

EUR 2764.i

COMUNITÀ EUROPEA DELL'ENERGIA ATOMICA - EURATOM

LIBRARY COPY

**INDAGINI SULLE CELLULE E SUI CROMOSOMI
DI LEUCEMIA UMANA**

Attività di ricerca svolta nel periodo 1962-1965

Relazione finale

di

F. GAVOSTO, A. PILERI e L. PEGORARO

(Università degli studi di Torino)



1966

**Relazione elaborata
dall'Università degli Studi di Torino, Italia
Istituto di Clinica Medica Generale
Laboratorio di Ematologia**

Contratto Euratom N. 016-62-1 BIOI

AVVERTENZA

Il presente documento è stato elaborato sotto gli auspici della Commissione della Comunità Europea dell'Energia Atomica (EURATOM).

Si precisa che la Commissione dell'Euratom, i suoi contraenti, o qualsiasi altra persona che agisca in loro nome :

non garantiscono l'esattezza o la completezza delle informazioni contenute nel presente documento, nè che l'uso di qualsiasi informazione, dispositivo, metodo o processo, descritti nel presente documento, non arrechino pregiudizio ai diritti sulle opere dell'ingegno e sulle invenzioni industriali;

non assumono alcuna responsabilità per i danni che dovessero risultare dall'uso di informazioni, dispositivi, metodi o processi divulgati con il presente documento.

La presente relazione può essere acquistata presso gli uffici vendita indicati nella quarta pagina della copertina

Al prezzo di Lit. 870 FF 7,- FB 70,- DM 5.60 Fl. 5.10

All'at o dell'ordinazione, si prega di menzionare il riferimento EUR e il titolo, che figurano sulla copertina di ciascuna relazione.

Stampa da Smeets, s.p.r.l.

Bruxelles, Aprile 1966.

Per la riproduzione di questo documento ci si è serviti della miglior copia disponibile.

EUR 2764.i

COMUNITA EUROPEA DELL'ENERGIA ATOMICA - EURATOM

**INDAGINI SULLE CELLULE E SUI CROMOSOMI
DI LEUCEMIA UMANA**

Attività di ricerca svolta nel periodo 1962-1965

Relazione finale

di

F. GAVOSTO, A. PILERI e L. PEGORARO

(Università degli studi di Torino)



1966

Relazione elaborata
dall'Università degli Studi di Torino, Italia
Istituto di Clinica Medica Generale
Laboratorio di Ematologia
Contratto Euratom N. 016-62-1 BIOI

S O M M A R I O

1)- RELAZIONE SCIENTIFICA	
- Indagini citogenetiche	pag. 3
- Duplicazione dell'ADN nei cromosomi di cellule sanguigne normali e leucemiche	" 6
- Potenzialità proliferativa e maturativa degli elementi leucemici	" 14
- Metabolismo dell'ARN negli elementi di leucemia acuta	" 20
- Influenza di ARN esogeno sul metabolismo proteico di cellule normali e leucemiche	" 23
- Considerazioni generali	" 26
2)- ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	" 34
3)- VIAGGI E MISSIONI	" 38
4)- ATTIVITA' DIDATTICA DEL LABORATORIO.....	" 42
5)- ELENCO DEI VISITATORI STRANIERI	" 43

FIGURE 1 a 16

RIASSUNTO

I seguenti indirizzi di indagine sono stati seguiti nello studio delle cellule e dei cromosomi di leucemia umana : a) indagini citogenetiche, b) duplicazione dell'ADN nei cromosomi di cellule sanguigne normali e leucemiche, c) potenzialità proliferativa e maturativa delle cellule di leucemia acuta, d) metabolismo dell'ARN nelle cellule di leucemia acuta, e) influenza di ARN esogeno sul metabolismo proteico di cellule normali e leucemiche.

L'osservazione citogenetica ha messo in evidenza che in circa il 60% dei casi di leucemia acuta il cariotipo è morfologicamente normale. Invece, nelle leucemia mieloidi croniche in via di acutizzazione, persiste l'anomalia Ph¹.

A livello cromosomico si è osservata l'esistenza di un caratteristico «pattern» nella sintesi dell'ADN anche per le cellule leucemiche, oltre che per quelle normali. Inoltre, per alcuni cromosomi di leucemia acuta, è stata osservata una certa tardività nella replicazione del loro ADN, rispetto ai corrispondenti cromosomi normali.

A livello cellulare è stato rilevato che la riduzione nella capacità proliferativa degli elementi di leucemia acuta è correlata all'entità del difetto differenziativo di questi stessi elementi.

Si è osservato inoltre che, nell'ambito di una stessa popolazione di blasti di leucemia acuta, il difetto proliferativo non è uguale per tutti gli elementi, ma si rende sempre più spiccato man mano che questi invecchiano.

E' stato anche osservato, in sistemi incubanti in vitro, che l'aggiunta di ARN esogeno aumenta l'incorporazione di leucina sia in elementi leucemici che in cellule sanguigne normali.

Sulla base dei risultati ottenuti sono state effettuate alcune considerazioni ed avanzate ipotesi di carattere generale.

Sulla base dei programmi precedentemente enuncia-
ti, le indagini sono state sviluppate nelle seguenti dire-
zioni :

- A)- Indagini citogenetiche;
- B)- Duplicazione dell'ADN nei cromosomi di cellule sangui-
gne normali e leucemiche;
- C)- Potenzialità proliferativa e maturativa delle cellule
di leucemia acuta;
- D)- Metabolismo dell'ARN nelle cellule di leucemia acu-
ta;
- E)- Influenza di ARN esogeno sul metabolismo proteico di
cellule normali e leucemiche.

A)- INDAGINI CITOGENETICHE

E' ormai universalmente noto come sia frequente reperire nelle cellule leucemiche anomalie sia numeriche che morfologiche a carico del cariotipo che hanno talora, come il cromosoma Ph¹ nella leucemia mieloide cronica, carattere di specificità, ma che più comunemente, come nelle leucemie acute, mostrano una grande variabilità.

Nell'ambito del programma di indagini sul metabolismo degli acidi nucleici nei cromosomi di cellule leucemiche, sono stati esaminati, anche da un punto di vista puramente morfologico, numerosi casi di leucemia umana, nell'intento di dare un contributo agli studi citogenetici di questa malattia, attualmente sviluppati in un numero sempre più vasto di laboratori.

I nostri casi sono stati scelti tra pazienti mai trattati in precedenza: ciò allo scopo di evitare la possibile azione dei vari trattamenti terapeutici quali i cortisonici, i raggi X ed i citostatici sul cariotipo (il che probabilmente sarà oggetto, in futuro, di una indagine a parte). Abbiamo preferito inoltre servirci di una tecnica di esame diretto del midollo evitando di ricorrere a colture di sangue periferico o di midollo nelle quali le cellule aneuploidi difficilmente si dividono dando luogo ad un aumento artificioso della quota di elementi normali. A tal fine è stata messa a punto una metodica che comportasse un periodo di incubazione totale, non superiore ad un'ora. Invece, lo shock osmotico, il fissaggio e le colorazioni erano effettuate secondo le tecniche standard.

Per quanto riguarda le leucemie acute (1, 2) le indagini citogenetiche sono state effettuate a tuttora su venti casi differenziabili citologicamente in emocitoblastiche, mieloblastiche, eritroleucemiche e promielocitiche. La maggior parte di questi, cioè circa il 75%, ha dimostrato un numero modale di 46 cromoso

(1)- Pegoraro L. e Rovera G. - Progr. med. 20.1.1964.

(2)- Pegoraro L., Pileri A., Bachi C. e Gabosto F.- Proc. X Congr. Int.Soc.Haemat.Stockholm 1964. EUR. 2406, e.1965.

mi, sebbene la percentuale di cellule aneuploidi fosse più alta di quella riscontrata nei midolli normali. In alcuni casi, inoltre, malgrado il numero modale euploide, sono state riscontrate alterazioni morfologiche di notevole entità.

- In un caso con quadro di aplasia midollare totale il riscontro di un'importante anomalia morfologica in tutte le cellule midollari, cioè di un lungo cromosoma submetacentrico in luogo di uno dei due cromosomi della 1^a coppia, ha permesso di ascrivere il caso fra le leucemie acute (con impronta aplastica). Lo studio di questo caso ha fornito lo spunto per delle considerazioni sull'importanza che uno studio citogenetico può assumere anche in sede clinica per una diagnosi tra le sempre più frequenti leucemie con impronta aplastica e le aplasie midollari pure.(1)
- In due casi di eritro-leucemia rispettivamente con numero modale di 45 e di 47 cromosomi si è osservata nel primo l'assenza e nel secondo la presenza di un cromosoma in più in una delle coppie del gruppo 6-12 (probabilmente nella coppia N° 9).
- In un caso di leucemia mieloblastica con numero modale di 47 cromosomi è stata notata una trisomia in luogo della coppia 21, e, oltre a questa anomalia, un altro extracromosoma traslocato su uno dei due cromosomi della coppia 15 (fig.1)
- Infine in un altro caso di leucemia emocitoblastica è stato osservato un numero modale di 45 cromosomi oltre alla presenza di due piccoli frammenti derivanti probabilmente da rottura di uno dei cromosomi del VI gruppo.

Anche dalle nostre osservazioni risulta quindi che nelle leucemie acute non è possibile individuare alcuna anomalia morfologica costante e caratteristica. Nella maggior parte dei casi, inoltre, non è neppure possibile mettere in evidenza anomalie sia morfologiche che numeriche.

Le osservazioni citogenetiche sono state estese anche a casi di leucemia mieloide cronica puramente

(1)- Pegoraro L., Pileri A. e Gavosto F. - Haematologica, 48 - 713, 1963.

nell'intento di cogliere le modificazioni del cariotipo che sovente occorrono nelle fasi di acutizzazione. La tipica alterazione di queste forme cioè il cromosoma Ph¹ è stata costantemente dimostrata nei nostri casi.

In particolare è stata osservata anche in un caso in cui la leucemia era con ogni probabilità da mettersi in rapporto a cicli di irradiazioni subite dal paziente circa 5 anni prima per motivi medici (1). L'interesse è costituito dal fatto che l'opinione corrente tendeva a considerare le forme di leucemia mieloide cronica radioindotte come sprovviste dalla specifica alterazione Ph¹ (2, 3).

Nelle fasi terminali (acutizzazione) delle leucemie mieloidi croniche è osservabile la comparsa di nuove anomalie che per lo più si aggiungono a quella del Ph¹.

Oggetto di particolare studio è stato un caso che ha presentato, durante la crisi blastica terminale, la eccezionale, e finora mai descritta nella letteratura, presenza di tre cromosomi Ph¹ in quasi tutte le cellule midollari (fig.2). In questo caso il numero modale è risultato essere di 52 cromosomi con extracromosomi presenti nel III - IV e VI gruppo oltre alla presenza dei tre Ph¹ (4,5).

-
- (1)- Gavosto F., Pileri A. e Pegoraro L. - X-rays and Philadelphia chromosome. Lancet p. 1336, 1965.
- (2)- Court Brown W.M. e Tough J.M. - Adv. Cancer Res 7 - 351, 1963.
- (3)- Krauss S., Sakal J.E. e Sandberg A.A. - Ann. Intern. Med. 61 -625, 1964.
- (4)- Rovera G., Pegoraro L. e Masera P. - Boll.Soc.It. Biol. Sper. 41 - 741, 1965.
- (5)- Gavosto F., Pegoraro L. e Pileri A. - Lancet (in corso di stampa).

Un caso, con un quadro ematologico tipico di eritemia cronica è stato studiato sia clinicamente che citogeneticamente più volte nel corso di alcuni mesi. Le indagini citogenetiche condotte sul midollo osseo hanno dimostrato, nei primi mesi, un numero modale di 48 e successivamente di 49 cromosomi; gli extracromosomi erano presenti nel III, VI e VII gruppo. Contemporaneamente, durante questo periodo di tempo, è stata notata la comparsa di una anomalia del fenotipo eritrocitario cioè una progressiva perdita dell'antigene A. Questo fenomeno è stato interpretato quale una conseguenza più o meno diretta dell'anomalia cariotipica (1).

Un caso di leucemia plasmacellulare citogeneticamente caratterizzato dalla dominanza di un clono cellulare abnorme (52 cromosomi nel 60% delle mitosi) è stato oggetto di particolare indagine sia citogenetica che immunochimica nell'ambito di un programma generale tendente a stabilire eventuali correlazioni tra alterazioni genetiche ed espressione fenotipica (paraproteine) nei casi di mieloma, leucemia plasmacellulare, sindrome di Waldenström, leucemia linfatica cronica.

B)- DUPLICAZIONE DELL'ADN NEI CROMOSOMI DI CELLULE SANGUIGNE NORMALI E LEUCEMICHE

In occasione della trasformazione leucemica, qualunque ne sia la causa, la cellula sanguigna acquisisce delle nuove proprietà che diventano irreversibili ed ereditabili; quindi esse interessano, direttamente od indirettamente, la sostanza genetica. Inoltre, la perdita di ogni proprietà differenziativa negli elementi di leucemia acuta può dipendere da alterazioni del genoma di queste cellule, oppure essere in relazione ad altri fattori cellulari, per esempio di natura immunitaria. Tuttavia, la frequente comparsa negli stadi di acutizzazione terminale delle leucemie croniche, di nuovi cloni cellulari con complemento cromosomico differente, costituisce una prova di una possibile causa nucleare della perdita del potere differenziativo degli elementi blastici.

(1)- Ceppellini R., Celada F., Franceschini P., Gavosto F., Pileri A., Pegoraro L. e Zanalda A. - Atti Ass. Genet.It.Pavia Vol. IX-258, 1964.

Gli stessi risultati delle precedenti indagini oltre che le nuove concezioni che ne sono derivate, hanno proposto pertanto altri temi allo studio delle leucemie acute: in particolare un approccio alla valutazione diretta del metabolismo degli acidi nucleici a livello della sostanza genetica.

Delle varie attività metaboliche della sostanza genetica è stata particolarmente studiata, in questo laboratorio, la sintesi dell'ADN, cioè l'espressione della fondamentale proprietà della sostanza genetica di duplicare sè stessa.

Il primo sforzo è stato diretto alla ricerca della via migliore per analizzare nei singoli cromosomi i differenti dettagli dell'attività di sintesi dell'ADN portando l'indagine ad un livello subcromosomico. La tecnica autoradiografica è ancora l'unica che consente di affrontare questo problema, che appare uno dei più importanti sorti in questi ultimi anni, almeno per quanto riguarda le cellule sanguigne.

E' evidente che, per migliorare la possibilità di investigazione riconducendola ad un livello cromosomico e subcromosomico, occorre innanzitutto migliorare la risoluzione della tecnica. Ciò è stato possibile in due modi: utilizzando emulsioni nucleari a grani molto fini (0, 1 = 0,2 microns), ed impiegando emulsioni allo stato liquido, che assicurano un più intimo contatto con le cellule (fig.3) (1, 2).

Ma il problema metodologico più importante è sorto con la necessità di abbinare la tecnica autoradiografica ad alta risoluzione alla tecnica utilizzata per la preparazione e lo studio dei cromosomi. Lo scopo, evidentemente, è stato di elaborare tutti gli accorgimenti tecnici che consentano, ad un tempo, una soddisfacente preparazione e riconoscimento dei singoli cromosomi ed una valutazione topologica e quantitativa dell'incorporazione del precursore.

(1)- Gavosto F., Pegoraro L. e Pileri A. - Rév. Franç. Et. Clin. Biol. 8 - 920, 1963.

(2)- Gavosto F., Pegoraro L. e Pileri A. - Proc. IX Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon 1963 (S. Karger - Basel 1964) pp. 1549-1554.

Questo problema è stato affrontato contemporaneamente da noi e da alcuni altri laboratori. Attualmente è possibile avere dei buoni cariotipi ricostruiti da figure mitotiche marcate con timidina; nei singoli cromosomi e nei loro segmenti è ben localizzabile e misurabile l'attività di sintesi dell'ADN (fig. 4). E' necessario ricostruire i cariotipi sia dai cromosomi marcati, sia dai cromosomi della stessa figura mitotica rifotografata dopo rimozione della marcatura. La ragione di questo accorgimento tecnico è la seguente: è evidente, in linea teorica, che un ridotto numero di grani sulla figura mitotica facilita il riconoscimento dei cromosomi ai fini di una classificazione; d'altra parte è necessario avere un numero di grani sulla figura mitotica sufficientemente alto per una buona valutazione statistica della intensità di incorporazione nei singoli cromosomi. E' evidente che, a questo riguardo, la possibilità di rimuovere la marcatura dopo averla registrata nei singoli segmenti cromosomici offre un considerevole vantaggio perchè si realizza così un duplice vantaggio; l'intensità della marcatura può essere aumentata di quanto si vuole e quindi possono essere migliorati i rilievi quantitativi, mentre i cariotipi possono essere ricostruiti da figure mitotiche completamente chiare.

Nelle stesse figure mitotiche marcate, appare ben evidente l'asincronismo di sintesi dell'ADN. In effetti il processo di sintesi è presente, nel momento a cui l'esperimento si riferisce, soltanto in taluni loci, mentre gli altri segmenti cromosomici o già hanno completato in tempo più precoce od ancora debbono iniziare la loro attività sintetica. Questa successione può essere individuata con una particolare tecnica che consiste nel tenere soltanto per breve tempo il precursore marcato a contatto con le cellule ("pulse labelling"). In questo modo si può realizzare una immagine per così dire istantanea del processo di sintesi in una determinata fase, preventivamente scelta del periodo S. E' evidente, infatti, che se, al contrario, il contatto con il precursore fosse più lungo, l'asincronismo (vale a dire il rilievo del "pattern") sarebbe meno accentuato, fino a scomparire del tutto se il tempo di contatto del precursore con le cellule in fase di sintesi si avvicinasse all'intera durata di quest'ultima.

Noi abbiamo potuto osservare che anche la somministrazione per via endovenosa di timidina consente un vero e proprio "pulse labelling" dei cromosomi, in quanto essa viene rapidamente eliminata. In questi esperimenti è sufficiente procedere a prelievi di midollo osseo a tempi differenti per ottenere mitosi di cellule le quali, al tempo del "pulse labelling", erano in differenti fasi del periodo di sintesi (figg. 5-6) (1).

Tuttavia, anche un contatto continuo con timidina, come è facilmente effettuabile in vitro, può essere utilizzato per lo studio della fase terminale (od anche iniziale) del periodo sintetico: occorre soltanto predisporre i tempi dell'esperimento in modo da aversi mitosi di cellule che all'inizio del contatto con il precursore stavano per uscire dal (o per immergersi nel) periodo sintetico. Alcuni parametri, come ad esempio il numero di grani sulle figure mitotiche o sulla X eterocromatica (X calda), possono poi essere utilizzati per localizzare esattamente ciascuna mitosi marcata in rapporto alla sua cronologia nei riguardi della fase di sintesi che si studia (fig.7).

Ma è stato necessario approfondire ed analizzare più dettagliatamente tutto il problema sotto un profilo di critica metodologica.

E' evidente che l'obiettivo principale di queste indagini è di poter comparare tra di loro degli esperimenti diversi, o, per lo meno dei dati che provengono da casi differenti, per esempio normali e leucemici. Per poter far ciò è necessario, prima di tutto, che vi siano le stesse condizioni sperimentali. Inoltre, se ci sono più variabili (per esempio: diversa durata del periodo G_2 , diversa resistenza delle cellule alle condizioni di coltura, diversa velocità di sintesi dell'ADN) è necessario far sì che tutte le variabili, tranne quella che si vuole esaminare, siano eliminate. In pratica, se il piano sperimentale prevede lo studio della via migliore per valutare la velocità di sintesi dell'ADN, occorre eliminare le altre due variabili indicate. Per quanto riguarda la durata del periodo G_2 , questa è facilmente valutabile cono-

(1)- Gavosto F., Pileri A., Pegoraro L. e Momigliano A.
Nature 200 - 807, 1963.

scendo il tempo di contatto con colchicina ed il rapporto tra numero di mitosi marcate e numero di mitosi non marcate. Se, per esempio, il contatto con il precursore è stato di 4h, il contatto con colchicina di 1h ed il rapporto tra mitosi totali e mitosi non marcate eguale a 2, risulta evidente che il periodo G_2 è stato di 3h30' e di conseguenza potrà essere ben fissata, nell'esperimento, la fine del periodo S e quindi comparare tra di loro diversi esperimenti partendo da questo istante ed inoltrandosi verso le fasi più precoci dell'S. Per quanto riguarda la adattabilità delle cellule alla coltura, essa si può controllare dal numero di mitosi che si formano per unità di tempo durante tutta la durata dell'esperimento. In pratica abbiamo potuto constatare, nei nostri esperimenti, che, per tempi di coltura limitati ad alcune ore, il numero di mitosi fermate nell'unità di tempo è costante. Rimane così la variabile che si vuole valutare, la velocità di sintesi. Si è visto che nella fase finale del periodo S (che per motivi tecnici, è quella finora più studiata) i cromosomi ed i loro segmenti non presentano tutti la stessa intensità di marcatura, ma questa manifesta un proprio "pattern" (1, 2, 3).

Tuttavia anche questo pattern di duplicazione della fase finale del periodo S deve essere considerato come approssimativo in quanto è tenuto conto soltanto della incorporazione media avvenuta in tutto il periodo esplorato, che, pur limitato, è sempre dell'ordine di 30'-40'. In altri termini, anche se si tratta di un periodo di tempo ristretto rispetto a tutta la durata del periodo S, l'attività di sintesi appare sensibilmente differente da una mitosi all'altra, per cui, per avere degli attendibili valori medi, occorre disporre di non meno di 50-60 osservazioni e ciò appunto per il fatto che le singole mitosi non essendo sincrone, hanno differenti tempi di contatto con il precursore, pur sempre restando entro la fase considerata ai fini dell'indagine. Per esem-

-
- (1)-- Gavosto F., Pegoraro L. e Pileri A. - Relaz. XIX Congr.Soc.It.Emat. Pavia, 1963-Tip.Viscontea pp.67-74.
- (2)-- Gavosto F., Pileri A. e Pegoraro L. - Proc. IX Congr. Europ. Soc.Haemat. Lisbon 1963-S.Karger Basel, 1963 pp.63-60.
- (3)-- Gavosto F., Pegoraro L., Pileri A. e Bernardelli R.- Proc.X Congr.Int.Soc.Haemat.Stockholm 1964. EUR.2451.e.

pio: alcune mitosi corrisponderanno a cellule che hanno incominciato a sintetizzare ADN 30' prima della fine del periodo S ed hanno continuato fino alla fine, altre un tempo dopo e così via fino al termine della fase di sintesi. D'altra parte, proprio in questa fase finale, l'attività di sintesi subisce delle notevoli variazioni di velocità; in alcuni cromosomi ed in molti segmenti essa è zero (l'attività di sintesi già è cessata del tutto), in altri subisce delle improvvise riduzioni, in altri, relativamente agli altri cromosomi, delle rilevanti accelerazioni, per cui è evidente che la valutazione di essa, semplicemente come valore medio di tutto il periodo osservato, fornirà dei valori approssimativi.

Queste variazioni di velocità, ammesso che siano riproducibili in ogni caso, ci offrono però la possibilità di caratterizzare ogni singola cellula, di collocarla cioè esattamente nel periodo S, rendendola quindi paragonabile ad un'altra cellula proveniente da un altro esperimento. In effetti, la ricerca di un più preciso parametro che possa indicarci il periodo di tempo in cui ciascuna mitosi è stata in contatto con il precursore e consenta uno studio analitico del fenomeno costituisce attualmente il più importante problema metodologico.

Vi possono essere due modi di calcolare la posizione di una cellula nel periodo S. Il primo si avvale della differente distribuzione dei grani tra i cromosomi di una stessa cellula nel tempo. Per esempio: se l'X eteropicnotico sequestra il 50% della marcatura 10 minuti prima della fine, il 10% 20 minuti prima e così via, il rapporto Grani totali/Grani sull'X caldo indicherà la posizione della cellula nel periodo S. In effetti, la valutazione dell'intensità relativa di sintesi sul cromosoma X caldo si è dimostrata un mezzo assai idoneo perchè il comportamento di tale sintesi ha un andamento assai costante sia nelle mitosi normali che in quelle leucemiche (fig. 7) (1). L'aumento dell'attività relativa di sintesi in questo cromosoma nella fase terminale del periodo S non è lineare ma esprimibile con una funzione più complessa. E' in corso un tentativo di calcolare que

(1)- Gavosto F., Pegoraro L, Pileri A. - Relaz. Simp.Intern. Citog. Leucemie - Torino, 6 giugno 1965 - Atti Convegno Farmitalia (in corso di stampa).

sta funzione sui dati ottenuti sperimentalmente e di verificarne la sua validità generale. Comunque, stabilito empiricamente l'andamento della curva (o conosciutane la funzione), si può, nei singoli casi, scegliere delle classi omologhe, ciascuna corrispondente ad una determinata attività di sintesi del cromosoma considerato come "segna tempo", e confrontarle tra di loro.

E' evidente che la metodologia su descritta ed applicata ha in sé una forte limitazione in quanto la utilizzazione della X eteropicnotica è applicabile soltanto nei soggetti femminili e nessuno degli autosomi, né l'Y, ha una sintesi così tardiva ed un andamento così caratteristico da rendere agevole l'estensione della metodologia anche alle mitosi provenienti da soggetti maschi.

Un'altra possibilità di "collocare" ciascuna mitosi nel periodo S con sufficiente approssimazione, rendendola perciò paragonabile ad un'altra mitosi proveniente da un altro esperimento, è stata recentemente da noi adattata sulla base delle indagini di Muldal sulla cinetica della sintesi dell'ADN nella fase terminale del periodo S (1).

Essa si basa sul calcolo della quota di figure mitotiche marcate in una popolazione di cellule che sono state fermate con colchicina e che si suppone essere distribuite uniformemente nell'intervallo di tempo del blocco. La scelta delle figure mitotiche marcate è effettuata statisticamente considerando i grani sui cromosomi in confronto a quelli sul background. Stabilito ciò, si costruisce una "curva cumulativa" di tutte le mitosi con tot numero di grani o meno, in modo da esprimere su di essa le velocità di sintesi medie dei gruppi di cellule contenute, in egual numero, in tutti i tempuscoli in cui può essere diviso il periodo di tempo osservato (fig. 8). Sul tratto di ascissa della curva cumulativa risultano indicati gli intervalli temporali del periodo S. in cui è avvenuta l'incorporazione, ed è quindi possibile sostituire alle unità cellulari le unità di tempo di questo intervallo. Si può, di conseguenza, considerare la curva come una curva cumulativa di grani in funzione del tempo di sintesi esaminato. Essa è in pratica

(1)- Gilbert C.W., Muldal S., Lajtha L.G. - Nature, 208, 159, 1965.

una curva integrale e, mentre l'ascissa indica il tempo, l'ordinata sarà proporzionale alla quantità di ADN che resta da sintetizzare. Il tempo assoluto del periodo S che si è così studiato lo si calcola in base ai dati dell'esperimento, cioè conoscendo il tempo di contatto con colchicina, il rapporto tra Numero delle mitosi marcate e Numero di mitosi totali.

Poichè, come si è detto, la curva così costruita è una curva integrale, le tangenti alla curva nei singoli suoi punti forniranno i singoli valori delle derivate ed esse saranno evidentemente espressione della velocità di sintesi nei singoli momenti del periodo studiato.

Se, finalmente, si costruisce una curva delle derivate si può esprimere il comportamento della velocità di sintesi in funzione del tempo (fig. 8). Questa, in genere, è ancora massima circa 20' prima della fine del periodo S e poi cade rapidamente a zero. L'area sottesa da queste curve derivate esprimerà ciò che era espresso dall'ordinata della curva integrale, cioè la quantità di ADN ancora da sintetizzare.

La quantità di ADN relativa ad ogni cromosoma (o segmento di esso) che si voglia considerare può essere valutata in ogni intervallo di tempo, calcolando il rapporto tra i grani sul cromosoma considerato e quelli su tutta la figura mitotica.

Sulla base di questi indirizzi tecnici e metodologici è stato studiato il grado di incorporazione del precursore in tutti i cromosomi e nei loro singoli segmenti; esso viene espresso come "attività specifica", cioè come per cento di grani (di tutta la mitosi) per unità di lunghezza di cromatina. Ogni valore riferito è espresso dalla media di non meno di 100 mitosi analizzate. Complessivamente sono state finora analizzate oltre 300 mitosi di midollo normale e circa 600 di vari casi di leucemia acuta.

Le nostre indagini hanno innanzi tutto dimostrato - per la prima volta - che anche nelle cellule di leucemia acuta umana il raddoppiamento della sostanza genetica non avviene casualmente ma segue un suo particolare corso il quale, entro le sue linee generali, si

dimostra costante per tutte le cellule, anche se appartenenti (come in certi casi di leucemia acuta) a cloni cellulari differenti.

Questo profilo, inoltre, appare abbastanza simile a quello delle cellule normali, essendo ben rare le differenze che appaiono significative.

Tutto ciò significa, in primo luogo, che non esistono delle differenze grossolane nel processo di replicazione dell'ADN tra i cromosomi di midollo osseo umano normale e quelli di leucemia acuta; ciò conferma, tra l'altro, la validità dell'ipotesi che eventuali differenze debbono essere ricercate ad un livello molto più fine, e che gli attuali limiti di risoluzione non sono ancora, molto probabilmente, del tutto sufficienti.

Tuttavia alcune differenze esistono ed hanno tutta l'apparenza di essere significative.

Una differenza assai costante è stata da noi identificata nei cromosomi delle coppie 16 e 21, studiando la fase terminale del periodo S (fig.9) (1): questi rilievi saranno discussi nell'ultimo capitolo.

C)- POTENZIALITA' PROLIFERATIVA E MATURATIVA DEGLI ELEMENTI LEUCEMICI.

In precedenza è stato da noi osservato, con tecnica autoradiografica ed impiego di timidina tritiata, che la maturazione degli elementi midollari si accompagna ad una progressiva riduzione della loro attività proliferativa (2). Un analogo comportamento dell'attività proliferativa è stato riscontrato nelle leucemie e nelle eritremie croniche (3). E' stato anche osservato che, nelle

(1)- Gavosto F., Pegoraro L., Pileri A. - Current Research in Leukaemia - Cambridge Univ. Press, 1965 - pp.177 - 189.

(2)- Gavosto F., Pileri A. e Maraini G. - Haematologica 44 - 977, 1959.

(3)- Gavosto F., Maraini G. e Pileri A. - Blood 16, 1122-1960.

forme di leucemia ed eritremia acuta, caratterizzate da un blocco maturativo pressochè completo, la stessa capacità proliferativa è notevolmente ridotta se confrontata a quella dei corrispondenti elementi immaturi normali (1, 2). Questo dato è stato successivamente confermato da numerosi AA.

Negli ultimi tre anni sono state condotte nel nostro laboratorio varie indagini, sia in vitro che in vivo, miranti a definire l'eventuale rapporto esistente tra difetto proliferativo e maturativo degli elementi leucemici, e sono stati perciò seguiti due principali obiettivi di ricerca.

Il primo programma è stato quello di stabilire se la diminuzione della capacità proliferativa degli elementi di leucemia acuta fosse o no correlata alla loro perdita di differenziazione; le indagini sono state pertanto estese a varie condizioni cliniche intermedie, come le crisi mieloblastiche terminali di leucemia mieloide cronica d'un lato e gli stadi di remissione di leucemia acuta d'altro lato.

Il secondo obiettivo è stato di precisare il significato dell'eterogeneità della popolazione blastica di leucemia acuta, in rapporto alla diminuita capacità proliferativa media di questa stessa popolazione. La popolazione cellulare di ogni singolo caso di leucemia acuta è stata perciò suddivisa in differenti classi a seconda del diametro cellulare e la capacità proliferativa è stata valutata in ogni singola classe. La stessa valutazione della capacità proliferativa è stata anche contemporaneamente effettuata nel midollo e nel sangue circolante.

Risultati delle indagini relative al 1° programma di ricerche : capacità proliferativa degli elementi blastici in vari tipi di leucemia mieloide.

Nella fig. 10 la percentuale di blasti marcati con timidina in varie condizioni leucemiche viene

(1)- Gavosto F., Maraini G. e Pileri A.-Nature, 187 -611, 1960.

(2)- Gavosto F., Maraini G. e Pileri A.-Blood 16 - 1555, 1960.

correlata alla percentuale di elementi blastici midollari: coll'aumento della quota blastica si può così osservare una diminuzione dell'indice percentuale di marcatura con timidina. Ciò significa che la comparsa e la progressiva accentuazione del difetto maturativo comporta, in via secondaria, una progressiva diminuzione nella capacità proliferativa (1).

Una conferma dello stretto rapporto esistente tra difetto maturativo e proliferativo negli elementi di leucemia acuta si è anche avuta dallo studio della attività proliferativa nei casi di remissione parziale o totale del processo leucemico, susseguente ai vari trattamenti chemioterapici (2). Accanto alla diminuzione della quota blastica ed alla parziale restaurazione del processo maturativo è stata così osservata una netta ripresa della capacità proliferativa. Talvolta questa ripresa si è rilevata contemporanea alla scomparsa di cloni cellulari anormali, come è apparso da osservazioni citogenetiche. Questo confermerebbe una maggiore distruzione delle cellule anormali con una conseguente ripresa evolutiva di quelle normali.

Risultati delle indagini relative al 2° programma di ricerche : indagini cinetiche sugli elementi di leucemia acuta.

a)- Indagini in vitro

Nell'ambito di una stessa popolazione leucemica acuta, pur caratterizzata da un'attività proliferativa media nettamente diminuita nei confronti della popolazione blastica normale, l'incorporazione della timidina tritiata risulta molto eterogeneamente distribuita. In particolare una maggiore incorporazione percentuale è riscontrabile negli elementi blastici a maggior diametro, più nucleolati e più basofili. E' addirittura osservabile una stretta correlazione lineare tra il grado di incorporazione con timidina e le dimensioni cellula-

(1)- Pileri A., Pegoraro L., Bachi C. e Gavosto F. --
Sangre 9 - 320, 1964.

(2)- Dogliotti G.C. e Pileri A. - Atti Simposium Intern.
Chemiot. Emoblastasi - giugno 65 - Torino
(in corso di stampa).

ri (fig. 11) (1). Negli elementi blastici di taglia maggiore la capacità proliferativa risulta sovrapponibile a quella degli elementi blastici del midollo normale.

Risultati analoghi sono stati da noi ottenuti impiegando, quale precursore specifico dell'ADN, acido desossicitidilico- H_3 in luogo di timidina- H_3 (2).

Il fatto che la diminuita capacità proliferativa non sia caratteristica di tutta la popolazione leucemica acuta ma solo di una parte di essa è già suggestivo per l'ipotesi che gli elementi blastici primordiali di leucemia acuta siano dotati di una normale attività proliferativa, che verrebbe quindi a perdersi progressivamente proprio per la loro incapacità maturativa. A questo riguardo è stato di particolare interesse lo studio della capacità proliferativa in un raro caso di leucemia acuta promielocitica, caratterizzata quindi da un difetto maturativo ad uno stadio evolutivo della serie leucopoietica più avanzato che nelle comuni forme di leucemia acuta (3).

Negli elementi promielocitari di questo caso la percentuale di marcatura con timidina (6,5%) è risultata molto più bassa di quanto generalmente osservabile negli elementi blastici o promielocitari di midollo normale. Nell'ambito della stessa popolazione leucemica acuta è stata anche osservata una marcata eterogeneità nella percentuale di marcatura con timidina. In questo caso, quindi, nonostante il parziale avvio della differenziazione in senso mieloide, il comportamento dell'attività proliferativa (sia per quanto concerne la diminuita proliferazione media che l'eterogeneità metabolica in funzione del diametro cellulare) risulta del tutto simile a quanto generalmente osservabile nelle più comuni leucemie acute emocitoblastiche.

-
- (1)- Gavosto F., Pileri A., Bachi C. e Pegoraro L. - Nature 203, 92, 1964.
- (2)- Pileri A., Masera P., Pegoraro L., Bachi C. e Gavosto F.-Boll. Soc.It. Biol. Sper. 41 - 744, 1965.
- (3)- Pileri A., Pegoraro L. e Gavosto F. - Europ. J. Cancer (in corso di stampa).

b)- Indagini in vivo

Le reciproche interrelazioni esistenti tra le varie classi di blasti di una stessa popolazione sono state studiate in alcuni esperimenti in vivo, praticando delle marcature polso sia con timidina- H_3 che con uridina- H_3 .

Dopo somministrazione endovenosa di timidina tritiata il grado di marcatura degli elementi blastici circolanti è stato valutato complessivamente e nelle singole classi di cellule a diametro differente. Come indicato nel graf. 12, l'indice di marcatura nelle cellule più grandi (inizialmente più alto) cade rapidamente durante le prime 24 ore, mentre invece negli elementi a minor diametro l'indice di marcatura aumenta gradualmente dai valori più bassi (1-3%) a valori decisamente più alti (10-20%) (1).

Inoltre, mentre per gli elementi più grandi il numero medio di grani per cellula marcata diminuisce precocemente, per gli elementi più piccoli esso resta praticamente invariato.

In altri esperimenti in vivo, sempre con timidina tritiata, la valutazione della percentuale di cellule marcate e del numero medio di grani è stata condotta direttamente sugli elementi midollari, osservando così dopo appena 8-10 ore dalla somministrazione del precursore una netta modificazione nel profilo di marcatura della popolazione con aumento della percentuale di blasti marcati a minor diametro e contemporanea diminuzione della percentuale di blasti marcati a diametro maggiore. E' stato così dimostrato che per le leucemie acute la trasformazione degli elementi blastici di taglia maggiore in elementi blastici a minor taglia è preceduta dalla loro divisione cellulare, realizzandosi una parziale condizione di divisione cellulare eteromorfo genetica.

Osservazioni analoghe sulla cinetica della popolazione blastica di leucemia acuta si sono anche avute dagli esperimenti in vivo di marcatura polso con uridina tritiata. A differenza della timidina, impie-

(1)- Gavosto F., Pileri A., Bachi C. e Pegoraro L. -
Nature 203 - 92, 1964.

gando uridina- H_3 si è ottenuta, dopo una sola somministrazione, la marcatura dell'intera popolazione blastica e sono state quindi valutate, nel tempo, le variazioni nel grado medio di marcatura delle singole classi a diametro differente (1). Come indicato nel grafico 13, nei primi 14 giorni dopo la somministrazione del precursore, la diminuzione della marcatura è stata esclusivamente osservata nelle classi di cellule a maggior diametro, mentre invece nelle classi di cellule a minor diametro il grado di marcatura è rimasto praticamente invariato. Il dimezzamento del numero di grani nei blasti di taglia maggiore è attribuibile alla diluizione che consegue alla loro attività mitotica. Per i blasti di taglia minore, invece, la costanza della marcatura può essere attribuita sia alla lunga sopravvivenza di questi elementi, che al passaggio in questo compartimento di elementi blastici di taglia maggiore, previamente duplicatisi.

Mentre nel midollo normale solo le mitosi delle cellule più avanzate nella maturazione sono del tipo eteromorfogenetico, così che la divisione cellulare comporta una modificazione morfologica irreversibile e profonda tale da distinguere le cellule figlie dalle cellule madri, negli elementi più immaturi, ad esempio quelli blastici, non esistendo la possibilità di una chiara differenziazione citologica, si realizza una divisione omomorfogenetica.

Gli elementi blastici di leucemia acuta presenterebbero invece nei confronti degli elementi blastici del midollo normale una modalità mitotica tutta particolare, il cui significato risulta però ancora poco chiaro.

In base alle ricerche suesposte, gli elementi blastici di maggior taglia sono da considerare quali elementi più giovani, che nel corso delle loro divisioni cellulari e anche dopo una sola divisione possono trasformarsi in elementi blastici più piccoli e più deficitari dal punto di vista metabolico.

(1)- Gavosto F., Pileri A., Pegoraro L. e Butti W.
Tumori (in corso di stampa).

Inoltre, mentre per gli elementi midollari normali, la progressiva riduzione della capacità proliferativa è regolarmente associata alla loro evoluzione differenziatrice, per gli elementi di leucemia acuta tale riduzione della capacità proliferativa non si accompagna ad alcun vero e specifico fenomeno qualitativo di differenziazione (fig. 14), ma solo a delle modificazioni quantitative di alcuni parametri cellulari, quali la diminuzione del volume cellulare, del numero di nucleoli e del metabolismo acido-nucleico e proteico.

La patologia delle leucemie acute può quindi essere unitariamente riferita ad un primitivo difetto differenziativo che è responsabile a sua volta dell'accumulo della popolazione blastica, del suo invecchiamento e della progressiva riduzione della capacità proliferativa.

D)- METABOLISMO DELL'ARN NEGLI ELEMENTI DI LEUCEMIA ACUTA.

Lo studio del metabolismo dell'ARN appare particolarmente interessante per gli elementi di leucemia acuta, considerando d'un lato il suo ruolo nei processi di differenziazione cellulare e d'altro lato il difetto di questa funzione in questi stessi elementi. E' stato precedentemente osservato che il metabolismo dell'ARN è nettamente diminuito negli elementi di leucemia acuta nei confronti degli elementi blastici normali: è stata anche osservata una netta variabilità del rapporto tra metabolismo dello ARN e delle proteine, che può essere collegato all'incapacità di questi stessi elementi leucemici a maturare (1).

Analogamente alle cellule midollari normali, anche negli elementi di leucemia acuta, l'incorporazione dei vari precursori nucleosidici si realizza primitivamente nell'ARN nucleare con successiva comparsa nel citoplasma. La gran parte dell'ARN marcato risulta lega

(1)- Gavosto F., Maraini G., Pileri A. - Blood, 16 - 1555, 1960.

to ai cromosomi e la marcatura è più evidente alla loro superficie, piuttosto che nel loro "core" (fig. 15).

Ai fini di una più precisa localizzazione della sintesi dell'ARN a livello della sostanza genetica sono state condotte delle indagini sull'incorporazione di uridina- H_3 nell'ARN dei singoli cromosomi e dei loro rispettivi segmenti in cellule sanguigne umane. Si è potuto così constatare che un'attività di sintesi dell'ARN è presente durante il periodo G_2 fino all'inizio della divisione cellulare e che l'incorporazione del precursore dell'ARN risulta abbastanza omogeneamente distribuita lungo i cromatidi. Inoltre non si sono potute osservare significative differenze nel grado di incorporazione specifica tra le singole coppie di cromosomi (1). A questo riguardo va però tenuto presente che la quota di ARN cromosomiale osservabile in metafase non rappresenta che una piccola quota di quello in precedenza sintetizzato e che la forte spiralizzazione subita dai cromosomi stessi in occasione della mitosi potrebbe anche aver cancellato ogni asincronismo eventualmente presente nell'interfase. Non sono state comunque osservate differenze nella marcatura dell'ARN tra cromosomi metafasici di cellule midollari normali e di leucemia acuta.

Analogamente a quanto presente in vari materiali biologici e particolarmente quelli in crescita, anche sugli elementi midollari normali è osservabile una apparente stabilità metabolica dell'ARN, che è dovuta alla sua continua degradazione e resintesi intracellulare. Un comportamento simile è anche caratteristico degli elementi leucemici ed è riferibile ai ricchi pool intracellulari di precursori dell'ARN, in essi presenti. Anche negli elementi di leucemia acuta, il trattamento con actinomicina D, dopo marcatura polso con uridina- H_3 , ha permesso di osservare un effettivo turnover dell'ARN, e di distinguere, inoltre, due tipi fondamentali di ARN rispettivamente a maggiore e minore grado di turnover.

Per una più approfondita e protratta indagine del metabolismo dell'ARN negli elementi di leucemia

(1)- Pegoraro L., Pileri A., Bernardelli R., Rovera G. e Gavosto F. - Boll. Soc.It. Biol. Sper. 41, 75, 1965.

acuta, data anche la ben nota difficoltà di coltivare in vitro tali elementi, sono state condotte delle indagini direttamente in vivo, somministrando per via endovenosa uridina tritiata, seguita da un eccesso di uridina non marcata. Sono state seguite autoradiograficamente nel tempo le variazioni del grado di marcatura nella popolazione totale, nelle singole classi di elementi blastici a differente diametro e nelle singole strutture subcellulari. A differenza di quanto comunemente osservabile per l'ADN, il metabolismo dell'ARN appare come un fenomeno continuo, per cui tutti gli elementi blastici sono in grado di incorporare il precursore.

Questa marcatura risulta molto eterogeneamente distribuita nell'ambito della popolazione leucemica. Il grado di marcatura è inizialmente correlato ai diametri delle singole classi cellulari: tale correlazione è anche osservabile nei tempi avanzati, essendo però meno evidente la differenza di marcatura tra elementi di varia grandezza. Per gli elementi blastici di taglia minore la marcatura resta praticamente invariata. Questa progressiva diminuzione nella differenza di marcatura tra elementi blastici di varia grandezza è senz'altro riferibile ad una parziale trasformazione di elementi blastici con diametro maggiore in elementi blastici a diametro minore, nel corso delle successive divisioni cellulari, analogamente a quanto già da noi stessi osservato in vivo con timidina tritiata.

Il numero medio di grani per cellule nella popolazione totale, nonostante le divisioni intervenute nel periodo di osservazione, particolarmente nel gruppo delle cellule più grandi, risulta diminuita solo del 40% in 14 giorni. Il persistere della marcatura è senz'altro riferibile alla somministrazione di due fenomeni, quali la continua riutilizzazione intracellulare dei prodotti di degradazione e la prolungata sopravvivenza degli elementi blastici. Va anche tenuta presente la possibilità di una riutilizzazione di larghi frammenti dell'ARN extracellulare, analogamente a quanto già suggerito per le leucemie linfatiche croniche da Hamilton (1).

(1)- Hamilton L.D. - in Kinetics of cellular proliferation - Grune & Stratton New York, 1957 - pp. 151-165.

Nel graf. 16 sono riportate le variazioni del numero di grani a livello nucleare, nucleolare e citoplasmatico per i vari tempi dell'esperimento. La marcatura nucleare diminuisce costantemente già dalla seconda ora, mentre nel nucleolo essa presenta un ulteriore aumento fino alla quarta ora, e poi una costante diminuzione. La marcatura nel citoplasma, molto scarsa nelle prime ore, presenta un successivo aumento che coincide colla diminuzione di marcatura nel nucleo e nel nucleolo.

Il differente comportamento dell'ARN a livello nucleare e nucleolare suggerisce, in accordo anche a quanto osservato a livello cromosomico, che la sintesi di ARN si realizzi prevalentemente nella frazione cromatinica non nucleolo-associata con successivo passaggio nel nucleolo: inoltre la maggiore incorporazione specifica (per unità di superficie) osservabile nel nucleolo fin dall'inizio conferma la possibilità, da parte di esso, di concentrare la macromolecola, oltre che una sua possibile produzione autonoma.

E)- INFLUENZA DI ARN ESOGENO SUL METABOLISMO PROTEICO DI CELLULE NORMALI E LEUCEMICHE.

Negli ultimi anni vari Autori hanno osservato che delle significative modificazioni di talune attività cellulari possono essere indotte dal trattamento con acidi ribonucleici esogeni di varia natura. Accanto a delle modificazioni puramente morfologiche sono state riscontrate varie modificazioni biochimiche conseguenti alla penetrazione intracellulare dell'ARN quali un'esaltazione del metabolismo proteico o addirittura la possibilità di trasportare la sensibilità immunologica a cellule non immuni con ARN estratto da cellule immuni. Queste indagini suggerirebbero la possibilità che gli ARN esogeni possano svolgere una effettiva funzione messaggera, che è anche confermata dagli studi condotti da vari AA. su sistemi subcellulari.

Allo scopo di studiare eventuali differenze nell'attività biologica degli ARN ottenuti da cellule sanguigne normali e leucemiche, sono state condotte delle indagini sul comportamento del metabolismo proteico degli elementi midollari normali o di leucemia acuta, in

presenza di vari ARN estranei.

Gli ARN estratti da materiale midollare uti lizzanti le tecniche di Kirby (1), di Ralph e Bellamy (2), venivano aggiunti alla concentrazione di 0,5 mgr/ml. a sospensione di cellule midollari sia normali che di leucemia in vitro a 37°C per un periodo di circa 5 ore.

Incubando in vitro elementi di leucemia acu ta con ARN estratto da midollo umano normale è stata co sì osservato un significativo aumento nell'incorporazio ne di leucina (3); nessun aumento è stato viceversa os servato in presenza di ARN estratto da blasti di leuce- mia acuta (4).

E' da notare che gli elementi blastici di leucemia acuta presentano già di per sè un metabolismo proteico nettamente diminuito nei confronti degli ele- menti blastici del midollo normale (5). L'ARN estratto da midollo osseo umano normale avrebbe quindi la capa- cità di restaurare parzialmente questo metabolismo pro- teico. Questo aumento è inoltre omogeneamente osser va to nelle varie classi di blasti a differente diametro e con differente intensità metabolica.

Un tale fenomeno non è ovviamente interpre- tabile sulla base di questi soli dati autoradiografici: l'osservazione nostra e d'altri AA. che, in presenza di ARN esogeno normale, il metabolismo proteico aumenta an che in presenza di actinomicina, suggerirebbe che le suddette variazioni del metabolismo proteico siano al- meno in parte riferibili ad una diretta azione di que- sti ARN.

Analoghe ricerche sono state condotte valu- tando l'influenza degli ARN estratti da midolli normali o da blasti di leucemia acuta sul metabolismo proteico di elementi mielocitari normali coltivati in vitro'. An-

(1)- Kirby K.S. - Biochem. J. 64 - 405, 1956.

(2)- Ralph R.L. e Bellamy A.R. - Bioch. Bioph. Acta 87 - 9, 1964.

(3)- Bachi C., Pileri A., Pegoraro L. e Gavosto F. - Boll.Soc.It.Biol. Sper. 40 - 643, 1964.

(4)- Bachi C., Pegoraro L., Pileri A. e Gavosto F. - Boll.Soc.It.Biol.Sper. 41 - 739, 1965.

(5)- Gavosto F., Maraini G. e Pileri A. - Blood 16, 1555, 1960.

che in questi esperimenti si è potuto osservare che l'ARN estratto da midollo osseo umano normale è in grado di indurre un significativo aumento del metabolismo proteico; viceversa, ARN estratto da elementi di leucemia acuta, in analoghe condizioni sperimentali, non è stato in grado di esercitare alcuna significativa influenza sul metabolismo proteico degli elementi mielocitari normali e questo risultato si ricollega a quanto precedentemente riportato sul metabolismo proteico degli elementi blastici di leucemia acuta.

* * * *

CONSIDERAZIONI GENERALI

Dallo studio sistematico dell'attività proliferativa è risultato che questa è diminuita in molte condizioni leucemiche e che esiste una correlazione tra il grado di questa diminuzione e l'intensità del difetto differenziativo e maturativo comune a tutte le forme di leucemia acuta ed acutizzata. Nei casi tipici di leucemia acuta, con blocco maturativo quindi completo, sono stati infatti osservati i più bassi valori di attività proliferativa degli elementi blastici.

Inoltre sia nelle indagini in vitro che in quelle in vivo, è stato possibile rilevare una notevole eterogeneità della popolazione blastica di leucemia acuta, e che una quota di essa possiede una attività proliferativa pressochè normale: soltanto dopo alcune divisioni mitotiche i blasti mostrano una progressiva diminuzione della loro attività proliferativa, non associata ad una effettiva maturazione. Di conseguenza è da considerarsi caratteristico degli elementi di leucemia acuta un preminente difetto, quello differenziativo; esso comporta a sua volta, una progressiva diminuzione della capacità proliferativa.

Accanto a questo fondamentale difetto qualitativo nel meccanismo differenziativo, è anche riscontrabile, negli elementi di leucemia acuta, un difetto quantitativo nei meccanismi di replicazione cellulare: infatti, a differenza degli elementi più immaturi del midollo osseo umano normale che nel corso delle divisioni cellulari non sono distinguibili tra cellule madri e cellule figlie (divisione omomorfogenetica), nella popolazione blastica di leucemia acuta si instaurano delle divisioni in cui le cellule figlie possono essere distinguibili da quelle madri, essendo più piccole di queste (divisioni eteromorfogenetiche o, meglio, micromorfogenetiche).

Basandoci sul rilievo dell'importanza del difetto differenziativo nelle leucemie acute, sono state intrapresi altri programmi di indagine dei meccanismi biochimici, ai quali, nelle cellule midollari normali è devoluto il controllo della differenziazione.

Una direzione di indagine ha puntato direttamente allo studio del corredo cromosomico, cioè della sostanza genetica delle cellule leucemiche acute. E' evidente che se queste cellule, morfologicamente così simili ai blasti normali, sono del tutto incapaci di differenziare, l'alterazione occorsa nella loro possibilità di espressione genetica deve essere rilevante. Le alterazioni più grossolane del genoma sono ora, come è noto, osservabili morfologicamente all'esame diretto dei cromosomi metafasici.

Ma queste alterazioni, nelle leucemie acute, sono state riscontrate presenti in meno del 50% dei casi e, quando presenti, hanno mostrato caratteristiche estremamente variabili da un caso all'altro; spesso inoltre, nel corso della malattia esse sono comparse soltanto tardivamente. Non è apparsa, nelle forme acute, un'alterazione costante ed iniziale come nelle leucemie croniche mieloidi, e, di conseguenza, le anomalie riscontrate non possono essere considerate come "una prima lesione" da cui prende avvio il processo leucemico. D'altra parte, lo stesso fatto che esse siano differenti di volta in volta, variabili spesso anche nell'ambito di uno stesso caso, e, che, almeno nella metà dei casi non esistono, già ne diminuisce di per sé l'importanza nei confronti dei meccanismi di induzione del difetto differenziativo, invece costantemente presente.

Si è reso perciò necessario approfondire l'indagine nelle cellule leucemiche, portandola ad un livello subcromosomico e, nello stesso tempo, ad una dimensione più funzionale. Tale tentativo è stato da noi effettuato con l'ausilio di tecniche autoradiografiche ad alta risoluzione.

Lo scopo principale della indagine è stato evidentemente di valutare, nel maggior numero di dettagli possibile, la base biochimica fondamentale del processo di divisione cellulare, e quindi dell'attività proliferativa del tessuto. Tuttavia, si è tenuto implicitamente conto del fatto che se lo studio è condotto comparativamente su cellule normali e cellule leucemiche, esso può essere in grado di rilevare, in queste ultime, l'esistenza di alterazioni caratteristiche, se esse esistono.

Come è noto, il processo di duplicazione dell'ADN non è nè simultaneo, nè uniforme, ma avviene in modo asincrono, segmento per segmento, e segue sempre un suo ordine ben preciso, ha, come si dice, un "pattern" caratteristico. Esso è necessariamente regolato da un meccanismo di controllo che assicura la replicazione di ogni molecola o segmento cromosomico nel lo stesso tempo ad ogni ciclo cellulare. Pare che l'ordine con cui si replicano tutte queste numerosissime subunità di sostanza genetica abbia una notevole importanza. Nelle cellule sanguigne umane molti cromosomi mostrano numerosi punti attivi simultanei, ma questa osservazione va considerata anche in funzione del grado ancora limitato di risoluzione della tecnica.

Una ipotesi ora diffusamente accettata è che vi siano due grandi complessi di ADN, uno a replicazione precoce (early replicating), l'altro a replicazione tardiva (late replicating). Il primo corrisponde alla parte della cromatina geneticamente attiva mediante la sintesi di ARN messaggero; il secondo alla parte "repressa", inattiva dal punto di vista funzionale. Di conseguenza, se, per esempio, si studia soltanto la fase finale del periodo di replicazione (il che è possibile con particolari procedimenti tecnici) si possono individuare, in ogni cromosoma, i segmenti che replicano per ultimi e che dovrebbero, secondo la ipotesi su enunciata, corrispondere a regione geniche represses dal punto di vista funzionale. D'altra parte, il comportamento "late replicating" di un cromosoma dovrebbe variare a seconda del tessuto e dello stadio di sviluppo della cellula; è probabile, anzi, che durante la differenziazione i due pools di ADN varino reciprocamente, l'uno sovrapponendosi in misura variabile all'altro.

Comunque, una analisi comparativa di questo aspetto della replicazione dell'ADN tra cromosomi di cellule sanguigne umane e cromosomi di cellule di leucemia acuta, poteva apparire interessante ai fini della identificazione di eventuali regioni anomale nella sostanza genetica dei blasti leucemici.

Le nostre indagini hanno innanzi tutto dimostrato - per la prima volta - che anche nelle cellule di leucemia acuta umana il raddoppiamento della sostanza ge

netica non avviene casualmente, ma segue un suo particolare corso, il quale, nelle sue linee generali, appare abbastanza simile a quello delle cellule normali. Tuttavia, alcune differenze sono comparse nell'indagine comparativa, aventi tutta l'aria di essere significative.

Una differenza assai consistente, oltre che costante, è stata da noi identificata nei cromosomi della coppia 21.

I valori della attività di sintesi nella coppia leucemica nella fase terminale del periodo S sono apparsi considerevolmente più alti che nei corrispondenti cromosomi normali, il che significa che nei cromosomi leucemici la replicazione è più tardiva. Attualmente sono in studio le possibilità metodologiche per una ancor più esatta valutazione comparativa della attività di sintesi in questa regione del genoma, ed inoltre si ritiene che sarà necessario valutare fino a che punto l'alterazione è legata ai difetti differenziativi e proliferativi, così caratteristici delle cellule leucemiche, studiando eventualmente anche le forme croniche e, soprattutto, le situazioni intermedie. Comunque, si può fin da ora rilevare che, interessando il rilievo anche i cromosomi 21, ben altrimenti implicati nelle leucemie, queste indicazioni assumono un interesse particolare e giustificano questo attuale indirizzo di indagine.

L'evidenza di una replicazione tardiva in questi cromosomi (ed in altre zone del genoma) può significare un'avvenuta induzione in queste regioni di uno stato represso, sotto l'influenza dei fattori leucemogeni. In particolare, per le leucemie acute, noi riteniamo suggestiva l'ipotesi di una repressione dei meccanismi regolatori della differenziazione, meccanismi che nelle cellule sanguigne normali sono controllati dall'attività integrata di geni operatori, regolatori e strutturali, esistenti nelle coppie di cromosomi ove ha sede il controllo genetico della normale leucopoiesi: è questa una nostra attuale ipotesi di lavoro, che considera, in altri termini, giustificata la ricerca, nelle cellule leucemiche, di eventuali regioni repressate della sostanza genetica, visualizzabili con una loro replicazione tardiva, il che è in accordo con alcune correnti teorie.

Va tuttavia tenuto presente che in un tale programma di indagine, un fattore limitante è dato dal grado di risoluzione della tecnica nel senso che si potranno evidenziare soltanto le eventuali differenze di entità superiore alla risolvibilità tecnica, non quelle più piccole e limitate, forse, ad alcuni complessi genici.

Infine, è evidente che l'alterazione rilevata nelle ricerche effettuate finora dovrà mostrarsi costante in tutti i casi prima di poterla considerare un fenomeno peculiare delle leucemie acute, inoltre, si dovrà valutare fino a che punto l'alterazione è implicata nel difetto differenziativo, studiando eventualmente anche le forme croniche e, soprattutto, le situazioni intermedie.

Comunque, è stato osservato che interessando il rilievo proprio i cromosomi 21, come si sa ben altrimenti implicati nelle leucemie, i dati finora ottenuti assumono un interesse ancor più vivo.

Una seconda via di indagine ha riguardato lo studio di taluni parametri biochimici nucleo-citoplasmatici, più o meno strettamente legati al processo di differenziazione cellulare. Per esempio, nelle cellule sanguigne è stato possibile osservare una correlazione tra intensità del metabolismo dell'ARN e del metabolismo proteico: la costanza di questo rapporto è stata messa in relazione alle ben definite capacità differenziative degli elementi midollari normali. Invece, negli elementi di leucemia acuta tale rapporto è del tutto differente e variabile da caso a caso. Recentemente, Caspersson (1), sulla base di un'osservata variabilità di contenuto di ARN e proteine, ha ammesso l'esistenza, nelle cellule neoplastiche, di un disturbo dell'apparato sintetico cromatinico associato al nucleolo; d'altro canto noi abbiamo potuto confermare, anche per i precursori purinici, una netta variabilità ed incon-

(1)- Caspersson T., Foley G.E., Killander D. e Lamakka G.
- Exptl. Cell Res. 32 - 553, 1963.

stanza di incorporazione nelle cellule di leucemia acuta. Si tratta evidentemente di dati alquanto grossolani, tuttavia in grado di suggerire una via di approccio all'essenza del problema, oltre che l'opportunità di una indagine più dettagliata sulla sintesi e sul metabolismo dei vari tipi di ARN, particolarmente di quello messaggero. Alcuni tentativi di ulteriormente approfondire questo aspetto del problema sono ora in corso nel nostro laboratorio.

Una indagine sul metabolismo dell'ARN degli elementi di leucemia acuta, condotta iniettando direttamente "in vivo" il precursore tritiato, ha messo in evidenza una apparente stabilità metabolica della macromolecola, dovuta anche ad una continua resintesi dei prodotti di degradazione, oltre che ad una prolungata sopravvivenza degli elementi blastici. Inoltre si è potuto osservare che gli elementi più giovani sono metabolicamente più attivi. Infine è apparso chiaramente che anche negli elementi leucemici il ruolo principale nel metabolismo dello ARN è svolto dal nucleo e più precisamente dalla parte Cromatinica di esso, mostrando il nucleo un'attività metabolica molto intensa, che precede quella citoplasmatica. Se ne è concluso che praticamente ogni singola fase del metabolismo cellulare dell'ARN si svolge compiutamente anche nei blasti di leucemia acuta; vale a dire: sintesi di esso a livello della sostanza genetica, ivi compresa la quota nucleolo associata, con successivo trasferimento nel citoplasma. Tutto ciò ha permesso di escludere che il difetto differenziativo di queste cellule dipenda esclusivamente da una primitiva e grossolana alterazione delle fasi principali del metabolismo cellulare dell'ARN, al di fuori dell'attività del sistema genico.

Di conseguenza, si è tentato di studiare direttamente il metabolismo dell'ARN a livello dei singoli cromosomi, ove l'azione genica legata alla differenziazione è espressa dall'attività di specifiche regioni con produzione di ARN Messaggero e dalla repressione di sempre più estese zone di sostanza genetica. Ma, almeno fino a questo momento, una grandissima limitazione a queste indagini, teoricamente oltremodo suggestive, è data dal fatto che, essendo per ora possibile studiare soltanto i cromosomi metafasici delle cel-

lule umane, la effettiva sintesi dell'ARN Messaggero, che è interrotta all'inizio della mitosi, sfugge ad una diretta valutazione a causa della rapidità di dissmissione della macromolecola dai cromosomi.

Altri tentativi in corso, nel nostro laboratorio, infine, derivano da un presupposto che si rifà ai classici studi sulla trasformazione batterica: potrebbe apparire interessante, infatti, conoscere che cosa capita nelle cellule di leucemia acuta se si riesce a far penetrare in esse dell'ARN che abbia con sé dei "messaggi" potenzialmente idonei a promuovere alcuni processi di sintesi specifica quali avvengono nelle cellule sanguigne normalmente differenziate. In alcuni esperimenti preliminari, si è potuto osservare che ARN nativo estratto da midollo osseo umano normale aumenta l'incorporazione di un aminoacido nei blasti di leucemia acuta. Ma, al fine di uscire da questo programma screening e di iniziare un più diretto approccio al tema si ritiene necessaria una intensissima preparazione tecnica ed un controllo, passo per passo, di una serie di possibili cause di errore, per cui nessuno dei dati finora in possesso può dirsi sicuro e concreto.

Riferendoci ancora agli studi sull'ARN, è interessante rilevare l'analogia tra i dati osservati nelle cellule di leucemia acuta e le osservazioni effettuate dai biologi sui cosiddetti ibridi letali (1,2). Se, per esempio, un uovo di rana esculenta è fecondato da uno spermatozoo di rana temporaria, si ha un inizio di sviluppo, cioè delle divisioni cellulari fino allo stadio di giovane gastrula, dopo di che la crescita si arresta e l'embrione muore. Questa letalità è evidentemente la conseguenza dell'introduzione di un nucleo maschio di specie straniera, ed essa si esprime con un blocco della differenziazione allo stadio di gastrula. Orbene, recenti indagini su queste cellule, incapaci di ulteriormente evolversi differenziando, hanno messo in evidenza delle intense alterazioni del metabolismo dell'ARN, delle sue proprietà fisico-chimiche,

(1)- Brachet J., Bieliavsky N. e Tencer R. - Bull. Cl. Sci. Acad. roy Belg. 48 - 255, 1962.

(2)- Ficq A. e Brachet J. - Exptl. Cell Res. 32 - 90, 1963.

dei suoi rapporti con le sintesi proteiche: alterazioni analoghe, a quelle osservate nelle leucemie acute, e, come queste, da ritenersi strettamente collegate all'arresto della differenziazione cellulare.

§§§

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

- GAVOSTO F., PEGORARO L. e PILERI A. - Possibilité de marquer, à l'aide de précurseurs tritiés, les chromosomes de cellules leucémiques chez l'homme.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 8 - 920, 1963.
- GAVOSTO F., PILERI A. e PEGORARO L. - Metabolismo dell'ADN nei cromosomi di leucemia acuta umana. Atti XIX Congr. Naz. Soc. It. Emat. - Pavia, marzo 1963 - Tip. Viscontea - Pavia, 1963 p. 68.
- GAVOSTO F., PEGORARO L. e PILERI A. - The radioautographic technique in the study of nucleic acid metabolism in the chromosomes of human leukemic cells.
Proc. IX Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon, 1963 (S. Karger Basel, 1963) p. 1549.
- GAVOSTO F., PILERI A. e PEGORARO L. - DNA metabolism in acute leukaemia chromosomes.
Proc. IX Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon, 1963- (S. Karger Basel, 1963) p. 63.
- GAVOSTO F., PILERI A., PEGORARO L. e MOMIGLIANO A. - In vivo incorporation of tritiated thymidine in acute leukaemia chromosomes.
Nature 200 - 807, 1963.
- GAVOSTO F., GHEMI F., PEGORARO L. e PILERI A. - Sintesi dell'ADN in cromosomi di leucemia acuta umana. Atti Congr. Ass. Genet. It. Roma, 1964. Tip. Popolare - Pavia 9 - 280, 1964.
- PILERI A., PEGORARO L., BACHI C. e GAVOSTO F. - Pouvoir proliférant des éléments blastique leucémiques. Comm. IX Congr. Soc. Hemat. Lisbon 1963. - Sangre 9 - 320, 1964.
- GAVOSTO F., PILERI A., BACHI C. e PEGORARO L. - Proliferation and maturation defect in acute leukaemia cells.
Nature 203 - 92, 1964.

CEPPELLINI R., CELADA F., FRANCESCHINI P., GAVOSTO F., PILERI A., PEGORARO L. e ZANALDA A. - Anomalia del cariotipo midollare e del fenotipo eritrocitario in un caso di eritemia cronica (malattia di Di Guglielmo).

Atti Congr. Ass. Genet. It. Roma, 1964.

Tip. Popolare, Pavia, 9 - 258, 1964.

GAVOSTO F., PEGORARO L. e PILERI A. - Thymidine incorporation in the chromosomes of human acute leukaemia-in Current Rresearch in Leukaemia. Cambridge Univ. Press pp. 177-189, 1965

PEGORARO L., BACHI C., PILERI A. e GAVOSTO F. - Possibilità di indagine del metabolismo istonico direttamente a livello dei cromosomi di cellule sanguigne umane.

Boll. Soc.It. Biol. Sper. 40 - 645,1964.

PILERI A., BACHI C., PEGORARO L. e GAVOSTO F.- Correlazione tra metabolismo purinico dell'ARN e metabolismo proteico negli elementi di midollo osseo umano normale.

Boll. Soc. It. Biol. Sper. 40 - 641,1964.

BACHI C., PEGORARO L., PILERI A. e GAVOSTO F. - Stimolazione del metabolismo proteico di cellule di leucemia acuta umana da parte di acido ribonucleico nativo estratto da midollo osseo umano normale.

Boll. Soc. It. Biol. Sper. 40 - 643,1964.

PEGORARO L., PILERI A., BACHI C. e GAVOSTO F. - Chromosomes abnormalities in bone marrow cells of human acute leukaemia.

Proc. X Congr. Intern. Soc. Haemat. Stockholm 1964, A: 67 - EUR 2406.e 1965.

GAVOSTO F., PILERI A., PEGORARO L. e BERNARDELLI R. - Behaviour of DNA synthesis in different phases of the S-period in chromosomes of human acute leukaemia.

Proc. X Congr. Intern. Soc. Haemat. Stockholm 1964, A: 4 - EUR 2451.e 1965.

- GAVOSTO F., PILERI A. e PEGORARO L. - Metabolismo degli acidi nucleici nelle cellule e nei cromosomi di leucemia umana.
EUR. ~~240~~4.i, 1965.
- PILERI A., MASERA P., PEGORARO L., BACHI C. e GAVOSTO F. - Studio della capacità proliferativa delle cellule sanguigne mediante l'impiego di acido desossicitidilico in luogo di timidina.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. 41 - 744, 1965.
- PEGORARO L., PILERI A., BERNARDELLI R., ROVERA G. e GAVOSTO F. - Sintesi dell'ARN nei cromosomi umani in periodo premitotico.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. 41 - 751, 1965.
- BACHI C., PEGORARO L., PILERI A. e GAVOSTO F. - Influenza dell'ARN normale e leucemico sul metabolismo proteico di cellule di leucemia acuta.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. 41 - 739, 1965.
- MASERA P., PEGORARO L. e ROVERA G. - Anomalie del cromosoma 21 e fosfatasi alcalina nelle leucemie.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. 41 - 748, 1965.
- ROVERA G., PEGORARO L. e MASERA P. - Sviluppo di un clono cellulare a tre cromosomi Ph¹ nello stadio terminale di un caso di leucemia mieloide cronica.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. 41 - 741, 1965.
- GAVOSTO F. - Citogenetica e problemi attuali delle leucemie umane.
Rass. Med. Sarda 48 - 373, 1965
- GAVOSTO F., PILERI A. e PEGORARO L. - X-rays and Philadelphia chromosome.
Lancet p. 1336 - 1965.
- GAVOSTO F., PEGORARO L. e PILERI A. - Fase finale della duplicazione dell'ADN nei cromosomi di leucemia acuta.
Apparirà su: Atti Simposium Intern. Citogen. Leucemie - XVIII Conv. Farmitalia, giugno 1965, Torino.

DOGLIOTTI G.C. e PILERI A. - Chemioterapia e potenzialità proliferativa degli elementi leucemici. Apparirà su : Atti Simposium Intern. Chemiot. Emoblastosi, giugno 1965, Torino.

GAVOSTO F., PILERI A., PEGORARO L. e GABUTTI W. - Ricerche in vivo sul metabolismo dell'ARN negli elementi di leucemia acuta umana. Apparirà su : Tumori.

GAVOSTO F. - Leucemie e differenziazione cellulare. Apparirà su : Haematologica latina.

PILERI A., PEGORARO L., GAVOSTO F. - Cytogenetical and proliferative characteristics of acute promyelocytic leukaemia cells. Apparirà su : Europ.J. Cancer.

GAVOSTO F., PEGORARO L., PILERI A. e ROVERA G. - Three Ph¹ chromosomes during acute transformation of Chronich Myeloid Leukaemia. Apparirà su : Lancet.

GAVOSTO F. - DNA duplication in normal and leukemic human chromosomes. Apparirà su : Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology - vol. VII - Ed. J. N. Davidson and W.E. Cohn - Academic Press Inc. New-York.

§§§

VIAGGI - MISSIONI

Il Dr. Felice GAVOSTO ha partecipato con relazioni, comunicazioni, conferenze ai seguenti Congressi, Simposi o Riunioni :

- Simposio Nazionale della Società Italiana di Cancrologia.
Bari, 9-11 novembre 1962
- Riunione dei Radiobiologi dei sei Paesi della Comunità Europea. Bruxelles, 13-15 dicembre 1962.
- XIX Congresso Nazionale Società Italiana di Ematologia.
Pavia, 17-18 marzo 1963.
- IX Congresso Società Europea di Ematologia :
 - 1)- Simposio : "Cromosomi"
 - 2)- Simposio : "Possibilità e difficoltà nell'uso dei precursori tritati nelle ricerche ematologiche".
Lisbona, 26-31 agosto 1963.
- Convegno Antonio Baselli su "Acidi nucleici e loro funzione biologica". Milano, 16-18 settembre 1963.
- Simposio su "Statistica nelle ricerche sui Tumori" ISTAT. Roma, 27-28 ottobre 1963.
- Simposio "Current Research in Human Leukaemia".
Cambridge, 18 - 22 agosto 1964.
- X Congresso Società Internazionale di Ematologia.
Stoccolma, 30 agosto - 4 settembre 1964.
- Congresso Associazione Genetisti Italiani.
Roma, 6-7 dicembre 1964.
- Riunione Società tra i Cultori Sardi di Scienze Biologiche e Mediche. Cagliari, 6 Marzo 1965.
- Congresso Società Italiana di Biologia e Medicina Nucleare. Napoli, 11 aprile 1965.
- Simposio Internazionale sulla Citogenetica delle leucemie. Torino, 6 giugno 1965.
- Simposio su "Macromolecules and Cancer". New York, 18-20 ottobre 1965.

Il Dr. Gavosto ha inoltre soggiornato come visitatore nei seguenti Istituti o Laboratori, ha avuto numerosi incontri scientifici informali con molti ricercatori ed ha tenuto i seminari appresso indicati :

- Laboratoire de Morphologie Animale et de Radiobiologie.
Université Libre de Bruxelles.

- Holt Radium Institute - Paterson Laboratories.
Manchester.
- Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica.
Napoli.
- Brookhaven National Laboratory.
Upton. N.Y.
- The Cincinnati General Hospital.
Cincinnati.
(seminario su "Chemiotherapy and proliferative activity of leukaemic cells" - 25 ottobre 1965)
- The Children's Hospital Research Foundation.
Cincinnati.
(seminario su "DNA replication in human chromosomes"
26 ottobre 1965)
- Roswell Park Memorial Institute.
Buffalo.
- Oak Ridge National Laboratory-Biology Division.
Oak Ridge.
(seminario su "DNA synthesis in human acute leukaemia chromosomes" - 29 ottobre 1965)
- Institute of Cancer - National Institute of Health.
Bethesda.
- Sloan Kettering Institute for Cancer Research.
New York.
(seminario su "Proliferative activity of human acute leukaemia cells" 3 novembre 1965,
- The New York Hospital - Cornell Medical Center.
New York.
- College of Physicians & Surgeons of Columbia University. New York.
(seminario su "DNA replication in human leukaemic chromosomes" 5 novembre 1965).

Il Dr. Alessandro PILERI ha partecipato ai seguenti Congressi o Simposi :

- XIX Congresso della Società Italiana di Ematologia.
Pavia, 17-18 marzo 1963.
- IX Congresso della Società Europea di Ematologia.
Lisbona, 26-31 agosto 1963
- Convegno Antonio Baselli su "Acidi nucleici e loro funzione biologica".
Milano, 16-18 settembre 1963.

- Simposio "Current Research in Human Leukaemia".
Cambridge, 18-22 agosto 1964.
- X Congresso della Società Internazionale di Ematologia.
Stoccolma, 30 agosto-4 settembre 1964.
- Simposio Internazionale sulla citogenetica delle leucemie.
Torino, 6 giugno 1965
- Simposio Internazionale sulla chemioterapia delle emoblastosi.
Torino, 10 giugno 1965.

Nel settembre 1964 il Dott. PILERI ha visitato vari laboratori di ricerca della Facoltà di Scienze dell'Université Libre de Bruxelles (Mrs. Brachet, Chantrene, Errera, Thomas) ed i laboratori di radiobiologia di Mol (Mrs. Maisin e Ledoux).

Il Dr. Luigi PEGORARO ha partecipato ai seguenti Corsi, Congressi e Simposi:

- Corso sulle tecniche dei cromosomi (Istituto di Genetica dell'Università di Pavia).
Pavia, 26 marzo - 7 aprile 1962
- XIX Congresso della Società Italiana di Ematologia.
Pavia, 17-18 marzo 1963.
- Convegno Antonio Baselli su "Acidi nucleici e loro funzione biologica".
Milano, 16-18 settembre 1963.
- Congresso dell'Associazione Genetisti Italiani.
Roma, 6-7 dicembre 1963.
- Simposio "Current Research in Human Leukaemia".
Cambridge, 18-22 agosto 1964.
- X Congresso della Società Internazionale di Ematologia.
Stoccolma, 30 agosto - 4 settembre 1964.
- Simposio Internazionale sulla Citogenetica delle Leucemie.
Torino, 6 giugno 1965
- Corso di Biologia Molecolare e Radiobiologia (Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica).
Napoli, 27 settembre - 23 ottobre 1965

Inoltre nell'ambito di un progetto di ricerche in collaborazione su particolari aspetti cinetici della replicazione del DNA nei cromosomi di cellule leucemiche, il dott. PEGORARO ha frequentato il laboratorio di

Citogenetica del Christie Hospital and Holt Radium Institute (Manchester) dal marzo al giugno 1964 e dall'ottobre al dicembre 1965.

Infine ha visitato il dipartimento di citogenetica del Western General Hospital (Edimburgo) nel giugno del 1964 e nell'agosto del 1965.

* * * *

ATTIVITA' DIDATTICA SVOLTA NEL LABORATORIO

Da parte dei Dr. F. GAVOSTO, A. PILERI e L. PEGORARO sono stati regolarmente tenuti nel laboratorio di ematologia seminari, corsi, lezioni per il personale del laboratorio stesso, della Clinica Medica Generale e per gli allievi dei corsi di perfezionamento in oncologia, medicina interna (ematologia), medicina del lavoro, malattie del metabolismo e della nutrizione.

Gli argomenti trattati sono stati i seguenti :

- Funzione degli acidi nucleici nella cellula normale (codice genetico, trascrizione e traduzione del codice, ecc.)
- Sintesi delle proteine specifiche.
- Duplicazione dell'ADN nei cromosomi delle cellule sanguigne.
- Cinetica proliferativa degli elementi leucemici..
- Vari tipi di ARN e loro sintesi nelle cellule normali e leucemiche.
- Ripopolazione dei tessuti ematopoietici dopo trattamento radiante o citostatico nelle leucemie.
- Citogenetica delle leucemie umane.
- Meccanismi citogenetici in patologia umana.
- Danni del benzolo sui tessuti ematopoietici e sua azione leucemogena.

* * *

ELENCO DEI VISITATORI STRANIERI DEL
LABORATORIO

- 1962 - M. ERRERA, Laboratoire de Biophysique et de Radiobiologie. Université Libre de Bruxelles.
- 1962 - A. HOLLAENDER, Oak Ridge National Laboratory - Biological Division. Oak Ridge
- 1963 - P. GULLINO, Institute of Cancer - N.I.H. -Bethesda
- 1964 - R.K. APLEYARD, Euratom - Division Recherches et Ens. Bruxelles.
- 1964 - A.J. BERTINCHAMP, Euratom - Division Recherches et Ens. Bruxelles.
- 1965 - R. BERGER, Institut de Progénèse de la Faculté de Médecine de Paris - Paris.
- 1965 - M. ERRERA, Laboratoire de Biophysique et de Radiobiologie. Université Libre de Bruxelles.
- 1965 - J.L. HAMERTON, Pediatric Research Unit - Guy's Hospital Medical School. - London.
- 1965 - L. LATHA, Christie Hospital and Holt Radium Inst. Paterson Laboratories. Manchester.
- 1965 - J. LEJEUNE, Institut de Progénèse de la Faculté de Médecine de Paris - Paris.
- 1965 - S. MULDAL, Cytogenetic - Paterson Laboratories - Manchester.
- 1965 - A. SABIN, The Children's Hospital Research Foundation. Cincinnati.
- 1965 A.A. SANDBERG, Medicina C - Roswell Park Memorial Inst. Buffalo N.Y.

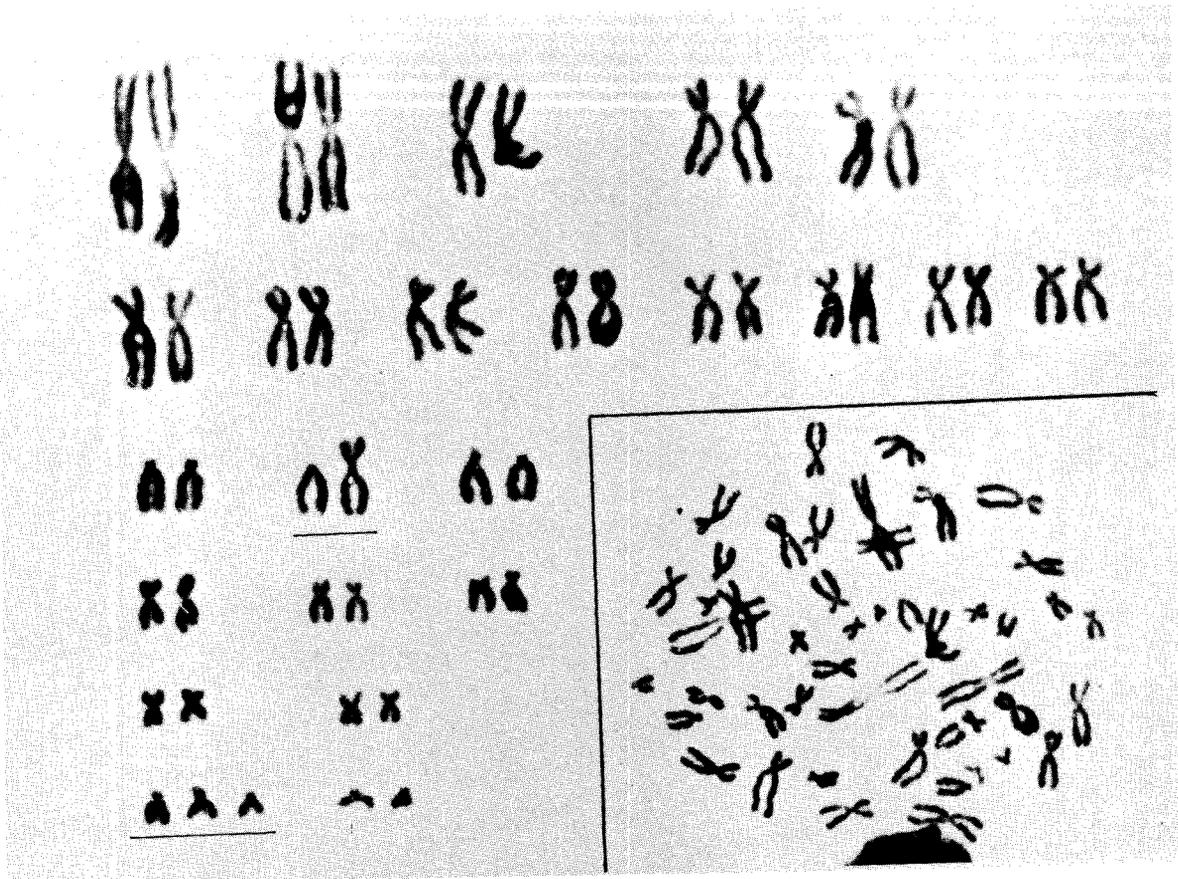


Fig. 1 - Leucemia acuta mieloblastica - Sono presenti un cromosoma sovranumerario nel VII gruppo ed uno traslocato nel IV gruppo.

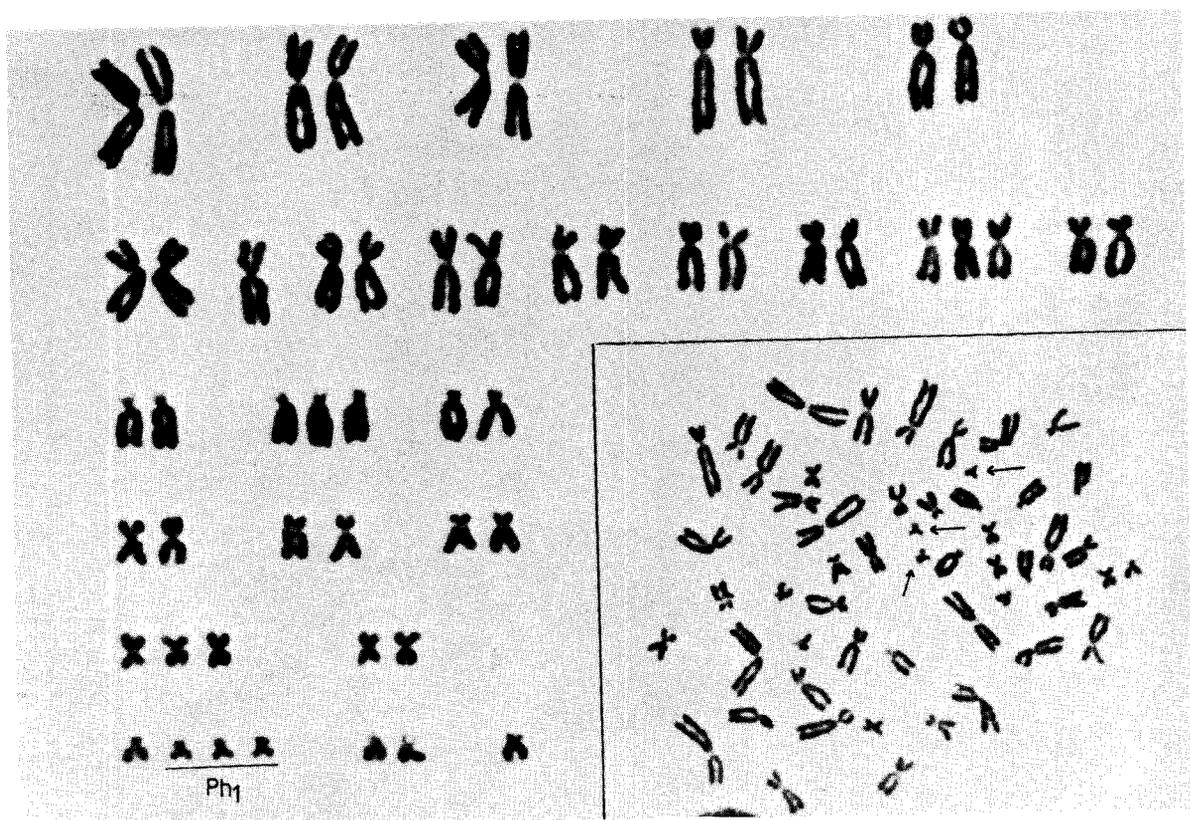


Fig. 2 - Fase terminale di leucemia mieloide cronica - Cariotipo di cellula con tre cromosomi Ph¹ ed altri cromosomi sovranumerari.

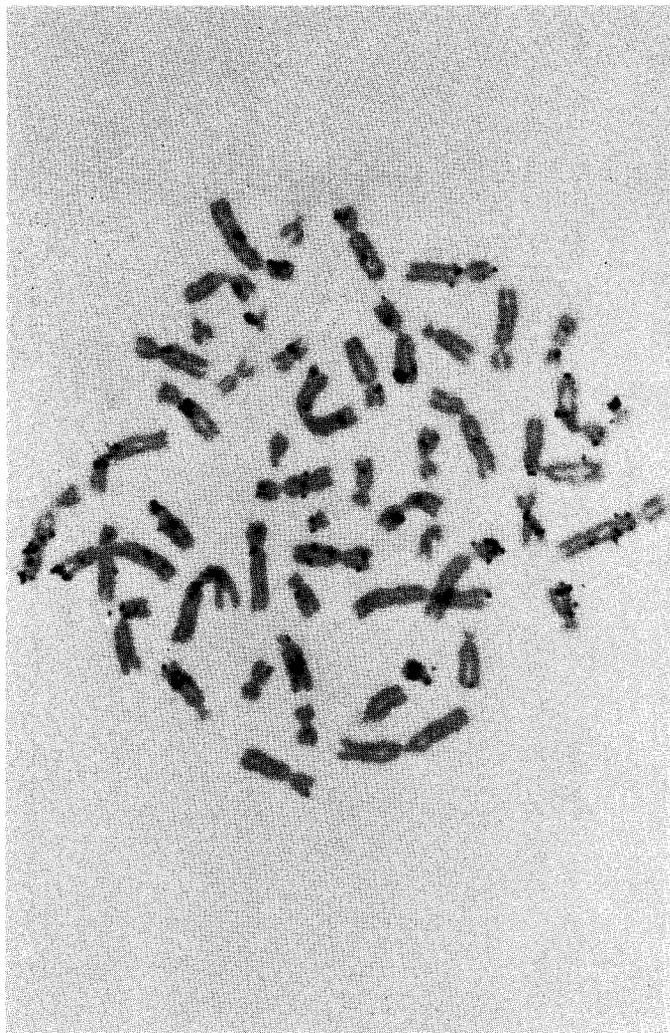


Fig. 3 - Figura mitotica di cellula di leucemia acuta - Marcatura ad alta risoluzione.

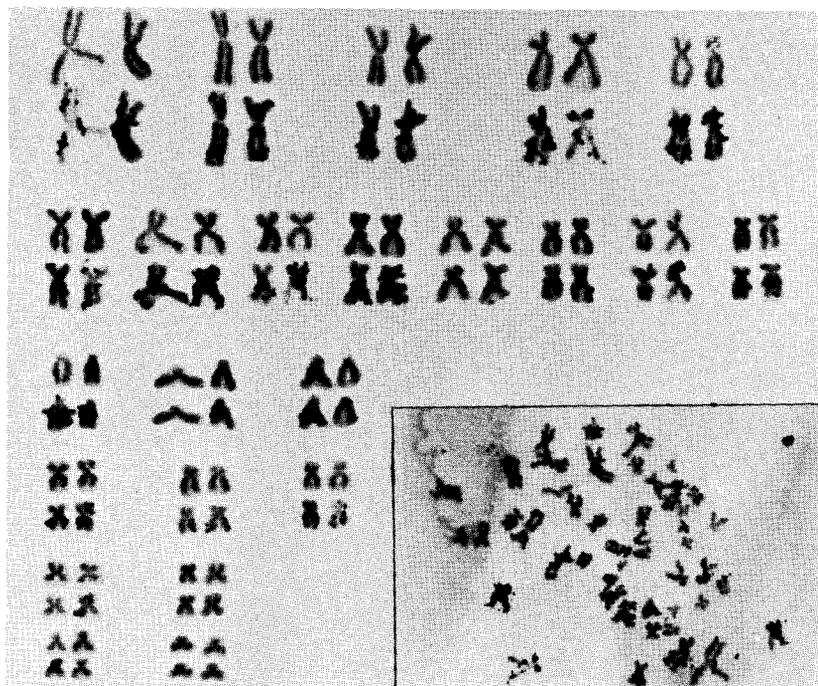


Fig. 4 - Cariotipo di cellula di leucemia acuta ricostruito dopo la rimozione della marcatura.

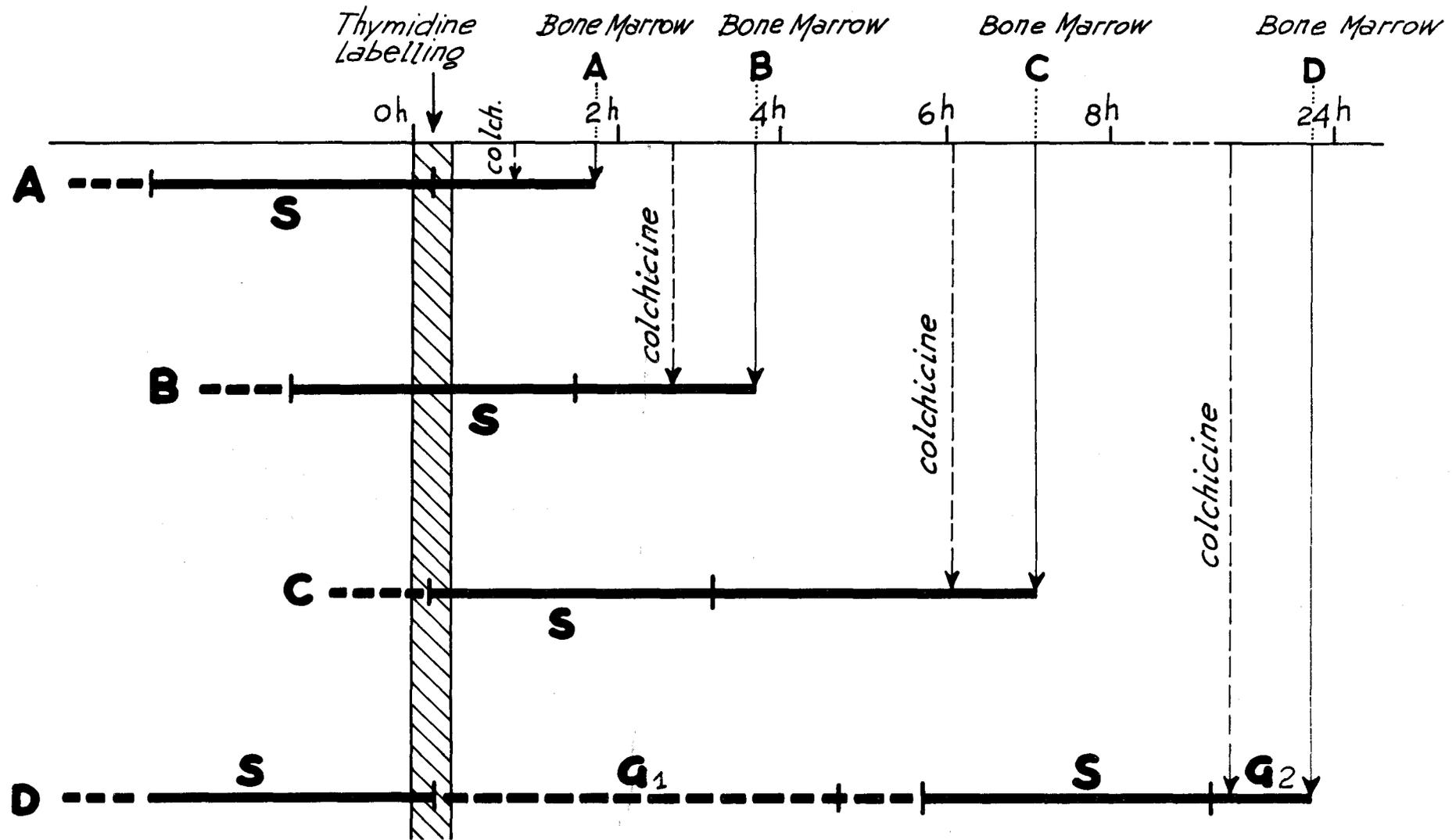


Fig. 5 - Schema di esperimento in vivo ("pulse labelling") per lo studio di diverse fasi del periodo S .

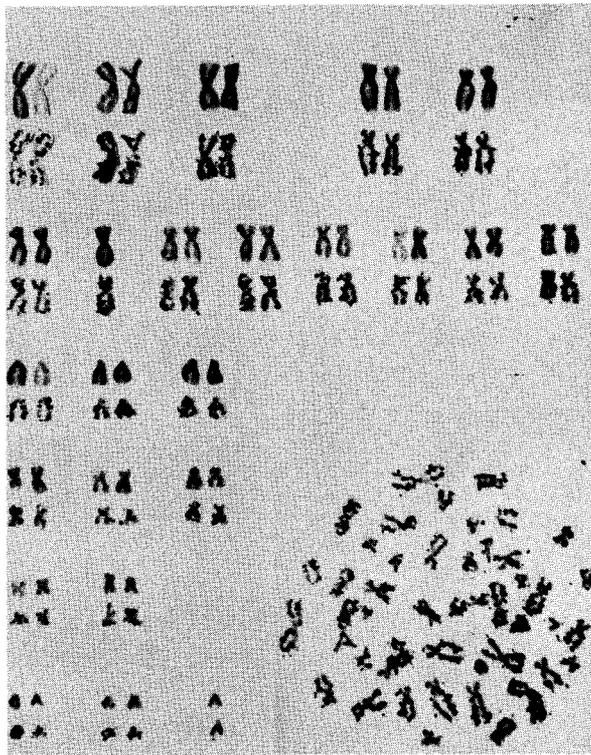


Fig. 6 A - Fase precoce della sintesi dell'ADN ("pulse labelling" in vivo).



Fig. 6 B - Fase tardiva della sintesi dell'ADN ("pulse labelling" in vivo).

**BEHAVIOUR OF THE DNA SYNTHESIS IN THE "HOT," X
CHROMOSOME DURING THE TERMINAL PHASE OF
THE S PERIOD.**

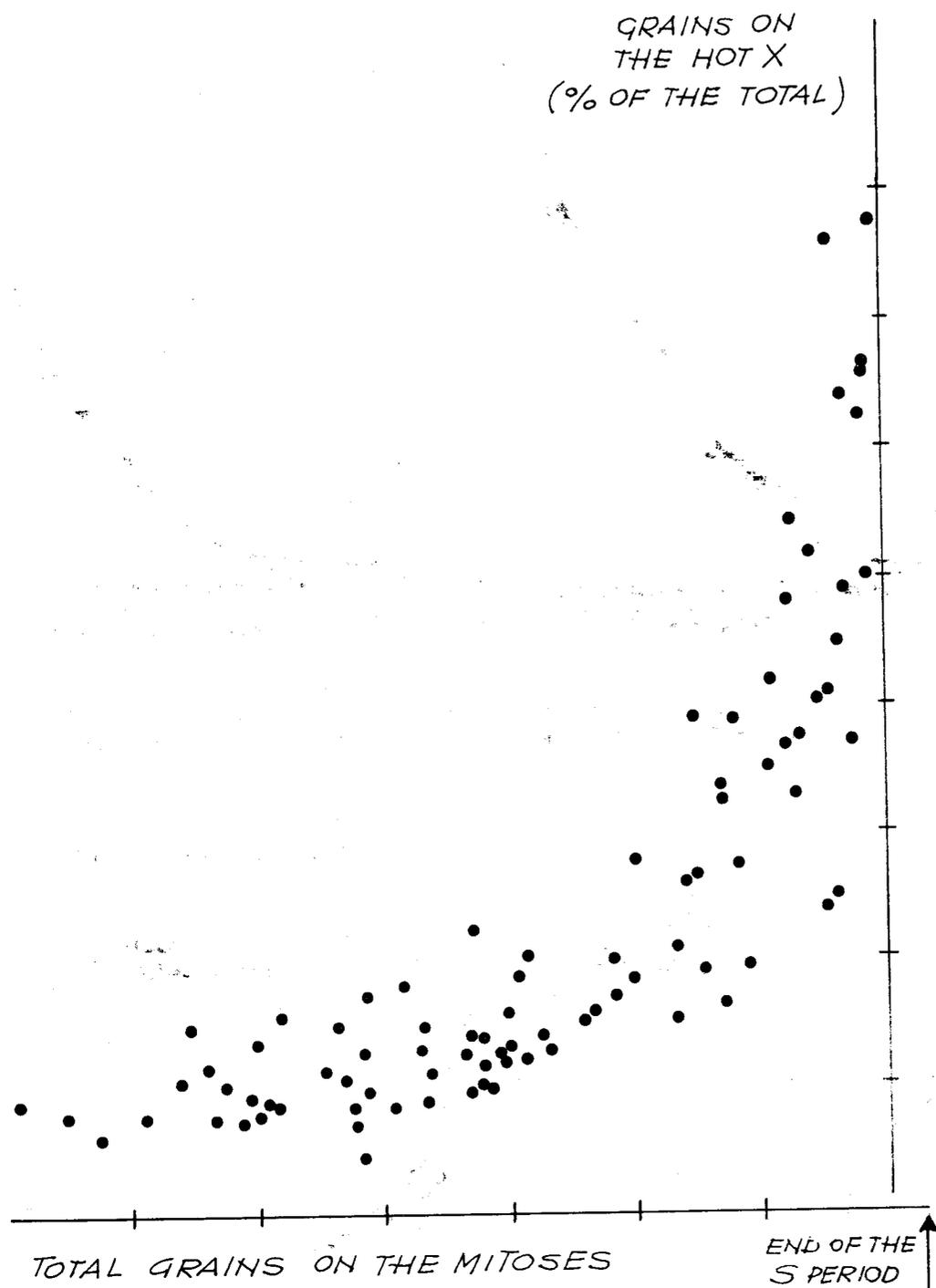


Fig. 7 - Incorporazione di timidina- H_3 nell'X eteropicnotico e negli autosomi nella fase terminale del periodo S .

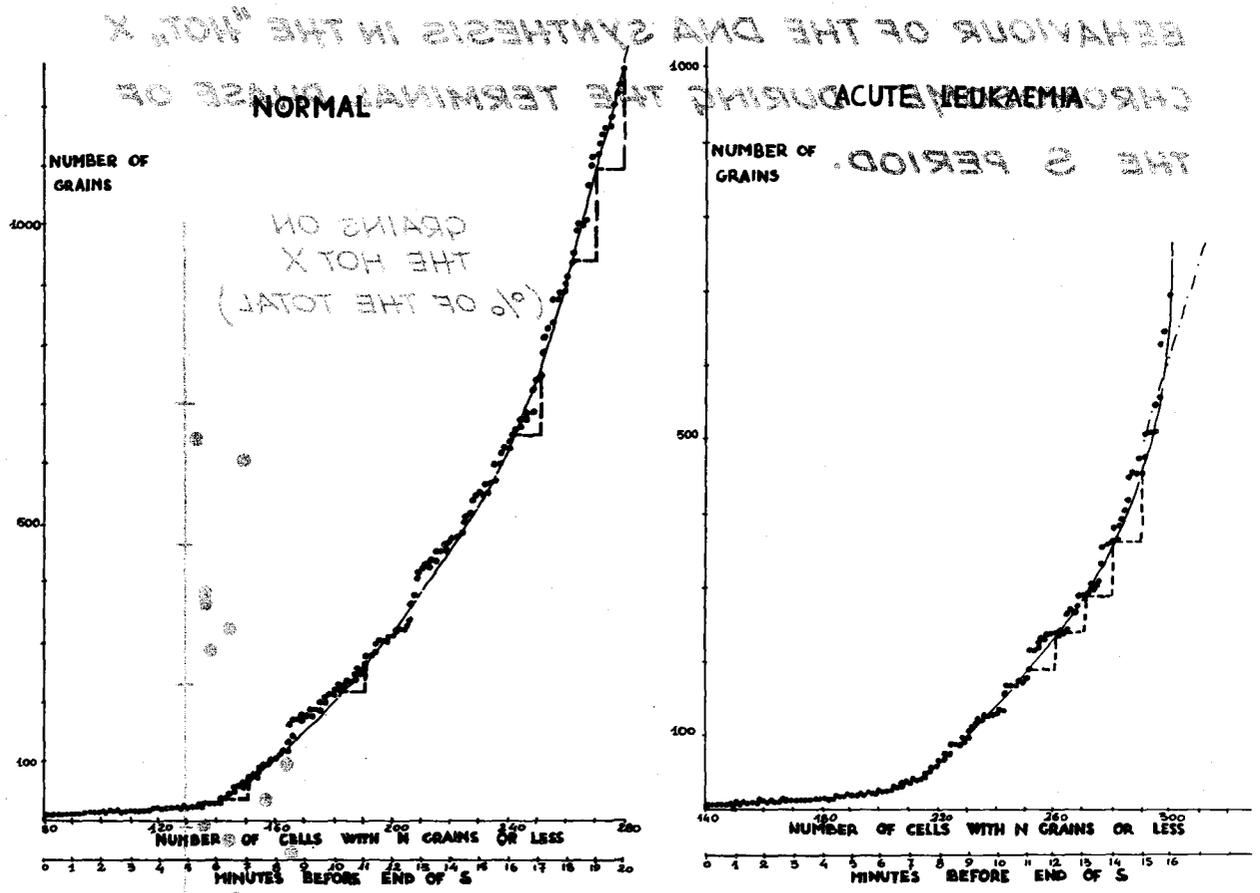


Fig. 8 - Incorporazione di timidina- H_3 nella fase finale del periodo S in mitosi normali e di leucemia acuta - Curve di distribuzione cumulativa.

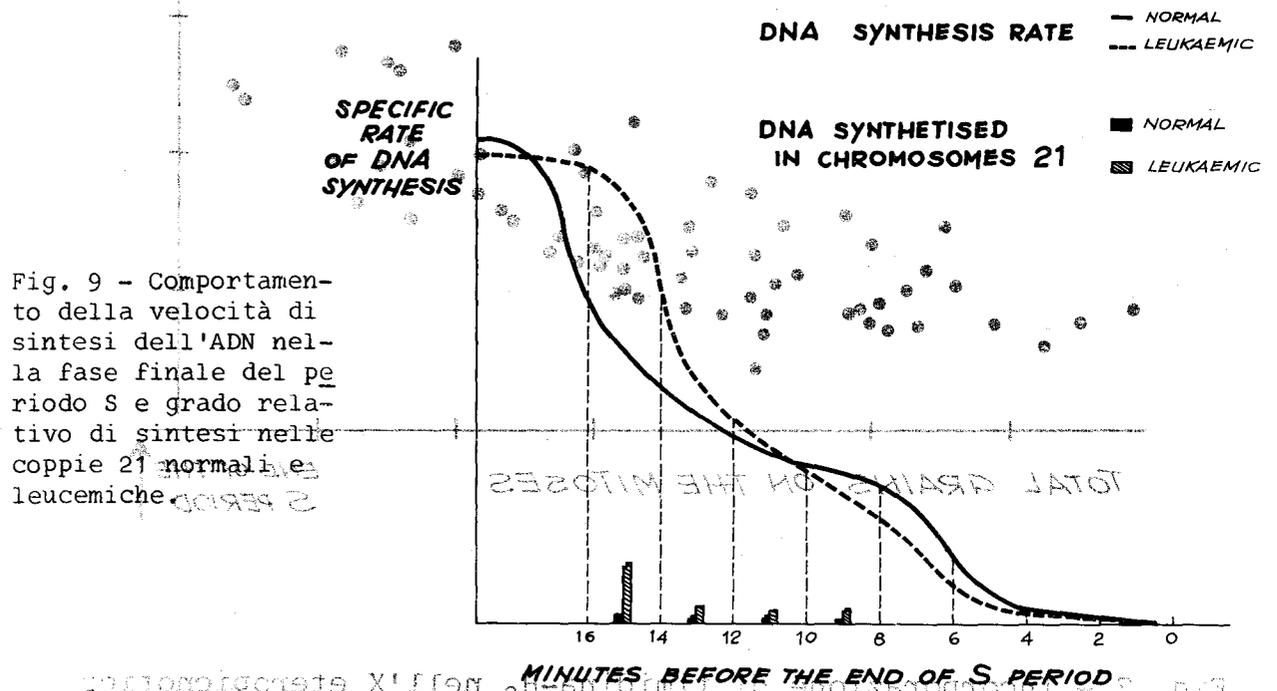


Fig. 9 - Comportamento della velocità di sintesi dell'ADN nella fase finale del periodo S e grado relativo di sintesi nelle coppie 21 normali e leucemiche.

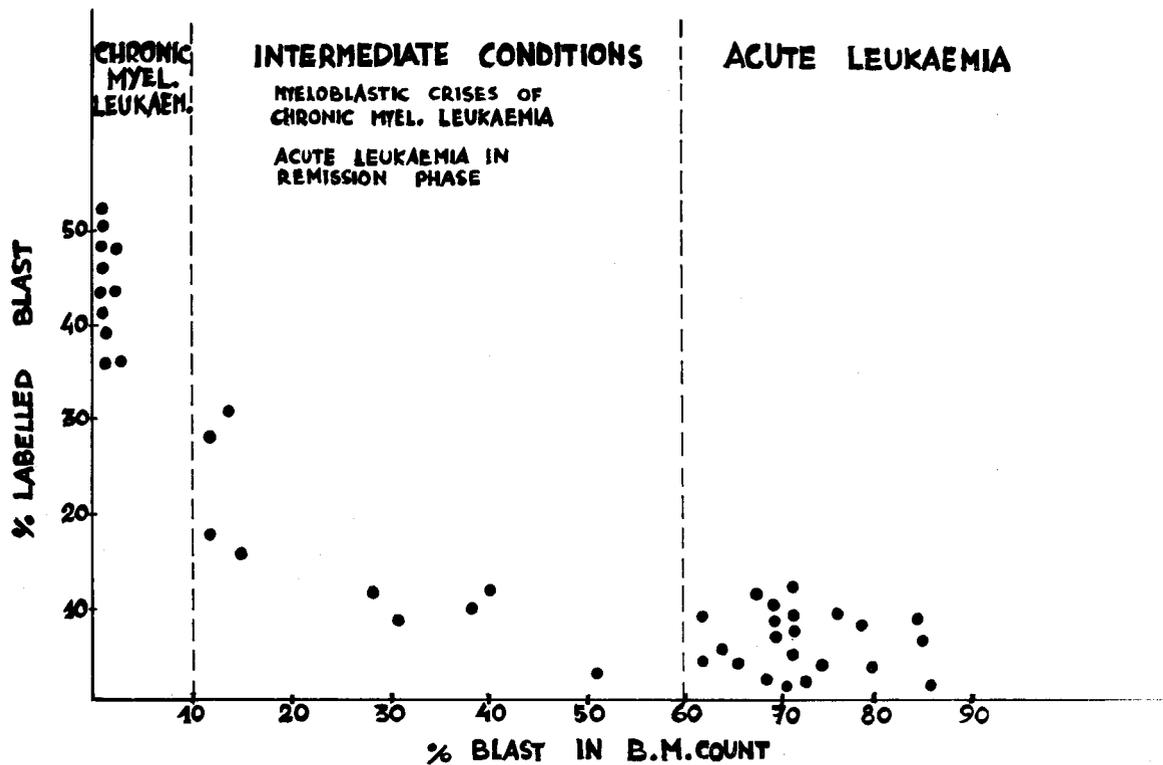


Fig. 10 - Correlazione tra la percentuale di blasti e "Labelling index" con timidina- H_3 in differenti condizioni leucemiche.

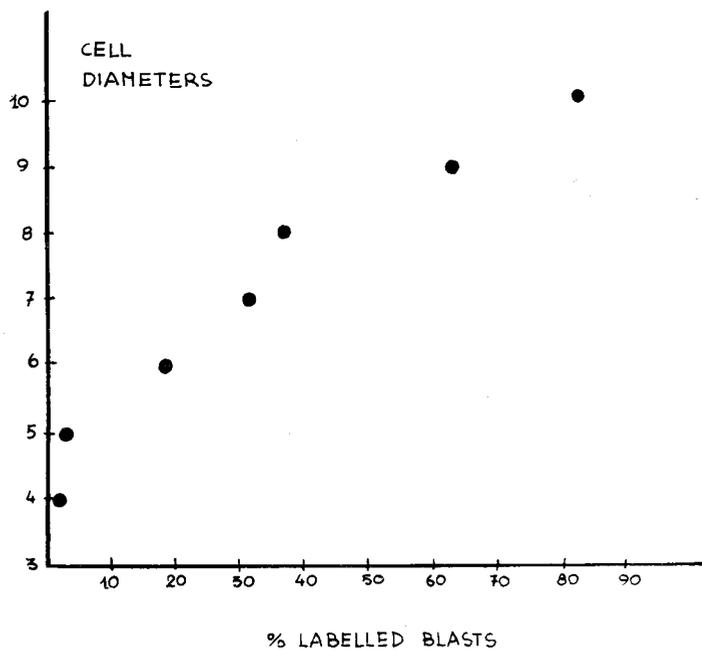


Fig. 11 - Incorporazione percentuale di timidina- H_3 nelle classi di cellule a differente diametro in un caso di leucemia acuta.

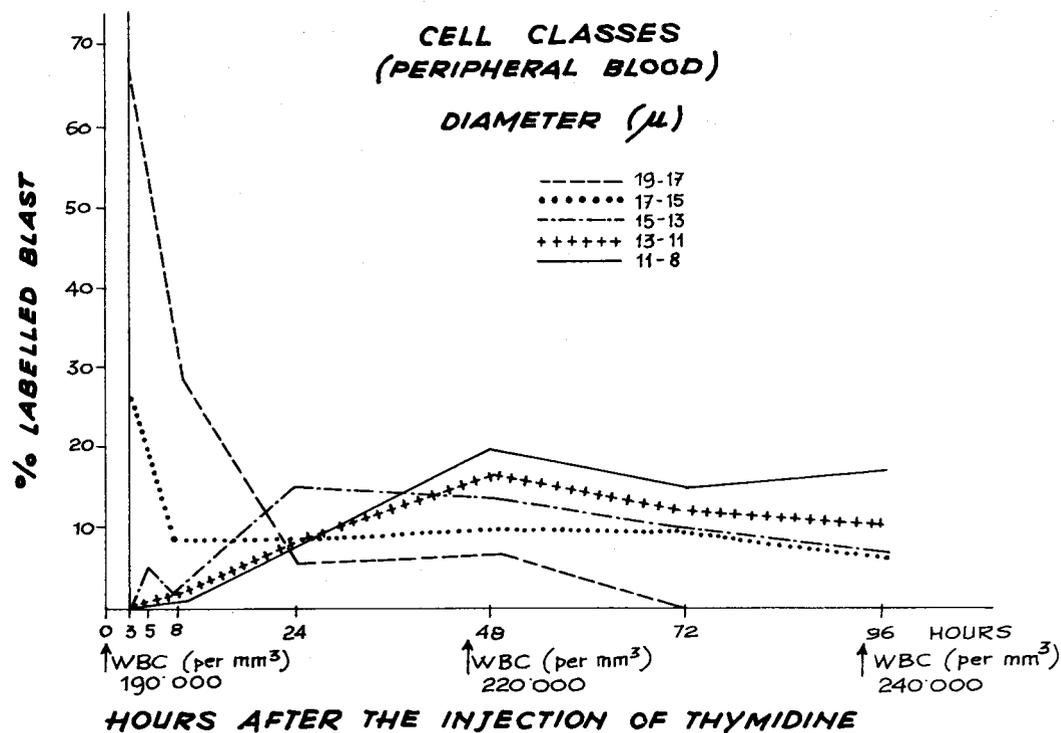


Fig. 12 - Comportamento del "Labelling index" dopo marcatura polso con timidina- H_3 in vivo in differenti classi di blasti di uno stesso caso di leucemia acuta.

**NUMERO MEDIO DI GRANI PER CELLULA NELLE SINGOLE
CLASSI DI BLASTI DISTINTI SECONDO IL LORO DIAMETRO,
A TEMPI DIFFERENTI DALLA SOMMINISTRAZIONE DI
URIDINA - H_3 IN VIVO.**

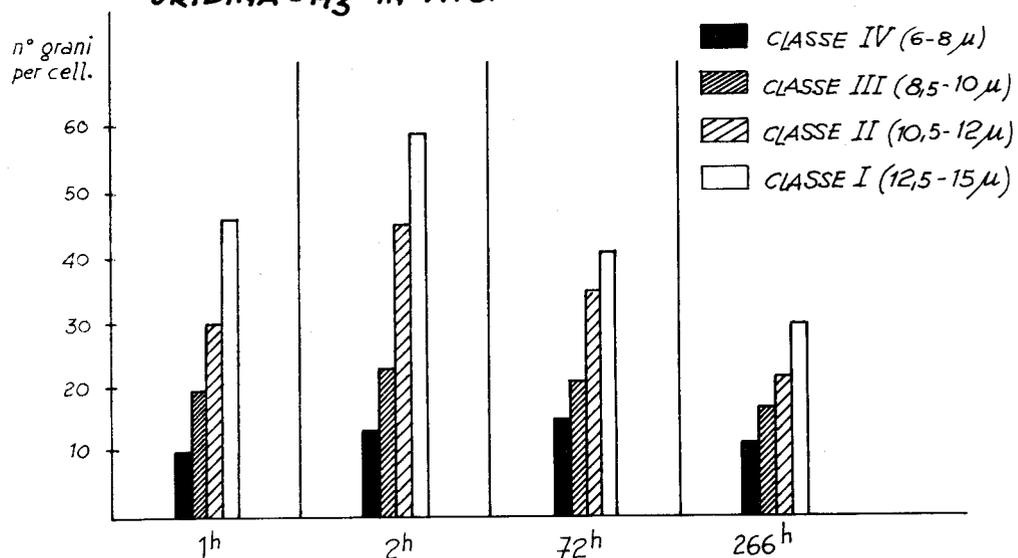
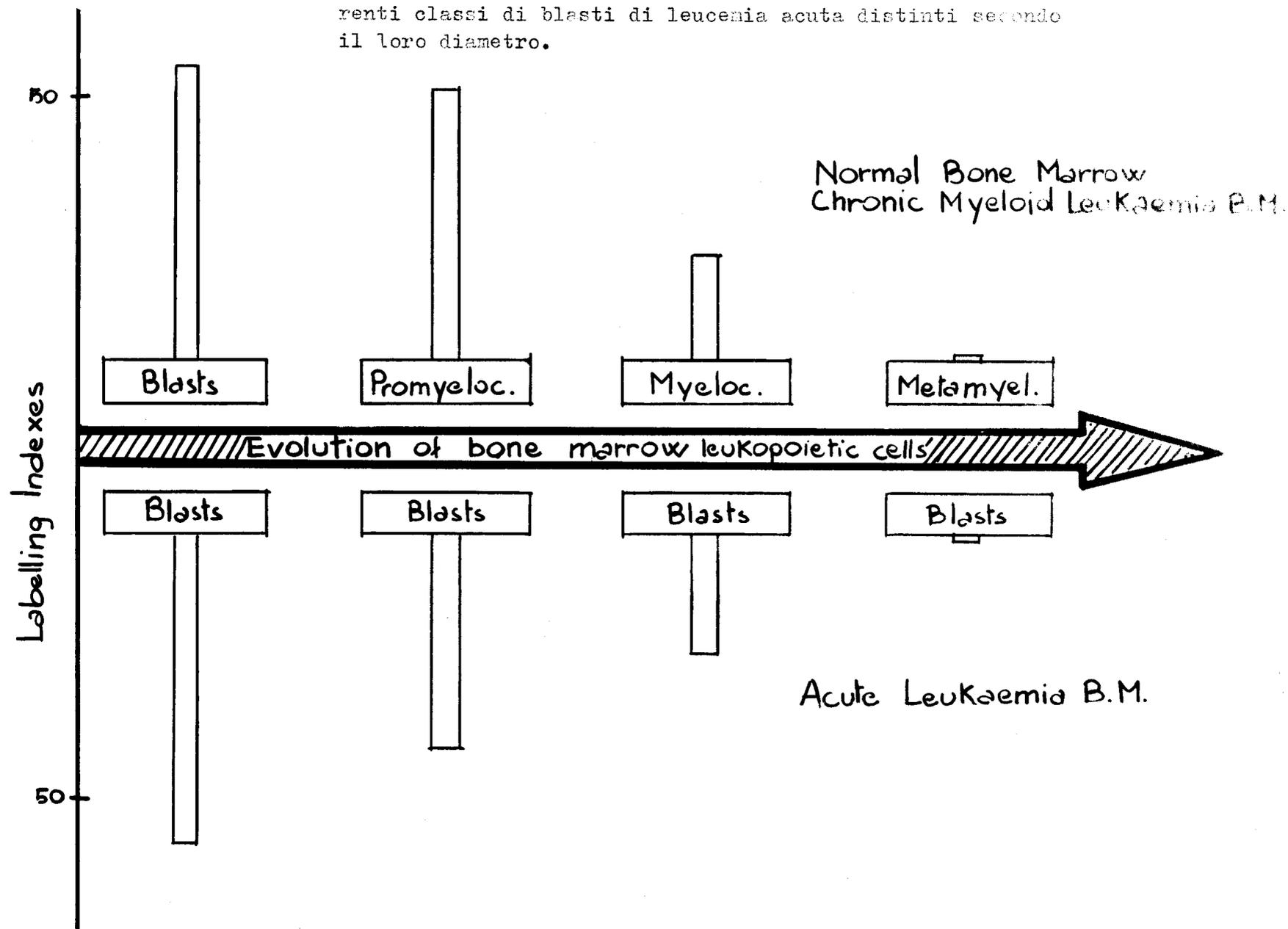


Fig 14 - Capacità proliferativa in vari stadi maturativi di midollo osseo normale (e di leucemia mieloide cronica) e in differenti classi di blasti di leucemia acuta distinti secondo il loro diametro.



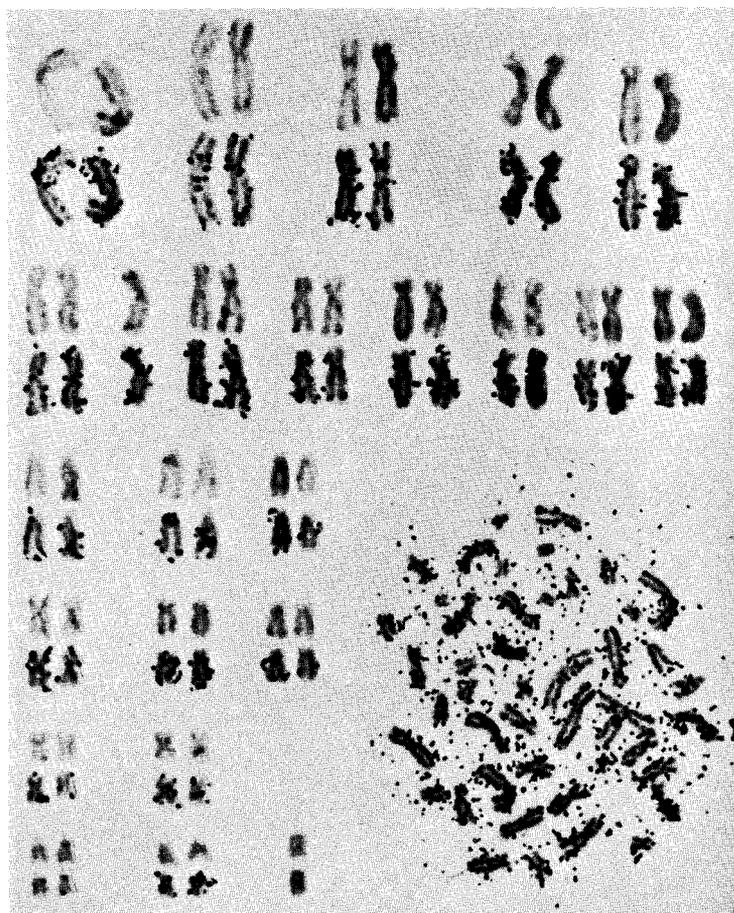


Fig. 15 - Incorporazione di Uridina- H_3 in cromosomi di cellule midollari umane normali. Metafase di soggetto maschio - Cariotipo ricostruito prima e dopo rimozione della marcatura.

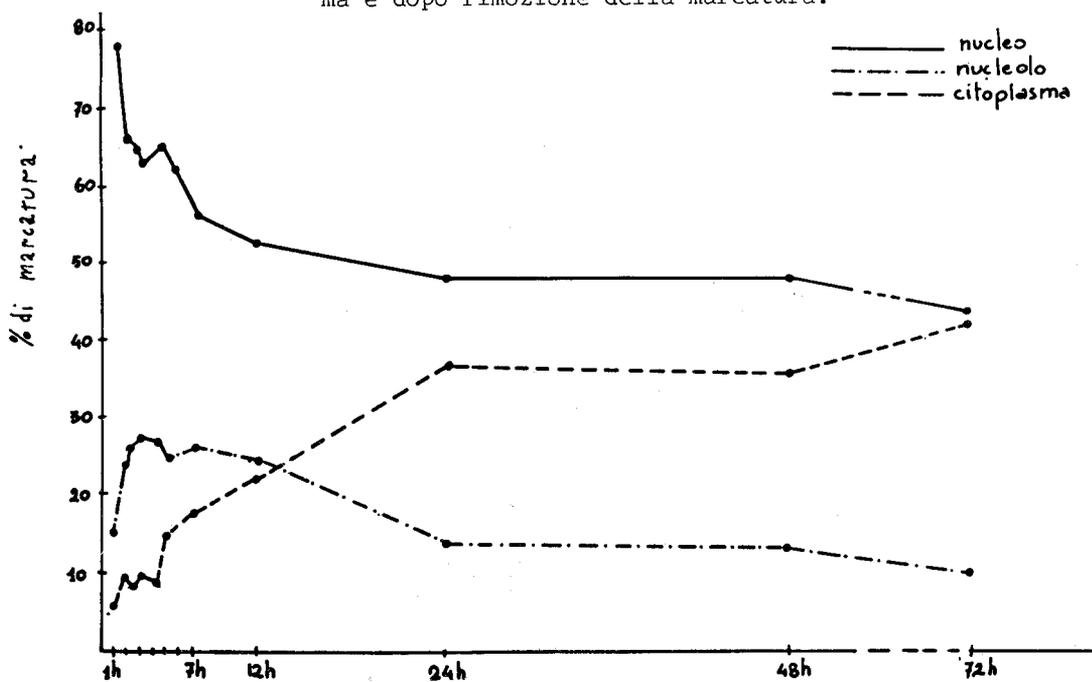
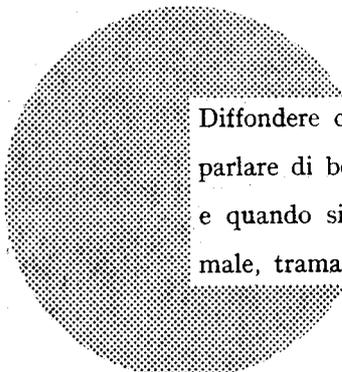


Fig. 16 - Distribuzione relativa dell'incorporazione di Uridina- H_3 nel nucleo, nucleolo e citoplasma di cellule di leucemia acuta dopo marcatura polso in vivo.



Diffondere cognizioni equivale a diffondere benessere — intendo parlare di benessere generale e non già di ricchezza individuale — e quando si instaura il benessere va sempre più scomparendo il male, tramandatoci da un oscuro passato.

Alfred Nobel

UFFICI DI VENDITA

Tutte le relazioni Euratom si vendono nei seguenti uffici ai prezzi indicati a tergo della copertina (all'atto dell'ordinazione, indicare chiaramente il riferimento EUR e il titolo della relazione che figurano sulla copertina).

PRESSES ACADEMIQUES EUROPEENNES

98, Chaussée de Charleroi, Bruxelles 6

Banque de la Société Générale - Bruxelles
compte N° 964.558,

Banque Belgo Congolaise - Bruxelles
compte N° 2444.141,

Compte chèque postal - Bruxelles - N° 167.37,

Belgian American Bank and Trust Company - New York
compte No. 22.186,

Lloyds Bank (Europe) Ltd. - 10 Moorgate, London E.C.2,
Postcheckkonto - Köln - Nr. 160.861.

OFFICE CENTRAL DE VENTE DES PUBLICATIONS DES COMMUNAUTES EUROPEENNES

2, place de Metz, Luxembourg (Compte chèque postal N° 191-90)

BELGIQUE — BELGIË

MONITEUR BELGE
40-42, rue de Louvain - Bruxelles
BELGISCH STAATSBLED
Leuvenseweg 40-42 - Brussel

DEUTSCHLAND

BUNDESANZEIGER
Postfach - Köln 1

FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
26, rue Desaix - Paris 16^e

GRAND-DUCHE DE LUXEMBOURG

OFFICE CENTRAL DE VENTE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
9, rue Goethe - Luxembourg

ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO
Piazza G. Verdi, 10 - Roma

NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

EURATOM — C.I.D.
51-53, rue Belliard
Bruxelles (Belgique)