

La Fosfatasi Alcalina Leucocitaria nella Sindrome di Down

**Giuseppe Cardinali,¹ Giuliana Cardinali,¹ Francesco Renzulli,
Luigi Capotorti² e Enzo Ferrante²**

L'interesse dei ricercatori allo studio dell'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (F.A.L.) nella sindrome di Down, è legata alle precedenti osservazioni che hanno dimostrato che la F.A.L. è diminuita nella leucemia mieloide cronica, e alla dimostrazione che, in questa malattia, esiste una caratteristica alterazione cromosomica a livello della stessa coppia cromosomica che si trova alterata nella sindrome di Down.

Come è noto, in base alla osservazione di Nowell e Hungerford (1960), confermata successivamente da vari autori, nella leucemia mieloide cronica uno dei cromosomi della coppia 21 è abnormemente piccolo. Questa alterazione cromosomica è dovuta ad una delezione del braccio lungo e il cromosoma alterato è correntemente indicato con il nome di cromosoma di Filadelfia (Ph¹). Poiché nella leucemia mieloide cronica l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria è molto bassa, è stata avanzata l'ipotesi che nel cromosoma 21 siano localizzati il gene o i geni che controllano la F.A.L. (Moloney, 1961).

Nella sindrome di Down il cariotipo è costituito da 47 cromosomi per la presenza di un cromosoma 21 soprannumerario (Lejeune *et al.*, 1959 *a, b, c*).

Gli ulteriori sviluppi delle ricerche citogenetiche nella sindrome di Down hanno però dimostrato che, accanto a soggetti con 47 cromosomi (trisomia 21), esiste una minoranza di pazienti con 46 cromosomi, nei quali l'alterazione cariologica è rappresentata da una traslocazione tra il cromosoma soprannumerario 21 e un altro cromosoma (Polani *et al.*, 1960; Penrose *et al.*, 1960; Fraccaro *et al.*, 1960; Turpin e Lejeune, 1965). Si conoscono almeno due varietà di traslocazioni associate alla sindrome di Down. La prima è rappresentata dalla traslocazione tra un cromosoma 21 e un grande cromosoma acrocentrico del gruppo 13-15 (Polani *et al.*, 1960; Penrose

¹ Centro di Ematologia dell'Istituto di Genetica Medica dell'Università di Roma.

² Centro di Citogenetica dell'Istituto di Clinica Pediatrica dell'Università di Roma.

et al., 1960). La seconda consiste nella traslocazione tra un cromosoma 21 e un altro piccolo cromosoma acrocentrico 21-22 (Fraccaro *et al.*, 1960).

Il fatto che la leucemia mieloide cronica, nella quale vi è una delezione di materiale genetico della coppia 21, si accompagna ad una notevole diminuzione della F.A.L. (Wachstein, 1946; Wiltshaw e Moloney, 1955; Mitus *et al.*, 1958), ha indotto a studiare questa attività enzimatica anche nella sindrome di Down, nell'ipotesi che, essendovi qui una trisomia del cromosoma 21, supposta sede del locus che controlla la F.A.L., questa dovrebbe essere costantemente aumentata.

Le ricerche condotte fino ad ora hanno dimostrato che la F.A.L. è elevata soltanto in parte dei soggetti affetti da sindrome di Down (Trubowitz *et al.*, 1962; King *et al.*, 1962 *a, b*; Lennox *et al.*, 1962; O'Sullivan e Pryles, 1963; Alter *et al.*, 1963). La mancanza di un aumento costante dell'attività fosfatase leucocitaria in questi pazienti, è stata variamente interpretata.

Trubowitz *et al.* (1962) hanno pensato che la F.A.L. possa essere aumentata nei soggetti con trisomia e sia, invece, nei limiti della norma nei soggetti portatori di traslocazione.

O'Sullivan e Pryles (1963) hanno però dimostrato una normale attività fosfatase leucocitaria in 18 soggetti con trisomia 21. È stata anche avanzata l'ipotesi che la F.A.L. possa trovarsi elevata non per cause genetiche, ma come conseguenza delle complicazioni infettive che sono piuttosto frequenti nei soggetti con sindrome di Down (Trubowitz *et al.*, 1962; Lawler, 1962), o come conseguenza di una relativa immaturità dei neutrofili, associata ad una diminuzione della loro durata di vita (Hook e Engel, 1964).

Le osservazioni di Alter *et al.* (1963) indicherebbero che la F.A.L. è soprattutto elevata nei pazienti di età inferiore ai 10 anni.

I dati finora a disposizione non permettono, quindi, di stabilire con precisione quale sia l'influenza, rispettivamente, dei fattori genetici e di quelli extra-genetici sul comportamento della fosfatasi alcalina leucocitaria nella sindrome di Down. È sembrato quindi utile condurre uno studio dell'attività fosfatase leucocitaria e del cariotipo in soggetti affetti da sindrome di Down, esenti da complicazioni infettive, e suddivisi in gruppi di varie età.

Materiale e metodo

L'indagine è stata condotta su 40 soggetti affetti da sindrome di Down di ambo i sessi e di età variabile da 1 settimana a 15 anni. Come controlli sono stati adoperati soggetti normali della stessa età dei pazienti. Particolare attenzione è stata posta nella selezione sia dei pazienti che dei soggetti normali, per evitare d'includere nello studio soggetti con processi flogistici in atto o latenti. La F.A.L. è stata determinata con il metodo di Hayhoe e Quaglini (1958). Con questo metodo il citoplasma dei leucociti fosfatasi-negativi assume un colore giallo pallido. I granulociti fosfatasi-positivi assumono un colore brunoastro diffuso del citoplasma, e presentano granuli bruno-scuro intracitoplasmatici (Fig. 1).

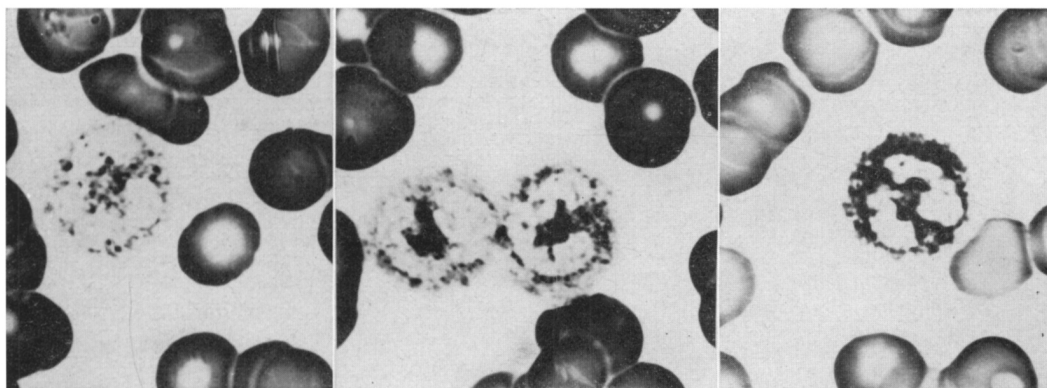


Fig. 1. Vari gradi di positività (da 1 a 4) della F.A.L. in un soggetto con sindrome di Down

Gli strisci sono sempre stati fissati entro 1 ora dal prelievo. L'indice di attività è stato determinato contando almeno 200 granulociti neutrofilii, i quali sono stati assegnati a 4 classi di valori, da 0 a 4, a seconda del numero dei granuli colorati e della intensità della colorazione. Valore 0 è stato attribuito ai granulociti fosfatasi-negativi; valore 1 ai granulociti con poche e sparse granulazioni; valore 2 ai granulociti con maggior numero di granuli intensamente bruni; valore 3 agli elementi contenenti granulazioni intensamente brune, diffuse in tutto il citoplasma; valore 4 ai granulociti nei quali il citoplasma era stipato di granuli bruni, senza nessuno spazio chiaro tra un granulo e l'altro, per cui le cellule assumevano una intensa colorazione bruna diffusa. L'indice di attività è stato calcolato moltiplicando il numero dei granulociti di ogni classe per il valore della classe, e sommando i valori così ottenuti per ogni classe.

L'esame cariologico è stato eseguito su culture di sangue periferico con la tecnica di Moorhead *et al.* (1960). Di ciascun soggetto sono state contate almeno 20 piastre metafasiche, ed almeno 5 sono state fotografate e montate secondo lo schema di Denver (1960).

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati nelle Tabb. 1 e 2. L'indice medio di attività della F.A.L., calcolato su tutti i soggetti normali, è 108,7 e quello calcolato su tutti i soggetti con sindrome di Down 175,5. Se si considerano i valori dell'attività enzimatica negli individui suddivisi per gruppi di età, risalta subito la variabilità della F.A.L. in rapporto all'età nei soggetti normali (Tab. 3). I valori più elevati si sono osservati nei soggetti di età inferiore agli undici anni. I confronti degli indici medi della F.A.L. nelle quattro classi di età hanno dimostrato che le differenze osservate tra le classi, II, III e IV e I e IV sono statisticamente significative (Tabb. 3 e 5). Nei soggetti con sindrome di Down non si sono, invece, osservate differenze significative degli indici medi della F.A.L. in rapporto all'età (Tabb. 4 e 6).

Tab. 1. Indice della F.A.L. nei soggetti normali

| N. | Nome | Età | Sesso | F.A.L. |
|----|--------|-----------|-------|--------|
| 1 | S.W. | 25 giorni | ♂ | 123 |
| 2 | P.M. | 30 » | ♂ | 116 |
| 3 | C.A. | 1 mese | ♂ | 148 |
| 4 | N.S. | 2 mesi | ♂ | 144 |
| 5 | P.R. | 3 » | ♂ | 81 |
| 6 | V.M. | 4 » | ♂ | 64 |
| 7 | S.G. | 4 » | ♂ | 122 |
| 8 | C.A. | 5 » | ♂ | 137 |
| 9 | A.B. | 6 » | ♂ | 60 |
| 10 | P.M. | 10 » | ♂ | 96 |
| 11 | M.D. | 11 » | ♂ | 116 |
| 12 | L. | 1 anno | ♂ | 175 |
| 13 | T.M. | 13 mesi | ♂ | 148 |
| 14 | C.D. | 2 anni | ♂ | 172 |
| 15 | I. | 3 » | ♂ | 170 |
| 16 | P.M. | 3 » | ♂ | 139 |
| 17 | S.S. | 3 » | ♂ | 105 |
| 18 | E.G. | 4 » | ♂ | 119 |
| 19 | B. | 5 » | ♂ | 98 |
| 20 | A.A. | 5 » | ♂ | 110 |
| 21 | R.A. | 5 » | ♂ | 129 |
| 22 | C.K. | 5 » | ♂ | 139 |
| 23 | B.G. | 6 » | ♂ | 106 |
| 24 | S.R. | 6 » | ♂ | 66 |
| 25 | R.G.R. | 7 » | ♂ | 77 |
| 26 | Z.G. | 7 » | ♂ | 116 |
| 27 | R.E. | 8 » | ♂ | 140 |
| 28 | E.B. | 9 » | ♂ | 110 |
| 29 | G.B. | 9 » | ♂ | 86 |
| 30 | M.B. | 9 » | ♂ | 108 |
| 31 | P.F. | 9 » | ♂ | 135 |
| 32 | T.S. | 9 » | ♂ | 106 |
| 33 | T.F. | 9 » | ♂ | 102 |
| 34 | R.G.G. | 10 » | ♂ | 101 |
| 35 | C.T. | 11 » | ♂ | 95 |
| 36 | C.R. | 11 » | ♂ | 55 |
| 37 | L.A. | 12 » | ♂ | 117 |
| 38 | L.P. | 12 » | ♂ | 47 |
| 39 | D.V. | 13 » | ♂ | 25 |
| 40 | L.C. | 13 » | ♂ | 110 |
| 41 | G.C. | 13 » | ♂ | 83 |
| 42 | B.M. | 15 » | ♂ | 68 |

Tab. 2. Indice della F.A.L. e cariogramma nei soggetti con sindrome di Down

| N. | Nome | Età | Sesso | F.A.L. | Cariogramma |
|----|---------|-----------|-------|--------|-------------|
| 1 | R.M. | 7 giorni | ♂ | 167 | |
| 2 | M.C. | 8 » | | 205 | |
| 3 | L.A. | 12 » | | 138 | |
| 4 | A.M. | 20 » | | 168 | |
| 5 | M.C. | 22 » | | 131 | |
| 6 | C.E. | 22 » | | 114 | |
| 7 | L.M. | 1 mese | | 122 | T 21 |
| 8 | F.A. | 46 giorni | | 152 | T 21 |
| 9 | M.M. | 2½ mesi | | 117 | T 21 |
| 10 | C.A. | 3 » | | 186 | |
| 11 | C.P. | 5 » | | 107 | T 21 XXX |
| 12 | M. | 5 » | | 175 | |
| 13 | C.R. | 5 » | | 211 | |
| 14 | N.S. | 5 » | | 149 | |
| 15 | D.R. | 9 » | | 123 | T 21 |
| 16 | R.F. | 9 » | | 291 | T 21 |
| 17 | G.G. | 10 » | | 248 | T 21 |
| 18 | G.A. | 19 » | | 287 | T 21 |
| 19 | Di G.A. | 33 » | | 123 | |
| 20 | G.M. | 3 anni | | 196 | T 21 |
| 21 | S.N. | 3 » | | 196 | |
| 22 | C.M.L. | 4 » | | 115 | |
| 23 | T.G. | 5 » | | 148 | |
| 24 | T.G. | 5 » | | 218 | |
| 25 | R.Y. | 5 » | | 125 | |
| 26 | M.L. | 5 » | | 253 | T 21 |
| 27 | I.E. | 6 » | | 204 | T 21 |
| 28 | M.E. | 6 » | | 198 | |
| 29 | D.C.M. | 6 » | | 134 | |
| 30 | N.L. | 7 » | | 215 | Tras. 15/21 |
| 31 | C.V. | 9 » | | 182 | |
| 32 | S.G. | 9 » | | 127 | |
| 33 | C.F. | 10 » | | 272 | |
| 34 | S.S. | 11 » | | 119 | |
| 35 | T.P. | 11 » | | 227 | |
| 36 | M.S. | 13 » | | 223 | |
| 37 | C.T. | 14 » | | 161 | |
| 38 | D.R.G. | 14 » | | 146 | |
| 39 | C.D. | 15 » | | 234 | |
| 40 | S.S. | 15 » | | 115 | T 21 |

Tab. 3. Attività della F.A.L. nei soggetti normali suddivisi per gruppi di età

| Gruppi di età | N. casi | Indici medi (\bar{X}) della F.A.L. | Scarto quadratico medio (S) | Coefficiente di variazione ($V=S/\bar{X} \cdot 100$) |
|---------------------------|---------|---|--------------------------------|--|
| I (fino a 1 anno) | 12 | 115,17 | $\pm 34,73$ | 30,15 |
| II (da > 1 a 5 anni) | 10 | 132,90 | $\pm 25,68$ | 19,32 |
| III (da 6 a 10 anni) | 12 | 104,42 | $\pm 21,25$ | 20,35 |
| IV (da 11 a 15 anni) | 8 | 75,00 | $\pm 32,04$ | 42,72 |
| Totale (da < 1 a 15 anni) | 42 | 108,67 | $\pm 33,87$ | 31,16 |

Tab. 4. Attività della F.A.L. nei soggetti con sindrome di Down suddivisi per gruppi di età

| Gruppi di età | N. casi | Indici medi (\bar{X}) della F.A.L. | Scarto quadratico medio (S) | Coefficiente di variazione ($V=S/\bar{X} \cdot 100$) |
|---------------------------|---------|---|--------------------------------|--|
| I (fino a 1 anno) | 17 | 164,94 | $\pm 50,76$ | 30,77 |
| II (da > 1 a 5 anni) | 9 | 184,56 | $\pm 61,31$ | 33,22 |
| III (da 6 a 10 anni) | 7 | 190,28 | $\pm 49,63$ | 26,08 |
| IV (da 11 a 15 anni) | 7 | 175,00 | $\pm 52,05$ | 29,74 |
| Totale (da < 1 a 15 anni) | 40 | 175,55 | $\pm 52,26$ | 29,76 |

Tab. 5. Valori della t di Student per i confronti tra gli indici medi della F.A.L. nei vari gruppi di età dei soggetti normali

| Gruppi di età | Differenza tra le medie | t | Gradi di libertà | p |
|---------------|----------------------------|------|---------------------|-----------------|
| I vs. II | -17,73 | 1,34 | 20 | >0,05 |
| I vs. III | 10,75 | 0,91 | 22 | >0,05 |
| I vs. IV | 40,17 | 2,61 | 18 | <0,05 >0,01 |
| II vs. III | 28,48 | 2,85 | 20 | <0,01 >0,001 |
| II vs. IV | 57,90 | 4,26 | 16 | <0,001 |
| III vs. IV | 29,42 | 2,48 | 18 | <0,05 >0,01 |

Tab. 6. Valori della t di Student per i confronti tra gli indici medi della F.A.L. nei vari gruppi di età dei soggetti con sindrome di Down

| Gruppi di età | Differenza tra le medie | t | Gradi di libertà | p |
|---------------|-------------------------|------|------------------|-------|
| I vs. II | —19,62 | 0,87 | 24 | >0,05 |
| I vs. III | —25,34 | 1,12 | 22 | >0,05 |
| I vs. IV | —10,06 | 0,44 | 22 | >0,05 |
| II vs. III | — 5,72 | 0,20 | 14 | >0,05 |
| II vs. IV | 9,56 | 0,33 | 14 | >0,05 |
| III vs. IV | 15,28 | 0,56 | 12 | >0,05 |

Per meglio valutare l'esistenza di un rapporto causale tra F.A.L. ed età di soggetti normali, è stato calcolato l'indice r di correlazione tra l'attività fosfataseica ed il parametro età. Per questo calcolo sono state considerate tre classi di età: da 0 a 5 anni, da 5 a 10 anni, da 10 a 15 anni, e tre classi di attività fosfataseica aventi per estremi, rispettivamente, i valori di 40-85, 85-130 e 130-175. Il calcolo della correlazione ha dato un valore di $r = -0,459$. Sulla base di questa stima il coefficiente ρ di correlazione tra i 2 fenomeni (attività fosfataseica ed età) risulta compreso tra $-0,20$ e $-0,65$, nei limiti di confidenza del 5%. Il coefficiente di regressione della F.A.L. sull'età è risultato uguale a $-3,73$. Date le classi considerate la regressione media annuale della F.A.L. sull'età è risultata uguale a $-0,75$ circa. Il coefficiente così ottenuto ci ha permesso di tracciare la retta di regressione (Fig. 2).

Avendo stabilito che nei soggetti normali esiste una variazione causale della

Tab. 7. Valori della t di Student per i confronti tra gli indici medi della F.A.L. nei pazienti (p) e nei controlli (c)

| Gruppi di età | Differenza tra gli indici medi ($\bar{X}_p - \bar{X}_c$) | t | Gradi di libertà | p |
|-----------------------------|--|------|------------------|-----------------|
| I (fino a 1 anno) | 49,77 | 2,94 | 27 | <0,01 >0,001 |
| II (da > 1 a 5 anni) | 51,66 | 2,44 | 17 | <0,05 >0,01 |
| III (da 5 a 10 anni) | 85,86 | 5,30 | 17 | <0,001 |
| IV (da 11 a 15 anni) | 100,00 | 4,54 | 13 | <0,001 |
| Totale * (da < 1 a 15 anni) | 66,43 | 6,76 | 80 | <0,00001 |

* Il confronto nel totale dei due campioni è stato effettuato tra i valori corretti del campione normale ed i valori sperimentali del campione dei soggetti affetti da sindrome di Down.

F.A.L. dovuta all'età, i valori del campione dei controlli sono stati corretti pre-quandoli all'età media del campione stesso (De Castro, 1961). Applicando il test di normalità (De Castro, 1961) si è potuto dimostrare che i valori così corretti non differiscono significativamente ($p > 0,82$) da quelli di una distribuzione normale. La verifica della normalità dei valori rilevati sperimentalmente nei soggetti affetti

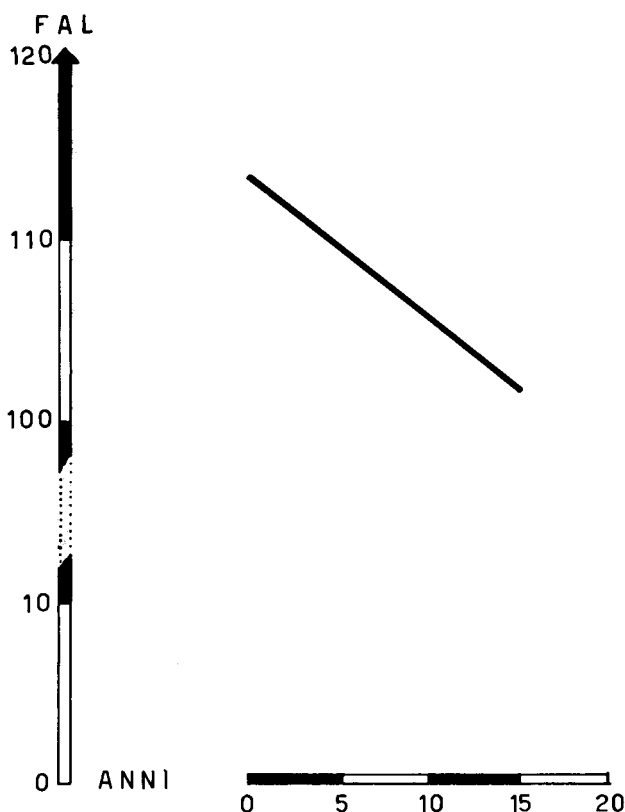


Fig. 2. Retta di regressione della F.A.L. sull'età nei soggetti normali

da sindrome di Down ha condotto ad un risultato analogo ($p > 0,11$). Si è potuto quindi applicare il test *t* di Student per il confronto tra i 2 campioni. La verifica di normalità è stata attuata solo nel totale dei due campioni, dato che il numero dei casi nelle singole classi non era sufficiente per permettere una verifica significativa della normalità in ciascuna classe.

I confronti tra i valori medi della F.A.L. negli individui normali e nei soggetti affetti da sindrome di Down sono riportati nella Tab. 7. Le differenze osservate sono statisticamente significative sia nelle singole classi che nel totale dei casi.

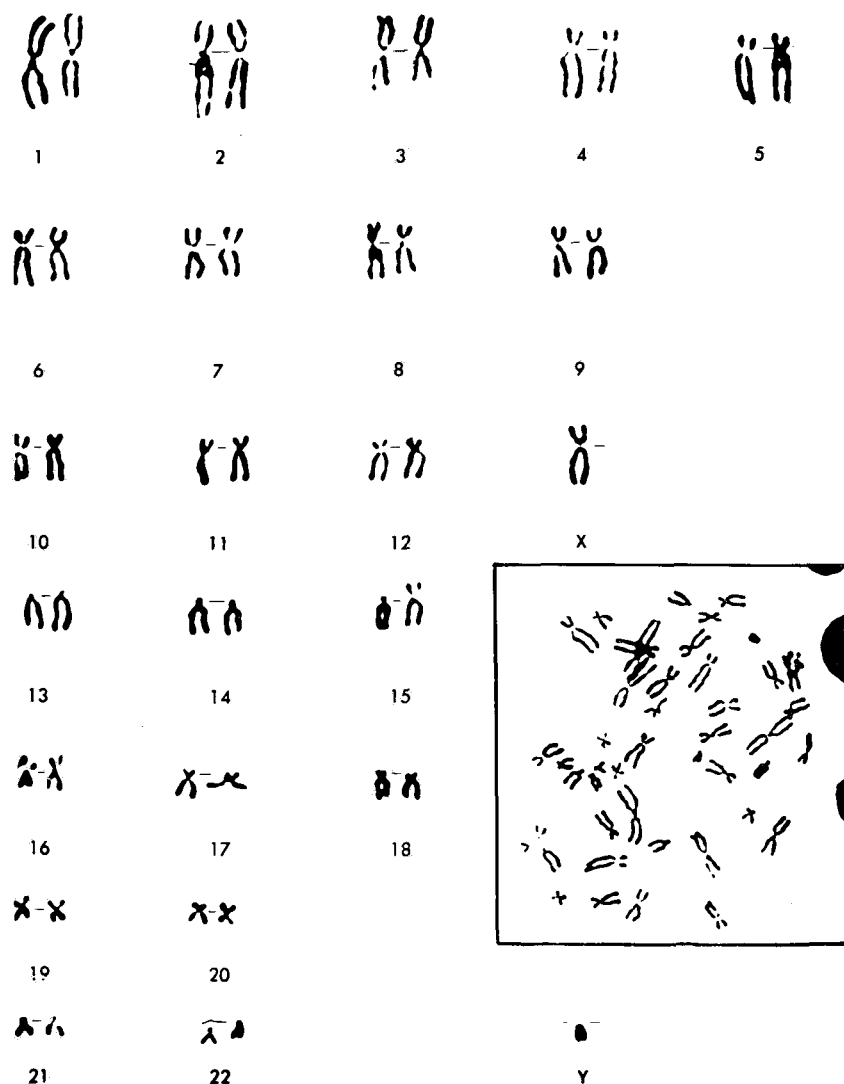


Fig. 3. Cariogramma di un soggetto affetto da sindrome di Down. Traslocazione tipo 15/21

Per quanto riguarda le alterazioni cromosomiche, sui 13 casi studiati soltanto uno (caso n. 30) si è dimostrato del tipo traslocazione 15/21 (Fig. 3), mentre in tutti gli altri casi si è osservata una trisomia 21. Nel caso di traslocazione si è trovato un indice di attività fosfatasi elevata (Tab. 2).

Discussione

Il rapido sviluppo delle indagini citogenetiche ha stimolato in questi ultimi anni l'interesse dei ricercatori allo studio dei rapporti tra alterazioni cromosomiche e disturbi enzimatici. È verosimile attendersi che le anomalie del cariotipo caratterizzate da una perdita di materiale genetico come si ha nelle delezioni, e può aversi nelle traslocazioni, possano accompagnarsi ad un deficit enzimatico, mentre le condizioni nelle quali si ha un aumento del numero dei cromosomi, come si verifica nelle trisomie e nelle polisomie in genere, possano invece tradursi in un aumento di certe attività enzimatiche. Questo rapporto quantitativo tra grado dell'attività enzimatica e numero dei cromosomi che sono sede del relativo locus, può essere prospettato per le attività enzimatiche controllate dagli autosomi, ma non per quegli enzimi la cui attività è controllata da geni situati sul cromosoma X (ad es., la glucoso-6-fosfato-deidrogenasi). Questo sarebbe dovuto al fatto che un solo cromosoma X è geneticamente attivo, mentre l'altro o gli altri cromosomi X presenti sono inattivati in una fase molto precoce della vita embrionale (Beutler *et al.*, 1962; Lyon, 1962).

Per quanto riguarda la F.A.L. è stata avanzata l'ipotesi che il gene o i geni responsabili del suo controllo siano situati sul cromosoma 21 (Moloney, 1961). Questo potrebbe spiegare la diminuzione dell'attività di questo enzima nella leucemia mieloide cronica, che è caratterizzata, dal punto di vista citogenetico, dalla perdita di gran parte del braccio lungo del cromosoma 21. In contrasto con questa ipotesi, vi è, tuttavia, l'osservazione che la F.A.L. può nelle mielosi croniche ritornare ai valori normali durante le remissioni (Xeftaris *et al.*, 1961) e che la F.A.L. può elevarsi se si associano alla malattia certe affezioni flogistiche (Rosen e Nishiyama, 1965; Rosen e Teplitz, 1965). L'aumento della F.A.L. durante le remissioni potrebbe dipendere sia da una ripresa dell'attività enzimatica leucocitaria, in coincidenza con la regressione delle manifestazioni leucemiche, sia dall'aumento della quota granulocitaria normale, secondario alla depressione della popolazione cellulare leucemica (Mitus *et al.*, 1958; Marmont *et al.*, 1963). La seconda ipotesi appare più verosimile se si ammette che la riduzione della F.A.L. nella leucemia mieloide cronica è strettamente legata alla diminuzione di materiale genetico della coppia cromosomica 21. Va subito notato però che la diminuzione della F.A.L. nella leucemia mieloide cronica è notevole, potendo arrivare spesso fino alla totale scomparsa, e quindi non è proporzionale alla perdita di materiale genetico. Se la proporzione fosse rispettata, i livelli di attività enzimatica nella leucemia mieloide cronica, nel soggetto normale e nella sindrome di Down dovrebbero essere nel rapporto 1:2:3, a meno che non si invocino fenomeni di inattivazione casuale di uno dei cromosomi 21 durante lo sviluppo embrionario (Turpin e Lejeune, 1965).

Secondo King *et al.* (1962 *b*) l'aumento potrebbe verificarsi anche in cellule derivate da precursori cellulari portatori del cromosoma Ph¹. Se per l'aumento della F.A.L. che si osserva nel corso di certe complicazioni flogistiche complicanti la leucemia mieloide cronica, si può invocare un aumento, sotto lo stimolo flogistico, della quota granulocitaria normale, non si può certo pensare a questo meccanismo per spiegare

i livelli elevati di F.A.L. che si possono osservare nella trasformazione delle forme di mielosi croniche in mielosi acute.

Mentre il rapporto tra i livelli della F.A.L. nella leucemia mieloide cronica e nel normale non sembra corrisponda al rapporto previsto 1:2, quello tra livello della F.A.L. nella sindrome di Down e nel normale è stato trovato abbastanza vicino al rapporto previsto $3/2 = 1,5$ (Trubowitz *et al.*, 1962; Lennox *et al.*, 1962; Alter *et al.*, 1963). Nella nostra casistica il rapporto è $175,5/108,7 = 1,6$. Questo dato, sul quale le osservazioni di vari ricercatori sono abbastanza concordi, è certamente molto suggestivo per l'ipotesi che l'aumento dell'attività enzimatica, osservata nella sindrome di Down, sia correlabile alla trisomia 21, e che quindi il gene o i geni che controllano la F.A.L. siano situati su questo cromosoma.

Che l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria sia influenzata da numerosi meccanismi fisiologici è ampiamente dimostrato. È noto che l'attività della F.A.L. aumenta nelle condizioni di stimolata attività ipofiso-surrenalica (Valentine *et al.*, 1954, 1957) e durante la gravidanza (Quijley *et al.*, 1960). La F.A.L. varia certamente in funzione dell'età (Alter *et al.*, 1963; Bertolotti *et al.*, 1964), come anche i nostri dati dimostrano. Scarsa sembra essere invece l'influenza del sesso sui valori della F.A.L. (O'Sullivan e Pyles, 1963; Alter *et al.*, 1963). Le variazioni fisiologiche dipendono probabilmente da 2 fattori principali: (1) modificazioni della leucopoiesi e della immissione in circolo di leucociti dai depositi, sotto stimoli vari, e (2) modificazioni dell'ambiente esterno ai leucociti. Indubbiamente l'attività ormonale deve giocare un ruolo importante nella regolazione esterna della fosfatasi alcalina leucocitaria, come indicano l'influenza dei corticosteroidi e della gravidanza sull'attività di questo enzima. Appare plausibile, tuttavia, pensare che le variazioni della fosfatasi alcalina leucocitaria si manifestino entro i limiti del controllo genetico (King *et al.*, 1962). Per quanto riguarda l'influenza dell'età, i nostri dati, in accordo con quelli riportati da Alter *et al.* (1963), dimostrano che la F.A.L. tende a diminuire con l'età.

Le nostre osservazioni non hanno, invece, dimostrato, in contrasto con le osservazioni di Alter *et al.* (1963), una influenza dell'età sull'attività della F.A.L. nei soggetti con sindrome di Down, almeno in base ai gruppi di età nei quali è stata suddivisa la nostra casistica. Sembrerebbe, pertanto, che l'attività della fosfatasi alcalina sia meno influenzabile dai fattori fisiologici nella sindrome di Down rispetto ai soggetti normali. Sarebbe importante studiare l'influenza in questi soggetti di certi stimoli ormonali, quali ad esempio, quello dell'ACTH e del cortisone.

Un punto che merita di essere brevemente discusso è l'osservazione che in un certo numero di soggetti con sindrome di Down si trovano livelli della F.A.L. sovrapponibili a quelli dei soggetti normali (Trubowitz *et al.*, 1962; King *et al.*, 1962 a). Questo fatto ha suscitato alcune perplessità nella interpretazione dei risultati e Trubowitz *et al.* (1962) pensano che possano esistere 2 differenti popolazioni di soggetti con sindrome di Down. Questi autori hanno avanzato l'ipotesi che il comportamento della F.A.L. possa essere differente a seconda che l'alterazione cromosomica dei pazienti sia del tipo trisomia o del tipo traslocazione (Trubowitz *et al.*, 1962). Lo

studio comparativo dell'attività della F.A.L. e del kariogramma ha però dimostrato che la F.A.L. può avere livelli che rientrano nei limiti dei valori normali nei pazienti con tipica trisomia 21 (O'Sullivan e Pryles, 1963). Questo è ampiamente confermato dai dati della nostra casistica. In un caso di traslocazione, inoltre, noi abbiamo osservato un livello molto alto di attività fosfatasi. Pertanto, non sembra che l'ipotesi di Trubowitz possa essere sostenuta sulla base dei dati oggi a disposizione.

Oltre la fosfatasi alcalina leucocitaria, altre attività enzimatiche sono state trovate alterate nella sindrome di Down.

Brandt *et al.* (1963 *a, b*) hanno dimostrato un aumento della galattoso-1-fosfato uridil transferasi nel sangue di soggetti affetti da questa malattia, ed è stato prospettato che anche il gene che controlla questo enzima sia localizzato sul cromosoma 21. Un aumento dei livelli della fosfatasi acida, della glucoso-6-fosfato deidrogenasi e della galattoso-1-fosfato uridil transferasi nei leucociti di soggetti affetti da sindrome di Down, è stato riportato da Mellman *et al.* (1964). Secondo questi autori, però, è probabile che l'aumento di certe attività enzimatiche nella sindrome di Down sia la conseguenza di una più generale alterazione metabolica dei leucociti piuttosto che di un aumento del materiale genetico che controlla queste attività enzimatiche. Particolarmente significativa in questo senso, è la dimostrazione dell'aumento della glucoso-6-fosfato deidrogenasi, la quale è controllata da un gene situato sul cromosoma X (Childs *et al.*, 1958). Per quanto riguarda l'aumento della galattoso-1-fosfato uridil transferasi nel sangue dei soggetti con sindrome di Down, è stato dimostrato che esso è dovuto essenzialmente all'aumento di questo enzima nei leucociti, mentre esso non è aumentato negli eritrociti (Hsia *et al.*, 1964).

Baikie *et al.* (1965) hanno osservato che nella sindrome di Down vi è un aumento della fosfoesochinasi eritrocitaria, mentre gli altri enzimi del ciclo di Embden-Meyerhof, come anche la glucoso-6-fosfato deidrogenasi e la glutatione-reduttasi, avrebbero, negli eritrociti, una attività normale. Secondo Baikie *et al.* l'aumento della fosfoesochinasi eritrocitaria sarebbe la conseguenza diretta dell'azione di geni situati sul cromosoma 21, e non una manifestazione collaterale di una alterata funzione cellulare (Jérome *et al.*, 1960). L'esistenza di disordini nel metabolismo del triptofano erano già noti dalle ricerche di Gershoff *et al.* (1958-1959) e di Jérome *et al.* (1960). Questi disturbi sono denunciati, principalmente, da diminuita escrezione di acido xanturenico, di acido indolacetico e acido 5-idrossiindolacetico. Secondo Jérome e Lejeune (1960) nei soggetti con sindrome di Down è accelerata una delle due vie di degradazione del triptofano, e precisamente quella che porta alla degradazione in kinurenina, a svantaggio della via metabolica della serotonina. Questa accelerazione dipenderebbe dall'eccesso di materiale genetico del cromosoma 21 (Jérome *et al.*, 1960). Recentemente Rosner *et al.* (1965) hanno dimostrato una diminuzione della serotonina nel sangue di pazienti con trisomia 21, mentre hanno trovato livelli normali di questa sostanza, o leggermente diminuiti, nei soggetti con sindrome di Down con traslocazione. Anche questi autori condividono l'ipotesi su esposta di Jérome e Lejeune.

La molteplicità delle alterazioni enzimatiche osservate nella sindrome di Down

rende difficile stabilire se, e quante di queste alterazioni, siano dovute alla trisomia 21 o dipendano, invece, da un danno cellulare e metabolico più generale. Per quanto riguarda l'attività enzimatica che è stata oggetto di questo studio, ossia la fosfatasi alcalina leucocitaria, esistono, tuttavia, vari elementi a favore della ipotesi che il suo aumento sia, più o meno direttamente, correlato all'aumento del materiale genetico del cromosoma 21. Di questi il più importante è, a nostro avviso, l'osservazione che la F.A.L. è aumentata nei soggetti con sindrome di Down, in un rapporto pressoché corrispondente a quello previsto di 3:2 rispetto ai controlli. La bassa attività della F.A.L. nella leucemia mieloide cronica, anche se suscettibile di variare in seguito a complicazioni infettive o nel corso di acutizzazione della malattia, contribuisce all'ipotesi della esistenza di un controllo della F.A.L. da parte di un gene situato sul cromosoma 21.

Indubbiamente vi sono molti dati che rendono difficile immaginare un semplice controllo gene-enzima e, probabilmente la regolazione dell'attività della F.A.L. è piuttosto complessa.

Allo stato attuale due ipotesi possono essere prospettate: la prima è quella proposta da King *et al.* (1962 *b*) e ripresa da vari autori, che esista un controllo multiplo della F.A.L. Un determinante fondamentale sarebbe situato su un cromosoma differente dal 21 o su quella parte del cromosoma 21 che non è colpito dalla delezione caratteristica del cromosoma Ph¹ (King *et al.*, 1962 *b*). Sul braccio lungo del cromosoma 21 sarebbero situati il gene o i geni che regolano l'attività della F.A.L., reprimendo o dereprimendo il gene determinante fondamentale. La seconda ipotesi è che il gene o i geni che controllano direttamente la F.A.L. siano effettivamente situati sul braccio lungo del cromosoma 21 e che le modificazioni osservate nella leucemia mieloide cronica possano dipendere dall'influenza di fattori fisiologici che determinano la variazione dell'attività enzimatica entro i limiti consentiti dal controllo genico.

In conclusione, mentre appare probabile che esista una relazione tra attività della F.A.L. e cromosoma 21, il ruolo svolto da esso è attualmente non ben precisabile.

Riassunto

Gli AA. hanno studiato l'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria (F.A.L.) in 40 soggetti affetti da sindrome di Down, di età variabile da una settimana a 15 anni. In 13 di questi soggetti è stato anche studiato il kariogramma. Come controlli sono stati adoperati 42 bambini normali di età comparabile a quella dei pazienti. L'indice medio di attività della F.A.L. nei soggetti con sindrome di Down è risultato uguale a 175,5 e nei controlli uguale a 108,8. Nei soggetti normali si è osservata una netta influenza della età sulla F.A.L. I valori più elevati sono stati osservati negli individui di età inferiore agli undici anni. Il coefficiente di regressione della F.A.L. sull'età nel gruppo, degli individui normali è risultato uguale a $-3,73$.

Nei soggetti affetti da sindrome di Down non sono state osservate differenze statisticamente significative della F.A.L. in rapporto all'età.

Nei soggetti nei quali è stato studiato il kariogramma è stato trovato in 12 casi una trisomia 21 e in 1 caso una traslocazione del tipo 15/21. Anche in quest'ultimo caso si è trovato un indice di attività fosfatase elevata.

Gli AA. sostengono l'ipotesi che il gene o i geni che controllano la F.A.L. siano situati sul cromosoma 21 e che l'attività fosfatase leucocitaria possa variare sotto l'influenza di vari fattori capaci di influire sulla F.A.L. entro i limiti consentiti dal controllo genico.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano il Dr. G. Brenci per la sua collaborazione ed assistenza nella elaborazione statistica dei dati ottenuti e il Prof. Vito Pende per aver loro permesso di studiare i pazienti ricoverati nella sua clinica.

Bibliografia

- ALTER A. A. *et al.* (1963). Studies on leukocyte alkaline phosphatase in mongolism — a possible chromosome marker. *Blood*, **22**: 165.
- BAIKIE A. G. *et al.* (1965). Phosphohexokinase activity of erythrocytes in mongolism. *Lancet*, **1**: 412.
- BERTOLOTI E. *et al.* (1964). La fosfatasi alcalina nei granulociti neutrofilii. Suo comportamento nelle prime epoche della vita. (Studio negli immaturi nel corso del primo mese di vita). *Minerva Med.*, **16**: 72.
- BEUTLER E. *et al.* (1962). The normal human female as a mosaic of X chromosome activity. Studies using the gene for G-6-P-D deficiency as a marker. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**: 9.
- BRANDT N. J. (1963 *a*). Galactose-1-phosphatase-uridil-transferase in oligophrenic patients with special reference to patients with Down's syndrome. *Danish Med. Bull.*, **10**: 50.
- *et al.* (1963 *b*). Galactosaemia locus and the Down's syndrome chromosome. *Lancet*, **II**: 700.
- CHILDS B. *et al.* (1958). A genetic study of a defect in glutathione metabolism of erythrocyte. *Bull. Hopkins Hosp.*, **122**: 21.
- Classificazione di Denver (1960). Proposition d'un système standard de nomenclature des chromosomes humains. *Ann. Genet.*, **1**: 35.
- DE CASTRO D. (1961). Genetica e Statistica. In L. Gedda: De Genetica Medica, I, Ed. Istituto Mendel, Rome.
- FRACCARO M. *et al.* (1960). Chromosomal abnormalities in father and mongol child. *Lancet*, **1**: 724.
- GERSHOFF S. N. *et al.* (1958). Metabolic studies of mongoloids. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **6**: 526.
- *et al.* (1959). Effect of pyridoxine administration on the urinary excretion of oxalic acid, pyridoxine and related compounds in mongoloids and non mongoloids. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **7**: 76.
- HAYHOE F. G. J., QUAGLINO D. (1958). Cytochemical demonstration and measurement of leukocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by modified azo-dye counting technique. *Brit. J. Haemat.*, **4**: 375.
- HOOKE E. B., ENGEL R. R. (1964). Leukocyte life-span, leukocyte alkaline phosphatase, and the 21st chromosome. *Lancet*, **I**: 112.
- HSIA D. *et al.* (1964). Studies on galactose oxidation in Down's syndrome. *New Engl. J. Med.*, **270**: 1085.
- JEROME H. *et al.* (1960). Etude de l'excrétion urinaire de certains métabolites du tryptophane chez les enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci.*, **251**: 474.
- KING M. J. *et al.* (1962 *a*). The polymorph alkaline phosphatase in mongolism. *Lancet*, **2**: 661.
- *et al.* (1962 *b*). Alkaline-phosphatase activity of polymorphs in mongolism. *Lancet*, **2**: 1302.
- LAWLER S. D. (1962). Genes on the mongol chromosome? *Lancet*, **2**: 837.
- LEJEUNE J. *et al.* (1959 *a*). Les chromosomes humains en culture de tissus. *C. R. Acad. Sci.*, **248**: 602.
- *et al.* (1959 *b*). Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci.*, **248**: 1721.
- *et al.* (1959 *c*). Le mongolisme, maladie chromosomique (trisomie). *Bull. Acad. Nat. Med.*, **143**: 256.
- LENNOX B. *et al.* (1962). The polymorph alkaline phosphatase in mongolism. *Lancet*, **II**: 991.

- LYON M. F. (1962). Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. *Amer. J. Hum. Genet.*, **14**: 135.
- MARMONT A. *et al.* (1963). La fosfatasi alcalina leucocitaria in ematologia. *Arch. Maragliano Pat. Clin.*, **19**: 231.
- MELLMANN W. J. *et al.* (1964). Leukocyte enzymes in Down's syndrome. *Lancet*, **II**: 674.
- MITUS W. J. *et al.* (1958). Alkaline phosphatase of mature neutrophils in chronic forms of the myeloproliferative syndrome. *Amer. J. Clin. Path.*, **30**: 285.
- MOLONEY W. C. (1961). Histochemical studies on leukocytes. *Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Haematol.*, **1**: 9. Vienna, 1961. S. Karger, Basel-New York.
- MOORHEAD P. S. *et al.* (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, **20**: 613.
- NOWELL P. C., HUNGERFORD D. A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, **132**: 1497.
- O'SULLIVAN M. A., PRYLES C. V. (1963). A comparison of leukocyte alkaline phosphatase determinations in 200 patients with mongolism and 200 «familial» controls. *New Engl. J. Med.*, **268**: 1168.
- PEARSON E. S., HARTLEY H. O. (1958). Biometrika Tables for Statisticians. *University Press*, Cambridge.
- PENROSE, L. S. *et al.* (1960). Chromosomal translocations in mongolism and in normal relatives. *Lancet*, **2**: 409.
- POLANI P. E. *et al.* (1960). A mongol girl with 46 chromosomes. *Lancet*, **1**: 721.
- QUIGLEY H. Y. *et al.* (1960). The activity of alkaline phosphatase in granular leukocytes during pregnancy and the puerperium: a preliminary report. *Amer. J. Clin. Path.*, **33**: 109.
- ROSEN R. B., H. NISHIYAMA (1965). Leukocyte life-span and leukocyte alkaline phosphatase. *Lancet*, **I**: 554.
- TEPLITZ R. L. (1965). Chronic granulocytic leukemia complicated by ulcerative colitis; elevated leukocyte alkaline phosphatase and possible modifier gene deletion. *Blood*, **26**: 148.
- ROSNER F. *et al.* (1965). Blood-serotonin activity in trisomic and translocation Down's syndrome. *Lancet*, **I**: 1191.
- TRUBOWITZ S. *et al.* (1962). The leukocyte alkaline phosphatase in mongolism. *Lancet*, **2**: 486.
- TURPIN R., LEJEUNE J. (1965). Les Chromosomes Humains. *Ed. Gauthier-Villars*, Paris.
- VALENTINE W. N. *et al.* (1954). Studies on leukocyte alkaline phosphatase activity: relation to «stress» and pituitary-adrenal activity. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 219.
- VALENTINE W. N. *et al.* (1957). The relationship of leukocyte alkaline phosphatase to «stress», to ACTH and adrenal 17-OH-corticosteroids. *J. Lab. Clin. Med.*, **47**: 723.
- WACHSTEIN M. (1946). Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. Clin. Med.*, **31**: 1.
- WILTSHAW E., MOLONEY W. C. (1955). Histochemical and biochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase activity. *Blood*, **10**: 1120.
- XEPTERIS E. *et al.* (1961). Leukocyte alkaline phosphatase in busulfan induced remission of chronic granulocytic leukemia. *Blood*, **18**: 202.

SUMMARY

The Authors studied the leukocyte alkaline phosphatase (LAP) activity in 40 subjects with Down's syndrome. The age of the patients ranged from one week to 15 years. Chromosome analysis was carried out in 13 cases. 42 normal children of the same age as the patients were used as controls. The mean value of LAP in the patients with Down's syndrome was 175.5 and in the control group 108.8. In the latter group the LAP activity was clearly influenced by the age; the highest values were obtained in children under 11 years of age. The regression coefficient of the LAP on the age

in the control group was -3.73 . In the patients with Down's syndrome the differences observed between the various age groups were not statistically significant.

Chromosome studies showed a 21 trisomy in 12 cases; in one case a 15/21 translocation was found. The latter case presented an elevated LAP activity.

The Authors support the hypothesis that the gene or genes controlling LAP activity are located in the 21 chromosome and that the LAP activity may vary under the influence of several factors within the limits of the genetic control.

RÉSUMÉ

Les Auteurs ont étudié l'activité de la « phosphatase alcaline leucocytaire » (PAL) sur 40 sujets atteints de « syndrome de Down », d'âge variant entre une semaine et 15 ans. Sur 13 de ces sujets on a aussi étudié le « caryotype ». Pour contrôle, 42 enfants, d'âge comparable à ceux des patients ont été utilisés. Il en résulta que le taux moyen d'activité de la PAL chez les sujets atteints de syndrome de Down est de 175,5, tandis que chez les sujets normaux le taux est de 108,7. Chez ces derniers on a remarqué une nette influence de l'âge sur la P.A.L. Les plus basses valeurs ont été observées chez les individus d'âge supérieur à onze ans. Le coefficient de régression de la PAL sur l'âge dans le groupe d'individus normaux est résulté

égal à 3,73. Chez les sujets atteints de syndrome de Down on n'a pas observé des différences statistiquement significatives de la PAL ayant trait à l'âge. Chez les sujets sur lesquels le caryogramme a été étudié on a trouvé dans 12 cas une trisomie 21 et dans un cas une translocation du type 15/21. Dans ce dernier cas aussi on a trouvé un taux d'activité phosphatasique élevé.

Les Auteurs supportent la validité de l'hypothèse que le gène ou les gènes qui contrôlent la PAL soient situés sur le chromosome 21 et que l'activité phosphatasique leucocytaire puisse varier sous l'influence de divers facteurs, capable d'influencer la PAL dans les limites admises par le contrôle génique.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei 40 Kindern im Alter von 1 Woche bis zu 15 Jahren, die an einem Downschen Syndrom litten, untersuchten die Verf. die Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase (F.A.L.). Bei 13 davon wurde auch das Karyogramm untersucht. Als Kontrolle wurden 42 normale Kinder ungefähr gleicher Altersstufe gewählt. Der Durchschnittsindex der F.A.L.-Aktivität beträgt bei den Kindern mit Downschem Syndrom 175,5, bei den Kontrollen 108,7. Bei den normalen Kindern war ein deutlicher Einfluss des Alters auf die F.A.L. festzustellen. Die höchsten Werte waren bei Kindern unter 11 Jahren beobachtet. Der altersgemässe Regressionskoeffizient der F.A.L. war bei der normalen Gruppe -3,73.

Bei den Kindern mit Downschem Syndrom liessen sich keine statistisch wesentlichen Unterschiede der F.A.L. für die verschiedenen Altersstufen feststellen.

In 12 der Fälle, wo das Karyogramm untersucht wurde, fand sich eine Trisomie 21 und beim dreizehnten Fall eine Translokation vom Typ 15/21. Auch bei diesem letzten Fall war der Index der F.A.L.-Aktivität hoch.

Verf. behaupten, dass das oder die Gene, welche die F.A.L. kontrollieren, auf dem Chromosom 21 liegen und dass die Aktivität der Leukozytenphosphatase dem Einfluss verschiedener Faktoren unterliegt, welche die F.A.L. innerhalb der von der Genkontrolle gestatteten Grenzen beeinflussen.