentemente dalla quantità di r somministrati, dal periodo complessivo in cui l'irradiazione è avvenuta, dalla distanza di tempo intercorsa tra l'ultima irradiazione e il prelievo di sangue per la cultura, ogni bambino ha avuto una risposta sua propria. Ciò risulta evidente dal confronto dei casi I e X, e IV-V e IX, che sono abbastanza omologabili.

Caso	Nome	Cariotipo	mr.	Periodo complessivo irradiaz. (giorni)	Distanza prelievo da ultima irradiaz. (giorni)	Cellule con aberrazioni cromosomiche temporanee		Totale cellule esaminate	Poliploidi %
						totale	%		
I	B. Alfredo	46/XY	13.895	350	60	12	11,32	106	—
II	N. Angelo	46/XY	1.030	42	36	14	12,61	111	3,5
III	G. Rita	46/XX	20.500	840	20	66	44,0	150	1
IV	C. Assunta	46/XX	1.405	18	4	31	15,81	196	0,5
V	C. Angela	46/XX	1.650	20	18	5	3,93	127	0,9
VI	P. Andreina	44 A + XO/XX	1.290	57	15	10	8,54	117	0,9
VII	M. Marzia	44 A + XO/XX	4.270	33	1	14	12,61	111	2
VIII	G. Ezio	46/XY	6.770	570	49	23	23,0	100	—
IX	S. Silvano	46/XY	1.690	9	7	32	42,66	75	6,6
X	S. Antonio	46/XY	12.700	260	62	91	81,25	112	19,5
Controlli non irradiati (19 bambini)			—	—	—	3,6		—	0,4

Tale comportamento, anche se riscontrato in soli 10 casi, ci permette di ritenere che il fattore individuale della più o meno spiccata suscettibilità delle cellule di ogni singolo soggetto all'insulto delle radiazioni ionizzanti giochi il ruolo più importante nel determinismo di queste lesioni. Si potrebbe dedurre da ciò che in pratica non si può stabilire una dose-soglia al di sotto della quale l'irradiazione non provochi alcun danno cromosomico.

Il problema dei pericoli delle irradiazioni a scopo diagnostico per le cellule viventi è appena aperto. Ampi studi su maggiori casistiche sono necessari per trarre delle conclusioni. Noi ci limitiamo a segnalare che nel bambino dosi di raggi X, anche inferiori a quelle comunemente considerate massime, possono indurre nei leucociti, lesioni cromosomiche persistenti per alcuni mesi dopo l'esposizione.

Riassunto

Gli Autori hanno osservato alterazioni morfologiche dei cromosomi di culture di leucociti in elevata percentuale in 10 bambini che erano stati precedentemente sottoposti ad irradiazioni Roentgen a scopo diagnostico. Sono state riscontrate alterazioni di tipo temporaneo quali interruzioni della cromatina sul filamento proteico, definite come lesioni acromatiche di uno o di due cromatidi, frammentazioni di cromatidi, frammenti senza centromero, delezioni, cromosomi ad anello, dicentrici e tricentrici e in alcuni casi aumento delle mitosi poliploidi sia per endoreduplicazione che per mancata divisione citoplasmatica.

Bibliografia

1. BENDER M. A.: Chromosome aberrations in irradiated human subjects. *Ann. New York Acad. Sci.*, 114: 249-251, 1964.
2. BENDER M. A. & GOOCH P. C.: Chromatid-type aberrations induced by X-rays in human leukocyte cultures. *Cytogenetics*, 2: 107-116, 1963.
3. BERAUD CL. & BASTIDE R.: Les dangers éloignés des examens radiologiques chez le nourrisson et chez l'enfant. *J. Radiol. Electrol.*, 38: 616-621, 1957.
4. BLOOM A. D. & TJO J. H.: In vivo effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes. *New Engl. J. Med.* 270: 1341-1344, 1964.
5. BÖÖK J. A., FRACCARO M., FREDGA K., LINDSTEN J.: Radiation induced chromosome aberrations in human foetal cells grown in vitro. *Ge. Me. Ge.*, 11: 356-389, 1962.
6. BUCKTON K. E., JACOBS P. A., COURT BROWN W. M., DOLL R.: A study of the chromosome damage persisting after X-ray therapy for ankylosing spondylitis. *Lancet*, 2: 676-682, 1962.
7. CHU E. H. Y., GILES N. H., PASSANO K.: Types and frequencies of human chromosome aberration induced by X-rays. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 830, 1961.
8. CONEN P. E., BELL A. G., ASPIN N.: Chromosomal aberration in an infant following the use of diagnostic X-rays. *Pediatrics*, 31: 72-78, 1963.
9. FOSSATI F., GALLONE P., PARMEGGIANI L., POLVANI C., SCOLARI M.: Norme per la protezione contro le radiazioni ionizzanti. Ed. Höpli - Milano - 1956.
10. MOORHEAD P. S., NOWELL P. C., MELLMAN W. J., BATIPPS D. M., HUNGERFORD D. A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616, 1960.
11. NAKANISHI Y. H. & MAKINO S.: Phase cinematography studies on the effects of radiation and chemicals on the cell and the chromosomes. *J. Microscopie*, 1: 233, 1962.
12. OHNUKI Y., AWA A., POMERAT C. M.: Chromosomal studies on irradiated leucocytes in vitro. *Ann. New York Acad. Sci.*, 95: 882-888, 1961.
13. PUCK T. T.: The action of radiation on mammalian cells. *Am. Naturalist.*, 94: 95, 1960.
14. STEWART J. S. S. & SANDERSON A.: Chromosomal aberration after diagnostic X-irradiation. *Lancet*, 1: 978, 1961.
15. TUBIANA M.: La prophylaxie des accidents causés par les radiations. *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1: 739-751, 1956.

SUMMARY

The Authors have observed a high rate of chromosomal morphologic alterations in leukocyte cultures in 10 children who had previously undergone Roentgen irradiation for diagnostic purposes. Temporary alterations have been observed, such as interruptions of chromatine on the proteic thread, defined as achromatic lesions of one or more chromatids; fragmentations of chromatids; fragments without centromere; deletions; ring-chromosomes; dicentric and trivalent chromosomes and, in certain cases, increase of polyploid mitoses, both on account of endo-reduplications or of a lacking cytoplasm division.

RÉSUMÉ

Les Auteurs ont observé une fréquence élevée d'altérations morphologiques chromosomiales dans des cultures de leucocytes chez 10 enfants qui avaient été précédemment irradiés pour des raisons diagnostiques. Ils ont observé des altérations temporaires, telles que des interruptions du filament protéique, définies comme lésions achromatiques d'un ou deux centromères; des fragmentations de chromatides; des fragments sans centromère; des délétions; des chromosomes à anneau, dicentriques et tricentriques et, en quelques cas, une augmentation de mitoses polyploïdes soit par endoréduplication, soit par défaut de division du cytoplasme.

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. beobachteten an 10 Kindern, die zu diagnostischen Zwecken geröntgt worden waren, morphologische Chromosomenalterationen der Leukozytenkulturen. Es handelte sich um vorübergehende Veränderungen, wie Unterbrechung des Chromatins auf den Eiweißfasern, welche man als achromatische Läsionen einer oder zweier Chromatiden bezeichnet, Chromatidenframmentierungen, Fragmente ohne Zentromer, Deletionen, ringförmige zwei- und dreizentrige Chromosomen und in einigen Fällen Erhöhung der polyploiden Mitosen und zwar sowohl durch Endoreduplikation als durch Ausfall der Zytoplasmaspaltung.