

## LAVORO ORIGINALE

# Alta frequenza di micronuclei spontanei osservati in linfociti di pazienti con sclerosi sistemica: risultati preliminari\*

## *The high frequency of spontaneous micronuclei observed in lymphocytes of systemic sclerosis patients: preliminary results*

G. Porciello, R. Scarpato<sup>1</sup>, F. Storino<sup>2</sup>, F. Cagetti<sup>1</sup>, R. Marcolongo, L. Migliore<sup>1</sup>, C. Ferri<sup>2</sup>, M. Galeazzi

Istituto di Reumatologia, Università di Siena. <sup>1</sup>Dip. Di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente e

<sup>2</sup>Istituto di Reumatologia, Università degli Studi di Pisa

### SUMMARY

**Objective:** aim of the study is to assess the presence of spontaneous chromosome damage in patients affected by limited (lSSc) or diffuse (dSSc) Systemic Sclerosis, using the micronucleus (MN) assay.

**Methods:** we evaluated MN frequency in cultured peripheral lymphocytes of 18 SSc and in a group of 20 healthy controls. Patients were also classified as ACA+, Scl70+, FAN+ according to the presence of the specific anti-nuclear antibodies. We also explored the hypothesis that the extent of cytogenetic alteration might be related to the severity of the pathological condition and/or to the immunological profile.

**Results:** compared to controls, the patient group as a whole showed significantly higher MN frequencies ( $10.8 \pm 4.5$  vs.  $27.8 \pm 13.7$ ,  $p < 0.001$ ). No correlation was found between spontaneous chromosome damage and severity of the disease, being MN frequency  $33.1 \pm 17.0$  and  $19.8 \pm 2.7$  in lSSc and dSSc, respectively. Interestingly, ACA+ subjects displayed the highest MN frequency ( $36.9 \pm 15.0$ ), as compared to patients with different antibody pattern (Scl70+, FAN+;  $19.7 \pm 8.2$ ).

**Conclusions:** our results confirm the presence of chromosomal damage in circulating lymphocytes of SSc patients and would suggest a key role of antibodies to the centromere in determining the observed cytogenetic anomalies.

Reumatismo, 2002; 54(1):36-39

### INTRODUZIONE

La Sclerodermia o Sclerosi Sistemica (ScS) è una malattia del connettivo caratterizzata da una progressiva fibrosi della cute e degli organi interni e dalla presenza, nel siero dei pazienti, di anticorpi antinucleari (ANA) (1). Sulla base dell'estensione della sclerosi cutanea la ScS si distingue in una forma limitata e una diffusa, caratterizzate da differenze clinico-evolutive e sierologiche (2). Nella maggior parte dei casi il fenomeno di Raynaud (FR) rappresenta il sintomo d'esordio della ScS ed è spesso caratterizzato dalla presenza di anticorpi anti-nucleo e/o da specifiche alterazioni capillaroscopiche periungueali (FR secondario) (3, 4). Di-

versi studi hanno rilevato la presenza di elevati livelli spontanei od indotti di anomalie citogenetiche nei linfociti circolanti di pazienti affetti da ScS (5, 6). Per quanto riguarda il FR, invece, le evidenze circa un aumento di alterazioni a livello cromosomico sono, al momento, ancora piuttosto limitate (7, 8). Oltre al ritrovamento di un fattore clastogeno nel plasma di questi pazienti (9, 10), anche la presenza di un diverso profilo anticorpale potrebbe rendere conto, almeno in parte, delle anomalie cromosomiche rilevate nei linfociti dei soggetti con ScS. Lo scopo del presente lavoro, pertanto, è stato quello di verificare la presenza di danni cromosomici spontanei utilizzando il test del micronucleo (MN) in colture di linfociti periferici (11) di soggetti affetti da Sclerosi Sistemica (diffusa e limitata). Questa metodica consente la contemporanea valutazione di eventi di rottura e perdita cromosomica. Infatti, sia frammenti cromosomici privi del centromero, sia cromosomi interi in ritardo migratorio durante l'anafase, non riuscendo ad essere in-

\*Lavoro premiato al XXXVII Congresso SIR di Milano, 2000

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Giovanni Porciello, Istituto di Reumatologia Policlinico  
Le Scotte, viale Bracci 1, 53100 Siena

globati nei due nuclei di nuova formazione, sono in grado di formare micronuclei. È stata anche valutata l'ipotesi che l'estensione del danno citogenetico potesse essere proporzionale alla gravità della malattia od associato alla presenza di una specifica classe di autoanticorpi.

## PAZIENTI E METODI

Sono state studiate le alterazioni cromosomiche di 18 pazienti affetti da Sclerosi Sistemica (17 F e 1 M, età media  $57.1 \pm 10.7$  anni), distinta in forma limitata (9 ScSl) e diffusa (9 dScSd) secondo i criteri di Le Roy (2). La malattia si presentava più grave nei pazienti con forma diffusa essendo presente un maggior impegno d'organo (5 interstizio-patie polmonari di cui 3 complicate da ipertensione polmonare secondaria, 3 aritmie cardiache ventricolari, 1 insufficienza renale cronica). Nel gruppo con forma limitata l'impegno d'organo era caratterizzato dall'esofagopatia in 5 pazienti, da un'aritmia cardiaca sopraventricolare in 4; nessuno era affetto da fibrosi e/o ipertensione polmonare. Ogni paziente è stato poi caratterizzato sotto il profilo anticorpale ed assegnato ad una delle seguenti classi in base alla positività: ACA+ (9 ScS), Scl70+ (5 ScS), ANA+ tipo nucleolare (4 ScS). Il gruppo di controllo era composto da 20 soggetti sani appaiati per sesso (19 F ed 1 M) ed età (età media:  $51.3 \pm 9.9$  anni).

I MN sono masserelle rotondegianti di cromatina organizzate come piccoli nuclei accessori visibili nel citoplasma di cellule interfasiche che hanno compiuto un ciclo di divisione. Il trattamento delle colture con citocalasina B blocca la citodieresi delle cellule in mitosi garantendone un facile riconoscimento per il classico aspetto binucleato che esse assumono. Di ogni soggetto campionato venivano allestite due colture di sangue intero in terreno contenente fitoemoagglutinina ed incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 72 ore. Alla 44 ora veniva aggiunta la citocalasina B. Il recupero delle cellule veniva effettuato in accordo alla metodica classica (12). Per ogni individuo, la frequenza di MN veniva espressa come numero di cellule micronucleate (contenenti 1 o più MN) per 1000 linfociti binucleati su di un totale di 2000 cellule lette. Differenze nei livelli spontanei di MN sia tra pazienti e controlli sia tra soggetti con forma clinica e profilo anticorpale diversi sono state valutate mediante analisi della varianza assumendo come significativi valori di  $p < 0.05$ .

**Tabella I** - Risultati delle analisi di danno cromosomico (test del MN) in linfociti periferici di soggetti con Sclerosi Sistemica limitata (ScSl) e diffusa (ScSd).

	No. soggetti	Frequenza MN (‰) Media $\pm$ D.S.
Soggetti (ScS)	18	$27.8 \pm 13.7^a$
Controlli	20	$10.8 \pm 4.5$
Soggetti ScSl	12	$33.1 \pm 17.0^b$
Soggetti ScSd	6	$19.8 \pm 2.7^c$
Soggetti ACA+	9	$36.9 \pm 15.0^d$
Soggetti ACA- (Scl70+, FAN+)	9	$19.7 \pm 8.2$

<sup>a</sup> Significativamente differente dal controllo ( $p < 0.001$ , analisi della varianza).  
<sup>b,c</sup> Significativamente differente dal controllo ( $p < 0.001$ , analisi della varianza).  
<sup>d</sup> Significativamente differente dai soggetti ACA- ( $p < 0.005$ , analisi della varianza).

## RISULTATI

La tabella I riporta i risultati dell'analisi citogenetica effettuata nei linfociti circolanti dei pazienti e dei controlli. La frequenza media di cellule micronucleate rilevata nel gruppo dei pazienti era di  $27.8 \pm 13.7$ ; tale valore risultava significativamente più elevato ( $p < 0.001$ ) rispetto a quello osservato nei controlli sani ( $10.8 \pm 4.5$ ). I livelli medi spontanei di MN andavano da  $19.8 \pm 2.7$  a  $33.1 \pm 17.0$  per i pazienti affetti, rispettivamente, dalla forma diffusa e limitata; le differenze osservate rispetto ai valori dei controlli assumevano significatività statistica in tutte e due le forme di malattia considerate ( $p < 0.001$ ). Nella parte terminale della tabella I vengono riportati i valori dei livelli basali di danno cromosomico in rapporto al profilo immunologico. I soggetti caratterizzati da anticorpi anti-centromero (ACA+) mostrano una frequenza di MN di  $36.9 \pm 15.0$ , significativamente più elevata ( $p < 0.005$ ) rispetto a quella dei pazienti con diverso pattern anticorpale (Scl70+, ANA+nucleolare:  $19.7 \pm 8.2$ ).

## DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta i risultati dell'analisi di danno cromosomico eseguita su linfociti coltivati di sangue periferico di un gruppo di 18 pazienti affetti

da Sclerosi Sistemica. Il livello di alterazioni cromosomiche, espresse come frequenza di cellule micronucleate, è risultato, nel complesso, significativamente più elevato rispetto ai controlli sani. Non è stata riscontrata alcuna correlazione, invece, tra gravità del quadro clinico dei pazienti affetti da ScS ed entità del danno citogenetico spontaneo. Infatti, i soggetti che presentavano un minor impegno d'organo (ScSI) mostravano, in media, frequenze di MN più elevate rispetto ai pazienti per i quali era stata diagnosticata la forma diffusa, in cui l'impegno d'organo era presente in modo più grave e diffuso. Considerando inoltre che quest'ultimo gruppo, con impegno clinico più grave e con minor frequenza di micronuclei, era anche quello in cui più frequentemente venivano impiegati farmaci con potenziale effetto clastogeno (ciclofosfamide, griseofulvina, D-penicillamina), possiamo ragionevolmente escludere una relazione tra terapia farmacologica e danno cromosomico. L'analisi dei dati in funzione del profilo immunologico indicherebbe che, sebbene la casistica sia ancora piuttosto limitata, i livelli spontanei più alti di MN caratterizzano i soggetti con anticorpi anti-centromero.

Il nostro studio conferma i risultati di lavori precedenti su pazienti affetti da ScS nei quali venivano riscontrati elevati livelli di rotture e riarrangiamenti cromosomici, di aneuploidia o di scambi tra cromatidi fratelli (13, 14, 15). L'osservazione di questo danno cromosomico è stata associata alla presenza, nel plasma dei pazienti, di un fattore clastogeno. Sono state identificate alcune classi di sostanze tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa, diverse citochine ed altre molecole ossidanti coinvolte nella perossidazione lipidica, tutte con provata attività clastogena (9, 10). È probabile che

l'induzione del danno cromosomico avvenga tramite la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno altamente reattive (16-17). Altri studi hanno cercato di stabilire quale fosse il ruolo svolto dal pattern anticorpale nel determinare l'insorgenza di anomalie cromosomiche nei pazienti affetti da patologie autoimmunitarie del connettivo. Jabs et al. hanno osservato incrementi significativi delle frequenze di aneuploidia in colture di linfociti di pazienti sclerodermici che presentavano anticorpi contro il centromero (18), mentre pazienti con anticorpi anti-topoisomerasi I mostravano una prevalenza di anomalie cromosomiche dovute ad eventi clastogeni (6). Al contrario, altri Autori non hanno trovato differenze significative tra pazienti ACA+ e ACA- nei livelli spontanei di anomalie cromosomiche strutturali e numeriche (19). A questo proposito, l'inattivazione del centromero o l'alterazione dell'attività della topoisomerasi I, enzima coinvolto nelle fasi iniziali della replicazione e riparazione del DNA, da parte delle due classi di anticorpi, potrebbero infatti causare, rispettivamente, una non corretta migrazione dei cromosomi o la formazione di rotture nell'elica del DNA. Tuttavia, allo stato attuale delle evidenze sperimentali, non è ancora possibile chiarire se ed in che modo la presenza di determinati classi di anticorpi possa interagire con quelle sostanze (fattore clastogeno) la cui presenza nel plasma dei pazienti è causa di alterazioni cromosomiche. Alla luce di queste considerazioni, un interessante sviluppo del presente lavoro sarebbe quello di effettuare un'analisi in fluorescenza dei MN, negli stessi pazienti, usando una sonda specifica per il centromero di tutti i cromosomi. In questo modo saremmo in grado di comprendere meglio il meccanismo alla ba-

## RIASSUNTO

Scopo dello studio è verificare la presenza di danni cromosomici spontanei, espressi come frequenza di micronuclei (MN), in linfociti periferici di 18 pazienti affetti da Sclerosi Sistemica (ScS) nelle sue varianti limitata e diffusa. I pazienti sono stati suddivisi in soggetti con anticorpi anti-centromero (ACA+), anti-topoisomerasi I (ScI70+) e anti-nucleolo (FAN+ nucleolare). È stata quindi valutata l'ipotesi che l'estensione del danno citogenetico potesse essere proporzionale alla gravità della malattia e/od associato al pattern anticorpale. I risultati indicano che i pazienti mostrano una frequenza di MN significativamente maggiore rispetto a quella dei controlli (ScS  $27.8 \pm 13.7$  vs  $10.8 \pm 4.5$ ). Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra gravità del quadro clinico ed entità del danno citogenetico spontaneo. Un'analisi dei dati in funzione dello stato anticorpale sembrerebbe indicare come le frequenze di MN maggiori caratterizzino i soggetti ACA+.

**Parole chiave:** Sclerosi Sistemica, fenomeno di Raynaud, fattori clastogeni, danni cromosomici, micronuclei nei linfociti umani.

**Key words:** *Systemic Sclerosis, Raynaud phenomenon, clastogenic factors, chromosomal breakage, human lymphocyte micronuclei.*

se della formazione dei MN e verificare l'ipotesi di una associazione tra specifici autoanticorpi e tipo di danno cromosomico.

In conclusione il presente studio conferma la presenza di elevati livelli di anomalie cromosomiche osservate in cellule periferiche di soggetti affetti da Sclerosi Sistemica. Tali alterazioni, pur rappresentandone un pattern ricorrente, non sembrano essere correlate alla gravità del quadro clinico ma piuttosto al profilo immunologico. In particolare, gli anticorpi anti-centromero sembrano giocare un certo ruolo nell'estensione del danno citogenetico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of Systemic sclerosis (Scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
2. Le Roy EC, Black CM, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA et al. Scleroderma (systemic sclerosis). Classification, subset and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-5.
3. Kallenberg CG. Early detection of connective tissue disease in patients with Raynaud's phenomenon. *Reum Dis Clin North Am* 1990; 16: 11-30.
4. Hirschl M, Kundi M. Initial prevalence and incidence of secondary Raynaud's phenomenon in patients with Raynaud's symptomatology. *J Rheumatol* 1996; 23: 302-9.
5. Pan SF, Rodnan GP, Deutsch M, Wald N. Chromosomal abnormalities in progressive Systemic sclerosis (Scleroderma) with consideration of radiation effects. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 300-8.
6. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic Lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis* 1999; 14: 227-31.
7. Emerit I. Chromosomal breakage in Systemic sclerosis and related disorders. *Dermatologica* 1976; 153: 145-56.
8. Galeazzi M, Anichini C, Morozzi G, Bellisai F, Puddu P, Marcolongo R. Chromosomal abnormalities in peripheral lymphocytes from idiopathic Raynaud's phenomenon patients. *Clin Rheumatol* 1996; 15: 418-9.
9. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possibile role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 99-109.
10. Emerit I, Philipe P, Meunier P, Auclair C, Freitas J, Deroussent A et al. Clastogenic activity in the plasma of scleroderma patients: a biomarker of oxidative stress. *Dermatology* 1997; 194: 140-6.
11. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
12. Scarpato R, Landini E, Migliore L. Acrocentric chromosome frequency in spontaneous human lymphocyte micronuclei, evaluated by dual-colour hybridisation, is neither sex-nor age-related. *Mutat Res* 1996; 372: 195-204.
13. Emerit I, Marteau R. Chromosome studies in 14 patients with Disseminated Sclerosis. *Humangenetik* 1971; 13: 25-33.
14. Sherer GK, Jackson BB, Leroy EC. Chromosome breakage and sister chromatid exchange frequencies in Scleroderma. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1409-13.
15. Wolff DJ, Needleman BW, Wasserman SS, Schwartz S. Spontaneous and clastogen induced chromosomal breakage in Scleroderma. *J Rheumatol* 1991; 18: 837-40.
16. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 387: 147-63.
17. Kawanishi S, Hiraku Y, and Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 2000; 488: 65-76.
18. Jabs EW, Tuck-Muller CM, Anhalt GJ, Earnshaw W, Wise RA, Wigley F. Cytogenetic survey in Systemic sclerosis: correlation of aneuploidy with the presence of anticentromere antibodies. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63: 169-75.
19. Powell FC, Schroeter AL, Winkelmann RK, Dewald GW. Chromosome studies in Scleroderma with Consideration of anticentromere antibody status and assessment of possible in vitro clastogenic activity. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 414-18.