

I 17-Chetosteroidi Totali nei Gemelli

L. Gedda, T. Dati

Premessa

In una recente indagine gemellare sul controllo genetico della glutationemia, Gedda e Dati (1965) hanno confermato l'esistenza del fenomeno della « *isoglutationemia gemellare* » (Gedda, 1951), osservando uno scarto intracoppia dei valori del glutatione ematico nella serie di coppie MZ notevolmente maggiore di quello ottenuto nella serie di coppie DZ.

Con il presente lavoro, ci siamo proposti un'indagine orientativa sul comportamento dei 17-chetosteroidi totali urinari in coppie gemellari di sesso maschile e femminile e di età variabile dai 9 ai 30 anni, anche per scoprire le eventuali differenze quantitative esistenti tra un gruppo di MZ ed uno di DZ.

Materiale e metodi

Nella sperimentazione, abbiamo seguito il metodo di Dreker *et al.* (1952), al quale è stata applicata una correzione per la eventuale presenza di cromogeni nell'estratto finale, in maniera da garantire il risultato da possibili interferenze non completamente eliminate dal trattamento standard con pasticche di idrossido di sodio. Tale correzione è stata eseguita misurando l'assorbenza dell'estratto, trattato con il reattivo di Zimmermann, alle due lunghezze d'onda di 420 e 520 m μ , secondo il giusto criterio indicato da Talbot *et al.* (1942) nel passato, ma non sempre eseguito dai vari AA.

Si prelevano 10 ml di urina delle 24 ore (dopo aver misurato il volume totale) in una beutina a tappo smeriglio da 30 ml.

Si aggiungono poi 3 ml di HCl conc. e si scalda a 100 °C per 10 min. (per ciascuna serie di determinazioni si esegue una prova in bianco, sostituendo 10 ml di acqua all'urina e seguendo tutto il procedimento).

Dopo raffreddamento, si aggiungono ai campioni 10 ml di dicloroetilene, si tappa e si dibatte per 15 min.

Successivamente si centrifuga, si aspira la fase acquosa soprastante (che viene eliminata) e si filtra su carta in beutina da 20 ml.

Si aggiungono 20 pasticche di NaOH, si tappa, si dibatte per altri 15 min. e si filtra su carta.

Si pipettano 2 ml della soluzione dicloroetilenica in tubo da saggio e si portano a secco su bagno-maria sotto leggera aspirazione, eliminando completamente il solvente.

Dopo raffreddamento si aggiungono 0,4 ml di metadinitrobenzene 1% e si agita bene per sciogliere il residuo secco. Si aggiungono poi 0,3 ml di KOH 8 N, si agita e si pone in bagno ad acqua a 25° C.

Si portano a secco in tubo da saggio cm. 0,4 di una soluzione standard di deidroisoandrosterone (50 mg/litro) e si aggiunge il reattivo di Zimmermann.

Dopo esattamente 25 min. si aggiungono 2 ml di alcool etilico al 75%.

Si agita bene; si legge allo spettrofotometro a 525 m μ lo standard contro il bianco del reattivo di Zimmermann e successivamente il campione contro il bianco di acqua. Con opportune proporzioni, si risale alla quantità di 17-chetosteroidi delle 24 ore, espressi come deidroisoandrosterone.

In 18 coppie di gemelli assistiti dal nostro Istituto, selezionati tra soggetti esenti da malattie in atto capaci di influenzare la steroidogenesi, e nei quali era stata già accertata la diagnosi di zigotismo, abbiamo dosato il tasso dei 17-chetosteroidi totali nelle urine. Trattandosi di persone ormonicamente sane e quindi non soggette a variazioni patologiche, per ottenere le migliori condizioni tecniche, dati gli scarti minimi, e per poter avere un valido confronto dei valori ottenuti, abbiamo eseguito più determinazioni dei 17-chetosteroidi (i dati riportati si riferiscono alla media di almeno due dosaggi distinti) contemporaneamente nei due gemelli ed appena terminato di raccogliere le urine delle 24 ore, tenute in frigorifero durante il prelievo.

Risultati*

MZ ♂♂

Caso n. 1 [637]

M. ANGELO ed ENRICO, di anni 11. (10-4-65).

ANGELO: quantità delle urine: 504 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 0,84/24 h.

ENRICO: quantità delle urine: 672 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 1,41/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,57

Caso n. 2 [639]

R. RENATO e ROBERTO, di anni 13. (15-5-65).

RENATO: quantità delle urine: 440 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 1,10/24 h.

ROBERTO: quantità delle urine: 480 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 1,45/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,35

* I numeri fra parentesi quadra rappresentano il n° d'ordine delle singole coppie gemellari nella gemelloteca dell'Istituto Mendel di Roma.

Caso n. 3 [6000]

M. ANTONIO e GIORGIO, di anni 15. (20-5-65).

ANTONIO: quantità delle urine: 660 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 2,59/24 h.

GIORGIO: quantità delle urine: 820 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 2,65/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,06

Caso n. 4 [8603]

M. FRANCO e GIOVANNI, di anni 16. (20-4-65).

FRANCO: quantità delle urine: 972 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 8,61/24 h.

GIOVANNI: quantità delle urine: 820 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 7,21/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 1,40

Caso n. 5 [126]

Z. SANDRO e STEFANO, di anni 16. (10-5-65).

SANDRO: quantità delle urine 1260 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 15,49/24 h.

STEFANO: quantità delle urine 1270 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 17,50/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 2,01

Caso n. 6 [5235]

F. BRUNO e MAURIZIO, di anni 20. (25-4-65).

BRUNO: quantità delle urine 780 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 13,19/24 h.

MAURIZIO: quantità delle urine 740 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 14,35/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 1,16

Caso n. 7 [182]

M. GIORGIO e VITTORIO, di anni 25. (22-5-65).

GIORGIO: quantità delle urine: 1580 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 17,11/24 h.

VITTORIO: quantità delle urine: 1048 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 15,11/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 2,00

Caso n. 8 [6437]

V. MATTEO e NINO, di anni 30. (23-5-65).

MATTEO: quantità delle urine: 850 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 7,49/24 h.

NINO: quantità delle urine: 988 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 6,93/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,56

DZ ♂♂

Caso n. 9 [9836]

R. MARINO e GIOVANNI, di anni 9. (5-4-65).

MARINO: affetto da criptorchidismo inguinale bilaterale.

Quantità delle urine: 394 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 2,20/24 h.
 GIOVANNI: quantità delle urine: 538 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 0,92/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi tra i due gemelli: mg 1,28

Caso n. 10 [161]

G. MAURIZIO e MAURO, di anni 14. (1-6-65).

MAURIZIO: Sviluppo genitale inferiore a quello del cogemello.

Quantità delle urine: 856 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 2,55/24 h.
 MAURO: quantità delle urine: 1336 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 3,19/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,64

Caso n. 11 [5526]

G. FRANCO e NATALE, di anni 19. (26-4-65).

FRANCO: quantità delle urine: 908 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 10,45/24 h.
 NATALE: quantità delle urine: 572 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 7,92/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 2,53

Caso n. 12 [40]

D. LORENZO e RENATO, di anni 27. (26-5-65).

LORENZO: quantità delle urine: 380 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 6,08/24 h.
 RENATO: quantità delle urine: 712 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 5,22/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi dei due gemelli: mg 0,86

MZ ♀♀

Caso n. 13 [801]

M. CARLA e PAOLA, di anni 18. (7-4-65).

CARLA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 30-3-65.

Splenectomia per anemia emolitica il 7-4-64.

Quantità delle urine: 784 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 4,08/24 h.
 PAOLA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 27-3-65.

Splenectomia per anemia emolitica il 7-4-64.

Quantità delle urine: 676 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 5,58/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 1,50

Caso n. 14 [1055]

C. ANNA MARIA e CLELIA, di anni 19. (14-4-65).

ANNA MARIA: menarca a 15 anni; mestruazioni regolari; ultima il 15-3-65.

Quantità delle urine: 872 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 4,41/24 h.
 CLELIA: menarca a 15 anni; mestruazioni regolari; ultima il 22-5-65.

Quantità delle urine: 756 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 6,03/24 h.
 Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 1,62

Caso n. 15 [259]

T. MILVIA ed IVA, di anni 22. (29-3-65).

MILVIA: menarca a 12 anni; mestruazioni regolari; ultima il 18-3-65.

Quantità delle urine: 696 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 18,07/24 h.

IVA: menarca a 12 anni; mestruazioni regolari; ultima il 6-3-65.

Quantità delle urine: 884 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 14,45/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 3,62

DZ ♀♀

Caso n. 16 [10200]

Z. ANNA e SIMONETTA, di anni 17. (4-6-65).

ANNA: menarca a 9 anni; mestruazioni regolari; ultima il 25-3-65.

Quantità delle urine: 1372 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 8,46/24 h.

SIMONETTA: menarca a 9 anni; mestruazioni regolari; ultima il 20-3-65.

Quantità delle urine: 1462 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 12,48/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 3,82

Caso n. 17 [167]

R. ANNA e SILVIA, di anni 17. (7-4-65).

ANNA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 23-3-65.

Quantità delle urine: 460 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 5,74/24 h.

SILVIA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 17-3-65.

Quantità delle urine: 1160 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 6,32/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 0,58

Caso n. 18 [203]

F. LIANA e LOREDANA, di anni 21. (15-4-65).

LIANA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 28-3-65.

Quantità delle urine: 840 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 15,14/24 h.

LOREDANA: menarca a 13 anni; mestruazioni regolari; ultima il 10-3-65.

Quantità delle urine: 476 ml/24 h. 17-chetosteroidi: mg 8,11/24 h.

Differenza del tasso dei 17-chetosteroidi delle due gemelle: mg 7,03

Discussione e conclusioni

I risultati della ricerca offrono la possibilità di tre indagini. La prima, rivolta ad accertare l'esistenza di un'eventuale determinazione ereditaria nella sintesi dei 17-chetosteroidi urinari, mediante il metodo gemellare che appunto a tal fine fu prescelto.

La seconda, rivolta ad utilizzare i dati raccolti come dati individuali, che permettono di avanzare delle ipotesi intorno alla normale produzione dei 17-chetosteroidi urinari rispetto alle fasi dell'età evolutiva a cui appartiene il nostro materiale di studio.

La terza, infine, rivolta a stabilire un confronto quanto meno indicativo sul comportamento differenziale dei 17-chetosteroidi urinari in soggetti dei due sessi.

Per quanto riguarda la prima indagine, il metodo gemellare consiglia l'ordinamento del materiale in due gruppi a seconda che le coppie considerate siano MZ o DZ. Per ovvie ragioni di simmetria della distribuzione dell'esperimento, essendo state scartate le coppie DZ ♂♀, le coppie DZ a cui si accenna sono ♂♂ o ♀♀. La classificazione delle coppie gemellari studiate a seconda dello zigotismo è stata realizzata sulla base della diagnosi policaratteriale, attribuendo alla classe DZ le coppie i cui membri differivano per almeno uno dei caratteri ambientostabili che vengono di norma rilevati nei protocolli della gemelloteca dell'Istituto Mendel.

I due gruppi sono risultati composti come indicato nella prima colonna della Tab. 1 nella quale vengono riportati per ciascun gruppo anche i seguenti valori dei 17-chetosteroidi urinari:

- A) la media dei valori dei primi-nati;
- B) la media dei valori dei secondi-nati;
- C) la media dei valori assoluti delle differenze intracoppia;
- D) la media, valutata in percentuale, dei rapporti fra le differenze ed i valori medi delle singole coppie.

Tab. 1

	N	A	B	C	D %
MZ	11	7,58	8,02	1,35	10,29
DZ	7	6,56	6,97	2,42	10,26

La Tab. 1, essendo riferita ai valori del materiale gemellare in quanto tale, richiede di essere integrata da altre tabelle che riferiscono l'analisi del materiale dal punto di vista dei valori individuali.

Ovviamente, questo utilizzo del materiale per evitare l'interferenza di casualità genetiche, avviene considerando i dati di un solo gemello, preso a caso, per ciascuna coppia. Pertanto, nella Tab. 2 vengono rapportati i valori dei soggetti di età inferiore o superiore ai 15 anni, indipendentemente dal sesso.

Nella Tab. 3, infine, vengono raffrontati i valori dei soggetti maschili con quelli dei soggetti femminili.

In questa elaborazione, per rendere omogenei i gruppi di confronto, sono stati esclusi i soggetti con età inferiore ai 15 anni perchè presenti nel solo gruppo maschile.

Tab. 2

Età	N	Valore medio	Scarto quadratico
≤ 15 anni	5	1,60	0,80
> 15 anni	13	8,79	3,80

Tab. 3 (riferita a soggetti in età superiore ai 15 anni)

Sesso	N	Valore medio	Scarto quadratico
♂	7	10,15	3,97
♀	6	7,21	2,87

La disposizione sperimentale illustrata ed i risultati obiettivi raccolti consentono di discutere i vari problemi proposti all'inizio ed anzitutto quello dell'incidenza dell'eredità nel metabolismo dei 17-chetosteroidi urinari.

Tale assunto può essere apportato secondo la metodologia gemellare ricorrendo alla nota formula di Holzinger:

$$I_H = \frac{\bar{X} \text{ DZ} - \bar{X} \text{ MZ}}{\bar{X} \text{ DZ}} 100$$

Risolvendo con i nostri dati la formula, cioè sottraendo dai valori medi delle coppie DZ il valore medio delle coppie MZ e dividendo la differenza per il valore medio delle coppie DZ si ottiene un indice che esprime il valore che può essere attribuito al condizionamento ereditario (I_H).

L'indice che nel caso si ottiene è pari a 43,65% e suggerisce che dei determinanti ereditari esercitano una funzione di controllo causale nella sintesi delle sostanze allo studio, che quasi raggiunge la metà del volume complessivo dei fattori causali.

Ovviamente si tratta di una valutazione di massima che in base alla presente analisi non è possibile approfondire ulteriormente e cioè confrontare con meccanismi ereditari noti oppure con successioni fenogenetiche accertate.

Qualunque siano, per altro, questi particolari del meccanismo genetico in atto, importa stabilire che il metabolismo dei 17-chetosteroidi urinari non è soltanto un epifenomeno di condizioni paratipiche, ma in larga misura debitore del genotipo individuale.

Di conseguenza, nella valutazione del fenomeno in sede di Genetica Medica e specialmente di Genetica Clinica, cioè nei confronti del singolo ammalato, si rende necessario tener conto di una variabilità individuale di origine genetica.

Per quanto attiene al secondo problema, cioè ad un rapporto che potrebbe essere evidenziato sulla base dei nostri dati fra età ed escrezione dei 17-chetosteroidi, i risultati esposti nella Tab. 2 ne offrono una dimostrazione. Assumendo come traguardo medio differenziale il 15° anno di età e tenendo conto di tutte le coppie esaminate, si ottiene un valore medio corrispondente a mg. 1.60 per i soggetti sotto ai 16 anni, e rispettivamente a mg. 8.79 per i soggetti dai 16 anni in su.

L'analisi di questa variabilità correlata all'età fu da noi apprezzata anche limitando il confronto alle coppie bimaschili in età variabile fra i 9 e i 30 anni. In tal modo abbiamo potuto constatare che intorno al 16° anno di età si verifica un caratteristico, cioè netto e cospicuo, aumento del tasso che porta i 17-chetosteroidi da un livello minimo di mg. 1,84 agli 11 anni e di mg. 2,65 ai 15 anni, ad un livello massimo di mg. 17,50 ai 16 anni.

Si ritiene che questo brusco incremento dell'escrezione debba essere rapportato, almeno in parte, all'ingresso funzionale relativamente nuovo delle cellule interstiziali di Leydig.

Come già notato, in questa direzione i gemelli vengono considerati e utilizzati come individui singoli, cioè a prescindere dalla loro qualità gemellare. Il risultato conseguito appare interessante perché nel *continuum* della funzione metabolica ha potuto essere evidenziato un'acme dell'escrezione che, verosimilmente, è in rapporto con l'ingresso in funzione o con l'accresciuta funzione di qualche batteria di geni per un'attivazione legata al ciclo biologico individuale.

In ordine al terzo problema, impostato sul confronto fra soggetti maschili e femminili oltre il 15° anno di età, si conferma anche sul nostro materiale che l'escrezione media dei 17-chetosteroidi urinari nei soggetti maschili (mg. 10,15%) è nettamente superiore all'escrezione media dei soggetti femminili (mg. 7,21%). Questo risultato si accorda con quanto risulta dalla bibliografia sulla maggiore funzionalità del cortico-surrene nei soggetti maschili e sul cospicuo apporto steroideo delle gonadi maschili.

Riassunto

Gli AA. hanno rilevato il tasso dei 17-chetosteroidi urinari totali nei soggetti dei due sessi di 18 coppie gemellari delle quali 8 MZ ♂♂, 3 MZ ♀♀, 4 DZ ♂♂ e 3 DZ ♀♀. Sulla base di questo materiale ha potuto essere dimostrato: a) la presenza di un controllo ereditario nel metabolismo dei 17-chetosteroidi urinari per un quantum del 43,65%; b) una correlazione della secrezione dei 17-chetosteroidi urinari con l'età; c) una differenziazione quantitativa del fenomeno nei due sessi.

Bibliografia

- DREKTER I. J. *et al.* (1952) The determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **12**: 55.
GEDDA L. (1951). Lo Studio dei Gemelli. *Ed. Orizzonte Medico*, Roma.
— DATI T. (1965). Indagine gemellare sul controllo genetico della glutationemia.
TALBOT N. B. *et al.* (1942). Elimination of errors in the colorimetric assay of neutral urinary 17-ketosteroids by means of a color correction equation. *J. Biol. Chem.*, **143**: 211.

SUMMARY

The rate of the total urinary 17-ketosteroids has been studied in twins of the two sexes (8 ♂♂ and 3 ♀♀ MZ, and 4 ♂♂ and 3 ♀♀ DZ, for a total of 18 twin pairs).

On the basis of this material it could be shown: (i) that the metabolism of the urinary 17-ketosteroids is genetically controlled for a *quantum* of 43.65%; (ii) that the secretion of the urinary 17-ketosteroids is correlated with age, and (iii) that a quantitative differentiation of the phenomenon exists in the two sexes.

RÉSUMÉ

Le taux des 17-kétostéroïdes urinaires totaux a été étudié chez des jumeaux des deux sexes (18 couples: 8 ♂♂ et 3 ♀♀ MZ, et 4 ♂♂ et 3 ♀♀ DZ).

Sur la base des résultats obtenus, il est possible d'affirmer:

1. que le métabolisme des 17-kétostéroïdes urinaires est sous le contrôle héréditaire pour un *quantum* de 43,65%;
2. que la sécrétion des 17-kétostéroïdes urinaires est en corrélation avec l'âge;
3. qu'il existe une différenciation quantitative du phénomène chez les deux sexes.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei den Paarlingen von 18 Zwillingspaaren beiderlei Geschlechts (8 EZ ♂♂, 3 EZ ♀♀, 4 ZZ ♂♂, 3 ZZ ♀♀) bestimmten Verf. den Gehalt an totalen 17-Ketosteroiden im Urin. Daraus ergab sich folgendes:

- a) der Abbau der 17-Ketosteroide im Urin ist zu einem Quantum von 43,65% erbbedingt;
- b) es besteht eine Korrelation zwischen der Ausscheidung der 17-Ketosteroide und dem Alter.
- c) das Phänomen unterscheidet sich quantitativ bei den beiden Geschlechtern.