

49

**PAOLO POZZILLI
RAFFAELLA BUZZETTI
ENRICA PROCACCINI
ALBERTO SIGNORE**

L'immunologia del diabete mellito

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

 **MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51

49

**PAOLO POZZILLI
RAFFAELLA BUZZETTI*
ENRICA PROCACCINI
ALBERTO SIGNORE**

L'immunologia del diabete mellito

Endocrinologia (I), II Clinica Medica, *Genetica Umana,
Dipartimento di Medicina Sperimentale,
Università di Roma "La Sapienza"

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

 **MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 80.80.51

Editoriale

La scoperta del ruolo chiave che viene giocato da parte del sistema immune nella patogenesi del diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) apre nuove possibilità per una diagnosi precoce, per una diagnosi cioè che preceda la comparsa delle manifestazioni cliniche del diabete, e quindi anche per una terapia che prevenga la distruzione della massa β cellulare.

Questo volume vuole proprio analizzare i recentissimi sviluppi in questo settore. Così, ad esempio, benchè i determinanti DR determinabili sierologicamente sono i marcatori più facilmente utilizzati, dati del tutto recenti, che si basano sul polimorfismo di lunghezza dei frammenti ottenuti con gli enzimi di restrizione (RFLP), indicano che nell'IDDM i determinanti DQ possono giocare un ruolo fondamentale nel determinare la suscettibilità o la resistenza a questa malattia ed in particolare la presenza dell'acido aspartico in posizione 57 della catena DQ β 1 conferisce resistenza. Ampio spazio trova anche la trattazione dei più moderni aspetti della immunoterapia dell'IDDM e per questo abbiamo un gruppo di ricerca che è un vero punto di riferimento a livello nazionale ed internazionale.

Il dottor Paolo Pozzilli, laureatosi presso l'Università di Roma La Sapienza, specialista in Endocrinologia, è attualmente Aiuto del Professor Andreani presso la Divisione di Malattie Metaboliche ed Endocrinologia dell'Istituto di II Clinica Medica-Università di Roma La Sapienza. Fin dal 1979 egli collabora con il Dipartimento di Diabetologia e di Immunogenetica dell'Ospedale St Bartholomew's di Londra dove attualmente ricopre la carica di Senior Lecturer e dirige un Laboratorio di Diabetologia Sperimentale. Nel corso dell'anno accademico 1989/90 è stato nominato professore di Diabetologia Sperimentale nell'ambito del programma Erasmus della CEE. La Sua ricerca è nota a livello internazionale, soprattutto per i contributi nella patogenesi del diabete insulino-dipendente e dell'immunoterapia dello stesso. Oltre ad essere socio di molte Società Scientifiche nazionali ed internazionali, ricopre la carica di coordinatore nazionale del gruppo di studio di immunologia ed immunoterapia del diabete della Società Italiana di Diabetologia nonché Segretario Generale dell'International Diabetes Immunotherapy Group. Titolare di progetti di ricerca del Ministero della Pubblica Istruzione, del C.N.R. e di contratti di ricerca bilaterali C.N.R. anglo-italiani, è autore di oltre 200 pubblicazioni su riviste internazionali.

La dottoressa Raffaella Buzzetti, specialista in Endocrinologia, è attualmente borsista del Ministero della Ricerca Scientifica e dell'Università presso il Department of Chemical Endocrinology del St Bartholomew's Hospital di Londra. Già titolare di Borsa di Studio dell'Accademia dei Lincei presso lo stesso Dipartimento ha poi proseguito le Sue indagini con una borsa di studio del C.N.R. compiendo originali osservazioni sulla

funzione endocrina delle cellule del sistema immunocompetente con particolare riguardo alla produzione di peptidi con funzioni immunoregolatorie. E' autrice di oltre quaranta pubblicazioni a livello nazionale ed internazionale.

La dottoressa Enrica Procaccini, laureatasi all'Università di Roma La Sapienza è attualmente specializzanda presso la II Scuola di Specializzazione di Endocrinologia e Malattie del Ricambio diretta dal Professor D. Andreani. Ha già svolto attività di ricerca nel settore dell'immunologia del diabete con particolare riguardo ai progetti di immunoterapia nei pazienti neodiagnosticati (IMDIAB I). Attualmente svolge attività di ricerca in modelli animali (topo NOD) ed è autrice di numerose pubblicazioni sull'argomento.

Il dottor Alberto Signore, si è laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Roma La Sapienza. Specializzatosi successivamente in Endocrinologia è specializzando attualmente in Medicina Nucleare. Dal 1983 collabora con il Dipartimento di Diabetologia ed Immunogenetica del St Bartholomew's Hospital a Londra. Svolge attività di ricerca nell'ambito del diabete di Tipo 1 e sui modelli animali (topo NOD); in particolare ha compiuto importanti studi sulla patogenesi del diabete di Tipo 1 e sullo sviluppo di nuove tecniche medico-nucleari per la diagnosi precoce dell'insulite. Attualmente è borsista della Juvenile Diabetes Foundation (USA) e sta svolgendo un corso di PhD in Immunologia presso l'Imperial Cancer Research Fund (ICRF-HTIG) a Londra. Vincitore di premi internazionali e socio di molte società scientifiche ha pubblicato oltre 80 lavori scientifici su riviste nazionali ed internazionali.

Sergio Rassa

Introduzione

L'immunologia ha rappresentato in quest'ultimo periodo la chiave interpretativa di molti fenomeni patogenetici ritenuti altrimenti oscuri o difficilmente comprensibili (1). Infatti, se molta patologia ha visto negli studi immunologici soltanto un'ipotesi di lavoro, per altre manifestazioni morbose questa disciplina ha rappresentato la base per comprenderne la patogenesi e quindi il punto di partenza per poter intervenire sulla progressione della malattia stessa. Le conoscenze acquisite in questi ultimi anni hanno in parte fatto luce sui rapporti intercorrenti tra il settore T (immunità cellulare), il settore B (immunità umorale) e sulle relazioni che si instaurano fra le cellule del sistema immunitario ed i determinanti antigenetici (sia quelli estranei, che quelli propri del sistema maggiore d'istocompatibilità HLA) durante la risposta immune. E' pur vero, peraltro, che siamo ancora lontani dall'aver ottenuto una risposta esauriente ai molti quesiti tuttora aperti anche se si stanno chiarendo molti aspetti di base che guidano le dinamiche della risposta immunitaria (2).

Immunologia ed autoimmunità

Molti fenomeni morbosi vedono alla base della loro patogenesi processi di tipo autoaggressivo, come testimoniato dalle alterazioni immunologiche che si instaurano nel corso della malattia e che spesso la precedono. Secondo i modelli classici, il presupposto di tali fenomeni è la rottura di un delicato equilibrio che regola la relazione tra sistema immunitario ed antigeni "self" (3). Sappiamo infatti che il sistema immunitario "impara" durante l'accrescimento embrionale a riconoscere i propri costituenti antigenici e quindi a sopprimere od eliminare i cloni cellulari potenzialmente autoaggressivi stabilendo uno stato di tolleranza nei confronti del "self". La rottura di tale equilibrio può venire a seguito di modificazioni delle molecole-antigene in conseguenza di insulti chimico-fisici, di infezioni virali, del legame con alcuni farmaci oppure per fenomeni di reattività crociata. In tutti questi casi si vengono quindi a creare le basi patogenetiche della malattia autoimmune e la malattia, a differenza di quanto avviene normalmente, produce anticorpi verso i propri costituenti antigenici e le reazioni antigeni e anticorpo divengono responsabili di lesioni specifiche (4).

Immunologia nella patogenesi del diabete insulino dipendente (tipo 1)

Secondo le più moderne e accreditate convinzioni scientifiche, il diabete insulino dipendente (tipo 1) viene considerato una condizione morbosa dalla patogenesi piuttosto complessa ed articolata. L'attenzione viene tuttavia focalizzata su tre aspetti della malattia, riducibili essenzialmente a fattori genetici (5), ambientali (6), ed immunitari (7). Questi tre aspetti, nonostante vengano generalmente trattati separatamente, risultano strettamente interconnessi nel concorrere alla genesi della malattia (Fig. 1).

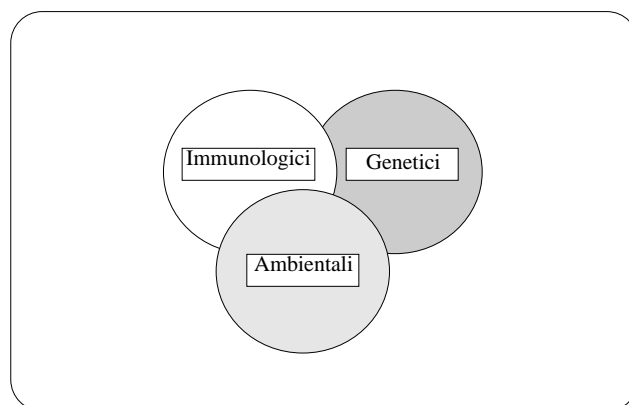


Figura 1. Fattori genetici ed ambientali influiscono sul sistema immunitario coinvolto nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1.

Per quanto riguarda la suscettibilità genetica, è ormai una evidenza che l'80% dei soggetti diabetici risulta positivo per gli antigeni d'istocompatibilità HLA-DR3 (8) o DR3/DR4 in associazione (9). Si sa inoltre che nell'anamnesi di tali pazienti ricorre con una frequenza certamente non imputabile al caso il rilievo di un episodio infettivo virale specifico (10) che precede di poco l'episodio della malattia; infatti di volta in volta sono stati chiamati in causa virus come quello rubeolico (11), il paramixovirus paratoditis, il citomegalovirus (12), il virus Cocksackie B4 (13). Trova così spazio la patogenesi virale come concausa nell'esordio della malattia. Un'ipotesi esplicativa che legerebbe la base ambientale alla base genetica è che ci si trovi di fronte ad una reazione crociata tra virus ed antigeni tissutali espressi dalla beta cellula. E' probabile tuttavia che espressione antigenica di superficie e reazione autoimmune siano legati da rapporti più articolati e complessi ancora da chiarire. Ciò che conta è che l'espressione sulla cellula - pancreatica di un determinato isotipo possa provocare, in seguito ad un evento scatenante

quale un'infezione virale, una reazione immunopatologica con conseguente produzione di anticorpi specifici come gli anticorpi anti-insula pancreatica (ICA) e di linfociti T citotossici. L'aspetto più ampiamente studiato della patogenesi del diabete mellito di tipo 1 è quello legato alle complesse alterazioni immunitarie rilevabili non soltanto dopo l'esordio della malattia, ma anche nel periodo precedente ad esso. Sia l'immunità umorale che quella cellulare giocano un ruolo importante nella patogenesi del diabete di tipo 1 (14). Al momento della diagnosi la quasi totalità dei pazienti presenta positività per gli ICA (15). Si tratta di anticorpi organo-specifici appartenenti alla classe delle IgG, e rivolti verso la beta cellula e che molto spesso precedono l'esordio del diabete sul piano clinico. Inoltre da studi condotti su familiari di pazienti diabetici è emerso che gli ICA, nel momento in cui acquisiscono la capacità di fissare il complemento (CF-ICA) ovvero sono ad alto titolo (16) possono essere considerati come marker più attendibili di malattia in soggetti immunologicamente e geneticamente a rischio (17). Il titolo anticorpale tende tuttavia a decrescere con il procedere della malattia; infatti ad un anno dalla diagnosi la quasi totalità dei soggetti risulta negativo (18), tranne una percentuale variabile tra il 10 e il 20% in cui sono presenti alterazioni dell'immunità umorale (ICA ed altri anticorpi organo specifici) e cellulare (riduzione del rapporto linfocitario CD4/CD8, presenza di elevati livelli di linfociti K). Tali soggetti rientrano nella categoria dei cosiddetti "poliendocrinopatici". Gli ICA ad alto titolo fissanti il complemento assumono quindi particolare importanza sia in quanto markers attendibili di malattia, sia perché in grado di mediare la risposta citotossica nei confronti della beta cellula pancreatica attraverso un meccanismo di citotossicità anticorpo mediata complemento dipendente. Sempre nell'ambito dei disordini della risposta umorale, si è rilevato che ancor prima di instaurare la terapia insulinica, è possibile riscontrare la presenza degli anticorpi antiinsulina (IAA) (19). Tra questi quelli appartenenti alla classe delle IgG (a differenza degli IgM IAA) sono significativamente associati con la presenza di CF-ICA. Gli IAA poiché si generano prima del trattamento insulinico sono anticorpi spontanei che indicano come l'insulina possa fungere da determinante antigenico (21). Come detto prima, le alterazioni dell'immunità cellulare sono anch'esse molto rilevanti ai fini patogenetici. E' noto ad esempio che durante le prime fasi di malattia i linfociti K con attività citotossica subiscono un incremento riscontrabile a livello del sangue periferico (22, 23). E' verosimile che nel processo finale di danno alle beta cellule, queste vengono distrutte da linfociti effettori che si legano ad esse per mezzo di recettori per il frammento Fc delle IgG (linfociti killer) (24). La lisi cellulare avviene tramite il rilascio di enzimi proteolitici, dal momento che risulta ridotta dopo trattamenti con inibitori specifici delle proteasi. La specificità della reazione di citotossicità dipende in questo caso più dall'anticorpo che dalla cellula K di per sé. Nei diabetici di tipo 1 la funzione delle cellule ad attività soppressoria è fortemente ridotta in special modo al momento della diagnosi clinica della malattia (25). Alcuni autori attribuiscono ad un deficit di attività soppressoria la risposta autoimmune anti-beta cellule osservabile nel diabete. D'altro canto molti fenomeni autoimmuni anche in altre patologie vengono ricollegati ad una riduzione di attività dei linfociti soppressori. In modelli animali altresì si è visto come sia una riduzione di queste cellule che può spiegare l'insorgenza del diabete (ratto BB/Wistar e topo NOD). Come verrà detto più estesamente in seguito, un altro dato

caratteristico è il riscontro di linfociti T attivati esprimenti cioè antigeni di attivazione tra cui i più rilevanti sono quelli HLA di classe II e quelli aventi recettori per l'interleuchina 2 (26); questi, oltre che in circolo sono presenti anche a livello dell'infiltrato mononucleare del pancreas endocrino, coinvolti cioè nel processo di insulite tipico nelle fasi iniziali della malattia (vedi avanti)

	Tipo 1	Tipo 2
Età di insorgenza	<30 anni	>30 anni
Sesso	indifferente	> femminile
Frequenza nella popolazione bianca	0,3%	2-4%
Incidenza stagionale	mesi invernali	assente
Secrezione insulinica	assente	presente
Quadro clinico	magrezza, tendenza alla chetoacidosi frequenti	tendenza all'obesità frequenti
Complicanze tardive	(>microangiopatia)	(>macroangiopatia)
Terapia	insulina	dieta + ipoglicemizzanti orali

Tabella 1. Caratteristiche differenziali tra le due principali forme di diabete mellito.

	Tipo 1	Tipo 2
Background genetico	-Associazione con HLA DR3/DR4 -Assenza dell'acido aspartico sul gene DQ -Possibile legame con il gene dell'insulina	-Nessuna associazione con il sistema HLA -Possibile legame con il gene che controlla il trasporto del glucosio e quello relativo al recettore insulinico
Infezione virale (causa di malattia)	-Possibile	-Assente
Alterazioni immunitarie alla diagnosi	-Presenti (anticorpi anti-isola pancreatica, anticorpi anti-insulina, linfociti attivati)	-Assenti
Alterazioni immunitarie in pazienti con lunga durata di malattia	-Ridotta attività del sistema fagocitico e della cooperazione linfocitaria B/T (dipendente dalla gravità dello scompenso metabolico e forse geneticamente determinata)	-Ridotta attività del sistema fagocitico e della cooperazione linfocitaria T/B (dipendente dalla gravità dello scompenso metabolico)
Alterazioni istopatologiche	-Insulite, riduzione >90% delle cellule	-Modesta riduzione del numero e della grandezza delle isole

Tabella 2. Caratteristiche eziopatogenetiche delle due principali forme di diabete mellito.

Associazione fra diabete mellito di tipo 1 ed altre endocrinopatie autoimmuni

Si è accennato precedentemente come la maggioranza dei casi di diabete mellito di tipo 1 ad un anno di malattia presenti la normalizzazione di quei parametri immunologici che troviamo alterati prima e dopo l'esordio di questa. Ciò si verifica per gli ICA che dopo un periodo di positività tendono a negativizzarsi.

Per quanto riguarda i linfociti T totali nel sangue periferico, si è riscontrato tramite un test di blastizzazione che la loro attività funzionale è ridotta nelle prime fasi di malattia (27), verosimilmente a causa dell'alterazione metabolica iniziale. Un dato correlabile a quello degli ICA emerge anche dalla valutazione del numero e dell'attività dei linfociti K o killer. Come già detto al momento della diagnosi tali cellule tendono a subire un incremento nel sangue periferico ed inoltre ad aumentare la loro attività citotossica in vitro verso un bersaglio non specifico. Nelle fasi successive invece tali parametri rientrano nell'ambito della norma (28). Essendo gli ICA e i linfociti K coinvolti verosimilmente nel processo citotossico già prima dell'esordio clinico della malattia si può speculare che la normalizzazione del dato immunologico, che si verifica dopo un anno dalla diagnosi, rappresenti l'esaurirsi di tale processo. Tuttavia nel 10% dei casi di diabete di tipo 1 non assistiamo ad un fenomeno di questo genere ed indipendentemente dalla durata del diabete è possibile riscontrare valori elevati di linfociti K nel sangue periferico e la persistenza di autoanticorpi, inclusi gli ICA. Si tratta di un particolare diabete mellito di tipo 1, associato ad altra patologia autoimmune e dal punto di vista dell'inquadramento definito quale diabete mellito tipo 1b (28). Nella tabella 3 è possibile confrontare le differenze esistenti fra i due tipi di diabete.

	1A	1B
-Asse di suscettibilità HLA	DR4-B62-C3	DR3-B8-A1
-% di casi	90	10
-Sesso prevalente	M>F	F>M
-Età di insorgenza	Giovanile	Qualunque età
-Incidenza stagionale	Presente	Assente
-Associazione con altre malattie endocrine	No	Si
-Funzione cellulare residua	Assente	Discreta
-ICA ed altre manifestazioni di alterata risposta immunitaria	Transitorie	Persistenti
-Patogenesi proposta	Virale con autoimmunità transitoria	Autoimmune primitiva

Tabella 3. Caratteristiche clinico-patogenetiche dell'IDDM (tipo 1).

Si noti come discordino fra loro per il dato genetico, l'età d'insorgenza, oltre alla transitorietà o la persistenza delle alterazioni immunologiche. Tra le patologie autoimmuni più frequentemente associate al diabete di tipo 1b si annoverano la malattia di Graves, il mixedema primitivo ed il morbo di Addison.

A conclusione di quanto esposto, vorremmo sottolineare l'estrema eterogeneità che caratterizza dal punto di vista immunopatogenetico la malattia diabetica di tipo 1 e come ogni tentativo di inquadramento etiopatogenetico debba essere intrapreso con estrema cautela e dovuta elasticità.

Aspetti genetici di rilevanza per l'immunologia del diabete

Il diabete di tipo 1 è, come abbiamo visto, una malattia a patogenesi multifattoriale. Infatti, sebbene una risposta immunitaria rivolta verso le beta-cellule sia responsabile del danno cellulare, tale risposta trova nel fattore ambientale l'evento scatenante e sembra verificarsi in soggetti geneticamente predisposti. Da un punto di vista genetico è stato dimostrato che la regione HLA (Human Leucocyte Antigen), contribuisce a più del 50% dell'ereditarietà, come risulta da studi condotti su gemelli monozigoti e fratelli HLA identici. Gli antigeni del sistema HLA sono costituiti da molecole glicoproteiche presenti sulla superficie cellulare. Tali antigeni sono codificati da geni poliallelici situati sul braccio corto del cromosoma 6. Vi sono due classi di antigeni HLA: nella prima rientrano, divisi in tre serie alleliche (A, B, e C) gli antigeni presenti su tutte le cellule nucleate. Gli antigeni della seconda classe sono invece presenti solo su alcune cellule in particolare sui linfociti B e sui monociti e se ne distinguono tre serie maggiori (D, DR e DQ). Le prime evidenze di associazione tra antigeni HLA e malattie riguardano pazienti affetti da linfoma di Hodgkin ove si osservò un aumento di frequenza dell'antigene allora denominato 4c che in seguito fu identificato come un determinante supertipico comune alle molecole B5, Bw35, B18, B15. Successivamente furono dimostrate le associazioni tra l'antigene HLA B8 ed il morbo celiaco e l'antigene HLA B27 e la spondilite anchilosante. Nelle patologie associate a determinanti antigenici HLA si riscontrano alcune caratteristiche comuni: si tratta di malattie familiari multifattoriali in quanto fattori ambientali e fattori genetici contribuiscono in varia misura all'eziopatogenesi. Inoltre tali malattie risultano essere ad eziologia non definita, mostrano un'elevata eterogeneità e, nella maggior parte dei casi presentano disordini immunologici. Anche l'associazione di particolari antigeni HLA con il diabete di tipo 1 è nota da tempo (Tab. 4).

	Pazienti (% range)	Controlli (% range)	Rischio relativo
Locus B			
B8	19-60	2-29	2.56
B15	4-50	2-26	2.05
B18	5-59	5-60	1.69
B7	3-29	3-32	0.54
Locus DR			
DR1	7-47	4-30	0.71
DR2	0-19	9-40	0.24
DR3	27-76	15-35	3.32
DR4	51-83	5-32	6.55
DR5	0-15	2-43	0.40
DR7	2-21	1-36	0.51
Locus DQ			
Non asp-non			
asp	96	19	
Asp-non asp	4	46	
Asp-asp	0	34	

Tabella 4. La frequenza degli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità nel diabete mellito di Tipo 1 (popolazione caucasioide).

Inizialmente si riteneva che soggetti portatori degli antigeni B8 e B15 ammalassero più frequentemente di diabete, ma con il progredire delle ricerche apparve evidente che tale associazione con gli alleli A, B e C era in realtà secondaria alla associazione di tali alleli con le specificità D e DR. In altre parole era dovuta al "linkage disequilibrium" esistente tra particolari associazioni alplotipiche. Ciascun alplotipo dovrebbe avere nella popolazione una frequenza uguale al prodotto delle frequenze geniche degli alleli che porta; ad esempio, la frequenza della combinazione A1, B8 dovrebbe essere uguale alla frequenza genica di A1 per la frequenza genica di B8. In effetti non è così: l'alplotipo A1, B8 è presente nella popolazione molto più spesso di quanto ci si attenda. Questo fenomeno prende appunto il nome di "linkage disequilibrium" e si misura come differenza tra le frequenze alplotipiche attese e le frequenze osservate. Il linkage permette probabilmente la selezione di sistemi altamente efficienti, ma spiega anche che la riscontrata associazione del B8 con il diabete era in realtà secondaria all'esistenza di un "linkage disequilibrium" tra il B8 e il DR3. E' stato infatti più recentemente dimostrato che circa il 95% dei soggetti affetti da IDDM sono positivi per gli antigeni DR3 e DR4 o per entrambi rispetto al 45-50% della popolazione di controllo. La tecnica finora più comunemente utilizzata per tipizzare gli antigeni HLA consiste in un test di

linfo-citotossicità mediata dal complemento, che si esegue utilizzando anticorpi che riconoscono tutte le diverse specificità. La ricerca di antisieri specifici viene normalmente effettuata in sieri di donne poligravide. Gli anticorpi monoclonali più recentemente introdotti, offrono, rispetto agli antisieri, il vantaggio di avere una più definita specificità e di essere disponibili in quantità praticamente illimitata. Più recentemente nuove tecniche di tipizzazione sono divenute disponibili. E' stato infatti possibile applicare le metodologie dell'ingegneria genetica allo studio dei geni HLA utilizzando sonde nucleotidiche specifiche (probes).

L'ibridazione tramite tali sonde specifiche, successiva a digestione con enzimi di restrizione rivela nel DNA in esame frammenti genici detti RFLP (restriction fragment length polymorphism) che permettono di studiare il polimorfismo a livello del DNA. Un ulteriore metodo di studio può essere fornito dall'analisi mediante oligonucleotidi, sequenze che possono essere costruite artificialmente conoscendo la struttura primaria di una molecola HLA. Utilizzando "probes" oligonucleotidici locus ed allele specifici è possibile analizzare finemente il polimorfismo genico. Recentemente utilizzando la tecnica degli oligonucleotidi Todd e coll. hanno dimostrato che la variazione di un singolo aminoacido in posizione 57 della catena DQ protegge un individuo o lo pone a rischio di malattia; in tale contesto l'aminoacido acido aspartico in particolare è risultato svolgere un'azione protettiva (29). L'uso degli oligonucleotidi in futuro potrà certamente favorire indagini su larga scala per l'identificazione dei soggetti a rischio per diabete di tipo 1.

Modelli animali di diabete autoimmune: il topo NOD ed il ratto BB Wistar

Presupposto fondamentale per lo studio di un processo patogenetico su di un modello animale è che questo sia comparabile nelle sue linee fondamentali a quello umano. Per molto tempo, nell'ambito degli studi svolti alla comprensione della dinamica patogenetica del diabete di tipo 1, le uniche possibilità erano quelle di "creare" artificialmente nell'animale le condizioni di danno pancreatico tramite composti derivati dalle nitrosuree (es. streptozotocina) (30) o tramite procedimenti chirurgici atti a rimuovere parzialmente o completamente l'organo. Nonostante questo tipo di approccio continui a mantenere la propria validità in accordo con il tipo di studio e gli obiettivi prefissi, un modello animale in grado di sviluppare la malattia spontaneamente facilita il compito del ricercatore nella identificazione dei fattori responsabili del danno alle beta cellule. La scoperta e la descrizione di due modelli animali hanno segnato una tappa cruciale per lo studio e la comprensione della patogenesi del diabete (31). Si tratta del topo NOD (non obese diabetic mouse) e del ratto BB Wistar, due ceppi che, nonostante presentino tra loro alcune differenze immunologiche, sviluppano spontaneamente un diabete di tipo

autoimmune molto simile per numerosi aspetti al diabete insulino dipendente umano. Il topo NOD (32) sviluppa la malattia in una percentuale che si avvicina nella femmina all'80% e nel maschio al 20%; la castrazione di quest'ultimo aumenta l'incidenza di diabete mentre nella femmina la castrazione risulta essere protettiva (33). Il processo d'insulite inizia spontaneamente a partire dalla quinta settimana di età e la malattia si rende evidente clinicamente attorno alla 17-24^a settimana con glicosuria, chetonuria, rapida perdita di peso ed iperglicemia persistente. Nel ratto BB/Wistar (34) sia il maschio che la femmina sviluppano la malattia in uguale percentuale. Generalmente l'animale diventa diabetico tra 60 e 120 giorni di età, con picco d'incidenza attorno alla 90^a giornata. Anche per il ratto BB/Wistar la malattia viene rilevata con perdita di peso, poliuria, polidipsia, l'animale presenta inoltre un elevato livello di acidi grassi non esterificati, bassi valori di insulinemia associati ad un elevato livello di glucagone. Il dato per noi di maggior rilievo, tuttavia, è quello riferibile alla presenza dell'insulite, per cui entrambi gli animali rappresentano un modello insostituibile dal momento che, in accordo con quanto espresso precedentemente, tale processo ricalca nelle sue linee di base quello umano (Fig. 2 e 3).

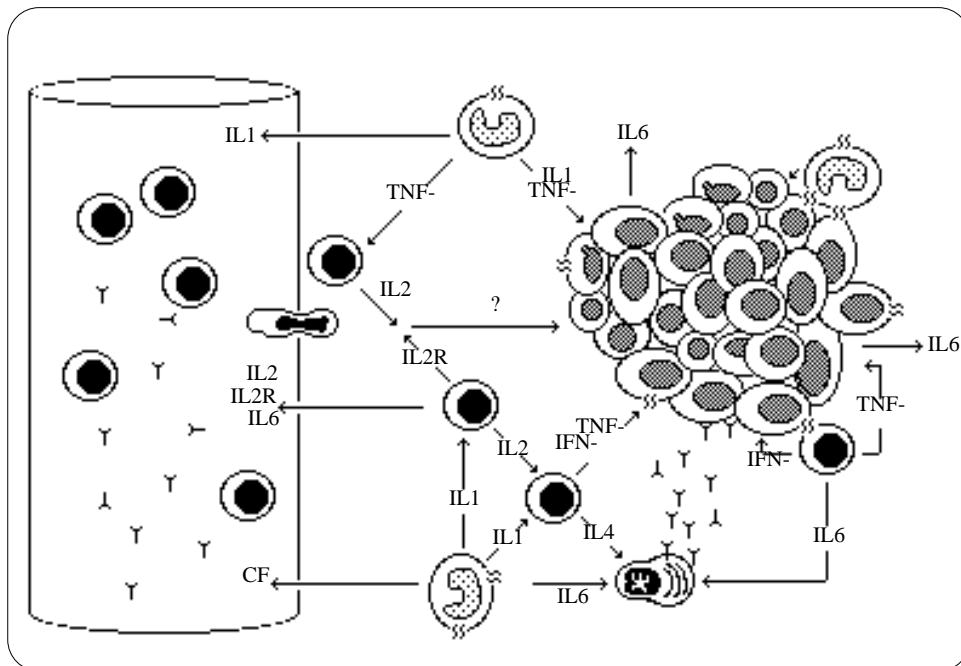


Figura 2. Il complesso meccanismo di citotossicità cellulare nelle fasi precoci del diabete di Tipo 1. Si nota il coinvolgimento di monociti/macrofagi che secernono l'interleuchina-1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6), fattore chemiotattico (CF) ed il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). I linfociti T provenienti dai vasi secernono l'interleuchina-2 (IL-2), recettori solubili per l'IL2 (IL2R), IL6, interleuchina-4 (IL-4) ed il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Anche le plasmacellule sono presenti e secernono autoanticorpi. Le cellule possono secernere anche loro linfocine come l'IL6. SS rappresenta le molecole HLA di classe II.

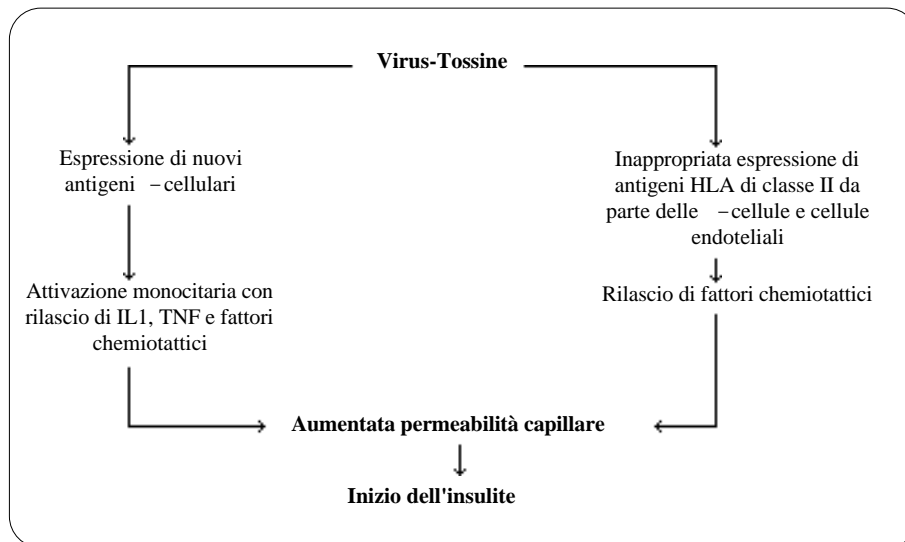


Figura 3. Possibili eventi patogenetici scatenanti l'insulite.

Il processo di insulite espressione di autoimmunità organo specifica

La trattazione del disordine della risposta immunitaria umorale e cellulare riscontrabile analizzando il siero ed i linfociti ottenuti dal sangue periferico di soggetti affetti da diabete di tipo 1 certamente non esaurisce il discorso sul significato di tale alterazione. Ci si deve chiedere innanzitutto se ciò che si evidenzia a livello del sangue periferico rifletta quello che accade a livello dell'organo bersaglio (isole di Langerhans) in cui avvengono quei fenomeni di citotossicità cellulo-mediata di cui si è fatto menzione in precedenza. Sappiamo infatti che dal punto di vista istopatologico il diabete di tipo 1 all'esordio si manifesta con un quadro d'infiltrazione linfomonocitaria delle insule pancreatiche. Una dimostrazione diretta e la migliore definizione di tale processo nell'uomo si è avuta tramite l'osservazione del pancreas di una bambina morta accidentalmente 24 ore dopo la diagnosi di diabete insulino-dipendente (35). La popolazione cellulare presente a livello dell'infiltrato pancreatico era composta nella quasi totalità da linfociti; nonostante fossero rappresentate tutte le sottopopolazioni, la percentuale maggiore era costituita da linfociti attivati, esprimenti cioè antigeni di attivazione tra cui antigeni HLA di classe II e recettore di superficie per l'interleukina 2. Tali cellule

includono verosimilmente cloni diretti verso antigeni beta cellulari, a testimonianza di una risposta immunitaria specifica che si sviluppa nei confronti di antigene(i) espressi sulle beta cellule. La disponibilità di animali in grado di sviluppare spontaneamente un processo di insulite, quale il topo NOD ed il ratto BB/Wistar, offre un modello sperimentale ideale per studiare e quindi definire lo svolgimento del processo d'insulite (36). Da indagini svolte in tali modelli si è visto che l'infiltrato linfomonocitario compare molto tempo prima dell'esordio clinico della malattia, a dimostrazione dell'importanza di questo evento nell'indurre il danno a carico delle beta cellule nel corso probabilmente già della fase di latenza (Fig. 4).

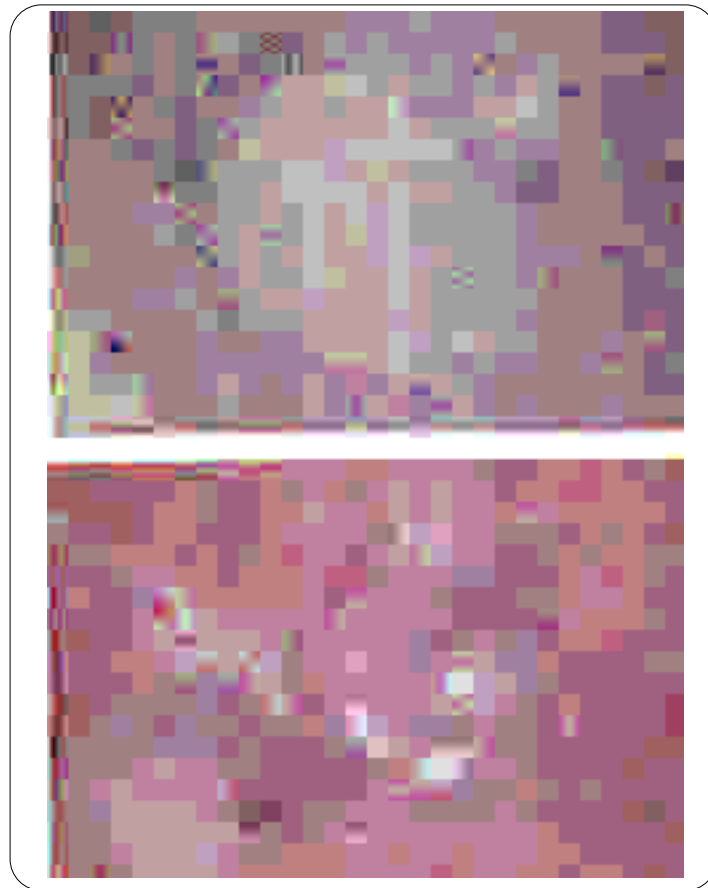


Figura 4. Sezioni criostatiche di pancreas di un topo NOD di 15 settimane colorate con il metodo ematossilina-eosina. I linfociti si dispongono dapprima alla periferia dell'insula (a) e la infiltrano progressivamente rendendo sempre più severo il quadro dell'insulite (b).

L'infiltrato è quindi un marker di malattia molto importante che, se svelato precocemente, potrebbe essere di grande ausilio nei tentativi di immunoterapia iniziale della malattia. Il problema che si pone quindi è quello di mettere a punto una tecnica non invasiva in grado di svelare in vivo ed in fase iniziale l'infiltrazione delle isole di Langerhans. Questo obiettivo è stato recentemente raggiunto grazie ad una metodica in grado di visualizzare la presenza di linfociti attivati a livello pancreatico (37, 38). Come è stato già detto i linfociti attivati che esprimono sulla loro superficie recettori per l'interleukina 2, sono quindi in grado di legare in maniera specifica tale proteina. La somministrazione e.v. di IL2 ricombinante marcata con I^{23} ci ha consentito di visualizzare tramite gamma camera le aree di concentrazione di detti linfociti, in virtù proprio della capacità di legame dell'IL2 da parte del recettore sulla superficie di queste cellule. Ciò è stato osservato sia nel topo NOD che nel ratto BB Wistar; il fenomeno non si verifica in animali di controllo. In questi ultimi la radioattività non si concentra nella regione pancreaticata, bensì appare rapidamente in vescica al contrario degli topi NOD che invece presentano tra il 4° ed il 15° minuto dopo la somministrazione di IL2 marcata un'elevata concentrazione del radionuclide nel pancreas (Figg. 5 e 6).



Figura 5. Immagine alla gamma camera di un topo Balb/c normale di 15 settimane d'età dopo somministrazione e.v. di ^{123}I -IL2.

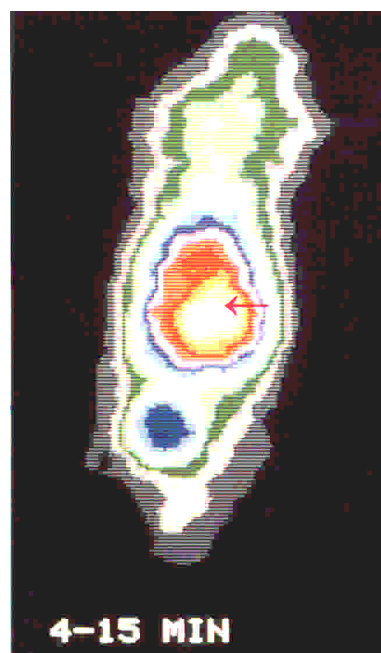


Figura 6. Immagine alla camera di un topo NOD prediabatico di 15 settimane di vita dopo somministrazione e.v. di ^{123}I -IL2. L'area di maggiore radioattività è localizzata in corrispondenza della regione pancreaticata (indicata dalla freccia) per il legame della IL2 marcata ai recettori espressi sui linfociti attivati infiltranti il pancreas.

Inoltre gli studi eseguiti sugli animali sacrificati dopo la somministrazione del tracciante hanno rivelato una correlazione positiva tra la radioattività nel pancreas e la presenza dell'infiltrato linfocitario (38). Si ricordi altresì che ciò era dimostrabile prima dell'insorgenza della sintomatologia clinica del diabete, ovvero nella fase di latenza. Si comprende come l'applicazione di questa metodologia nell'uomo possa riuscire ad identificare in vivo un marker precoce di malattia. Questo permetterebbe di identificare soggetti suscettibili a sviluppare un diabete di tipo 1, prima che il processo autoaggressivo operato dal sistema immunitario abbia distrutto gran parte delle insule pancreatiche, rendendo cioè clinicamente manifesta la carenza insulinica. Tra l'altro, essendo la tecnica di facile attuazione e priva di effetti collaterali, se ne potrebbe prospettare un suo uso ripetuto a distanza di tempo nello stesso individuo, potendo costituire quindi un valido ausilio nel monitoraggio di un eventuale immunointervento rivolto alla prevenzione della malattia.

Il periodo di latenza nell'uomo prima della comparsa del diabete clinico ed il significato dei marker immunologici

A questa fase della malattia si dà oggi molto importanza perchè è proprio nel periodo di latenza che sarebbe idoneo intervenire terapeuticamente per limitare il danno immuno mediato alle beta cellule. Numerosi markers sono stati chiamati in causa ma nessuno di essi ha acquisito il ruolo di indicatore specifico di malattia. Sappiamo comunque che i markers immunologici pur non essendo predittivi in maniera assoluta, individuano, nell'ambito dei soggetti a rischio quelli che più degli altri andranno incontro al diabete. E' necessario ricordare infatti come l'esordio clinico del diabete rappresenti l'evento finale di un processo autodistruttivo lungo anche anni, operato dal sistema immunitario (39). Le nozioni patogenetiche a nostra disposizione suggeriscono che la malattia ha inizio molto tempo prima della sua manifestazione clinica. Eisenbarth ha magistralmente descritto tramite una fortunata illustrazione, il lungo processo che conduce alla riduzione della massa beta cellulare e le tappe patogenetiche che attraversano le insule del Langerhans prima di giungere al loro esaurimento (Fig. 7).

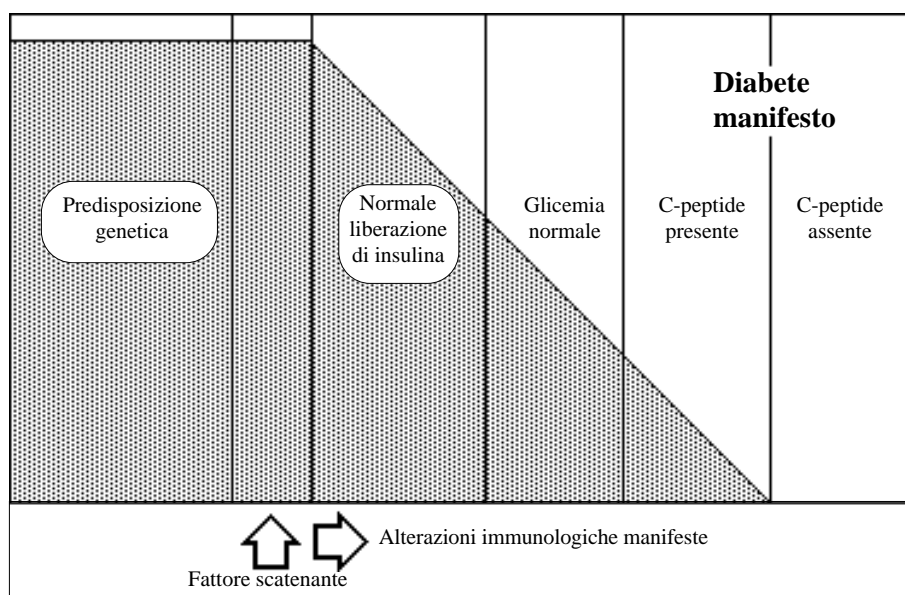


Figura 7. La storia naturale del diabete di Tipo I: variazioni della massa beta-cellulare nelle fasi precedenti l'esordio della sintomatologia clinica.

Alla luce delle più recenti osservazioni emerge che nel bambino e nel giovane adulto tale processo può svolgersi in tempi diversi essendo più rapido al di sotto dei 10 anni (Fig. 8).

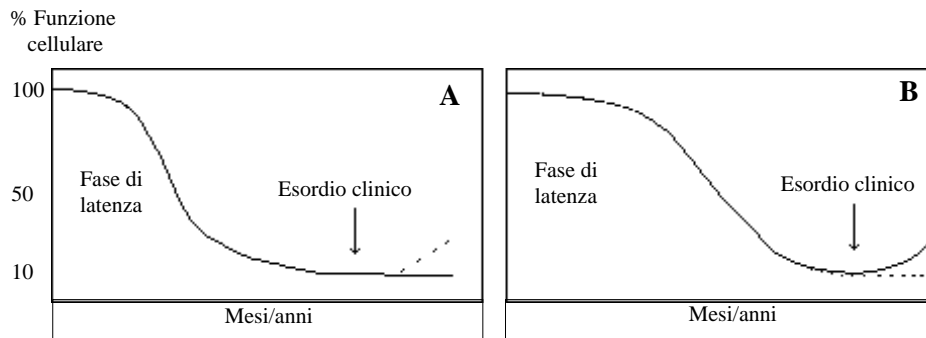


Figura 8. La storia naturale della funzione beta-cellulare nel diabete mellito di Tipo I ad insorgenza prima della pubertà (A) e dopo l'età puberale (B). Nel diabete ad insorgenza prepuberale si riscontra una minore incidenza di remissioni spontanee; inoltre si avrebbe una più breve fase di latenza preclinica.

A questo proposito è interessante ricordare il “Barts Windsor Family Study”, uno studio condotto in Inghilterra su oltre 200 famiglie residenti in una stessa area geografica e selezionate in base alla presenza di almeno un soggetto affetto da diabete mellito di tipo 1. Ogni membro della famiglia sano è stato tipizzato per HLA A, B, C, DR e l'istotipo confrontato con quello del fratello o sorella affetti da diabete. Ogni 3 mesi venivano poi controllati alcuni parametri metabolici ed immunologici. Dal follow-up è risultato che mentre nella popolazione normale non selezionata la frequenza di positività per gli ICA era dello 0.5%, nei familiari sani del diabetico risultava invece essere del 5% (40). Inoltre i CF-ICA, che come abbiamo visto costituiscono un marker più attendibile del processo citotossico verso la beta cellula, comparivano solo in quei soggetti con lo stesso HLA o un alotipo HLA in comune con il rispettivo fratello o sorella diabetici. Dati meno probanti sono stati rilevati per altri parametri immunologici, come ad esempio le sottopopolazioni linfocitarie. Si è visto, infatti, che un incremento del numero delle cellule K e della loro citotossicità in vitro non sempre si accompagna a positività agli ICA. Tuttavia 5 soggetti al momento delle prime indagini, che presentavano ambedue le anomalie immunologiche in assenza di alterata tolleranza glicidica, hanno successivamente sviluppato un classico diabete mellito di tipo 1, preceduto in due casi da un'infezione virale accertata (41). In questi soggetti almeno un alotipo HLA era in comune con il rispettivo fratello o sorella diabetico.

Alterazioni immunologiche nel corso della malattia

Fin qui si è discusso del complesso disordine immunitario che sottende l'esordio del diabete mellito di tipo 1 e che lo accompagna nelle sue prime fasi. Ma va detto che nei diabetici alcune alterazioni della risposta immunitaria sono presenti anche quando la malattia è ben consolidata nel tempo e, a differenza di quanto fin qui detto, possono comparire sia in pazienti con diabete tipo 1 che di tipo 2. E' noto infatti che in questi pazienti vi è una maggiore suscettibilità alle infezioni, verosimilmente a causa di una risposta immunitaria deficitaria (Tab. 5) (42).

Aumentate	Non aumentate
-infezioni del tratto urinario	-tubercolosi
-infezioni fungine	-infezioni postchirurgiche
-osteomieliti	-infezioni polmonari
-infezioni cutanee	-infezione carbonchiosa
-gangrena (non da clostridium)	
-otite esterna	
-ascessi	
-epatite B	

Tabella 5. Frequenza di alcune infezioni riscontrabili nel diabete rispetto alla popolazione normale. In pazienti diabetici di lunga durata sono state descritte alterazioni della risposta immunitaria cellulare che possono essere responsabili della maggiore frequenza della patologia suddetta. Queste includono sia il settore dei polimorfonucleati e dei macrofagi (vedi tabella 6) che quello della cooperazione linfocitaria T/B.

Una delle spiegazioni più classiche riconduce alla insufficiente utilizzazione di insulina da parte delle cellule del sistema immunitario ed alla conseguente diminuita attivazione e differenziazione delle stesse. Quindi, secondo quest'ottica, il diabete mellito, qualora scompensato, sarebbe da includere fra le condizioni di immunodeficienza secondaria. Ne consegue un circolo vizioso per cui le infezioni acute nel diabetico favoriscono lo scompenso metabolico che a sua volta riduce la risposta immunitaria. Da studi condotti in questa direzione è emerso che in molti pazienti con diabete di lunga durata vi è un aumento degli immunocomplessi circolanti, un decremento del numero totale dei linfociti T ed uno sbilanciamento nell'ambito delle sottopopolazioni linfocitarie, con un rapporto linfocitario CD4/CD8 ridotto compreso tra 1.5 e 2 dovuto in particolare ad una diminuzione delle cellule con fenotipo CD4 (helper) (43, 44). Un'ulteriore conferma

clinica dell'alterazione immunologica deriva dall'evidenza che pazienti con durata di malattia superiore a 5 anni mostrano una risposta anticorpale deficitaria dopo vaccinazione verso l'epatite B (45). La spiegazione di tale fenomeno sarebbe da ricercare nel mancato riconoscimento dei determinanti antigenici virali con conseguente ridotta risposta anticorpale specifica, dovuta appunto all'alterazione del rapporto e/o della funzione dei linfociti CD4 e CD8.

Nel caso della vaccinazione anti-influenzale il titolo anticorpale è risultato invece normale (46); ciò potrebbe trovare spiegazione nel fatto che trattandosi di una risposta secondaria ed in virtù della cross reattività con i diversi ceppi virali, verrebbe stimolato un clone di linfociti T con memoria già sensibilizzato verso quel particolare antigene. Questo processo non è strettamente dipendente, come nel caso della vaccinazione anti-epatite B, da un normale rapporto linfocitario CD4/CD8 e quindi chiarisce il perchè nel caso della vaccinazione anti-influenzale la risposta immunitaria specifica sia normale mentre non lo sia dopo somministrazione del vaccino per l'epatite B; trattasi infatti in quest'ultimo caso di una risposta primaria. In prospettiva quindi si arguisce come la normalizzazione dei parametri immunologici possa rappresentare per il diabetico con lunga durata di malattia un utile tentativo di prevenzione nei confronti di infezioni acute, siano esse virali o batteriche. Si viene in questo modo ad allontanare l'evenienza di uno scompenso metabolico che ne potrebbe derivare o peggio di una risultante chetoacidosi con tutte le conseguenze che provengono da tale condizione.

1) Chemiotassi: è ridotta in modo inversamente proporzionale al grado del compenso metabolico. L'aggiunta di insulina in vitro la migliora. Può essere alterata anche in parenti sani di primo grado con uno o due alplotipi HLA in comune con il diabetico suggerendo che anche fattori genetici possono essere importanti nell'indurre tale riduzione.

2) Fagocitosi: la fase iniziale è ridotta, non quella finale. I bassi livelli di calmodulina potrebbero avere un ruolo favorente tale depressione. La ridotta fagocitosi potrebbe essere responsabile dell'aumento degli immunocomplessi circolanti che si depositano a livello del microcircolo favorendo la comparsa delle lesioni microangiopatiche.

3) Attività killing: il test al nitroblu tetrazolio (un composto giallo che viene ridotto a blu nel corso degli eventi metabolici associati con il processo di killing) oppure la capacità delle cellule di emettere una radiazione elettromagnetica dopo la fagocitosi (chemiluminescenza) indicano che l'attività killing è ridotta. Anche in questo caso un trattamento insulinico intensificato (pancreas artificiale) è capace di migliorare questa funzione.

Tabella 6. Attività polimorfonucleare e macrofagica nel diabete.

	Tipo 1	Tipo 2
% linfociti T totali	riduzione	normale
% linfociti B totali	normale	normale
% sottopopolazione CD4	riduzione	riduzione
% sottopopolazione CD8	normale	normale
Rapporto linf. CD4/CD8	riduzione	riduzione
Blastizzazione linfocitaria con mitogeni:	(inversamente proporzionale allo stato del compenso metabolico)	
Produzione di IL-2	riduzione	normale
In vivo:		
Risposta secondaria (Multitest)	normale	normale
Titolo anticorpale dopo vaccinazione verso:		
-influenza	normale	normale
-epatite B	riduzione	riduzione
-pneumococco	riduzione	riduzione

Tabella 7. Alterazioni immunologiche riscontrabili nelle due principali forme di diabete in pazienti con lunga durata di malattia.

Aspetti immunologici delle complicanze croniche: la microangiopatia

Come ben noto il diabete è una condizione morbosa suscettibile di determinare una serie di complicanze con l'aumentare della durata della malattia che colpiscono in maniera caratteristica alcuni organi (47). Citiamo a tale proposito la retinopatia diabetica che, passando attraverso la fase di retinopatia diabetica semplice, può giungere a quella più grave proliferativa portando in alcuni casi fino alla cecità.

Anche il rene rappresenta un organo bersaglio della malattia diabetica presentando delle lesioni tipiche come il deposito peritubulare di glicogeno e mucopolisaccaridi, l'arteriosclerosi e la glomerulosclerosi. Il sistema nervoso periferico può essere colpito praticamente in ogni suo distretto e le lesioni possono appartenere sia al tipo della mononeuropatia, come della poli o multineuropatia; inoltre anche il sistema nervoso autonomo può essere colpito; ne deriva una sintomatologia caratterizzata da disturbi cardiorespiratori: è questo il quadro della neuropatia automatica. Tra i fattori patogenetici considerati nella genesi della microangiopatia, quello immunologico gioca una parte

rilevante in associazione al disordine metabolico. E' largamente accettato che quest'ultimo rappresenta un fattore fondamentale nel determinare e/o accelerare la microangiopatia diabetica, tuttavia vi sono alcuni aspetti patogenetici controversi (48). L'esperienza clinica ci insegna infatti come alcune volte sia difficile rinvenire i segni di una microangiopatia diabetica in pazienti con cattivo controllo metabolico o, come al contrario, vi siano pazienti che, nonostante l'ottimizzazione dei parametri metabolici, presentino a poca distanza dalla diagnosi le lesioni tipiche. In questo contesto ben si inseriscono alcuni aspetti immunologici i quali, sebbene nel corso degli anni abbiano subito delle ampie revisioni, mantengono inalterata nelle linee essenziali una certa validità. Dato probante è il rilievo di depositi di immunocomplessi a livello dei capillari renali e l'aumento degli stessi in circolo, legato verosimilmente ad alterazione dei meccanismi di "clearance" degli immunocomplessi. L'ispessimento della membrana basale, lesione tipica nella microangiopatia diabetica sarebbe la conseguenza tra l'altro di una complessa serie di alterazioni, tra cui l'intrappolamento dei complessi antigene-anticorpo rivestirebbe una parte importante. Da questa e da molte altre considerazioni emerge come la patogenesi della microangiopatia diabetica sia multifattoriale, determinata quindi non solo dal lato metabolico, ma influenzata dalla base genetica e dalla variabilità individuale.

Aumento della permeabilità vascolare	Riduzione dell'attività fagocitaria
Aumento di attività dell'enzima aldoso reductasi	Aumento degli immunocomplessi circolanti e deposito nel microcircolo
Aumento delle viscosità plasmatica	Riduzione della tensione di ossigeno
Aumento delle glicosilazione non enzimatica delle proteine	Riduzione del flusso con aumento dell'attività piastrinica

Tabella 8. Principali eventi nella patogenesi della microangiopatia diabetica.

L'immunointervento nel diabete di tipo 1 all'insorgenza: possibile terapia patogenetica

Nell'ambito degli studi sul diabete, uno dei settori che sta sviluppandosi prepotentemente è quello dell'immunoterapia del diabete di tipo 1 in fase iniziale. A tutt'oggi non è possibile l'attuazione di una vera e propria terapia patogenetica della malattia in quanto al momento dell'esordio clinico l'80% delle isole pancreatiche è andato ormai incontro a distruzione. Quando le manifestazioni cliniche del diabete si rendono evidenti, il processo autoaggressivo si è ormai compiuto. Alla luce di queste considerazioni appare evidente quanto sia importante riuscire ad identificare un marker che caratterizzi inequivocabilmente, ed ad uno stadio preclinico, il diabete di tipo 1 onde poter intervenire quando ancora il processo di riduzione della massa beta cellulare non abbia raggiunto proporzioni tali da rendere manifesta la carenza insulinica.

In attesa di poter effettuare una terapia patogenetica del diabete insulino dipendente ovvero intervenire prima della comparsa dell'iperglicemia, ci si pone quale obiettivo fondamentale quello di modificare la storia naturale della malattia. A questo proposito l'immunoterapia, nelle sue varie espressioni, rappresenta una delle proposte più interessanti per poter operare in questa direzione. Dalla consapevolezza che il diabete di tipo 1 sia una malattia essenzialmente autoimmune, è nata la convinzione che un trattamento di tipo immunosoppressivo possa bloccare il processo autolesivo alla base della carenza insulinica. Come noto tuttavia, nessun farmaco appartenente a questa categoria risulta totalmente scevro da rischi e da qui le difficoltà di valutare il rapporto costo-beneficio delle terapie immunosoppressive in questa malattia. In seguito a tali considerazioni si è recentemente costituito nell'ambito dell'IDF (International Diabetes Federation), l'IDIG (International Diabetes Immunotherapy Group) organismo nato dall'esigenza di coordinare i diversi gruppi che lavorano nel settore dell'immunoterapia del diabete insulino dipendente e quindi dalla necessità di stabilire regole e criteri con cui confrontare i dati emersi dai diversi trials e dar loro una significatività scientifica. Fine primario di ogni trattamento immunoterapico, sia che si operi con farmaci immunomodulatori che con immunosoppressori, è di favorire la remissione completa e/o parziale e di prolungarne la durata in pazienti trattati rispetto ad un gruppo di controllo rappresentato da diabetici che ricevono esclusivamente insulina. Si è concordi che per poter parlare di remissione parziale il fabbisogno insulinico debba essere quanto meno inferiore a 0.3 UI/Kg in presenza di un buon controllo metabolico, mentre per remissione clinica si intende la sospensione del trattamento insulinico con HbA_{1c} e glicemia nei limiti della norma. Un aspetto molto importante riguarda il momento più opportuno per iniziare un'immunoterapia (49). Sul piano etico e scientifico, non è oggi giustificabile un intervento immunoterapico (quanto meno immunosoppressivo) in soggetti normoglicemici che presentino positività per i markers attualmente conosciuti. In tali soggetti, infatti, pur essendo in corso un processo autoimmune, dimostrabile dalla presenza di ICA, potrebbero

operare meccanismi di protezione e di rigenerazione naturali delle cellule che una immunosoppressione intempestiva potrebbe in qualche modo bloccare. D'altra parte i tentativi d'effettuare una sperimentazione immunosoppressiva in periodo preclinico devono essere attentamente considerati data l'estrema difficoltà di poter avere a disposizione un gruppo numeroso di soggetti di controllo. Per tale ragione appare evidente come solo all'esordio della malattia, o entro brevissima distanza dalla diagnosi, sia opportuno intervenire al fine di agire sulla massa beta cellulare residua nel tentativo di arrestare l'autodistruzione, e magari favorire la rigenerazione delle beta cellule. E' per questo che trials intrapresi già dopo la 6^a settimana dalla diagnosi sono destinati ad andare incontro a fallimento. Solo in strutture altamente specializzate, atte a garantire una corretta sperimentazione scientifica, questi tentativi possono divenire, come di fatto sta già accadendo, una realtà.

Immunomodulazione ed immunosoppressione nel diabete di tipo 1 all'insorgenza

Entrando nel vivo della discussione sull'immunoterapia, bisogna sottolineare che sotto questa definizione vengono solitamente compresi sia l'intervento di tipo immunomodulante che quello di tipo immunosoppressivo. In sintesi, mentre l'azione dei farmaci immunomodulatori si esplica attraverso il ristabilimento di una normale funzione immunitaria, i farmaci immunosoppressori bloccano le mitosi delle cellule deputate alla risposta immunitaria. Prima di prendere in esame in maniera più dettagliata i trials finora condotti è bene ribadire il concetto che i farmaci appartenenti alla seconda categoria pur dimostrandosi molto più efficaci degli immunomodulatori nel favorire una remissione della malattia, risultano molto meno maneggevoli. I farmaci immunomodulatori fin qui utilizzati nel diabete correggono solo in parte l'insulto citotossico verso le beta cellule e pochi fra questi sono in grado di normalizzare del tutto un equilibrio immunoregulatorio deficitario (ad esempio un ridotto rapporto linfocitario CD4/CD8 helper/soppressorio) L'uso degli immunomodulatori, tuttavia, può rappresentare un valido ausilio nella terapia immunosoppressiva specie nel tentativo di prolungare la durata di remissione (sia totale che parziale); potrebbe altresì essere una proposta concreta di trattamento in soggetti geneticamente ed immunologicamente a rischio, ove l'uso dei farmaci immunosoppressivi non può essere giustificato al momento attuale.

Esperienza clinica con i farmaci immunomodulatori

Numerosi sono stati i tentativi eseguiti in diabetici neo diagnosticati con sostanze o procedimenti in grado di modulare la risposta immunitaria: tra questi ricordiamo l'uso di gamma globuline per via endovenosa (50), di interferone umano (51), di levamisole (52), della plasmateresi (53), degli ormoni timici (54), della teofillina, di indometacina associata al prednisone (55) di metisoprinolo (56) ed infine il tentativo di trasfusione allogenica di leucociti (57, 58). La tabella 9 mostra un elenco completo delle terapie utilizzate ed il rationale alla base del loro impiego. Se è vero che il loro uso non ha sortito gli effetti sperati nel conseguimento di remissioni totali o parziali, bisogna ammettere che nessuno di questi studi poggiava le basi su rigorosi criteri scientifici, quali una corretta selezione e/o randomizzazione, una casistica sufficientemente ampia, un gruppo di controllo reale. Un'esperienza piuttosto interessante sembra essere quella condotta con ciamexone (CMX), un derivato dalla 2-cyanaziridina, una sostanza in grado di incrementare l'attività di linfociti soppressori e di ridurre il riconoscimento e/o l'espressione degli antigeni HLA di classe II da parte delle cellule bersaglio. Studi in vitro non hanno rilevato un effetto del CMX sulla proliferazione linfocitaria o sulla produzione di interleuchina 2, tuttavia è stato dimostrato che il farmaco è in grado di ridurre l'attività dei linfociti killer. Gli studi sul modello animale sembrano essere piuttosto incoraggianti; infatti sul ratto BB Wistar (59) il CMX si è dimostrato in grado di operare una significativa riduzione della comparsa del diabete, soprattutto nelle femmine. Nel topo NOD il CMX sembra ritardare l'epoca di comparsa della malattia. Nell'uomo è stato condotto uno studio multicentrico in doppio cieco sul oltre 100 pazienti diabetici neodiagnosticati ed i risultati preliminari sembrano indicare un qualche effetto sia sulla secrezione del peptide C (aumentata rispetto al gruppo di controllo) che sull'incidenza delle remissioni.

Esperienza clinica con i farmaci immunosoppressori: la Ciclosporina

Quando si parla di terapia immunosoppressiva nel diabete di tipo 1 quasi inevitabilmente il discorso cade sulla ciclosporina, un farmaco che ha operato una vera e propria rivoluzione nell'ambito della chirurgia dei trapianti. I primi passi nel campo dell'immunosoppressione nel diabete furono intrapresi verso la fine degli anni '70 con farmaci quali il prednisone (60), la ciclofosfamida, l'azatioprina. A parte la loro elevata tossicità per l'azione su cellule in mitosi come quelle midollari ed intestinali, gli effetti sulla remissione, nonostante l'iniziale euforia, risultarono praticamente inesistenti. La ciclosporina ha aperto invece recentemente un nuovo capitolo nell'immunosoppressione del diabete di tipo 1. Questo oligopeptide ciclico viene prodotto dal fungo *Tolypocladium inflatum* ed agisce esclusivamente sulle cellule antigene sensibili in fase moltiplicativa ma è dotato inoltre di una azione tossica specifica sui linfociti proliferanti. Questo farmaco quindi risparmierebbe sia le cellule a riposo che trasportano la memoria immunologica nei confronti dei vari agenti microbici, sia le cellule in attiva mitosi dell'intestino e del midollo osseo. Sembra quindi possedere i requisiti ideali per l'impiego terapeutico. Dal punto di vista clinico la ciclosporina è stata utilizzata in questi ultimi 3 anni in diabetici tipo 1 neodiagnosticati in fase precoce e si è visto come sia in grado di incrementare il numero di remissioni. I risultati più interessanti sono emersi da due trials multicentrici, uno Europeo/Canadese (61), l'altro Francese (62). Sono entrati a far parte del primo studio 188 pazienti e nel gruppo dei soggetti trattati si è ottenuta una percentuale di remissioni totali pari al 30%, circa il doppio rispetto a quella del gruppo di controllo (10-15%). Dati simili si sono avuti dallo studio francese. Tuttavia non è possibile un'interpretazione definitiva di questi risultati, soprattutto alla luce dei nuovi criteri raccomandati dall'IDIG. Si può comunque ragionevolmente affermare che la terapia con ciclosporina ha modificato il decorso spontaneo del diabete di tipo 1 durante il primo anno di malattia. La dose di ciclosporina da somministrare è ancora oggetto di controversia. Si è comunque dimostrato che dosi comprese tra 5 e 7,5 mg/kg con eventuali correzioni in rapporto ai livelli ematici del farmaco (ideali sono 80/100 ng/ml) sono le più efficaci, riducendo al minimo gli effetti collaterali (63). Altro problema ampiamente dibattuto rimane quello del periodo di trattamento, in quanto non si possono perdere di vista gli effetti tossici del farmaco, ma d'altra parte la malattia sembra progredire allorché la terapia con ciclosporina viene interrotta. Questo ci impone di valutare attentamente questi aspetti onde trovare il miglior equilibrio fra efficacia terapeutica ed effetti collaterali.

Ciclosporina: effetti collaterali ed interazione con altri farmaci

Possiamo suddividere gli effetti collaterali della ciclosporina in due grandi gruppi alcuni dei quali reversibili e dose dipendenti (epatossicità, anemia, irsutismo, iperplasia gengivale) altri irreversibili come la nefrotossicità anche se solo ad alte dosi di Cya (64, 65). Il danno renale è senza dubbio uno degli aspetti più importanti da valutare quando si voglia intraprendere una terapia immunosoppressiva con ciclosporina. In letteratura queste alterazioni vengono distinte in modificazioni istopatologiche acute e croniche. La nefrotossicità acuta si esprime attraverso una tubulopatia seguita da una congestione capillare peritubulare. Non è certo se tali lesioni, che in un primo tempo appaiono reversibili alla sospensione del trattamento, non diventino a lungo termine irreversibili giungendo al danno renale cronico e cioè ad una fibrosi interstiziale, ad una atrofia tubulare nonché ad una arteriopatologia (66, 67). Non si deve dimenticare fra l'altro come il rene sia già organo bersaglio della microangiopatia diabetica. La tossicità renale della ciclosporina è quindi da valutare attentamente soprattutto perchè si pone come limite temporale ad un trattamento prolungato. Ma un altro aspetto da non tralasciare è quello relativo alle interazioni della ciclosporina con altri farmaci che possano potenziarne o ridurre la concentrazione ematica. Il DMC (Drug Monitoring Centre) della Sandoz ha curato delle tabelle in grado di esemplificare i dati più rilevanti emersi dalla letteratura, suggerendo possibili o potenziali interazioni ed eventuali meccanismi d'azione (68). Alcuni di questi farmaci ci interessano in modo particolare o perchè di largo uso, come l'eritromicina (69), antibiotico appartenente alla classe dei macrolidi o perchè di probabile uso in relazione all'età del paziente (giovani donne che facciano uso di contraccettivi orali); non per questo dobbiamo dimenticare l'interazione con anticonvulsivanti o antivirali, diuretici e cefalosporine e così via. Per alcuni di essi sappiamo in che modo interferiscono con il metabolismo epatico della ciclosporina e perchè siano in grado di potenziarne la tossicità renale; ma nella maggioranza dei casi abbiamo bisogno di studi ulteriori per arrivare a maggiori delucidazioni. Ciò che interessa è tuttavia sapere che esiste una vasta gamma di farmaci che possono far variare il livello ematico di ciclosporina e che quindi tale concentrazione deve essere attentamente monitorata. Si ribadisce quindi il concetto che solo in strutture altamente specializzate è possibile condurre in maniera corretta trials facenti uso di questo farmaco.

Razionale per l'uso della nicotinamide nel diabete di tipo 1 all'insorgenza

Agli inizi degli anni 80 cominciarono ad essere noti i risultati di alcuni studi in cui la nicotinamide (Fig. 9) veniva usata nell'animale per prevenire l'insorgenza del diabete. Si deve ad Huber nel 1867 la scoperta e l'isolamento di questa vitamina, ma solo più tardi la sua azione biochimica fu chiarita. Infatti Warburg e Christian isolarono l'amide dell'acido nicotinico (nicotinamide) dal NADP e due anni dopo Elvehjem e collaboratori dimostrarono ufficialmente l'azione antipellagra esercitata dai due composti. Negli anni immediatamente successivi venne quindi messa in evidenza un'azione farmacologica della niacina estranea all'attività vitaminica non condivisa peraltro dalla sua amide. L'acido nicotinico possiede infatti la capacità di ridurre la concentrazione di VLDL ed LDL nel plasma agendo sulla sintesi e sul catabolismo dei trigliceridi e del colesterolo. Altri effetti farmacologici della niacina riferiti in letteratura sono quello iperemizzante, galattogogo, fibrinolitico e vasomotorio, condivisi qualitativamente dalla nicotinamide,

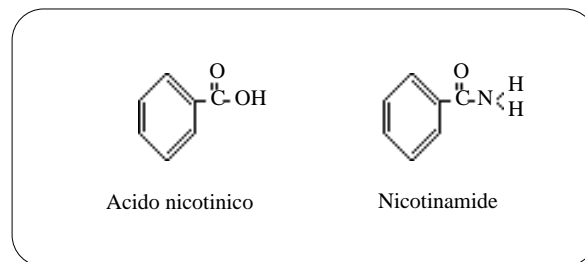


Figura 9. Struttura chimica dell'acido nicotinico e del suo derivato, la nicotinamide.

ma quantitativamente tanto deboli da farla ritenere priva d'azione farmacologico nei suddetti settori. Da alcuni classici studi con streptozotocina, è emersa la convinzione che i radicali liberi di ossigeno possano danneggiare la beta cellula attraverso la distruzione delle catene di DNA. I meccanismi di riparazione del DNA causano deplezione del contenuto di NAD intracellulare e quindi riducono la capacità di rimuovere i radicali prodotti durante il normale metabolismo ossidativo. Da questa nozione emerge come l'uso di sostanze capaci di normalizzare la concentrazione intracellulare di NAD possa giocare un ruolo importante nel limitare il danno beta cellulare o addirittura favorire la rigenerazione (70). In questa direzione si stanno muovendo dei passi importanti per mezzo dell'utilizzazione della nicotinamide. Si deve alla scuola giapponese in quest'ultimo decennio il merito di aver esplorato le possibilità terapeutiche della nicotinamide in ambito diabetologico. Si citano al riguardo gli importanti lavori di Okamoto, pubbli-

cati agli inizi degli anni '80 in cui l'Autore mostra il meccanismo d'azione della nicotinamide nel prevenire la comparsa di diabete nei topi NOD (71-74). Okamoto stesso ha elaborato un'ipotesi secondo la quale al danneggiamento della beta cellula fa seguito la rottura del DNA; viene quindi immediatamente attivato un meccanismo di riparazio-

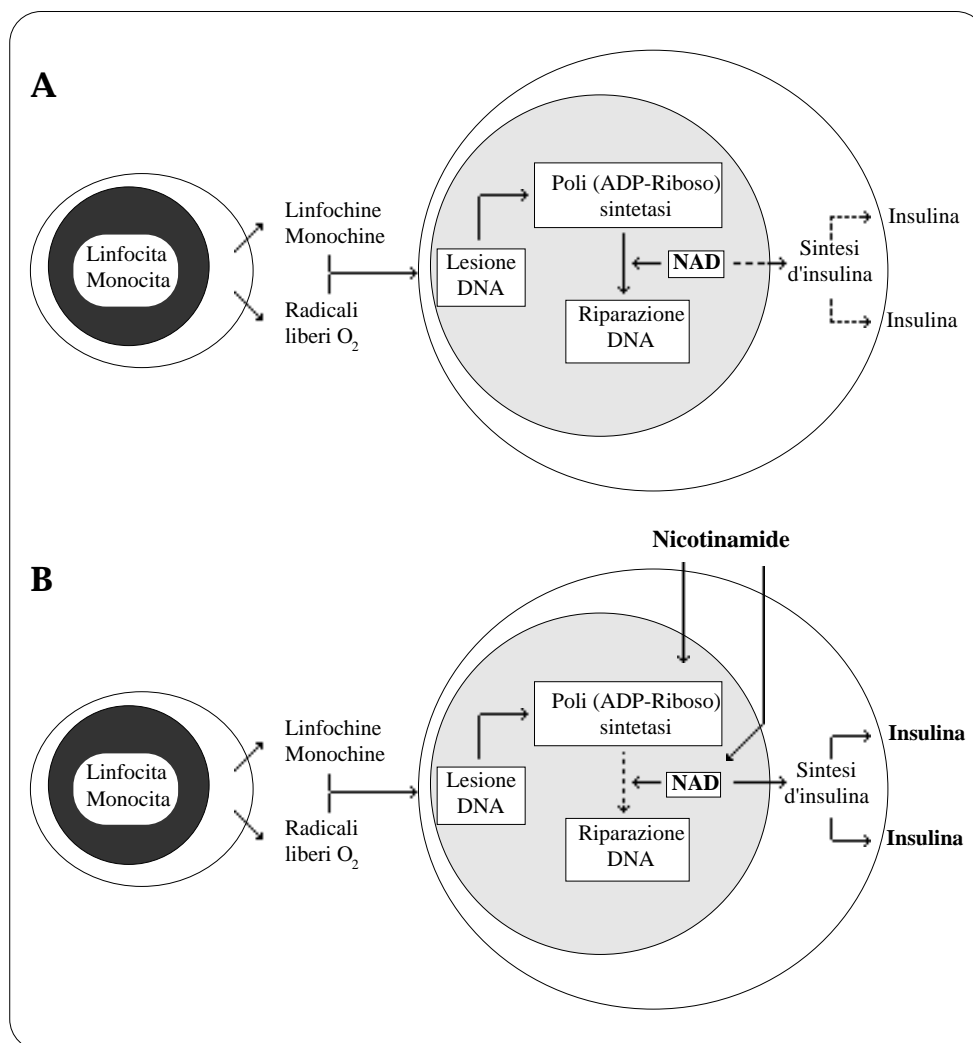


Figura 10. Rappresentazione schematica del danno beta-cellulare indotto dai radicali liberi di ossigeno rilasciati all'interno dell'isola dalle cellule del sistema immunitario (A). La nicotinamide, inibendo la poli-(ADP-riboso) sintetasi, aumenta il contenuto cellulare di NAD e favorisce la sintesi e la secrezione di insulina (B).

ne tramite l'enzima poli-ADP riboso sintetasi che consuma in modo sopra fisiologico NAD bloccando così la funzione di sintesi cellulare tra cui appunto quella dell'insulina. La nicotinamide, inibitore di tale enzima di riparazione, favorirebbe la sintesi di insulina residua da parte delle cellule danneggiate. Attraverso il blocco enzimatico si è dimostrato inoltre la capacità della nicotinamide di favorire la rigenerazione beta cellulare, facendo ciò supporre che l'enzima poli ADP-riboso sintetasi sia un enzima di restrizione per la moltiplicazione della beta cellula (Fig. 10a e 10b).

Quello che sorprende tuttavia è che già Lazarow, alla fine degli anni '40 poneva l'accento sulla possibilità di prevenire o ridurre la frequenza di diabete indotto da allossana su ratti previamente trattati con larghe dosi di nicotinamide (75). La proposta nell'ultimo decennio di questo tipo di intervento, sta aprendo nuove strade nel campo della terapia del diabete di tipo 1 nella sua fase iniziale. Sulla scorta delle nuove acquisizioni, ai primi timidi tentativi di uso della nicotinamide, hanno fatto seguito tutta una serie di trials in cui l'impiego della vitamina sta assumendo un ruolo di grande importanza.

Farmaco	Meccanismo di azione	Effetto sulla remissione
Azatioprina	Immunosoppressione	moderato o assente
Prednisone+azat.	Immunosoppressione	moderato o assente
Plasmaferesi	Rimozione degli autoanticorpi	assente
Interferone	Immunomodulazione	assente
Metisoprinolo	Immunomodulazione	assente
Nicotinamide	Aumento del contenuto di NAD nelle cellule con incremento della sintesi di insulina	-moderato a basse dosi (200 mg/die) -in corso trial ad alte dosi (1.5 g/die)
Ciclosporina	Immunosoppressione selettiva	-rilevante (30% di remissioni complete ad un anno) -assente o moderata dopo 2 anni di terapia

Tabella 9. Principali interventi terapeutici impiegati nel trattamento patogenetico del diabete di tipo I.

Nicotinamide: esperienza clinica nell'uomo

Si deve al gruppo di Vague il merito di aver ottenuto i primi validi risultati nell'ambito degli studi con nicotinamide nel diabete di tipo 1 all'insorgenza (76). Questo autore ha utilizzato 3 gr. al giorno di nicotinamide in diabetici neodiagnosticati in cui veniva eseguita anche una terapia insulinica intensificata. Partecipavano allo studio 14 pazienti suddivisi in un gruppo di controllo (trattamento con placebo ed insulina) ed un gruppo trattato con nicotinamide più insulina. A 12 mesi dalla diagnosi 3 dei 7 soggetti appartenenti al secondo gruppo erano andati incontro a remissione clinica mentre nessuno lo era fra i 7 pazienti di controllo. Sulla scorta di questi dati ed in base alla nostra esperienza, abbiamo voluto iniziare uno studio in pazienti diabetici di tipo 1 neodiagnosticati usando NCT a basso dosaggio. Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia della nicotinamide nel modificare i parametri metabolici ed immunologici rispetto al gruppo di controllo. Altro obiettivo che ci si è posti è stato quello di cercare la dose soglia di nicotinamide che avesse un'efficacia terapeutica. Abbiamo quindi eseguito uno studio aperto randomizzato con gruppo di controllo. All'indagine sono stati ammessi 36 pazienti il cui esordio di malattia non era superiore alle 4 settimane e di età compresa fra 5 e 35 anni. La dose di nicotinamide somministrata era pari a 100 mg. due volte al giorno, per la durata di un anno ed in ambedue i gruppi è stata effettuata una terapia insulinica ottimizzata. Nel gruppo trattato con nicotinamide abbiamo incluso 23 pazienti, 10 di sesso femminile e 13 di sesso maschile mentre il gruppo di controllo era composto da 13 pazienti di cui 6 femmine e 7 maschi. In ambedue i gruppi l'età media era di circa 18 anni. I parametri da noi seguiti suddivisi in due gruppi includevano quelli metabolici ed immunologici. Tali parametri oltre che al momento dell'ingresso nello studio sono stati valutati dopo 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia. Dall'analisi dei dati ottenuti valutando come parametro l'emoglobina glicosilata è emerso come sia possibile ottenere un miglior controllo metabolico in pazienti trattati con nicotinamide rispetto a quelli trattati solo con insulina (Fig 11).

Altro dato sicuramente significativo è quello riferibile al "breakfast tolerance test". Si è infatti osservato nel gruppo di pazienti trattati con nicotinamide un sensibile aumento della secrezione di C peptide sia dopo 6 che 12 mesi di terapia, mentre nel gruppo di controllo tale incremento non era significativo (Fig 12 e 13).

Nell'ambito invece dei parametri immunologici non è emerso alcun dato significativo; in altre parole il gruppo trattato con nicotinamide e di controllo hanno mostrato le stesse variazioni nel corso del follow-up (Tab 10).

Infine un aspetto interessante riguarda la dose di nicotinamide da noi utilizzata, sensibilmente inferiore rispetto a quella proposta da Vague nel suo studio che era pari a 3 g al giorno. Infatti i 200 mg previsti dal nostro protocollo si sono rivelati in grado di migliorare significativamente il controllo metabolico nei soggetti trattati rispetto al gruppo di controllo. E' chiaro a questo punto come il trattamento con nicotinamide possa essere in grado di agire non solo sulla fase di remissione ma di modificare anche il decorso metabolico della malattia. Il suo impiego è quindi giustificato anche in considerazione della assenza di fenomeni collaterali legati al suo uso.

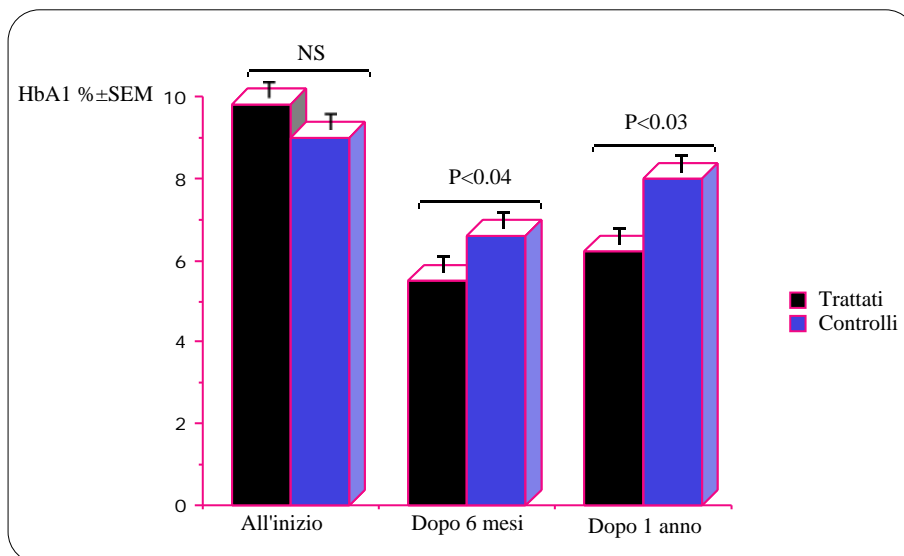


Figura 11. Valori dell'emoglobina glicosilata nei due gruppi studiati, alla diagnosi, dopo 6 e dodici mesi di trattamento. I pazienti trattati con NCT, in aggiunta alla terapia insulinica, mostrano una significativa riduzione della HbA1c rispetto ai controlli.

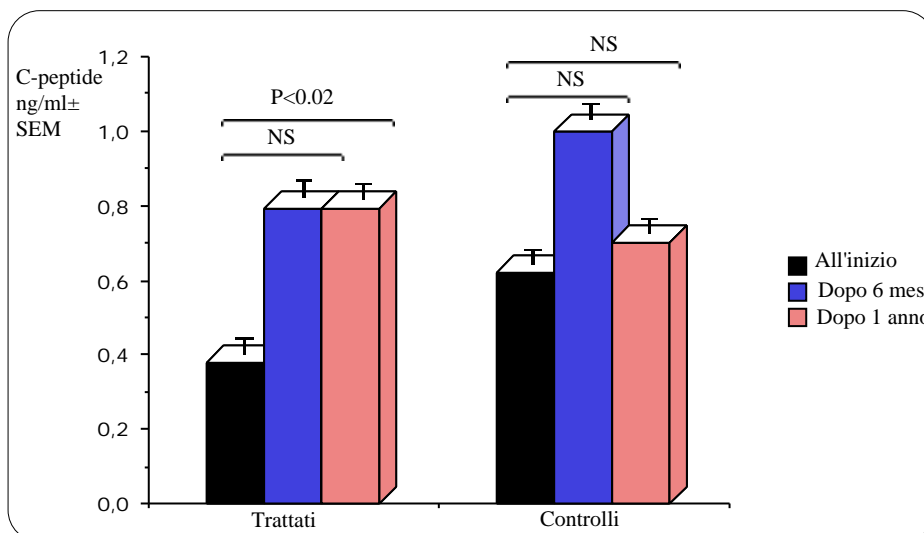


Figura 12. Valori del peptide C basale nei due gruppi studiati, alla diagnosi, dopo 6 e 12 mesi di trattamento. Solo nel gruppo trattato con NCT si osserva un incremento significativo del peptide C basale dopo un anno di trattamento.

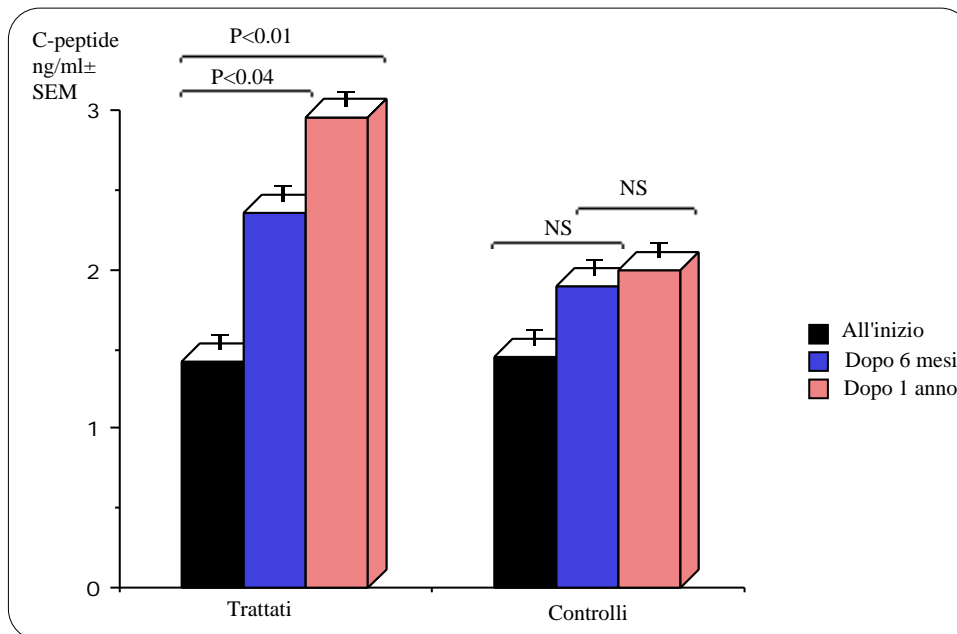


Figura 13. Valori del peptide C dopo stimolo (breakfast tolerance test) nei due gruppi studiati, alla diagnosi, dopo 6 e 12 mesi di terapia. Si osserva una risposta del peptide C al pasto significativamente migliore che al momento della diagnosi solo nei pazienti trattati con nicotinamide.

	Trattati con NCT	Controlli
Linfociti CD3+ (T totali)	57.8±2.1	55.0±3.2
Linfociti CD4+ (helper)	34.5±3.2	35.4±3.0
Linfociti CD8+ (citot/soppressori)	22.1±1.6	25.6±2.1
Linfociti CD7+ (K/natural K)	5.6±1.1	8.6±2.2
Linfociti CD22+ (Linfociti B)	16.1±2.0	12.0±2.9
Monociti	12.2±1.9	10.2±1.7
Linfociti T attivati CD25+ (recettore per IL2)	3.8±0.7	4.3±0.8
Anti-HLA-Classe II	14.9±2.0	11.6±1.0
Positività per anticorpi anti-insula pancreaticata (ICA)		
Alla diagnosi	69%	77%
Dopo 6 mesi	43%	38%
Dopo 12 mesi	35%	38%

Tabella 10. Dati immunologici nei due gruppi di pazienti all'inizio dello studio (media±SE).

Nicotinamide: prospettive future

Da quanto esposto finora emerge come la nicotinamide si proponga quale farmaco in grado di modificare la storia naturale del diabete insulino dipendente. In accordo con le ipotesi formulate da Okamoto, e da quanto emerso dal nostro studio, l'incremento della secrezione di C peptide nei soggetti trattati suggerisce come la nicotinamide sia in grado di migliorare le funzioni della massa beta cellulare residua in soggetti affetti da diabete mellito insulino dipendente al momento della diagnosi. In prospettiva, quindi, la mancanza di effetti collaterali della nicotinamide potrebbe suggerire la possibilità di una sua utilizzazione durante la fase preclinica della malattia. Sul piano etico questo tipo di intervento non suscita perplessità, anche se dal punto di vista scientifico il suo impiego deve essere attentamente valutato. Le prospettive più interessanti che sembrano aprirsi sono, comunque, quelle che prevedono una utilizzazione della nicotinamide in associazione con un farmaco immunosoppressivo. Se da una parte l'immunosoppressore potrebbe essere in grado di arrestare selettivamente il processo di distruzione delle beta cellule messo in atto dal sistema immunitario, dall'altro la nicotinamide favorirebbe la rigenerazione delle stesse. L'azione combinata dei due farmaci consentirebbe quindi di sfruttarne appieno la loro potenzialità terapeutica e di ridurre la dose di immunosoppressore utilizzato, onde minimizzare i suoi effetti tossici e poter condurre la sperimentazione con quest'ultimo per tempi più lunghi.

Bibliografia

- 1) Progress in Immunology. Fongerean M., Dausset J. (eds.) Academic Press, London, 1980.
- 2) Hobart MJ, Mc Connel I.: The immune system: a course on the molecular and cellular basis of immunity. Blacwell Scientifico Publications, Oxford, 1980.
- 3) Katz DH, Benacerra B: Immunological Tolerance, Academic Press, New York, 1974.
- 4) Sell S: Immunology, Immunopathology and Immunity. Harper, New York, 1975.
- 5) Wolf E, Spencer KM, Cudworth AG: The genetic susceptibility to Type 1 (insulin dependent) diabetes, analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia* 24:224-230.
- 6) Gamble DR: The epidemiology of insulin-dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. *Epidemiol. Rev.* 2:49-70, 1980.
- 7) Bottazzo GF, Pujol-Borrel R, Doniach D: Humoral and cellular immunity in diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Allergy* 1:63, 1981.
- 8) Pozzilli P, Tam A, Gale EAM: HLA-DR3 and activated lymphocytes: significance in autoimmunity. *Lancet* ii:954-955, 1985.
- 9) Anderson CE, Hodge SE, Rubin R, Rotter JI, Terasaki PL, Irvine WJ, Rimoin DL: A search for heterogeneity in insulin dependent diabetes mellitus. HLA and autoimmune studies in simplex, multiplex and multigenerational families. *Metabosism* 32: 471-477.
- 10) Toniolo A, Onodera T: Virus and diabetes. In: *Immunology of Diabetes*, Andreani D, Di Mario U, Federlin KF, Heding LGG (eds.), London, pp. 63-71, 1984.
- 11) Menser MA, Forrest JM, Bransby RD: Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* i: 57-60, 1978.
- 12) Onodera T, Suzuki H, Toniolo A, Notkins AL: Virus-induced diabetes: cytomegalovirus and multiple enviromental insults. *Diabetologia*, 24:218-219, 1983.
- 13) Notkins AL, Yoon JW, Onodera T, Jenson AB: Virus-induced diabet mellitus: infection of mice with variants of encephalomyocrditis virus, Cossachievirus B4, and Reovirus type 3. In: *Treatment of Early Diabetes* Camerini-Davalos RA, Hanover B (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 137-146, 1979.
- 14) Andreani D: Immunology in diabetes: introduction and overview. In: *Immunology in Diabetes*, Andreani D, Di Mario, Federlin KF, Heding LG. pp. 1-20, 1984.
- 15) Lernmark A: Islet cell antibodies. *Diabetic Medicine* 4: 285-292, 1987.
- 16) Bottazzo GF, Dean BM, Gorsuch AN, Cudworth AG, Doniach D: Complement-fixing islet cell antibodies in Type 1 diabetes: possible monitors of active beta-cell damage. *Lancet* i:668-672, 1980.
- 17) Eisenbarth GS: Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *Diabetes* 314:1360-1367, 1986.

- 18) Cudworth AG: Current concepts of aetiology: Type 1 (insulin dependent) diabetes. In: *Advanced Medicine*, Bellingham AJ (Ed.), Pitman Medical, Tunbridge Wells, 16:123-135, 1980.
- 19) Wilkin T, Armitage M, Casey C et al.: Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* i: 480-482, 1985.
- 20) Wilkin T, Palmer J, Bonifacio E, Diaz JL, Kruse V: First International Workshop on the Standardization of insulin autoantibodies. *Diabetologia* 30: 676-677, 1987.
- 21) Nerup J, Andersen OO, Bendixen G, Egeverg J, Poulsen JE: Antipancreatic cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. *Diabetes* 20: 424-427, 1971.
- 22) Pozzilli P, Sensi M, Gorsuch AN, Bottazzo GF, Cudworth AG: Evidence for raised K cell levels in Type 1 Diabetes. *Lancet* ii: 173-175, 1979.
- 23) Lovchik JC, Hong R: Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC): amylase antigen projection. *Prog Allergy* 22:1-10, 1977.
- 24) Pozzilli P, Sensi M, Gorsuch AN, Cudworth AG: The importance of measuring Fc γ 2 (killer) cells in insulin dependent (Type 1) diabetes. *Acta Diabetol Lat* 17:119-122, 1980.
- 25) Bushard K, Hodsbak S, Rygaard J: Depressed suppressor cell activity in patients with newly diagnosed insulin dependent diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 41:25-29, 1980.
- 26) Signore A, Cooke A, Pozzilli P, Butcher G, Simpson E, Beverley PCL: Class II and IL2 receptor positive cells in the pancreas of NOD mice. *Diabetologia* 30: 902-905, 1987.
- 27) Selam JL, Clot J, Andary M, Mirouze J: Circulating lymphocyte subpopulations in juvenile insulin dependent diabetics. *Diabetologia* 16: 35-40, 1979.
- 28) Pozzilli P, Andreani D, Sensi M, Wolf E, Taylor M, Bottazzo GF, Cudworth AG: K cells and antibody dependent cytotoxicity in autoimmune polyendocrine disease. VI Int Cong Endocrinology, Melbourne, pp. 529, 1980.
- 29) Morel AP, Dorman JS, Todd JA, McDevitt HO, Trucco M: Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ chain protects against type 1 diabetes: A family study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8111-8115, 1988.
- 30) Like AA, Rossini AA: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New Model of Diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417, 1976.
- 31) Rossini AA, Williams RM, Mordes JP, Appel MC, Like AA: Animal models of insulin dependent diabetes. *Excerpta Medica International Congress Series*, No. 500, pp. 367-372, 1979.
- 32) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y: Breeding of a non-obese strain of mice. *Exp Anim* 29:1-13, 1980.
- 33) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K: Effect of castration on the appearance of diabetes in the NOD mouse. *Exp Anim* 30:137-140, 1981.

- 34) Nakhooda AF, Like AA, Chappel CJ, Wei CN, Marliss EB: The spontaneously diabetic Wistar rat (the 'BB' rat). *Diabetologia* 14:199-207, 1978.
- 35) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, Mackay EH, Swift PGF, Gamble DR: In-situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N. Engl. J. Med.*, 313:353-360, 1985.
- 36) Dean BM, Walker R, Bone AJ et al.: Pre-diabetes in the spontaneously diabetic BB/E rat: lymphocyte subpopulations in the pancreatic infiltrate and expression of rat MHC class II molecules in endocrine cells. *Diabetologia* 28:464-466, 1985.
- 37) Signore A, Beverley PCL, Parman A, Pozzilli P: In vivo visualization of insulinitis in BB/W rats following i.v. administration of 123-I labelled interleukin 2. British Diabetic Association, Autumn Meeting A24, 1986.
- 38) Signore A, Parman A, Pozzilli P, Andreani D, Beverley PCL: Detection of activated lymphocytes in endocrine pancreas of BB/W rats by injection of 123 Iodine labelled interleukin-2: an early sign of Type 1 diabetes. *Lancet* ii:537-540, 1987.
- 39) Tarn A, Smith CP, Spencer CM, Bottazzo GF, Gale EAM: Type 1 (insulin dependent) diabetes: a disease of slow clinical onset? *Br Med J* 294:342-345, 1987.
- 40) Bottazzo GF, Mann JI, Thorogood M, Baum JD, Doniach D: Autoimmunity in diabetics and their families. *Br Med J* 2: 165-168, 1978.
- 41) Al Sakkaf L, Tarn AC, Schwarz G, Gale EAM, Bottazzo GF, Pozzilli P: Lymphocyte activation and reduced CD4/CD8 lymphocyte ratio before the onset of Type 1 diabetes. *Diabetologia*, 32:332-325, 1989.
- 42) Wilson RW, Reeves WG: Neutrophil function in diabetes. In: *Recent Advances in Type 2 Diabetes*. Natrass M. (Ed.), Churchill Livingstone, London, pp. 127-137, 1986.
- 43) Drell DW, Notkins AL: Multiple immunological abnormalities in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30:132-143, 1987.
- 44) Pozzilli P, Negri M, Pagani S, Beales P, Andreani D: Impaired CD4/CD8 lymphocyte ratio in patients with long standing diabetes mellitus. *IRCS Med Sci* 14:648-649, 1986.
- 45) Pozzilli P, Arduini P, Visalli N, Sutherland J, Pezzella M, Galli C, Corradini SG, Biasio L, Gale EAM, Andreani D: Reduced protection against hepatitis B virus following vaccination in patients with Type 1 (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia* 30:817-819, 1987.
- 46) Pozzilli P, Gale EAM, Visalli N, Baroni M, Crovari P, Frighi V, Cavallo MG, Andreani D: The immune response to influenza vaccination in diabetic patients. *Diabetologia* 29:850-854, 1986.
- 47) Cudworth AG, Andreani D, Bodansky HJ, Squadrito G: *Diabetes and its late complications*. Libbey, London, 1982.

- 48) Di Mario U, Iavicoli M, Ventriglia L, Galfo C, Bellagamba C, Trionfera G, Cicconetti C, Andreani D: Immune complexes, microangiopathy and metabolic control in diabetes. In: *Diabetes 1979*, Waldhausl WK (Ed.). Excerpta Medica, Amsterdam pp. 379-382, 1980.
- 49) Andreani D, Kolb H, Pozzilli O (Eds): *Immunotherapy of Type 1 diabetes*. John Wiley and Sons, Chichester 1989.
- 50) Heinze E, Thon A, Vetter U, Zuppinger K: Gammaglobulin therapy in 6 newly diagnosed diabetic children. *Acta Paediatr Scand* 74:179-184, 1985.
- 51) Doivisto VA, Aro A, Cantell K, Hataja M, Hutunen J, Karonen SL, Mustajoiski P, Pelkonen R, Seppala P: Remission in the newly diagnosed type 1 (insulin dependent) diabetes: influence of interferon as an adjunct to insulin therapy. *Diabetologia* 27:193, 1984.
- 52) Cobb WE, Molitch M, Reichlin S: Levamisole in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 303:1065-1066, 1980
- 53) Ludvigsson J, Heding L, Lieden G, Marnar B, Lernmark A: Plasmapheresis in the initial treatment of insulin-dependent diabetes mellitus in children. *Br Med J* 286:176, 1983.
- 54) Moncada E, Subira ML, Barberia JJ, Sanchez-Ibarrola A, Salvador J, Goni F, Oleaga A, Cano I: Effect of thymic hormone and azathioprine administration on remission rate and insular function of 35 recent diagnosed type 1 (insulin dependent) diabetic patients. A one year follow-up study. *Diabetologia* 30:559 (abstract), 1987.
- 55) Secchi A, Pontiroli AE, Falqui L, Pastore MR, Scorza R, Carenini A, Meroni PL, Pozza G: Prednisone, Indomethacin, or theophylline administration and the remission phase in recent onset of type 1 insulin-dependent diabetic patients. *Transplant Proc* 18:1540, 1986.
- 56) Greulich B, Lander T, Standl E, Kolb H, Gerbits KD, Bertams J, Albert E, Kuschak D, Mehnert H, Gries FA: Immune intervention trials in early diabetes mellitus type 1: effects of inosiplex on metabolic and immunological parameters. *Pediatr Adolesc Endocr* 15:350-354, 1986.
- 57) Pozzilli P, Ghirland G, Manna R, Alfano G, Grevo AV, Andreani D: White cell transfusion in recent onset of type 1 diabetes. *Diabetes Research* 3: 273, 1986.
- 58) Lohmann D, Bierworlf B, Krug J, Lampeter E, Verlohren HJ: Specific immunotherapy in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. of Autoimm.*, in press.
- 59) Kiesel U, Maruta K, Treichel U, Bicker U, Kolb H: Suppression of spontaneous insulin-dependent diabetes in BB rats by administration of ciamexone. *J. Immunopharmacol* 8:393, 1986.
- 60) Eisenbarth GS, Srikanta S, Jackson R, Morris MA: ATGAM and prednisone immunotherapy or recent onset Type 1 diabetes mellitus. *Clin Res* 31:500 (abstract), 1983.
- 61) The Canadian European randomized control trial group: Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes* 37:1574-1582, 1988.
- 62) Feutren G, Assan R, Karsenty G, Rostu DH, Sirmaj J, Papoz L, Vialettes B, Vexiau P, Rodier M, Lallemand A: Cyclosporin increases the rate and length of remission in insulin dependent diabetes of recent onset. *Lancet* ii:119-1234, 1986.

- 63) Mihatsch MJ: Morphology of cyclosporin nephropathy. *Prog. Allergy* 447-465, 1986.
- 64) Levy-Marchal C, Czernichow P: Effect of different dosages of cyclosporin A on the early phases of overt insulin dependent diabetes mellitus in children. *Transpl Proc* 18:1543-1544, 1986.
- 65) Ryffel B, Hiestand P, Foxwell B, Donatsch P, Boelsterli HJ, Maurer G, Mihatsch MJ: Nephrotoxic and immunosuppressive potentials of cyclosporine metabolites in rats. *Transplant Proc* pp. 41-45, 1985.
- 66) Myers BD, Ross J, Newton L, et al: Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 311:699-705, 1984.
- 67) Svenson K, Bohman SO, Hallgren R: Occurrence in patients with autoimmune diseases treated with cyclosporine. *Arch Intern Med* 146:2007-2010, 1986.
- 68) Cockburn I: Cyclosporine A: a clinical evaluation of drug interactions. *Transplantation Proceedings* vol XVIII No. 6, Suppl 5, pp.50-55, 1986.
- 69) Kessler M et al.: Interaction between cyclosporin and erythromycin in a kidney transplant patient. *Eur J Clin Pharmacol* 30:633-634, 1986.
- 70) Sandler S, Andersson A: Long term effects of exposure of metabolism and B-cell function. *Diabetologia* 29:199, 1986.
- 71) Okamoto H: Regulation of proinsulin-dependent diabetes. *Med Cell Biochem* 37:43-51, 1981.
- 72) Uchigata Y, Yamamoto H, Nagai H, Okamoto H: Effect of poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32:316-318, 1983.
- 73) Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294:284-286, 1981.
- 74) Yonemura Y, Takashima T, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H: Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet a-cell regeneration. *Diabetes* 33:401-404, 1984.
- 75) Lazarow A, Liambies J, Tausch AJ: Protection against diabetes with nicotinamide. *J Lab Clin Med* 36:249-258, 1950.
- 76) Vague PH, Viallettes B, Lassmann-Vague V, Vallo JJ: Nicotinamide may extend remission phase in insulin dependent diabetes. *Lancet* p. 619, 1987.
- 77) Pozzilli P, Visalli N, Ghirlanda G, Manna R, Andreani D: Nicotinamide increases C peptide secretion in patients with recent onset type 1 Diabetes. *Diabetic Medicine* 6:568-572, 1989.

Indice

Istruzioni per gli Autori.....	pag.	2
Editoriale.....	»	3
Introduzione.....	»	5
Immunologia ed autoimmunità	»	5
Immunologia nella patogenesi del diabete insulinodipendente (Tipo 1)	»	6
Associazione tra diabete mellito di Tipo 1 ed altre endocrinopatie autoimmuni	»	9
Aspetti genetici di rilevanza per l'immunologia del diabete	»	10
Modelli animali di diabete autoimmune: il topo NOD ed il ratto BB Wistar.....	»	12
Il processo di insulite espressione di autoimmunità organo specifica ..	»	14
Il periodo di latenza nell'uomo prima della comparsa del diabete clinico ed il significato dei markers immunologici.....	»	18
Alterazioni immunologiche nel corso della malattia	»	20
Aspetti immunologici delle complicanze croniche: la microangiopatia ..	»	22
L'immunointervento nel diabete di tipo 1 all'insorgenza: possibile terapia patogenetica	»	24
Immunomodulazione ed immunosoppressione nel diabete di tipo 1 all'insorgenza	»	25
Esperienza clinica con i farmaci immunomodulatori	»	26
Esperienza clinica con i farmaci immunosoppressori: la Ciclosporina .	»	27
Ciclosporina: effetti collaterali ed interazione con altri farmaci	»	28
Razionale per l'uso della nicotinamide nel diabete di tipo 1 all'insorgenza	»	29
Nicotinamide: esperienza clinica nell'uomo.....	»	32
Nicotinamide: prospettive future.....	»	35
Bibliografia	»	36
Indice	»	41
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio.....	»	42
Collana videocassette Medical Systems	»	44

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna, Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La β -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed immunologico ed fluorimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.

34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M., Gullo D.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.

Caleidoscopio
anno 8, numero 49

Rivista monografica di Medicina

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
(079) 270464



Editore

Medical Systems S.P.A.
Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
tel. (010) 808051(7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 804661- 802257.

Segretaria di Direzione

Fiorella Gaggero

Servizio Abbonamenti

Franca Giordano

Stampa

ATA - Azienda Tipografi Associati srl
Via G. Torti, 32 C. Rosso - Tel. (010)513120 - Telefax (010) 503320
16143 Genova

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare nel Marzo 1990

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4
- 3/8/6 DPR 627/78)