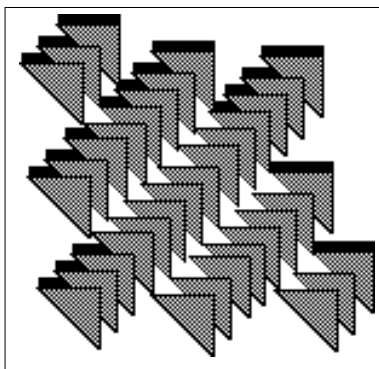


# Caleidoscopio



**Alberto Signore**  
**Marco Chianelli**  
**Vincenzo Fiore**  
**Paolo Pozzilli**  
**Marcello Negri**  
**Domenico Andreani**

## **L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni**

Servizio Speciale di Medicina Nucleare e  
Cattedra di Endocrinologia (I), II Clinica Medica,  
Università "La Sapienza"  
Roma

**Direttore Responsabile**  
**Sergio Rassu**

65

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

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83. 401  
Stampato a Genova 1991.



## Editoriale

La prevenzione delle patologie endocrine autoimmuni, e del diabete mellito di tipo 1 in particolare, è al centro di un fervore di ricerche in tutto il mondo.

Una delle tappe fondamentali per poter raggiungere questo scopo è poter disporre di mezzi diagnostici non invasivi che permettano una diagnosi precoce, prima che, nel caso del diabete mellito di tipo 1, la massa beta cellulare del pancreas venga distrutta completamente dal processo autoimmune.

L'immunoscintigrafia, dopo i pionieristici studi fatti con cellule immunitarie marcate, sta schiudendo interessanti prospettive anche per l'uomo con la messa a punto della metodologia in cui viene utilizzata l'interleuchina 2 marcata con il <sup>99m</sup>Tc.

Questa monografia analizza proprio queste problematiche e le inquadra dopo una aggiornata descrizione dei meccanismi alla base sia del diabete mellito di tipo 1 che della patologia autoimmune tiroidea.

Gli Autori che ospitiamo sono allievi della Scuola del Professor Domenico Andreani direttore della I Cattedra di Endocrinologia dell'Università "La Sapienza" di Roma, e costituiscono un gruppo di ricerca che ha fornito e continua a fornire degli importanti ed originali contributi su queste tematiche. Questi lavori hanno avuto rilievo nazionale ed internazionale stabilendo un importante rapporto di collaborazione con il Dipartimento di Diabetologia ed Immunogenetica del St. Bartholomew's Hospital e con lo Human Tumour Immunology Group dell'Imperial Cancer Research Found di Londra.

Il dottor Alberto Signore, specialista in Endocrinologia, ricopre attualmente la carica di Assistente presso il Servizio di Medicina Nucleare della Clinica Medica II della Università di Roma "La Sapienza". Dal 1983 collabora con il Dipartimento di Diabetologia e Immunogenetica del St. Bartholomew's Hospital e con lo Human Tumour Immunology Group dell'Imperial Cancer Reserch Fund di Londra, con i quali ha compiuto importanti studi sullo sviluppo di nuove tecniche medico-nucleari per la diagnosi precoce delle malattie autoimmuni organo-specifiche. Vincitore di premi nazionali ed internazionali tra cui il recente premio della società Italiana di Endocrinologia, è autore di oltre 100 pubblicazioni scientifiche.

Il dottor Marco Chianelli, laureatosi all'Università di Roma "La Sapienza", è attualmente specializzando in Medicina Nucleare. Ha già svolto attività di ricerca nel campo della immunoscintigrafia concentrandosi particolarmente sullo sviluppo di nuove tecniche di marcatura delle citochine con gli isotopi radioattivi dello Iodio. E' autore di più di 20 pubblicazioni scientifiche sull'argomento. Dal 1988 svolge attività di ricerca con il gruppo del Prof. D. Andreani.

Il dottor Vincenzo Fiore, specializzando in Endocrinologia presso la II Scuola diretta dal Prof. D. Andreani, si è dedicato sin dal 1986 allo studio della cinetica in vivo di proteine biologicamente attive. Di recente si occupa della messa a punto di nuove tecniche immunoscintigrafiche e della loro applicazione in pazienti endocrinopatici. E' autore di circa 20 pubblicazioni scientifiche prevalentemente sulla patogenesi del diabete mellito di tipo 1 e 2.

Il dottor Paolo Pozzilli è attualmente Professore di Diabetologia Sperimentale nell'ambito del programma Erasmus della CEE ed aiuto della I Cattedra di Endocrinologia dell'Università di Roma La Sapienza. Formatosi nella scuola del Prof. D. Andreani, nel 1985 è stato nominato Senior Lecturer presso il Dipartimento di Diabetologia e Immunogenetica del St. Bartholomew's Hospital di Londra. Le sue ricerche, note a livello internazionale, si sono concentrate soprattutto sulla patogenesi delle malattie endocrine autoimmuni. Oltre a essere socio di molte società scientifiche nazionali e internazionali è Coordinatore Nazionale del Gruppo di Studio di Immunologia e Immunoterapia del diabete della Società Italiana di Diabetologia, nonché Segretario Generale dell'International Diabetes Immunotherapy Group (IDIG); è autore di oltre 200 pubblicazioni scientifiche.

Il dottor Marcello Negri è attualmente professore straordinario di Fisiopatologia Applicata all'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". Libero docente in Patologia Speciale Medica e in Clinica Medica Generale è stato assistente straordinario e poi professore associato di Patologia Medica.

Ha pubblicato oltre 200 lavori dedicandosi in particolare alla ricerca nel campo dell'endocrinologia sperimentale e clinica.

Il professor Domenico Andreani, Ordinario di Endocrinologia, è il Direttore della II Scuola di Specializzazione in Endocrinologia presso l'Università di Roma "La Sapienza". La sua scuola si è distinta nel corso degli anni, ed è nota a livello nazionale ed internazionale, specialmente per gli studi sperimentali e clinici nel campo del diabete mellito di Tipo 1 e di Tipo 2. Il Prof. Andreani ha rivestito incarichi di notevole prestigio quali la presidenza dell'European Association for Study of Diabetes (EASD), quella della Società Italiana di Endocrinologia ed è attualmente editore della rivista "Diabetes and Metabolism Reviews".

I collaboratori a questa monografia costituiscono un'importante gruppo di ricerca in Italia sulla patogenesi delle malattie autoimmuni organo-specifiche e sullo sviluppo di nuove tecniche immunoscintigrafiche oggetto di questa rassegna.

**Sergio Rassu**

## Introduzione

La possibilità di diagnosticare precocemente una malattia è presupposto necessario per una terapia precoce e quindi per una prevenzione secondaria ed eventualmente primaria della malattia stessa.

E' quindi comprensibile la notevole mole di lavoro che in questi ultimi decenni è stata spesa da ricercatori di tutto il mondo per lo sviluppo di una medicina preventiva al fianco della tipica medicina clinica. Ciò ha comportato un notevole sviluppo di tecniche d'analisi genetica e di tecniche diagnostiche, non invasive, per l'identificazione di soggetti a rischio per alcuni quadri patologici di notevole importanza sociale.

Per molti di questi quadri, e in primo luogo quelli relativi a malattie autoimmuni organo-specifiche, la suscettibilità genetica non è da sola in grado di fornire una previsione temporale dell'espressione della malattia sul piano clinico. Il motivo di ciò risiede essenzialmente sull'interferenza patogenetica esercitata da fattori legati all'individuo (assetto immunitario, ormoni, stress, ecc.) e da fattori legati all'ambiente (infezioni, dieta, clima, ecc.). Nel tentativo quindi di predire l'epoca d'insorgenza di una malattia, in soggetti geneticamente predisposti, è indispensabile ricercare uno o più markers legati a fasi diverse della storia naturale della malattia.

La caratteristica istopatologica di molte malattie autoimmuni organo-specifiche è l'infiltrazione linfo-monocitaria del tessuto bersaglio.

L'identificazione *in vivo* di tale infiltrato potrebbe costituire un valido marker per la diagnosi precoce di queste malattie. Le tecniche di medicina nucleare, per la loro caratteristica non-invasività, rappresentano un importante mezzo per il raggiungimento di questo scopo.

In questa rassegna verranno brevemente ricordate le più recenti teorie sulla patogenesi delle malattie autoimmuni organo-specifiche al fine di poter meglio comprendere il razionale che è alla base delle tecniche immunoscintigrafiche esistenti ed in corso di sviluppo, per la diagnosi degli infiltrati patologici, che saranno oggetto di particolare discussione.

## L'autoimmunità endocrina

I disordini delle ghiandole endocrine possono essere divisi, dal punto di vista clinico, in alterazioni della funzione con eccessiva produzione dell'ormone o con insufficiente produzione dell'ormone, spesso associata ad atrofia ghiandolare. L'autoimmunità è una delle principali cause di entrambi questi disordini. Così, reazioni immunitarie possono essere rivolte contro componenti delle cellule endocrine, ormoni o antigeni e recettori presenti sulle cellule bersaglio. Gli autoanticorpi rivolti contro le cellule endocrine sono ritenuti organo-specifici e sono rilevati con test che utilizzano lo specifico tessuto ghiandolare coinvolto. Tuttavia, in molte malattie autoimmuni organo specifiche sono presenti diversi anticorpi diretti contro varie ghiandole in un singolo paziente (1).

Una ulteriore classificazione delle endocrinopatie autoimmuni può essere fatta dal punto di vista immunologico distinguendosi quadri morbosi con prevalente coinvolgimento dell'immunità umorale e quadri con prevalente coinvolgimento dell'immunità cellulare. Le più recenti teorie patogenetiche tendono tuttavia ad eliminare una classificazione così rigida, dal momento che in quasi tutte le malattie autoimmuni si possono osservare alterazioni associate delle due componenti della risposta immunitaria (tabella 1).

Dal punto di vista istopatologico è quasi sempre possibile riscontrare, a carico della ghiandola bersaglio, un'infiltrazione linfomonocitaria. Sebbene il grado di infiltrazione vari grandemente da malattia a malattia, questo aspetto può essere considerato come la caratteristica più importante delle endocrinopatie autoimmuni. A tale proposito vale la pena di soffermarsi sulle caratteristiche di tale infiltrato; questo è composto quasi esclusivamente da linfociti T, B e monociti, in percentuale variabile, con pressoché assenza di polimorfonucleati. L'esordio è generalmente lento e progressivo, cronico e lentamente evolutivo con proliferazione linfocitaria in loco, senza significativa partecipazione di polimorfonucleati e senza un'aumentata permeabilità vascolare, tipicamente riscontrabili nelle infiammazioni di tipo acuto ed iperacuto. Altra caratteristica è che tale infiltrato scompare quando le cellule bersaglio sono state distrutte, residuando una fibrosi dell'organo (2, 3). Queste caratteristiche sono di notevole importanza per la loro peculiarità fisiopatologica e clinica e condizionano in maniera determinante la scelta delle tecniche immunoscintigrafiche da adottare per la loro diagnosi e follow-up.

<b>ENDOCRINOPATIA</b>	<b>IMMUNITA' CELLULARE</b>	<b>IMMUNITA' UMOREALE</b>
<b>TIROIDITE DI HASHIMOTO</b>	Citotossicità linfocitaria su colture di cellule tiroidee. Possibilità di riprodurre la malattia in animali mediante trasferimento di linfociti. Infiltrazione linfocitaria del parenchima.	Ab anti-tireoglobulina Ab anti-microsomiali Ab anti-Ag II colloide Ab anti-Ag di superficie
<b>MORBO di GRAVES</b>	Difetto nel numero e nella funzione dei linfociti T suppressor. Infiltrazione linfocitaria del parenchima.	Ab anti-recettore del TSH. Ab stimolanti la crescita dei tessuti retro orbitali. Ab stimolanti la crescita ghiandolare.
<b>MIXEDEMA PRIMITIVO</b>	Infiltrazione linfocitaria della tiroide	Ab bloccanti la crescita ed il metabolismo ghiandolare.
<b>MORBO di ADDISON</b>	Possibilità di indurre la surrenalite sperimentale, mediante trasferimento di linfociti. Infiltrazione linfocitaria del parenchima. Sensibilità cellulo-mediata verso antigeni cellulari surrenalici.	Ab anti-cellule corticali del surrene ed alta incidenza di altri auto-anticorpi: anti-cellule gastriche anti-tireoglobulina anti-fattore intrinseco.
<b>OOFORITE</b>	Infiltrazione linfocitaria del parenchima riportata in alcuni casi.	Ab anti-cellule ovariche. Non sempre legati alla malattia poiché si rilevano anche nel Morbo di Addison, nel quale spesso la funzione mestruale è normale.
<b>ORCHITE</b>	Scarsa infiltrazione linfocitaria del parenchima.	Ab anti-antigeni cellulari testicolari
<b>INFERTILITA' ENDOCRINOPATIA</b>	Infiltrazione linfocitaria del parenchima scarsa.	Ab anti-spermatozoi nel siero e nel liquido seminale.

**Tabella 1. Principali alterazioni immunologiche cellulari e umorali riscontrabili nelle endocrinopatie autoimmuni (segue).**

	IMMUNITA' CELLULARE	IMMUNITA' UMORALE
IPOFISITE	Infiltrazione linfocitaria del parenchima in alcuni casi.	Ab diretti contro cellule secernenti GH, PRL, ACTH, TSH, LH, FSH, talvolta presenti in pazienti con disordini endocrini multipli.
DIABETE MELLITO DI TIPO 1 (INSULINO-DIPENDENTE)	Diminuzione del numero dei linfociti T totali. Diminuzione del numero dei linfociti T-helper. Diminuita attività delle cellule T-killer. Aumentato numero di linfociti T-attivati. Aumentato rilascio di recettori per l'IL2. Riproduzione della malattia nell'animale mediante trasferimento di linfociti T. Infiltrazione linfocitaria del pancreas endocrino.	Ab anti-isola pancreatica (ICA, ICSA e CF-ICA) Ab anti-insulina Ab anti-antigene 64K Ab anti-antigene polare.
DIABETE MELLITO INSULINO RESISTENTE	Alterazioni non descritte	Ab anti-recettore per l'insulina. Ab anti-insulina
IPOPARIETIROID. PRIMARIO	Infiltrazione linfocitaria della parotide osservata in modelli animali sperimentali	Ab anti-cellule paratiroidiche. Ab anti-cellule paratiroidiche.

**Tabella 1. Principali alterazioni immunologiche cellulari e umorali riscontrabili nelle endocrinopatie autoimmuni**

### **Ruolo dei markers genetici nella diagnosi precoce delle endocrinopatie autoimmuni**

Esistono numerose prove dell'esistenza di una stretta associazione tra malattie autoimmuni e genotipo. Il maggiore complesso di istocompatibilità (HLA nell'uomo) è rappresentato da un tratto del cromosoma 6 costituito da una decina di geni le cui proteine codificate caratterizzano ogni cellula del nostro organismo e possono essere divise in due classi: quelle di classe I, presenti su tutte le cellule nucleate, capaci di presentare antigeni ai linfociti T citotossici (CD8 positivi); quelle di classe II, espresse sulla superficie dei linfociti T attivati, delle cellule dendritiche e dei macrofagi (cellule



“APC”) che intervengono nella presentazione dell'antigene ai linfociti T helper (CD4 positivi).

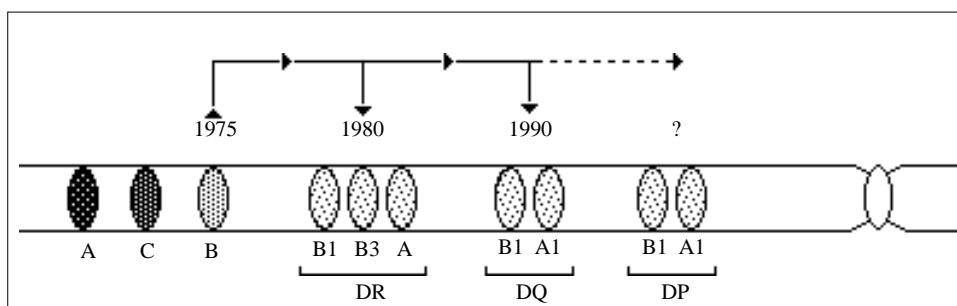
Le principali associazioni tra antigeni HLA di classe II e malattie autoimmuni sono riportate in tabella 2.

Il ruolo svolto dagli antigeni di classe I e II nell'induzione e nel controllo della risposta immunitaria rappresenta un' importante tappa nella patogenesi delle malattie autoimmuni e giustifica l'impegno sempre maggiore di ricercatori in questo campo. Inoltre, grazie alle nuove tecniche di genetica (modelli animali transgenici) e della biologia molecolare, si spera di arrivare ad identificare i geni responsabili della suscettibilità alla malattia (4).

<b>Morbo di Addison</b>	DR3/DQW2
<b>Tiroidite atrofica</b>	DR3
<b>Morbo di Graves</b>	DR3
<b>Diabete mellito di Tipo I</b>	DR1/DQW5, DR2/DQW1, DR3/DQW2, DR4/DQW8, DR6/DQW6
<b>Tiroidite di Hashimoto</b>	DR5/DQW3

**Tabella 2. Associazione tra antigeni HLA e principali endocrinopatie autoimmuni.**

Nel caso particolare del diabete mellito di Tipo 1 (IDDM) la ricerca del gene che conferisce suscettibilità è stata inizialmente confinata alle molecole di classe I e correlata dapprima con gli antigeni B8 e B15 (5). La successiva tipizzazione degli antigeni HLA di classe II ha messo in evidenza una più forte associazione con gli antigeni HLA-DR3 e DR4, in "linkage disequilibrium" con gli alleli della regione B (6). Attualmente l'applicazione di più sofisticate tecniche di biologia molecolare ha permesso di effettuare un'ulteriore tipizzazione della regione D (costituita dai loci DP, DQ e DR) e si è potuta così osservare una più stretta associazione della malattia con il locus DQ (e questo potrebbe essere ancora spiegabile con il "linkage disequilibrium") (figura 1).

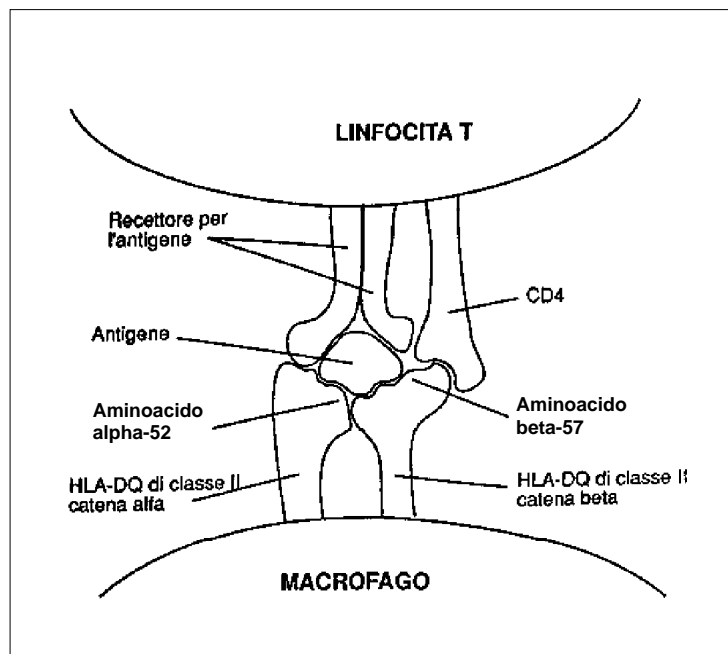


**Figura 1. Braccio corto del cromosoma 6 che mostra la posizione dei loci HLA che sono stati correlati alla suscettibilità per il diabete progressivamente nel corso degli anni.**

Sembrirebbe che la posizione 57 della catena  $\beta$  e la 52 della catena  $\alpha$  del gene DQ siano importanti nel conferire protezione o suscettibilità nei confronti di malattie autoimmuni come l'IDDM e il pemphigus vulgaris. In particolare, quando la posizione 57-  $\beta$  è occupata dall'acido aspartico, la probabilità di comparsa del diabete è molto bassa mentre quando trovasi un aminoacido a carica neutra (es. la valina) il rischio aumenta. In modo analogo risulta importante la presenza di un residuo di arginina in posizione 52-  $\alpha$  (7). Ciò sarebbe dovuto alla posizione strategica occupata dal residuo aminoacidico localizzato in un punto della catena che risulta accessibile sia all'antigene putativo del diabete che al recettore del linfocita T (TCR) al quale verrebbe presentato (figura 2).

La carica negativa che l'acido aspartico esprime esclude la formazione di un legame forte tra antigene di classe II e autoantigene che potrebbe fare aumentare le possibilità di riconoscimento da parte del linfocita T.

In tal modo, l'imprecisione nella tipizzazione HLA ha "oscurato" per molto tempo la relazione tra questa regione genica e la malattia, realizzandosi nel corso degli anni uno



**Figura 2. Meccanismo di presentazione dell'antigene da parte delle molecole HLA di classe II localizzate sulla superficie di una cellula "APC". La figura mostra la posizione critica dell'aminoacido 57 della catena  $\beta$  e 52 della catena  $\alpha$  della molecola di classe II da cui si deduce che una loro sostituzione possa alterare la formazione del legame con l'antigene e col recettore del linfocita T.**

spostamento del gene "putativo" di suscettibilità al diabete progressivamente verso il centromero del cromosoma 6, (figura 1), (6, 8).

Va peraltro osservato che la tipizzazione HLA, in aggiunta ad altri parametri, metabolici e immunologici, può rappresentare uno dei punti fondamentali di un programma di prevenzione che miri alla individuazione dei soggetti a rischio per la malattia diabetica, assumendo il carattere di predittività; d'altra parte, essa si mostra di scarsa utilità nel monitoraggio temporale di questi pazienti, non potendo essere di ausilio nel fornire informazioni relative allo "stato biologico e di funzione" delle cellule della componente endocrina del pancreas.

Per incidenza e rilevanza clinica e sociale, le malattie autoimmuni della tiroide e il diabete mellito di Tipo 1 sono state le più studiate dal punto di vista patogenetico e verranno più approfonditamente trattate in questa rassegna con particolare riguardo alle possibilità di diagnosi precoce mediante tecniche immunoscintigrafiche. Va inoltre specificato che non sono riportati in letteratura studi immunoscintigrafici per la diagnosi delle altre malattie endocrine autoimmuni elencate in tabella 1.

## **Il diabete mellito di Tipo 1: patogenesi e storia naturale**

E' oggi ampiamente riconosciuto che il diabete mellito di Tipo 1 (IDDM) è causato da una distruzione autoimmune delle cellule delle isole pancreatiche del Langerhans (9, 10). Per molto tempo si è creduto che l'esordio clinico della malattia coincidesse con il suo reale inizio attribuendo la comparsa dell'iperglicemia ad una perdita acuta della massa  $\beta$ -cellulare provocata dal combinarsi della predisposizione genetica e di fattori scatenanti ambientali. Negli ultimi anni alcune osservazioni sperimentali hanno contribuito a fare luce su alcuni punti chiave della storia naturale dell'IDDM (11, 12). Attualmente si ritiene che il processo cito-distruttivo delle  $\beta$  cellule sia mediato da meccanismi di tipo autoimmunitario i quali precedono di un periodo di tempo variabile (fase di latenza) l'esordio clinico della malattia. E' probabile che il fattore ambientale rappresenti il fattore scatenante in grado di evocare uno stress acuto sulle  $\beta$  cellule e solo quando più dell'80% di queste viene distrutto, si manifesta il peggioramento dell'omeostasi glicidica.

L'importanza dei meccanismi di immunità umorale nella patogenesi dell'IDDM è confermata dalla presenza di autoanticorpi rivolti contro le cellule endocrine delle isole (ICA) (13). Questi anticorpi sono presenti in circa l'80% dei pazienti alla diagnosi e progressivamente tendono a scomparire verosimilmente come conseguenza della scomparsa della stimolazione antigenica; ma possono essere ancora rilevati nel siero per alcuni mesi. Alcuni di questi anticorpi hanno la capacità di fissare il complemento (CF-ICA) e possono essere considerati, qualitativamente, un marker di malattia più attendibile (14). Nel 30% circa dei pazienti con IDDM vengono rilevati nel siero anticorpi anti-insulina (IAA) prima che sia iniziato alcun trattamento con insulina (15). Il loro significato è oscuro ma possono essere rilevati anche nel siero di soggetti a rischio per

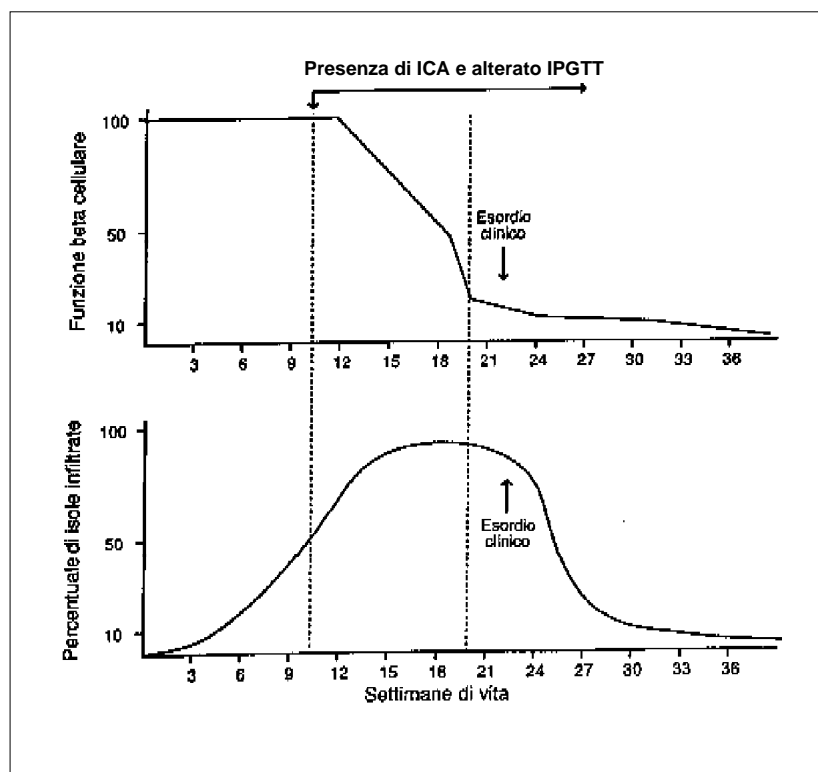
IDDM, ed in questo caso hanno la tendenza ad incrementarsi progressivamente fino alla diagnosi della malattia. In alcuni pazienti con IDDM è presente un movimento anticorpale di ampio spettro diretto verso altri tessuti che può coinvolgere la tireoglobulina e la perossidasi delle cellule tiroidee, le cellule parietali gastriche, le cellule della corticale del surrene o altre meno frequenti. Esiste quindi una parte di pazienti con IDDM nella quale il meccanismo autoimmunitario coinvolge molti tessuti endocrini (16).

In realtà, se si concentra l'attenzione sulla possibilità di attuare un programma di diagnosi precoce e prevenzione della malattia si hanno molte perplessità circa il ruolo degli auto-anticorpi come markers predittivi di malattia; infatti, esistono dati a favore di una presenza di ICA in soggetti che mai andranno incontro al diabete e, d'altra parte, non tutti i pazienti che hanno diabete erano ICA positivi negli anni o mesi che precedono l'insorgenza della malattia. Così, gli ICA sembrano essere un utile ma insufficiente indice predittivo su cui impostare un programma di prevenzione sia diagnostica che terapeutica (17).

Queste considerazioni portano a spostare l'attenzione su markers caratterizzati da una maggiore affidabilità. Come per altre endocrinopatie autoimmuni organo-specifiche (tabella 1), nel diabete di Tipo 1 l'organo bersaglio è sede di un infiltrato linfomonocitario che rappresenta un marker istopatologico di notevole importanza. L'infiltrato linfocitario è stato studiato nell'uomo alla diagnosi (3, 9, 12, 18, 19), ma per ovvi motivi, la difficoltà di effettuare manovre cruente nei soggetti a rischio (per prelevare campioni biotici nella sede della lesione) ha ostacolato i tempi e i termini della comprensione dei meccanismi del danno insulare nella fase preclinica. Sebbene limitata a pochi casi, la presenza dell'infiltrato è stata osservata con maggior frequenza nelle isole contenenti insulina, piuttosto che in quelle prive, che risultano in percentuale inferiore; questo, in analogia alle altre endocrinopatie autoimmuni, farebbe ipotizzare una precoce risoluzione dell'insulite una volta instauratosi il danno (3).

L'osservazione istologica di insulite, in pazienti deceduti entro 12 mesi dalla diagnosi, è stata rilevata in una elevata percentuale di casi (80%) e questa sembra correlare inversamente con l'età e il tempo della diagnosi (18, 19). In altre parole la possibilità di dimostrare la presenza dell'infiltrato aumenta notevolmente al di sotto dei 14 anni di età e soprattutto quanto minore è il numero di settimane dall'esordio clinico; l'infiltrato linfocitario pancreatico non è più riscontrabile già 2-4 mesi dopo l'esordio clinico della sintomatologia (3). Una conferma a quanto osservato nell'uomo alla diagnosi, viene fornita dallo studio della storia naturale del diabete in modelli animali sperimentali; tra questi il ratto Bio Breeding/Worcester (BB/W) ed il topo Non-Obese Diabetic (NOD) sono da considerarsi tra i più affidabili e simili al diabete umano (20, 21). In entrambi questi modelli animali l'insulite comincia a partire dalla 4<sup>o</sup>-6<sup>o</sup> settimana di età e progredisce fino al 4<sup>o</sup> mese di vita quando si instaura un diabete manifesto. Come nell'uomo, dal momento della diagnosi si osserva una progressiva riduzione dell'infiltrazione pancreatica (22) (figura 3).

Risulta quindi di notevole importanza studiare da un punto di vista istologico l'infiltrato in questi modelli animali onde poter estrapolare informazioni riguardanti la fase preclinica nell'uomo. Nel topo NOD, lo studio del fenotipo delle cellule mononucleate dell'infiltrato ha evidenziato la presenza di tutti i tipi di sottopopolazioni linfocitarie, sebbene i monociti e i linfociti T siano le popolazioni più rappresentative.



**Figura 3. Storia naturale del diabete nel topo NOD. Si osserva che l'infiltrazione linfocitaria del pancreas endocrino inizia diverse settimane prima di altri markers immunologici e/o metabolici. Al momento della diagnosi circa l'80% delle cellule è stato distrutto.**

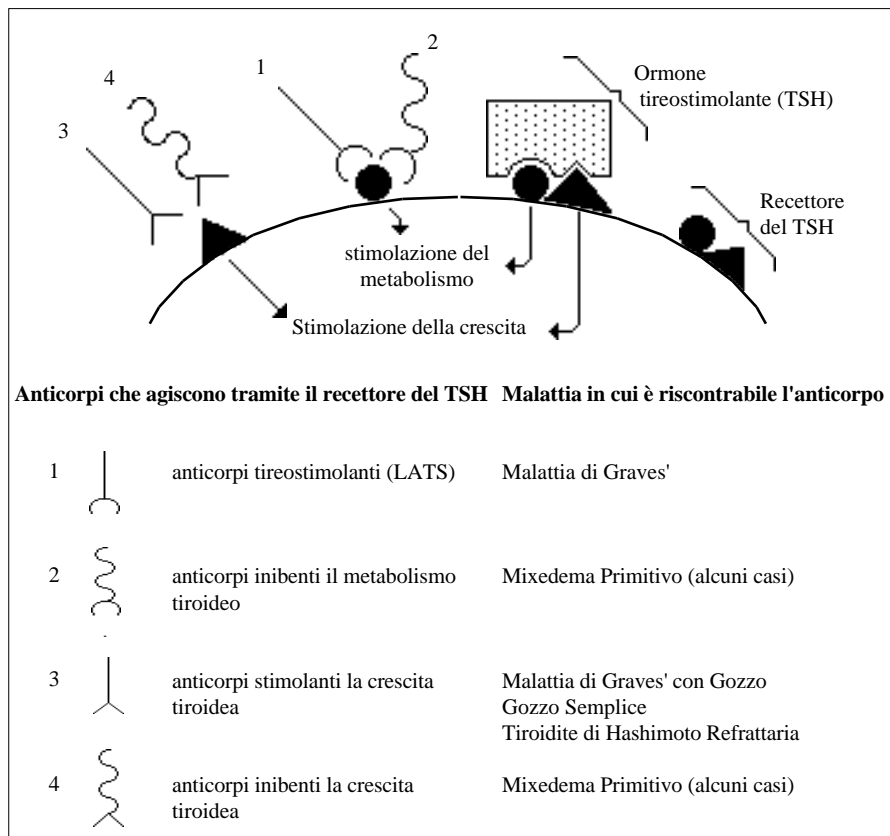
Circa il 30% dei linfociti infiltranti è costituito da linfociti T attivati, esprimenti cioè il recettore per l'interleukina-2 (IL2R), (23). La percentuale di linfociti attivati è maggiore nelle fasi iniziali dell'insulite e tende a diminuire verso l'epoca della diagnosi.

Nell'uomo l'insulite è caratterizzata da una prevalenza di linfociti citotossici e soppressori e molti di questi sono attivati ed esprimono l'IL2R ad indicare un coinvolgimento diretto di queste cellule nel processo di distruzione  $\beta$ -cellulare (24).

Nel periodo di latenza che precede l'esordio clinico della malattia, durante il quale si verifica la distruzione delle  $\beta$  cellule, e successivamente, nel corso delle prime settimane dopo la diagnosi, è dunque possibile osservare l'infiltrato linfocitario nel pancreas.

## Cenni sulla patogenesi della malattia di Graves' e della tiroidite di Hashimoto

L'autoantigene implicato nella malattia di Graves' o morbo di Flaiani Basedow, è il recettore dell'ormone ipofisario tireostimolante la tiroide. E' stata suggerita l'esistenza di una famiglia di glicoproteine leganti il TSH l'espressione delle quali può non essere ristretta alle sole cellule tiroidee. Nel 1956 Adams e Purves individuaron nel siero di soggetti affetti da malattia di Graves' una sostanza dotata di attività tireo-stimolante, ma distinta dal TSH per la durata assai maggiore del suo effetto (25). Studi successivi hanno permesso di chiarire la natura di questa sostanza denominata LATS (Long Acting Thyroid Stimulator). Si tratta di un'immunoglobulina G, con costante di sedimentazione 7S (26, 27). Sono stati in seguito descritti vari tipi di anticorpi antirecettore per il TSH (figura 4).



**Figura 4. Membrana plasmatica di una cellula tiroidea che mostra gli effetti dei vari anticorpi riscontrabili nelle malattie autoimmuni della tiroide sul recettore per il TSH.**

Un primo tipo, legandosi al recettore, bloccherebbe l'interazione con l'ormone ipofisario. Altri, dopo essersi legati al recettore, simulerebbero un'azione TSH simile. Un terzo tipo infine sarebbe in grado di indurre l'iperplasia delle cellule follicolari, senza però stimolare la biosintesi ormonale. Attualmente si preferisce riunire sotto il nome di anticorpi per il recettore del TSH (Trab) le varie immunoglobuline capaci di interagire con tale recettore, che sarebbero in ultima analisi, anticorpi policlonali contro un unico antigene tiroideo (28-31).

Ulteriori studi hanno però dimostrato che la positività del LATS è presente solo nel 60% dei pazienti basedowiani ed il suo titolo plasmatico non è sempre correlabile con la gravità della sintomatologia ipertiroidea. Ciò darebbe importanza anche ad altri fenomeni immunitari oltre alla produzione di anticorpi. Infatti, attualmente, si tende a considerare la malattia di Graves' come una malattia autoimmune in cui sia coinvolto un meccanismo di immunità cellulare oltre che umorale. Prove a favore di questa ipotesi derivano dall'esame delle lesioni istologiche caratteristiche della malattia: lo stroma interfollicolare è infiltrato da un notevole numero di linfociti e in alcune zone si osservano grosse formazioni follicolari con centri germinativi.

Tale infiltrazione rappresenta una manifestazione locale di un'iperplasia linfoide generalizzata con aumento di volume dei linfonodi ed iperplasia timica. Infiltrati linfocitari sono spesso presenti, insieme a edema, fibrosi e depositi di mucopolisaccaridi idrofili, anche nel tessuto retro-orbitale dell'occhio coinvolto nel processo autoimmune (32). Sono state proposte varie teorie per la patogenesi della malattia di Graves' e della tiroidite di Hashimoto, in cui il difetto principale consisterebbe in un'alterazione del numero e della funzione dei linfociti T soppressori su probabile base genetica (30).

E' presumibile che venendo a mancare un equilibrio immunitario tra le varie sottopopolazioni linfocitarie si verifichi un'espansione clonale dei linfociti B e T con trasformazione dei primi in plasmacellule, e sintesi di anticorpi antitiroidei, e attivazione degli altri che manterrebbero attivo il processo autoimmune (33-35).

Analogamente a quanto avviene nel diabete di Tipo 1, sia nel morbo di Graves' che nella tiroidite di Hashimoto, l'infiltrato è lentamente progressivo ed è presumibile che preceda l'esordio clinico della malattia. La sua individuazione, mediante tecniche non invasive, può rivestire fondamentale importanza sia per la diagnosi precoce che per la prevenzione delle recidive nel decorso della malattia di Graves'.

La tiroidite di Hashimoto è caratterizzata istologicamente da una più intensa infiltrazione linfocitaria della ghiandola ed è infatti nota anche con il termine di struma linfocitario, a sottolineare l'aspetto patogenomnico del quadro istologico. Tale infiltrazione è generalmente estesa a tutto il parenchima, raramente circoscritta in noduli, con formazione di veri e propri follicoli linfatici che tendono a sostituire l'intero parenchima ghiandolare (36, 37). Si è molto discusso se nel determinismo delle lesioni istologiche siano predominanti fenomeni immunitari umorali, da anticorpi circolanti, oppure fenomeni immunitari cellulari mediati. A favore dell'immunità cellulare sono i seguenti riscontri: presenza di istiociti e linfociti nell'infiltrato ghiandolare, come nelle reazioni di tipo ritardato; la possibilità di riprodurre la malattia nell'animale da esperimento mediante trasferimento di linfociti; l'effetto citotossico dei linfociti sensibilizzati sulle cellule tiroidee; l'assenza *in vitro* di un effetto citotossico degli anticorpi anti-tireoglo-

bulina su cellule tiroidee (38). Occorre inoltre precisare che nella tiroidite sperimentale l'antigene responsabile è la tireoglobulina. Nella tiroidite di Hashimoto si riscontrano quattro tipi di anticorpi diretti contro costituenti della tiroide: anti-tireoglobulina, non fissanti il complemento (55%) anti-microsomiali fissanti il complemento (95%) e in misura minore si riscontrano anticorpi anti-nucleo e anti-antigene secondo della colloide (39). Probabilmente questi anticorpi non sono citotossici da soli ma lo diventano agendo in cooperazione con i linfociti T (40). Secondo Volpé, i linfociti T svolgono un ruolo primario in un processo di tipo cellulare ritardato e, in seguito, cooperano con i linfociti B alla produzione di autoanticorpi antitiroide (30, 41). Quale che sia il meccanismo patogenetico alla base di questa malattia viene ritenuto che l'infiltrazione linfocitaria sia un fenomeno lentamente progressivo che avviene sia per clonazione in loco di linfociti che per migrazione continua di linfociti periferici richiamati da fattori chemiotattici liberati localmente. Anche in questa malattia la possibilità di seguire il processo patologico infiltrativo con tecniche non invasive è di notevole importanza diagnostica e terapeutica.



## Tecniche immunoscintigrafiche

Con il termine di immunoscintigrafia intendiamo la tecnica di studio delle cellule e/o delle strutture del sistema immunitario con mezzi attinenti alla medicina nucleare e non, come molto spesso accade, la visualizzazione di tessuti neoplastici mediante uso di prodotti del sistema immunitario. L'uso di anticorpi monoclonali radiomarcanti per la diagnosi di tumori rientra quindi nel campo della scintigrafia oncologica e non della immunoscintigrafia. Quest'ultima si basa essenzialmente sulla possibilità di rivelare in vivo i linfociti presenti negli infiltrati patologici.

Esistono numerose tecniche medico-nucleari a tale scopo la cui applicazione in una o un'altra malattia dipende sia dalle caratteristiche dell'infiltrato e delle cellule infiltranti che dalle caratteristiche intrinseche della tecnica stessa (tabella 3).

### L'immunoscintigrafia mediante cellule radiomarcate

Questa tecnica si basa sulla marcatura *in vitro* con radioisotopi di linfociti autologhi precedentemente prelevati dal paziente e sullo studio della loro distribuzione *in vivo* dopo somministrazione per via endovenosa mediante uso di una gamma camera computerizzata.

La tecnica di marcatura con  $^{111}\text{In}$ -ossina è stata messa a punto nel 1976 da M. L. Thakur e A. W. Segal sulla base di precedenti esperienze nel campo dell'immunoscintigrafia (42, 43). Da allora ha subito numerose modificazioni ed è stata utilizzata con successo in numerose malattie (figura 5).

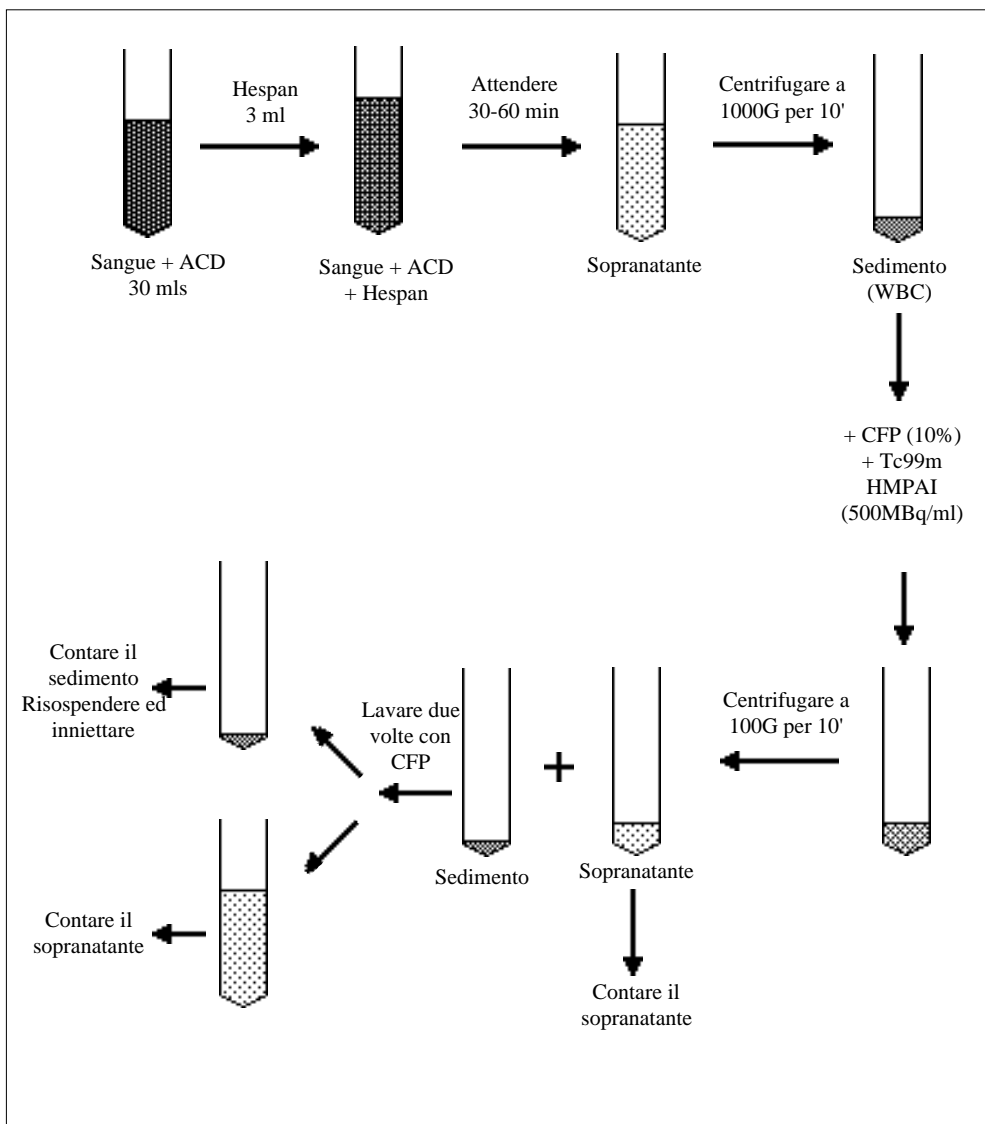
La marcatura con  $^{111}\text{In}$ -ossina o  $^{111}\text{In}$ -tropolone è stata estesa con successo anche ai monociti (44-46), alle cellule dendritiche (47) e ai linfociti infiltranti i tumori (TIL) per la ricerca di sedi metastatiche (48, 49). Recente si è cercato di sostituire l'isotopo  $^{111}\text{In}$ , costoso e poco efficiente per la gamma camera, con il più vantaggioso  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e sono state messe a punto delle metodiche piuttosto semplici per la marcatura dei leucociti e linfociti coniugando il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  all'esametilpropileneaminossima ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM-PAO), (50, 51) (figura 6).

Tutte queste tecniche si basano sul presupposto fisiopatologico che vi sia una migrazione di linfociti dal sangue periferico al tessuto sede di lesione, a causa della liberazione di sostanze chemiotattiche e di una aumentata permeabilità capillare locale. Questo concetto è estremamente importante e spiega il perché del fallimento di questa tecnica in alcune malattie caratterizzate da un evolversi molto lento dell'infiltrato, come spesso accade nelle malattie autoimmuni organo specifiche a lenta evoluzione, che hanno una scarsa componente essudativa.

Question	Answer	Marking Scheme	Marking Points	Marking Points
1. The following are the names of the countries in the world. Write down the name of the country that is the largest in each of the following regions. <td>1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America</td> <td>1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America</td> <td>1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America</td> <td>1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America</td>	1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America	1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America	1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America	1.1 Africa 1.2 Asia 1.3 Europe 1.4 North America 1.5 South America
2. The following are the names of the countries in the world. Write down the name of the country that is the smallest in each of the following regions. <td>2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America</td> <td>2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America</td> <td>2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America</td> <td>2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America</td>	2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America	2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America	2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America	2.1 Africa 2.2 Asia 2.3 Europe 2.4 North America 2.5 South America
3. The following are the names of the countries in the world. Write down the name of the country that is the most developed in each of the following regions. <td>3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America</td> <td>3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America</td> <td>3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America</td> <td>3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America</td>	3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America	3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America	3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America	3.1 Africa 3.2 Asia 3.3 Europe 3.4 North America 3.5 South America
4. The following are the names of the countries in the world. Write down the name of the country that is the least developed in each of the following regions. <td>4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America</td> <td>4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America</td> <td>4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America</td> <td>4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America</td>	4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America	4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America	4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America	4.1 Africa 4.2 Asia 4.3 Europe 4.4 North America 4.5 South America

<i>Materiale necessario per la marcatura dei linfociti con <sup>111</sup>Indio-ossina</i>		
- Mezzo per la separazione dei linfociti		200 ml
- Soluzione di Indio111-ossina (1 mCi/ml)	2 ml	
- Tampone Fosfato Salino (PBS), pH 7.3 sterile		500 ml
- Provette di plastica da 50 ml in confezione singola sterili	x 4	
- Provette di plastica da 10 ml in confezione singola sterili	x 6	
- Capsula di Petri da 5 cm diametro in confezione sterile		x 1
- Soluzione fisiologica		10 ml
<i>Metodo di marcatura dei linfociti con <sup>111</sup>Indio-ossina</i>		
La procedura completa richiede circa 3 ore.		
Per tutti i passaggi usare provette di plastica sterili da 10 ml eccetto per il passaggio 1 e 2 in cui si consiglia l'uso di provette di plastica sterili da 50 ml.		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prelevare 100 ml di sangue venoso eparinato (2000 i.u. circa) e suddividerli in aliquote uguali in quattro provette da 50 ml. Diluire le aliquote con un volume uguale di PBS.</li> <li>2. Isolare i linfociti per mezzo di centrifugazione su gradiente di densità stratificando lentamente il sangue diluito sul mezzo di separazione (rapporto sangue:mezzo di separazione = 2:1) e centrifugare a 400 g per 25-30 min.</li> <li>3. Rimuovere i linfociti all'interfase e lavarli in PBS a 100 g per 15 min. Gettare il supernatante.</li> <li>4. Sospendere il sedimento cellulare in PBS e centrifugare a 500 g per 7 min. Risospendere il sedimento cellulare in 10 ml di PBS e contare le cellule.</li> <li>5. Centrifugare la sospensione cellulare a 500 g per 7 min; gettare il supernatante e risospendere le cellule in PBS ad una concentrazione di <math>0.5 \times 10^8</math> cellule/ml.</li> <li>6. Aggiungere <sup>111</sup>Indio-ossina (<math>50 \mu\text{Ci}/1.0 \times 10^8</math> cellule) ed incubare la sospensione per 20-30 min a temperatura ambiente, agitando gentilmente ogni 6-7 min.</li> <li>7. Lavare le cellule marcate due volte con PBS centrifugandole a 500 g per 7 min. Infine sospendere le cellule in 5 ml di soluzione fisiologica.</li> <li>8. Versare la sospensione cellulare nella capsula di Petri e trasferirla in una siringa. <b>ATTENZIONE A NON RACCOGLIERE NESSUN AMMASSO CELLULARE.</b></li> <li>9. Iniettare la sospensione cellulare marcata per via endovena entro 5-10 min.</li> </ol>		

**Figura 5. Schema rappresentante la tecnica di marcatura dei linfociti con <sup>111</sup>In-ossina. L'esecuzione di questo metodo richiede circa 3 ore di tempo.**



**Figura 6. Schema rappresentante la tecnica di marcatura dei leucociti con  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO. ACD = anticoagulante; WBC = leucociti; CFP = plasma autologo privo di cellule. Questo metodo richiede circa 1 ora e 1/2 e va eseguito in condizioni di assoluta sterilità.**

Prima della scoperta dell'<sup>111</sup>In gli studi sulla circolazione e sulla distribuzione periferica dei linfociti erano piuttosto limitati per la mancanza di un adatto isotopo radioattivo. L'<sup>111</sup>In-ossina grazie alla sua buona efficienza di marcatura ha permesso di intraprendere nuovi studi in vivo sulla cinetica e migrazione dei linfociti (52, 53, 54). L'emivita dei linfociti circolanti è stata così calcolata intorno alle 57 ore (52) per cui, dopo la somministrazione in vivo di linfociti autologhi marcati, le immagini alla gamma camera vengono acquisite tra la 4<sup>a</sup> e la 72<sup>a</sup> ora. Nelle prime ore che seguono l'inoculazione, i linfociti marcati si localizzano principalmente nella milza ed in misura minore nel fegato. Verso la 4<sup>a</sup> ora inizia la ricircolazione delle cellule e la migrazione verso altri organi linfatici e i tessuti sede di un processo infiltrativo. Alla 24<sup>a</sup> ora appaiono visibili i pacchetti linfonodali principali ed il midollo osseo. Una discreta attività è sempre presente nella zona mediastinica (52, 54, 55). La quantità di rad assorbita dai principali organi quando 1 mCi di <sup>111</sup>In viene introdotto nel corpo è la seguente: fegato 1.6 rad; milza 13.4; midollo osseo e linfonodi 2.8 (56). Tuttavia nella pratica diagnostica non vengono mai superate dosi di 40 µCi di <sup>111</sup>In per 10<sup>8</sup> linfociti (57, 58); peraltro vengono consigliate dosi di 20 µCi per 10<sup>8</sup> cellule, corrispondenti ad un assorbimento di 350 rad circa da parte delle cellule marcate (59, 60, 61).

#### L'uso dei linfociti radiomarcanti

Storicamente questa metodica fu applicata per la prima volta nello studio del morbo di Hodgkin (62, 63) e successivamente essa è stata impiegata nella leucemia cronica (64), nei linfomi non-Hodgkin e nel sarcoma osteogenico (58).

Tuttavia, uno dei settori principali di applicazione è senz'altro lo studio delle malattie autoimmunitarie con prevalente coinvolgimento dell'immunità cellulare, come dimostrato da studi eseguiti nelle malattie autoimmuni della tiroide (55) ed in misura minore nel diabete mellito insulino dipendente (65).

Negli ultimi cinque anni dati contrastanti sono stati pubblicati riguardo un probabile danno cromosomico indotto dalle radiazioni, anche quando i linfociti vengono marcati con dosi di 20 µCi per 10<sup>8</sup> cellule (66) pur se in letteratura non è mai apparso alcun riferimento circa un aumentato rischio di leucemie in pazienti che hanno ricevuto dosi ben più alte dell'isotopo radioattivo (60, 67). Nella nostra esperienza riteniamo che ciò rappresenti un problema di grande rilevanza (68) ed è stato dimostrato in vitro che con dosi di 20 µCi per 10<sup>8</sup> cellule si ha già una riduzione della funzione e della capacità proliferativa dei linfociti, tale da impedirne una corretta ricircolazione *in vivo* (figura 7), (57, 69). Anche il carrier dell'<sup>111</sup>In potrebbe avere una parte importante nel contribuire alla tossicità del radiofarmaco (70).

Infine, altri fattori che hanno limitato la diffusione di questa tecnica nella pratica diagnostica sono quelli legati all'ingente quantità di sangue da prelevare al paziente, all'elaborata procedura di marcatura delle cellule (da eseguirsi in condizioni di assoluta sterilità) e ai lunghi tempi di acquisizione delle immagini alla gamma camera da doversi ripetere a 4, 24, 48 e 72 ore dopo la somministrazione delle cellule marcate.

Per tali motivi questa tecnica è oggi pressochè abbandonata e sostituita, per quanto

riguarda la diagnosi degli ascessi e dei processi flogistici acuti, dall'uso di leucociti marcati con  $^{99m}\text{Tc}$ -HM-PAO (71) o, per quanto riguarda la diagnosi delle malattie autoimmuni, dall'uso di altre tecniche cui si farà cenno di seguito.

	$\mu\text{Ci di }^{111}\text{In-ossina}/10^6 \text{ linfociti}$					
	0	20	40	60	80	100
% cellule morte	15.6 $\pm$ 8	19.9 $\pm$ 8	16.9 $\pm$ 8	18.1 $\pm$ 9	18.8 $\pm$ 9	15.5 $\pm$ 8
% cellule CD3+	47 $\pm$ 8	44 $\pm$ 12	45 $\pm$ 14	42 $\pm$ 11	54 $\pm$ 3	47 $\pm$ 8
% cellule CD8+	19 $\pm$ 5	21 $\pm$ 6	19 $\pm$ 4	21 $\pm$ 7	15 $\pm$ 6	17 $\pm$ 7
% ADCC	24 $\pm$ 11	14 $\pm$ 14*	12 $\pm$ 15*	11 $\pm$ 16*	8 $\pm$ 11°	8 $\pm$ 12°

**Figura 7. Effetti di concentrazioni crescenti di  $^{111}\text{In-ossina}$  sulla vitalità linfocitaria valutata con Tripan Blue dopo marcatura, sull'espressione di alcuni antigeni di membrana (CD3 e CD8) valutati in immunofluorescenza e sulla funzione linfocitaria di citotossicità anticorpo dipendente (ADCC) valutata su target tumorali. I valori sono medie $\pm$ SD. \* $p < 0.005$  e ° $p < 0.0001$  rispetto al controllo non marcato (test di Student per dati appaiati).**

## L'immunoscintigrafia mediante ligandi recettoriali radiomarcanti

La difficoltosa ed elaborata marcatura e soprattutto il rischio di trasformazioni cromosomiche dei linfociti marcati con  $^{111}\text{In}$  hanno incoraggiato l'elaborazione di tecniche alternative per la diagnosi degli infiltrati patologici leucocitari e/o linfocitari.

Intorno agli inizi degli anni '80 vennero messe a punto delle tecniche basate sull'uso di nanocolloidi di albumina sierica umana marcati con  $^{99m}\text{Tc}$  (72, 73). Il meccanismo su cui si basano queste tecniche risiede nell'aumentata permeabilità capillare nelle sedi infiammate e dunque non ha carattere di specificità. Sebbene siano stati riportati buoni risultati nel caso di alcune infiammazioni acute e croniche il loro ruolo nella diagnosi delle malattie autoimmuni resta da chiarire (74).

Con il fine di ottenere una maggiore specificità, la ricerca si è spostata sullo studio di tecniche basate su proteine (ligandi recettoriali) con capacità di legarsi a strutture leucocitarie note. La marcatura di tali sostanze con radioisotopi viene eseguita in vitro e, a seguito della loro somministrazione in vivo, è possibile visualizzare, mediante l'uso di una gamma camera, il legame con la struttura bersaglio e, quindi, eventuali focolai d'infiammazione.

Tali metodiche sono caratterizzate dalla relativa semplicità di marcatura delle proteine e dall'iniezione endovenosa della proteina marcata senza necessità di prelievi di sangue. Inoltre, il radiofarmaco iniettato per via endovenosa si distribuisce rapidamente

a tutti i linfociti circolanti e presenti negli infiltrati e non solo ad un piccolo numero di cellule come avviene quando la marcatura è fatta *in vitro*; infine, il tracciante non viene trasportato nel nucleo e, quindi, produce minori effetti nocivi sul DNA.

Da tali considerazioni si deduce che l'uso di queste sostanze semplifica molto l'esecuzione delle immunoscintigrafie e ne aumenta la sensibilità. Anche la specificità può essere molto elevata per la possibilità di utilizzare, per esempio, anticorpi diretti verso i granulociti, i linfociti o specifiche sottopopolazioni linfocitarie (per es. T-helper o T-suppressore o T-attivati).

I risultati delle immunoscintigrafie per mezzo di ligandi recettoriali radiomarcanti dipendono essenzialmente dalle caratteristiche intrinseche delle sostanze utilizzate quali il peso molecolare, la lipofilia, l'origine (umana ricombinante o murina) che influenzano la cinetica, la diffusibilità attraverso le membrane, gli effetti collaterali. Inoltre, dipendono anche dalle caratteristiche dell'antigene bersaglio (tabella 3). In particolare l'intensità dell'espressione antigenica sul tessuto bersaglio sembra influenzare grandemente la sensibilità della tecnica. La selettività dell'espressione dell'antigene sui tessuti bersaglio è un requisito indispensabile per il successo dell'indagine.

Per quanto riguarda l'isotopo da utilizzare per la marcatura dovranno essere considerati principalmente i seguenti parametri:

a) tempo di emivita fisica e tipo di decadimento (corpuscolato o no) per una bassa lesività biologica;

b) energia adatta per l'acquisizione di immagini alla gamma camera (intervallo ottimale tra 100 e 200 KeV);

c) semplicità di marcatura;

Gli isotopi correntemente più usati sono lo Iodio-131 (<sup>131</sup>I), lo Iodio-123 (<sup>123</sup>I), il Tecnezio-99m (<sup>99m</sup>Tc) e l'Indio-111 (<sup>111</sup>In), (tabella 4).

Attualmente l'isotopo di scelta per gli studi diagnostici in vivo è il <sup>99m</sup>Tc (emivita: 6 ore; energia: 140 KeV) che viene usato per la marcatura sia di proteine sia di cellule. Oltre a dare una scarsa esposizione del paziente a radiazioni ionizzanti, per la breve emivita e l'assenza di radiazioni corpuscolate, il <sup>99m</sup>Tc è caratterizzato da una elevata efficienza di marcatura e da una semplice esecuzione della marcatura stessa.

Caratteristiche	Iodio-131	Iodio-123	Indio-111	Tecnezio-99m
Emivita (ore)	192	13.21	67	6
Decadimento	,			
Energia (KeV)	364*	159	172, 246	140

\* fotone principale  
\* fotone principale

**Tabella 4. Caratteristiche fisiche dei radioisotopi più comunemente utilizzati nella diagnostica immunoscintigrafica.**

Per la marcatura di proteine biologicamente attive, la cui struttura può essere facilmente danneggiata, l'isotopo di elezione è lo  $^{125}\text{I}$  (emivita: 13,2 ore; energia: 159 KeV). La marcatura con il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , infatti, può danneggiare le proteine, per la necessità di usare carriers (DTPA etc) e/o sostanze fortemente riducenti.

A causa delle loro caratteristiche fisiche lo  $^{131}\text{I}$  e l' $^{111}\text{In}$  vengono usati sempre meno per studi diagnostici in vivo con proteine marcate. Lo  $^{131}\text{I}$  ha una emivita di 8 giorni ed emette anche particelle  $\beta$ , caratteristiche che ne determinano una lesività biologica non trascurabile. Inoltre, la sua energia principale, 364 KeV, non consente l'acquisizione di buone immagini alla gamma camera. Anche per quanto riguarda l' $^{111}\text{In}$  (emivita 2,8 giorni; emissione di 2 fotoni di energia pari a 172 e 246 KeV) vale quanto detto a proposito dello  $^{131}\text{I}$ .

Alcune caratteristiche sono comuni a tutte le tecniche immunoscintigrafiche eseguite per mezzo di ligandi radiomarcati.

Qualora si usi un radiofarmaco marcato con Iodio è opportuno trattare il paziente, prima dell'esame, con  $\text{KClO}_4$ , per prevenire la captazione tiroidea e gastrica dello Iodio libero.

Il radiofarmaco viene, quindi, somministrato al paziente per via endovenosa e dopo un periodo variabile, dipendente dalla cinetica del ligando impiegato, vengono acquisite immagini, planari o tomografiche, con gamma camera computerizzata, per la rilevazione delle aree di accumulo patologico del radiofarmaco.

La nostra attenzione è rivolta principalmente allo studio delle endocrinopatie autoimmuni che, come abbiamo specificato precedentemente, sono caratterizzate dalla infiltrazione linfomonocitaria dell'organo bersaglio.

Esamineremo l'uso degli anticorpi monoclonali (MoAb), dei loro derivati (Fab e  $\text{F(ab)}_2$ ), di immunoglobuline umane aspecifiche e delle citochine per la diagnosi scintigrafica ed il follow-up delle malattie autoimmuni organo-specifiche.

### **L'uso di anticorpi anti-linfociti**

Nelle immunoscintigrafie per la diagnosi delle malattie autoimmuni possono essere utilizzati anticorpi monoclonali diretti verso antigeni di membrana selettivamente espressi dai linfociti (tabella 5).

Dopo la marcatura questi vengono somministrati per via endovenosa e, in seguito al legame con l'antigene corrispondente, per mezzo della rilevazione esterna della radioattività, viene visualizzato l'infiltrato patologico contenente la specifica sottopopolazione linfocitaria verso la quale sono diretti.

Pur rappresentando un miglioramento rispetto all'uso dei linfociti autologhi radiomarcati, l'uso degli MoAb è caratterizzato da alcuni importanti svantaggi che ne limitano fortemente l'impiego nel campo diagnostico.

Primo fra tutti deve essere ricordato che, data la notevole diluizione cui essi vanno incontro dopo somministrazione endovenosa devono essere iniettati in quantità che variano da 0,5 a 2 mg; ciò potrebbe causare la comparsa di reazioni allergiche e/o anafilattiche che, a causa della natura murina degli anticorpi, possono verificarsi soprattutto in caso di somministrazioni ripetute.



Antigeni	Descrizione	Numero per linfocita	Sottopopolazione esprimente l'antigene
CD 2	recettore per la molecola LFA-3	~70000	Linfociti T
CD 3	recettore per l'antigene	~50000	Linfociti T
CD 4	recettore per gli antigeni di classe II	~35000	Linfociti T-helper. Alcuni monociti
CD 8	recettore per gli antigeni di classe I	~100000	Linfociti T citotossici o soppressori. Alcune cellule NK
CD 25 attivati	recettore per la interleuchina-2	1000-40000	Alcuni monociti. Linfociti T
CD 69	antigene non noto	5000-100000	Linfociti B e T attivati

**Tabella 5. Descrizione di alcuni degli antigeni linfocitari di maggior rilievo.**

A causa del loro elevato peso molecolare, gli anticorpi monoclonali non diffondono con facilità nei focolai infiammatori cronici che hanno scarso aumento della permeabilità vascolare, ottenendosi quindi, una scarsa concentrazione a livello dell'organo bersaglio sede dell'infiltrato patologico. Inoltre, la loro clearance non avviene attraverso l'emuntorio renale ma per mezzo dei monociti e del sistema reticolo-endoteliale. Questa si produce molto lentamente per cui le concentrazioni di anticorpo circolante rimangono a lungo elevate determinando un notevole segnale di fondo che rende necessario l'acquisizione delle immagini 48 ore dopo la somministrazione del radiofarmaco con conseguente fastidio da parte del paziente.

Altro aspetto importante riguarda la loro applicazione nel follow-up. Infatti, somministrazioni ripetute possono dar luogo alla formazione di anticorpi anti-isotipo e/o anti-idiotipo che, complessandosi con l'anticorpo, ne modificano la specificità e la cinetica.

La sensibilità di questa tecnica può essere inoltre ridotta da alcuni fattori quali: la scarsa espressione dell'antigene sulle cellule bersaglio, la scarsa affinità dell'anticorpo monoclonale per l'antigene bersaglio, la presenza di antigeni circolanti che, reagendo con l'MoAb, possono dar luogo alla formazione di immunocomplessi e prolungare il tempo di clearance plasmatica dell'anticorpo.

Infine, la specificità può essere diminuita da legami non specifici dell'anticorpo dovuti alla sua possibile reattività crociata o, a causa della presenza su linfociti e monociti del recettore per il frammento Fc degli anticorpi, questi possono legarsi non specificamente su popolazioni cellulari verso le quali non è diretto.

Da quanto detto risulta che il loro impiego diagnostico è piuttosto limitato e viene applicato solo in alcune malattie particolari, prevalentemente flogistiche acute.

Buoni risultati sono stati ottenuti mediante l'uso di MoAb diretti verso il recettore dell'interleuchina-2 (CD25), (75). Questo recettore viene espresso in elevate concentrazioni soprattutto da linfociti attivati. Studi istopatologici hanno evidenziato la presenza di linfociti attivati (10/30%) nell'infiltrato degli organi bersaglio presente nella fase prodromica delle malattie autoimmuni organo specifiche. Al contrario, in condizioni normali, la percentuale di linfociti attivati negli organi linfoidi è trascurabile (<5%) e nel sangue è addirittura inferiore al 2%. La radioattività rilevata con l'uso di questo MoAb, quindi, risulta essere specificamente associata all'infiltrato patologico.

Non altrettanto soddisfacenti sono stati i risultati ottenuti con MoAb diretti verso l'antigene CD3, poiché tale antigene è fortemente espresso da tutti i linfociti T. Ciò determina un intenso legame dell'MoAb all'antigene bersaglio ma contemporaneamente si ha una forte attività di fondo dovuta al legame dell'MoAb con i linfociti circolanti e presenti negli organi linfoidi.

#### **L'uso dei frammenti $F(ab)_2$ e Fab**

Come abbiamo potuto vedere nel precedente paragrafo l'uso degli anticorpi monoclonali anti-linfociti non è scevro da inconvenienti sia pratici sia teorici. Nell'intento di perfezionare questa tecnica si è pensato di usare frammenti di anticorpi monoclonali  $F(ab)_2$  e Fab (76). Questi si ottengono mediante digestione enzimatica dell'anticorpo.

In particolare, la papaina determina la formazione del frammento Fc e di due frammenti Fab; la pepsina produce la formazione un frammento  $F(ab)_2$  e la digestione del segmento Fc (figura 8).

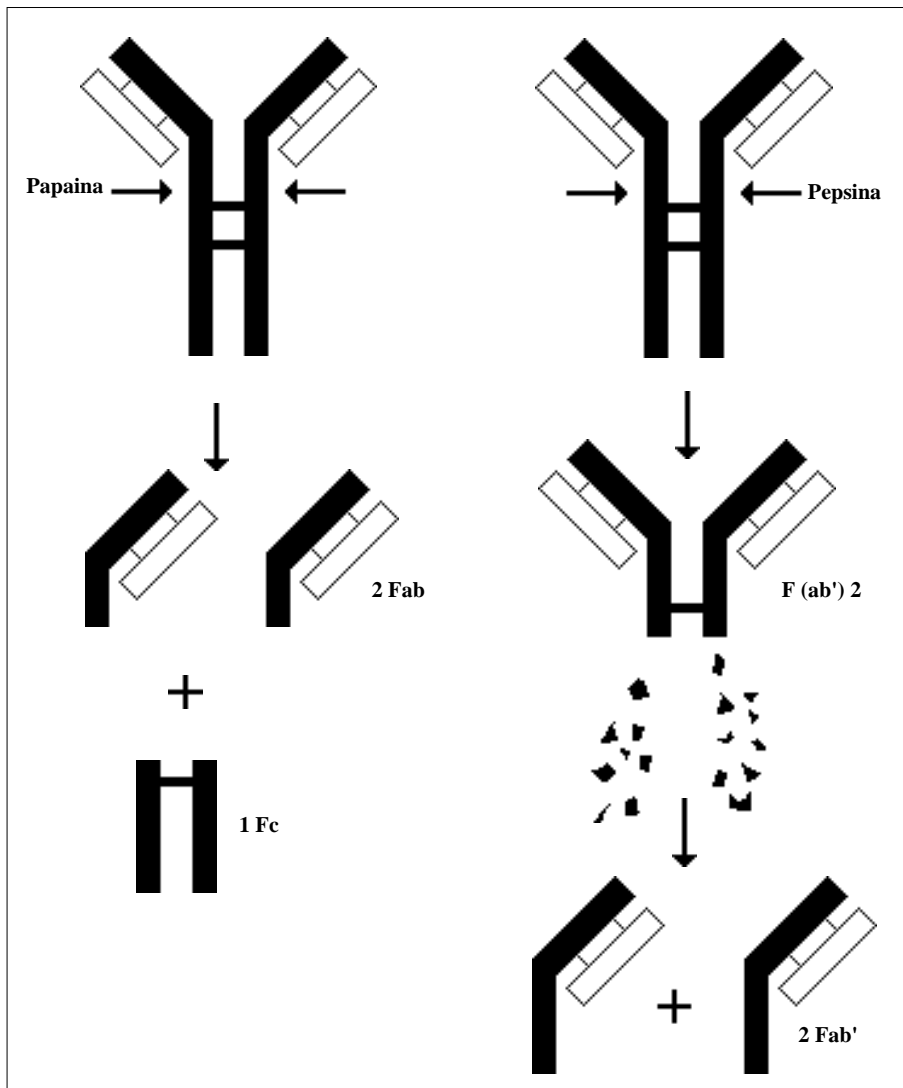
Questi mantengono la stessa specificità dell'anticorpo da cui originano ma, rispetto a questi ultimi sono caratterizzati dalla mancanza del frammento Fc e da un peso molecolare minore.

Queste caratteristiche determinano una maggiore diffusibilità, una clearance plasmatica più rapida, una marcatura con maggiore attività specifica e la mancanza di legame aspecifico mediato dal frammento Fc. Inoltre, tali sostanze possiedono un potere antigenico minore rispetto all'anticorpo integro e, quindi, riducono il rischio di reazioni allergiche e/o anafilattiche.

L'uso dei  $F(ab)_2$  e dei Fab consente la somministrazione di attività maggiori e minori effetti collaterali. Inoltre, rispetto agli anticorpi, la attività di fondo circolante è diminuita e la concentrazione nel focolaio di infiammazione dell'organo bersaglio è maggiore.

Tuttavia, l'uso di queste molecole è sempre limitato a causa di possibili effetti collaterali dovuti alla loro origine eterologa murina. Ciò non comporta in realtà una limitazione al loro impiego, tranne nel caso degli studi di follow-up, in cui sono previste somministrazioni ripetute del tracciante. La rapida clearance determina un accumulo di attività nel rene e ne impedisce l'uso per la diagnosi di infiltrati patologici di questo organo e delle regioni viciniori.

Per quanto riguarda il loro impiego diagnostico, i frammenti  $F(ab)_2$  e Fab sono stati utilizzati con successo nella diagnosi di alcuni tumori nell'uomo (77, 78) ma a tutt'oggi non sono stati ancora applicati alle malattie autoimmuni organo specifiche e devono considerarsi, pertanto, allo stadio sperimentale.



**Figura 8.** Schema di produzione dei frammenti  $F(ab)_2$  e Fab' a partire dalla molecola intera di anticorpo monoclonale.

### **L'uso delle immunoglobuline umane policlonali aspecifiche**

Più recentemente è stato introdotto nel campo delle immunoscintigrafie l'uso delle immunoglobuline umane aspecifiche radiomarcate (79).

Questa tecnica si basa sull'osservazione istologica di numerosi monociti/macrofagi e cellule NK nei siti di infiammazione. Queste cellule posseggono il recettore per il frammento Fc delle immunoglobuline, la cui espressione è aumentata considerevolmente in corso di attivazione (80). La tecnica presenta il vantaggio di evitare gli effetti collaterali tipici delle proteine eterologhe, ma è caratterizzata da scarsa specificità e, rispetto ai linfociti autologhi radiomarcati, da una bassa attività nell'organo bersaglio. Infine, la somministrazione ripetuta di tali molecole può essere gravata dalla formazione di immunocomplessi e dalla loro precipitazione in sedi patologiche.

A tutt'oggi l'uso delle immunoglobuline umane aspecifiche radiomarcate non è stato ben studiato. Risulta difficile, infatti, capire se l'accumulo di tale radiofarmaco nei focolai di infiammazione è dovuto solo a un'alterata permeabilità o al legame specifico con le cellule bersaglio. Questa tecnica è utilizzata attualmente per la diagnosi di alcuni processi infiammatori (81) e, in particolare, buoni risultati sono stati ottenuti nell'artrite reumatoide, mentre falsi negativi si sono ottenuti nel morbo di Crohn. Ciò può essere in parte spiegato considerando che i pazienti affetti dal morbo di Crohn non sono stati studiati durante la fase acuta della malattia quando presumibilmente vi era una componente essudativa/infiammatoria nel tessuto lesso. Nell'artrite reumatoide, invece, a livello delle articolazioni colpite dal processo autoimmune, è presente costantemente un processo infiammatorio che favorisce la diffusione capillare delle immunoglobuline e, quindi, un accumulo del tracciante indipendentemente dal legame specifico al proprio recettore.

Alla luce di queste considerazioni, le immunoglobuline umane aspecifiche radiomarcate non sembrano trovare il proprio campo di applicazione nelle malattie autoimmuni organo specifiche. Il loro ruolo, tuttavia, verrà meglio definito in futuro sulla base di più ampi studi diagnostici.

### **L'uso delle citochine**

Le citochine sono sostanze mediatrici dell'infiammazione e di altri processi immunologici prodotte da cellule del sistema immunocompetente. La loro sintesi, distribuzione e meccanismi d'azione sono stati ben caratterizzati negli ultimi anni; tali sostanze esercitano le proprie azioni biologiche per mezzo del legame a specifici recettori espressi sulle cellule bersaglio del sistema immunitario o, in alcuni casi, anche su cellule epiteliali e nervose (tabella 6).

Recentemente è stato proposto l'uso di tali molecole per la diagnosi immunoscintigrafica degli infiltrati linfomonocitari.

Tali sostanze, infatti, a causa del loro basso peso molecolare (13-20 kD), sono caratterizzate da grande diffusibilità capillare con possibilità di ottenere elevate concentrazioni nella sede dell'infiltrato patologico. Inoltre, possiedono una rapida clearance

Project Name	Year	Location	Comments	Notes
1.1	1995	...	...	...
1.2	1996	...	...	...
1.3	1997	...	...	...
1.4	1998	...	...	...
1.5	1999	...	...	...
1.6	2000	...	...	...
1.7	2001	...	...	...
1.8	2002	...	...	...
1.9	2003	...	...	...
1.10	2004	...	...	...
1.11	2005	...	...	...
1.12	2006	...	...	...
1.13	2007	...	...	...
1.14	2008	...	...	...
1.15	2009	...	...	...
1.16	2010	...	...	...
1.17	2011	...	...	...
1.18	2012	...	...	...
1.19	2013	...	...	...
1.20	2014	...	...	...
1.21	2015	...	...	...
1.22	2016	...	...	...
1.23	2017	...	...	...
1.24	2018	...	...	...
1.25	2019	...	...	...
1.26	2020	...	...	...
1.27	2021	...	...	...
1.28	2022	...	...	...
1.29	2023	...	...	...
1.30	2024	...	...	...
1.31	2025	...	...	...
1.32	2026	...	...	...
1.33	2027	...	...	...
1.34	2028	...	...	...
1.35	2029	...	...	...
1.36	2030	...	...	...
1.37	2031	...	...	...
1.38	2032	...	...	...
1.39	2033	...	...	...
1.40	2034	...	...	...
1.41	2035	...	...	...
1.42	2036	...	...	...
1.43	2037	...	...	...
1.44	2038	...	...	...
1.45	2039	...	...	...
1.46	2040	...	...	...
1.47	2041	...	...	...
1.48	2042	...	...	...
1.49	2043	...	...	...
1.50	2044	...	...	...
1.51	2045	...	...	...
1.52	2046	...	...	...
1.53	2047	...	...	...
1.54	2048	...	...	...
1.55	2049	...	...	...
1.56	2050	...	...	...
1.57	2051	...	...	...
1.58	2052	...	...	...
1.59	2053	...	...	...
1.60	2054	...	...	...
1.61	2055	...	...	...
1.62	2056	...	...	...
1.63	2057	...	...	...
1.64	2058	...	...	...
1.65	2059	...	...	...
1.66	2060	...	...	...
1.67	2061	...	...	...
1.68	2062	...	...	...
1.69	2063	...	...	...
1.70	2064	...	...	...
1.71	2065	...	...	...
1.72	2066	...	...	...
1.73	2067	...	...	...
1.74	2068	...	...	...
1.75	2069	...	...	...
1.76	2070	...	...	...
1.77	2071	...	...	...
1.78	2072	...	...	...
1.79	2073	...	...	...
1.80	2074	...	...	...
1.81	2075	...	...	...
1.82	2076	...	...	...
1.83	2077	...	...	...
1.84	2078	...	...	...
1.85	2079	...	...	...
1.86	2080	...	...	...
1.87	2081	...	...	...
1.88	2082	...	...	...
1.89	2083	...	...	...
1.90	2084	...	...	...
1.91	2085	...	...	...
1.92	2086	...	...	...
1.93	2087	...	...	...
1.94	2088	...	...	...
1.95	2089	...	...	...
1.96	2090	...	...	...
1.97	2091	...	...	...
1.98	2092	...	...	...
1.99	2093	...	...	...
1.100	2094	...	...	...

plasmatica con conseguente bassa attività di fondo circolante quando somministrate come radiofarmaci. Sono dotate di una elevata specificità e grande affinità per il proprio recettore da cui risulta la possibilità di predire la loro distribuzione *in vivo*.

Infine, per la possibilità di essere prodotte per mezzo della ingegneria ricombinante, la somministrazione delle citochine nell'uomo non comporta il rischio di fenomeni allergici e/o anafilattici; ciò è particolarmente utile negli studi di follow-up dove sono necessarie somministrazioni ripetute del tracciante.

Tali caratteristiche permettono la somministrazione di elevate attività con trascurabili effetti collaterali consentendo di ottenere elevate sensibilità con le immunoscintigrafie ottenute con queste proteine.

### **L'uso della interleuchina-2**

Attualmente solo l'interleuchina-2 (IL2) è stata sperimentata come radiofarmaco in alcuni modelli animali. L'IL2 e il relativo recettore (IL2R) sono stati approfonditamente studiati e ben definiti. Questa è una citochina dal peso molecolare di 15500 Dalton, sintetizzata dai linfociti T. La sua funzione è quella di promuovere la crescita e l'attività principalmente dei linfociti T e monociti sebbene recettori per l'IL2 siano stati riscontrati anche sui linfociti B e su alcune cellule epiteliali e nervose. L'IL2R è scarsamente espresso dai linfociti T in condizioni basali (1000 recettori per cellula), ma durante l'attivazione questo viene intensamente espresso sulla superficie cellulare (40000 recettori per cellula) (82).

Nella fase prodromica delle endocrinopatie autoimmuni organo specifiche esiste un infiltrato linfomonocitario nell'organo bersaglio e il 10-30% delle cellule infiltranti esprime l'IL2R (figura 9).

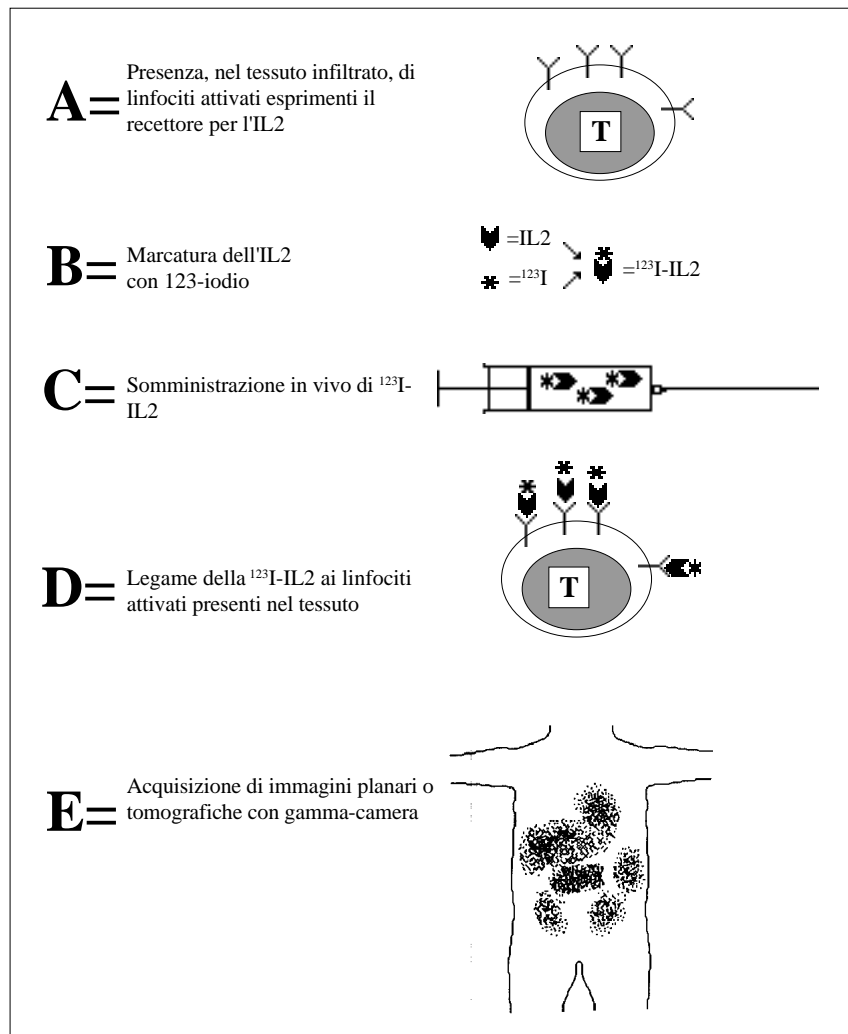


**Figura 9. Sezione criostatica di pancreas di topo NOD colorata con un anticorpo anti-IL2R per mettere in evidenza i linfociti attivati. Il legame dell'anticorpo è stato rivelato con il metodo dell'immunoperoxidasi (colorazione in Ematossilina X 400).**

Peraltro, nei tessuti linfoidi, e ancor meno nel sangue circolante, la percentuale di cellule esprimenti l'IL2R è molto bassa (3-4% dei linfociti totali).

Queste osservazioni incoraggiano l'utilizzazione dell'IL2 radiomarcata quale radiofarmaco per la diagnosi di infiltrati linfomonocitari patologici (figura 10).

Le caratteristiche di questa citochina permettono di diagnosticare specificamente le sedi di infiltrazione in quanto è trascurabile l'espressione del suo recettore in sedi diverse.



**Figura 10. Schema rappresentante la strategia per la rivelazione in vivo degli infiltrati linfocitari patologici nell'uomo mediante uso di  $^{123}\text{I}$ -IL2.**

Infine, la quantità di citochina radiomarcata da somministrare per ottenere un "imaging" soddisfacente è di pochi  $\mu\text{g}$  e non determina effetti biologici apprezzabili né tantomeno reazioni allergiche e/o anafilattiche come nel caso di anticorpi o loro frammenti.

Attualmente l'IL2 viene marcata con  $^{125}\text{I}$ . La radioiodinazione con questo isotopo dello iodio è particolarmente indaginosa e conduce a una scarsa resa di marcatura.

Se i risultati ottenuti nell'animale verranno confermati nell'uomo si prenderà in considerazione la possibilità di marcare l'IL2 con il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , l'isotopo che meglio si presta a studi *in vivo* nell'uomo.



## L'immunoscintigrafia per la diagnosi precoce del diabete mellito di Tipo 1

Esistono ormai numerose prove cliniche ed istologiche che confermano la patogenesi autoimmune del diabete mellito di Tipo 1 (9, 10, 11). In particolare, nell'ultimo decennio sono stati pubblicati studi istologici di pancreas di pazienti diabetici deceduti entro 1 mese dalla diagnosi che hanno confermato la presenza di linfociti nel pancreas endocrino (18, 19, 24). Da allora si è cercato di mettere a punto un metodo non invasivo per l'identificazione *in vivo* del processo autoimmune a carico delle cellule.

I primi tentativi a riguardo sono stati compiuti per mezzo della tecnica immunoscintigrafica di somministrazione di linfociti autologhi marcati con <sup>111</sup>In-ossina. Kaldany e coll. hanno riportato buoni risultati in pazienti diabetici neo-diagnosticati, seppure in una modesta casistica (tabella 7).

	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Etá (aa)	14	10	37
Durata dei sintomi prima della diagnosi (gg)	28	21	7
Insorgenza della sintomatologia	Lenta	Acuta	Acuta
Glicemia alla diagnosi (mg/dl)	>400	488	465
Trattamento insulinico (gg)	7	4	7
Risultato scintigrafico	Pos	Neg	Pos

I valori riportati sono tratti da A. Kaldany e coll. Diabetes 31:463-466; 1982.

**Tabella 7. Caratteristiche cliniche e scintigrafiche dei pazienti diabetici studiati con linfociti marcati con <sup>111</sup>In-ossina.**

Una limitazione all'esame scintigrafico del pancreas è data dalla posizione anatomica dell'organo e dai suoi rapporti con milza e fegato. Per poter ovviare a questo problema Kaldany e coll. hanno somministrato ai pazienti, prima dei linfociti marcati, una dose di <sup>99m</sup>Tc-solfuro colloidale per ottenere la visualizzazione del fegato e della milza da poter poi sottrarre alle immagini acquisite dopo somministrazione dei linfociti marcati. In questo modo si è raggiunta una discreta visualizzazione del pancreas nei casi in cui era presente l'infiltrato linfocitario peri-insulare (65).

Rimane un punto a sfavore di questa tecnica l'uso del doppio tracciante e quindi la alquanto elaborata procedura tecnica che comprende anche la marcatura dei linfociti *in vitro* in condizioni di assoluta sterilità.

Nel 1985 è stato pubblicato un altro lavoro da parte di un gruppo di ricercatori americani in cui la tecnica di somministrazione di linfociti autologhi marcati con <sup>111</sup>In-ossina veniva applicata nell'animale diabetico e prediabetico (83). Il vantaggio di questi studi rispetto a quelli eseguiti nell'uomo consiste senz'altro nella possibilità di sacrificare l'animale per contare la radiattività presente nel solo organo interessato senza eventuali interferenze di altri tessuti ed inoltre di verificare la specificità della tecnica grazie al riscontro istologico. Come mostrato in tabella 8, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella percentuale di radioattività per grammo di tessuto tra ratti dei diversi gruppi esaminati. Gli autori concludono che solo una piccola percentuale di linfociti circolanti è probabilmente coinvolta nel processo patogenetico a carico del pancreas e che l'infiltrato linfocitario pancreatico sarebbe caratterizzato da una popolazione cellulare che si espande in loco e scarsamente rinnovabile con il pool ematico. Di conseguenza, la somministrazione *in vivo* di linfociti radiomarcanti, precedentemente prelevati dal circolo, non garantisce una migrazione di questi nel pancreas come invece accadrebbe nel caso di un processo acuto. A dimostrazione di ciò è riportato un caso di una scintigrafia pancreatica positiva in un animale che all'esame istologico dimostrò poi di avere una pancreatite diffusa (83). Non va tuttavia esclusa la possibilità che i linfociti vengano danneggiati dalla marcatura a tal punto da perdere la capacità migratoria.

	Ratti BB/W prediabetici	Ratti BB/W diabetici neodiagnostici	Ratti BB/W resistenti al diabete	Ratti Wistar Furth di controllo
	n=9	n=7	n=3	n=7
<i>Milza</i>	16.3±12	12.8±14.1	13.8±9.2	15.1±9.5
<i>Tiroide</i>	0.36±0.07	0.59±0.21	0.42±0.04	0.36±0.04
<i>Pancreas</i>	0.15±0.03	0.21±0.05	0.19±0.01	0.24±0.07

I valori riportati sono le medie delle percentuali di dose somministrata per gr di tessuto ±SD (modificata da Gallina D.L. e coll. Diabetologia 28:143-147;1985).

**Tabella 8. Radioattività riscontrabile negli organi di ratti diabetici e ratti di controllo 48 ore dopo la somministrazione endovenosa di linfociti marcati con <sup>111</sup>In-ossina.**

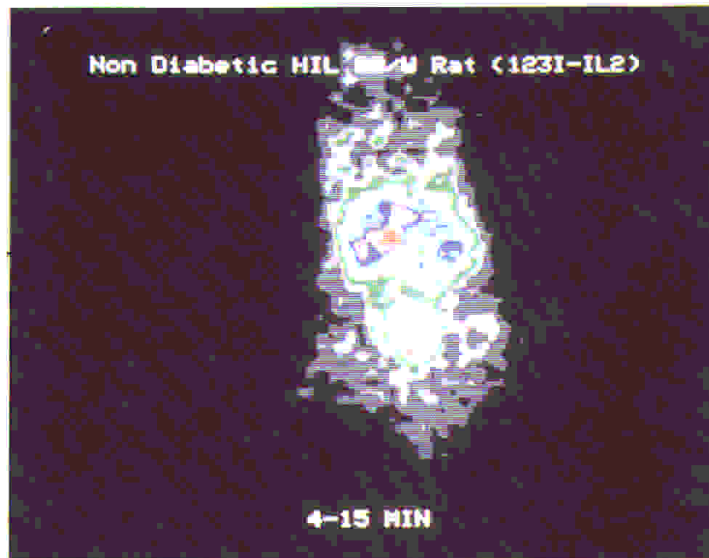
Sulla base di queste osservazioni e considerazioni patogenetiche sul diabete mellito di tipo 1 è stata applicata allo studio dell'insulite *in vivo* con maggior successo l'immunoscintigrafia per mezzo di ligandi recettoriali radiomarcanti. In particolare la somministrazione di interleuchina-2 marcata con <sup>123</sup>I in ratti prediabetici ha dimostrato di permettere la visualizzazione *in vivo* dell'insulite (84). È importante sottolineare che utilizzando lo stesso ceppo di animali, i ratti BB/W, questa tecnica si è dimostrata efficace là dove l'immunoscintigrafia con linfociti marcati aveva fallito (figura 11).

Questi esperimenti sono stati successivamente ripetuti utilizzando un diverso modello animale, il topo NOD, attualmente ritenuto il modello sperimentale piú simile al diabete mellito di tipo 1 dell'uomo. Anche in questi animali si è potuta visualizzare l'infiltrazione linfocitaria del pancreas *in vivo* mediante gamma camera (figura 12 e 13), ed inoltre è stata riscontrata una significativa correlazione tra radioattività pancreatica e severità istologica dell'infiltrazione pancreatica (figura 14), (85).

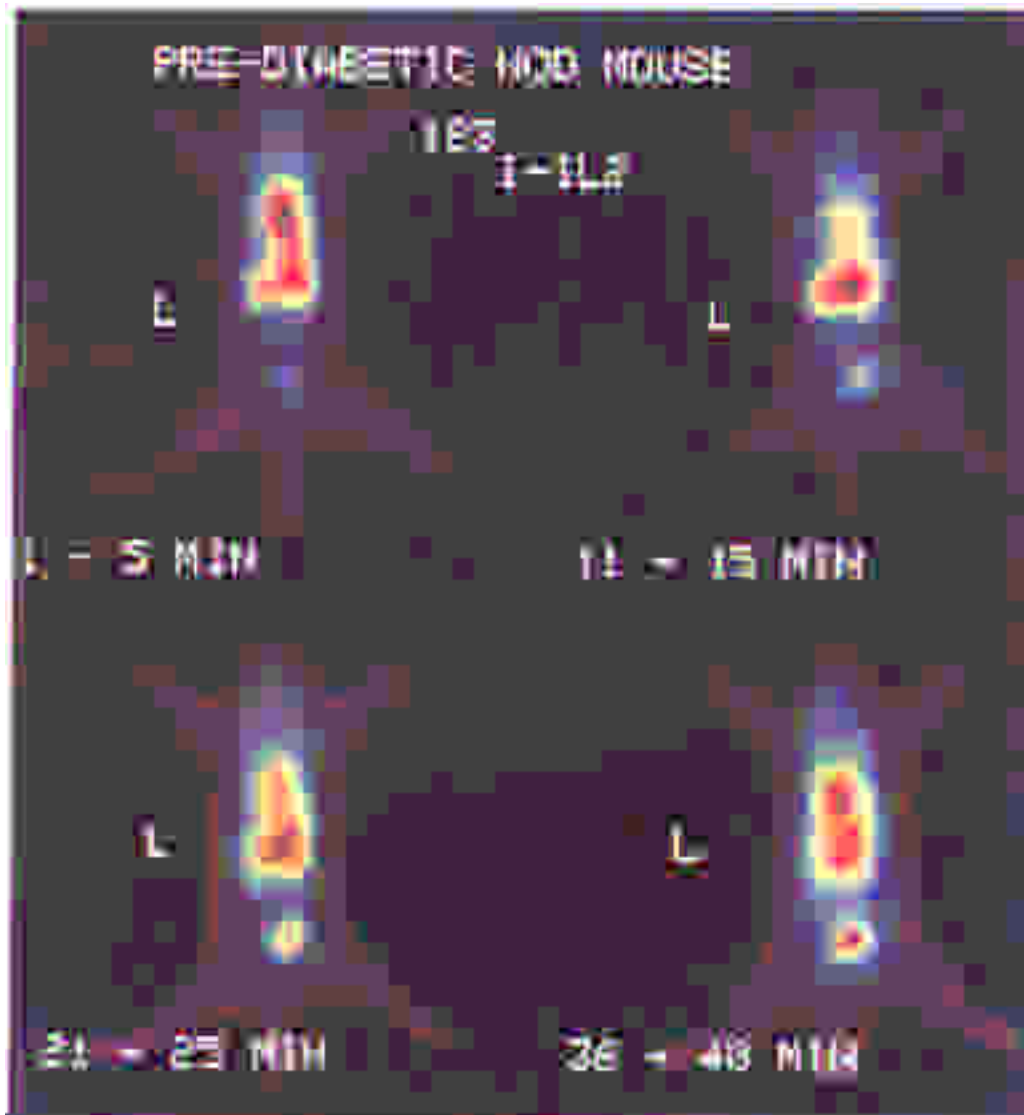
In altri esperimenti è stata dimostrata la specificità della tecnica mediante autoradiografia di sezioni di milza e pancreas (86).

Questa tecnica immunoscintigrafica si esegue somministrando in bolo endovenoso la  $^{123}\text{I}$ -IL2 e acquisendo contemporaneamente immagini dinamiche con la gamma camera computerizzata per 45 minuti ad una frequenza di 1 immagine al minuto. Non richiede quindi alcun prelievo di sangue né la ripetizione dell'acquisizione scintigrafica nei giorni successivi alla somministrazione del radiofarmaco come invece nel caso dell'uso di linfociti radiomarcanti.

La semplicità esecutiva, l'accuratezza diagnostica, gli scarsi effetti collaterali e soprattutto la possibilità di essere ripetuta a breve distanza di tempo nella stesso paziente, rendono questa tecnica assai promettente per la diagnosi precoce del diabete mellito in soggetti geneticamente suscettibili alla malattia con o senza la presenza di altri markers, quali gli anticorpi anti-64K o anticorpi anti-insula, e per il loro follow-up in corso di trattamento con farmaci immunomodulatori.



**Figura 11. Immagine scintigrafica di un ratto BB/W prediabete ottenuta 25 minuti dopo somministrazione e.v. di  $100\mu\text{Ci}$  di  $^{123}\text{I}$ -IL2. La radioattività si accumula in una piccola regione centro-addominale riferibile al pancreas (freccia).**



**Figura 12.** Sequenza di immagini scintigrafiche di un topo NOD prediabatico ottenute a vari tempi dopo la somministrazione e.v. di  $100\mu\text{Ci}$  di  $^{123}\text{I-IL2}$ . Oltre alla radioattività in regione cardiaca e in corrispondenza della vescica è possibile notare un accumulo della radioattività, progressivamente dal 10° al 40° minuto, in regione centro-addominale, riferibile al pancreas (freccia).

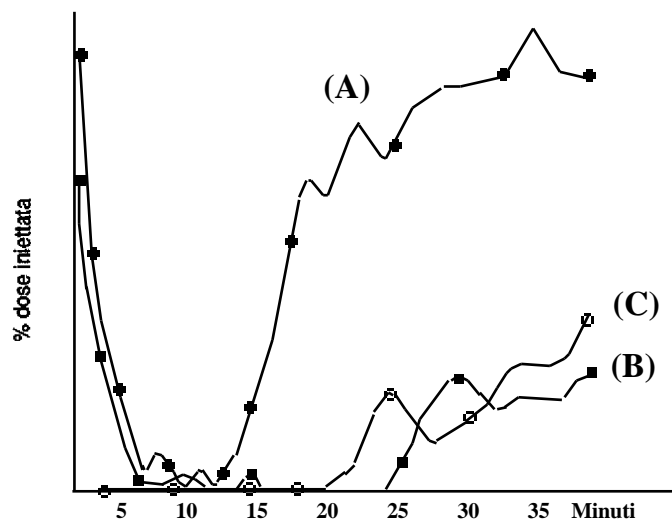


Figura 13. Curve della radioattività in funzione del tempo generate dal computer sulla regione pancreatica di un topo NOD prediabético (A) e di un topo di controllo Balb/c (B) dopo somministrazione e.v. di 100 $\mu$ Ci di  $^{123}\text{I}$ -IL2. La curva C corrisponde ad un topo NOD prediabético iniettato con un radiofarmaco di controllo ad eliminazione renale ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA). Si può notare che esiste un accumulo progressivo della radioattività pancreatica dal 10° al 40° minuto solo nel topo prediabético iniettato con  $^{123}\text{I}$ -IL2.

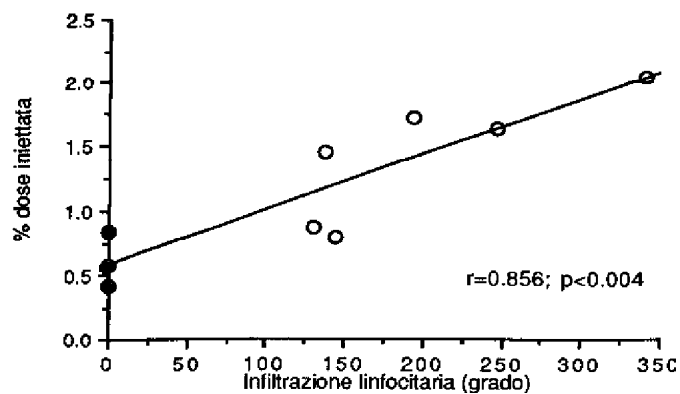


Figura 14. Correlazione tra la radioattività pancreatica registrata al 40° minuto e la gravità dell'infiltrato pancreatico in 6 topi NOD prediabéticos (simboli chiari) e 4 topi Balb/c di controllo (simboli scuri).

## L'immunoscintigrafia nella patologia autoimmune della tiroide

Sono pochi i lavori pubblicati riguardanti l'uso dell'immunoscintigrafia nella patologia tiroidea. Questo è dovuto essenzialmente a due fattori. Da una parte la reale utilità clinica delle informazioni ottenibili e dall'altra la sensibilità della tecnica impiegata.

Una delle tecniche immunoscintigrafiche usate in questo campo è quella dei linfociti autologhi marcati con  $^{111}\text{In}$ Indio-ossina o  $^{111}\text{In}$ Indio-tropolone (87, 88). Il vantaggio nell'uso del tropolone al posto dell'ossina come chelante dell' $^{111}\text{In}$  risiede essenzialmente nel fatto che il primo forma un legame più stabile con l'isotopo evitando la competizione con la transferrina e permettendo, di conseguenza, la marcatura dei linfociti direttamente nel plasma. Questa variante alla tecnica precedentemente descritta richiede sempre il prelievo di una certa quantità di sangue dal paziente per separare i linfociti, ma evita che i passaggi successivi siano fatti in tampone fosfato e riduce al minimo i danni alle cellule causati dallo shock della variazione del pH e del mezzo di incubazione. L'efficienza di marcatura può raggiungere l'80-90%. Dopo la somministrazione *in vivo* vengono acquisite immagini statiche alla gamma camera sulla regione del collo e sull'addome a 4, 24, 48 ed eventualmente anche a 72 ore. Dalle immagini della regione del collo si può visualizzare, oltre al normale anello linfonodale del Waldheimer, la presenza di radioattività in regione tiroidea in pazienti con infiltrazione linfocitaria dell'organo. Dalle immagini addominali si valuterà invece la ricircolazione linfocitaria dalla milza agli organi linfoidi periferici onde poter svelare eventuali casi di falsi negativi dovuti alla tecnica di marcatura; in tal caso le cellule marcate danneggiate, perdendo la capacità migratoria, rimangono concentrate nella milza anche nelle immagini tardive.

Studi *in vivo* hanno permesso di evidenziare l'infiltrato linfocitario nella tiroide di pazienti affetti da mixedema primitivo o da tiroidite di Hashimoto (figura 15) mentre non si sono ottenuti risultati soddisfacenti nella malattia di Graves' (figura 16), (89). Nei casi positivi la radioattività nella tiroide era già evidenziabile alla 4<sup>a</sup> ora, sebbene non distinguibile dall'attività registrata in sede mediastinica. Le immagini registrate alla 24<sup>a</sup> e 48<sup>a</sup> ora permettono invece di differenziare perfettamente i vari organi tra di loro compresi i linfonodi della regione laterocervicale (figura 17).

La negatività dell'indagine nei casi di malattia di Graves' può essere ricollegata alla diversa patogenesi di questa malattia rispetto alle altre malattie autoimmuni tiroidee. Come già accennato nei paragrafi precedenti, nella malattia di Graves' sono prevalenti le alterazioni dell'immunità umorale e l'infiltrazione linfocitaria della ghiandola, riscontrabile istologicamente, dipenderebbe prevalentemente da una proliferazione *in situ* dei linfociti senza un significativo turnover linfocitario, presupposto alla base della riuscita della tecnica in discussione. Altra possibilità consiste nel fatto che la malattia, nei pazienti con morbo di Graves', sia stata studiata in una fase di remissione, nel qual caso potrebbe essere presa in considerazione una eventuale applicazione di questa tecnica

per la predizione dell'insorgenza di recidive.

Attualmente, l'indicazione clinica principale consiste nelle diagnosi differenziale tra gozzo semplice e tiroidite di Hashimoto in fase preclinica nei casi in cui l'esame citologico è dubbio ed il movimento anticorpale scarso, onde poter instaurare prontamente un'adeguata terapia per cercare di prevenire l'evoluzione verso l'ipotiroidismo.

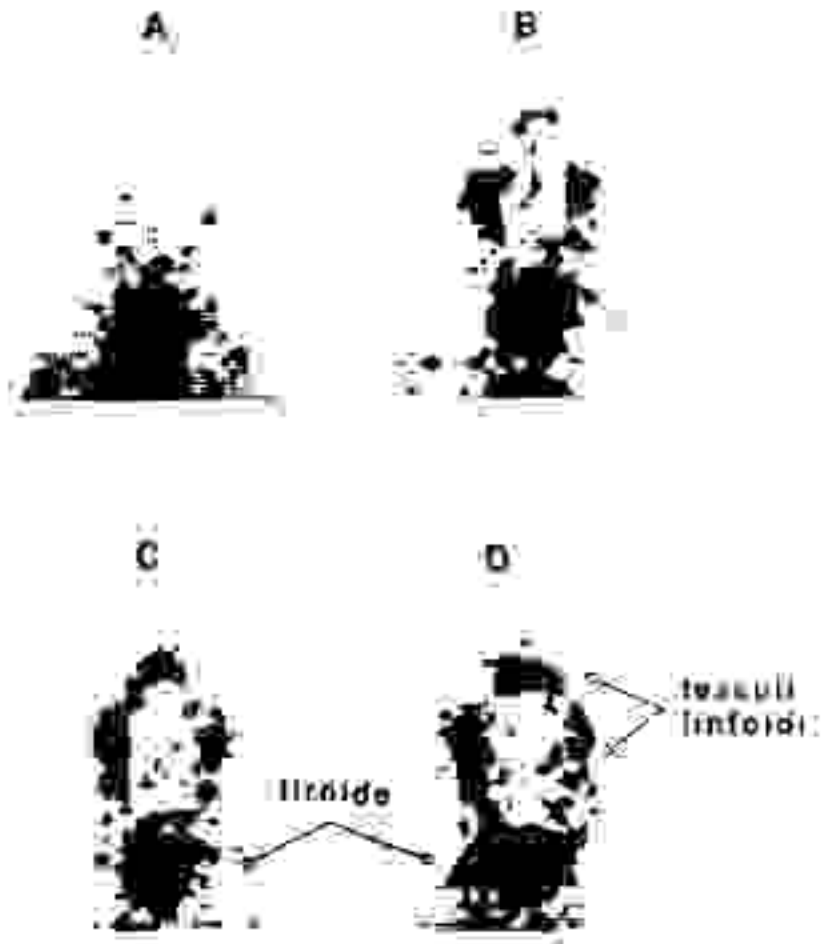
Va infine ricordato che studi nel ratto affetto da tiroidite autoimmune spontanea non hanno confermato i risultati ottenuti nell'uomo (83). Studi su una più ampia casistica sono necessari prima di giungere a definitive conclusioni sulla validità clinica di questa indagine scintigrafica.



**Figura 15. Immagine alla gamma camera della regione cervicale di un paziente affetto da tiroidite di Hashimoto, acquisita 24 ore dopo la somministrazione endovenosa di circa  $10^8$  linfociti autologhi marcati con  $40\mu\text{Ci}$  di  $^{111}\text{In}$ -ossina. Oltre all'attività in regione tiroidea si possono distinguere i due pacchetti di linfonodi laterocervicali che all'esame obbiettivo non erano palpabili.**



**Figura 16. Immagine alla gamma camera della regione cervicale di un paziente affetto da malattia di Graves', acquisita 24 ore dopo la somministrazione endovenosa di circa  $10^8$  linfociti autologhi marcati con  $40\mu\text{Ci}$  di  $^{111}\text{In}$ -ossina. Non è riscontrabile una significativa attività in regione tiroidea ma si possono distinguere bene i due pacchetti di linfonodi laterocervicali palpabili anche all'esame obbiettivo.**



**Figura 17.** Immagini alla gamma camera della regione cervicale di un paziente affetto da mixedema primitivo, acquisite a vari tempi dopo la somministrazione endovenosa di circa  $10^8$  linfociti autologhi marcati con  $40\mu\text{Ci}$  di  $^{111}\text{In}$ -ossina. La tiroide appare visibile già alla 4<sup>a</sup> ora (A) ma una buona definizione dei tessuti si osserva alla 24<sup>a</sup> (B) e 48<sup>a</sup> (C) ora senza significative differenze con l'immagine acquisita alla 72<sup>a</sup> ora (D).



## Bibliografia

- 1) G.F. Bottazzo, D. Doniach: Polyendocrine autoimmunity: an extended concept. In: Autoimmune and endocrine disease. R. Volpé Ed. M. Dekker Pbl. New York 1985, pp. 375-403.
- 2) G.F. Bottazzo, I. Todd, R. Mirakian, A. Belfiore, R. Pujol-Borrel: Organ specific autoimmunity: a 1986 overview. *Immunol Rev* 94:137-169;1986.
- 3) T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, S. Tamura, M. Inada, K. Yamada, N.Itoh, H. Asakawa, C. Nakagawa, A. Otsuka, N. Kono, S. Tarui: Examination of islets in the pancreas biopsy specimens from newly diagnosed Type I (insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33:105-111;1990.
- 4) A.G. Demaine: The molecular biology of autoimmune diseases. *Immunol Today* 10:357-361;1989.
- 5) A.G. Cudworth, E. Wolf: Aspects of the pathogenesis of Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. In: Skandia International Symposia. Recent trends in diabetes research. Almquist & Wiksell International Pbl. Stockholm 1982, pp. 59-70.
- 6) J.A. Todd: Genetic control of autoimmunity in Type 1 diabetes. *Immunol Today* 11:122-129;1990.
- 7) I. Khalil, L. D'Auriol, M. Gobet, L. Morin, V. Lepage, I. Deschamps, M. Sikpark, L. Degos, F. Galibert, J. Hors: A combination of HLA-DQ $\beta$  asp57-negative and HLA DQ $\alpha$  arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 85:1315-1319;1990.
- 8) P. Parham: A diversity of Diabetes. *Nature* 345:662-663;1990.
- 9) W Gepts: Islet cell morphology in type I and type II diabetes. In: Immunology of diabetes. W.J. Irvine Ed. Teviot Scientific Pbl. Edinburgh 1980, pp. 255-366.
- 10) G.F. Cahill, H.O. McDevitt: Insulin-dependent diabetes mellitus: the initial lesion. *N Engl J Med* 304:1454-1465;1981.
- 11) A.K. Foulis: The patogenesis of cell destruction in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Pathol* 152:141-148;1987.

- 12) A.K. Foulis, J.A. Stewart: The pancreas in recent-onset Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in exocrine acinar tissue. *Diabetologia* 26:456-461;1984.
- 13) W.J. Irwine, C.J. Mc Callum, R.S. Gray, C.J. Campbell, L.J. Duncan, J.W. Farquhar, H. Vaughan, J.P. Morris: Pancreatic islet cell antibodies in Diabetes mellitus correlated with the duration and Type of Diabetes, coexistent autoimmune disease. *Diabetes* 26:138-147;1977.
- 14) G.F. Bottazzo, B.M. Dean, A.N. Gorsuch, A.G. Cudworth, D. Doniach: Complement-fixing islet-cell antibodies in Type 1 diabetes: possible monitors of active cell damage. *Lancet* 1:668-672;1980.
- 15) G.F. Palmer, C.M. Asplin, P. Clemens, K. Lyen, O. Tatpati, P.K. Raghu, T.L. Paquette: Insulin antibodies in insulin dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 222:1337-1339;1983.
- 16) N.K. MacLaren, W.J. Riley: Thyroid, gastric and adrenal autoimmunities associated with insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 8:34-38;1985.
- 17) P.J. Bingley, E.A.M. Gale: Prediction of Type 1 Diabetes: the Bart's-Windsor Family Study. In: *Immunotherapy of Type 1 diabetes*. D. Andreani, H. Kolb, P. Pozzilli Eds. Jhon Wiley & Sons Pbl. London 1989, pp. 137-145.
- 18) A.K. Foulis, N.C. Liddle, M.A. Farquharson, J.A. Richmond, R.S. Weir: The histopathology of the pancreas in type I (insulin dependent) diabetes mellitus: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29:267-274;1986.
- 19) A.K. Foulis, G.F. Bottazzo: Insulinitis in the human pancreas. In: *The pathology of the endocrine pancreas in diabetes*. P.J. Lefebvre, D.G. Pipeleers Eds. Springer-Verlag Pbl. Berlin 1988, pp. 41-52.
- 20) E.F. Lampeter, A. Signore, E.A.M. Gale, P. Pozzilli: Lesson from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:703-708;1989.
- 21) S. Makino, K. Kunimoto, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri, Y. Tochino: Breeding of a non obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim* 29:1-13;1980.
- 22) A. Signore, P. Pozzilli, E.A.M. Gale, D. Andreani, P.C.L. Beverley: The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia* 32:282-289;1989.

- 23) A. Signore, A. Cooke, P. Pozzilli, G. Butcher, E. Simpson, P.C.L. Beverley: Class-II and IL2 receptor positive cells in the pancreas of NOD mice. *Diabetologia* 30:902-905;1987.
- 24) G.F. Bottazzo, B.M. Dean, J.M. McNally, E.H. MacKay, P.G.F. Swift, D.R. Gamble: In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *New Engl J Med* 313:353-360;1985.
- 25) I.J. Chopra, D.H. Solomon: Graves' disease with delayed hyperthyroidism. *Annals Internal Med* 73:985-990;1970.
- 26) J.M. Mc Kenzie: Long acting thyroid stimulator of Graves' disease. In: *Handbook of physiology endocrinology*, R.A. Greep, E.B. Astwood Eds. Am Physiol Soc Pbl. Washington 1974, pp. 255-260.
- 27) G.S. Levey, I. Pastan: Activation of thyroid adenil cyclase by long acting thyroid stimulator. *Life Sci Part II* 29:67-70;1970.
- 28) B.R. Smith, R. Hall: Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* 2:427-431;1974.
- 29) J. Orgiazzi, D.E. Williams, I.J. Chopra, D.H. Solomon: Human thyroid adenil-cyclase stimulator in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. *Proc. 7th International Thyroid Conference. Boston 1975*, pp. 81-85.
- 30) R. Volpé: Autoimmune thyroid disease -a perspective-. *Mol Biol Med* 3:25-51;1986.
- 31) J.M. Mc Kenzie: Humoral factors in the pathogenesis of Graves' disease. *Physiol Rev* 48:252-255;1968.
- 32) S.L. Robbins, R.S. Cotran: Thyroid. In: *Pathologic basis of diseases*; Piccin Ed. Padova 1984, pp. 1373-1376.
- 33) C. Thielemans, L. Vanhaelst, M. Jonckheer, M. Waele, B. Van Camp: Autoimmune thyroiditis: a condition related to a decrease in T-suppressor cells. *Clin Endocrinol* 15:259-263;1981.
- 34) A.P. Weetman, A.M. Mc Gregor: Autoimmune thyroid disease: developments in our understanding. *Endocr Rev* 5:309-315;1984.
- 35) K.D. Burman, J.R. Baker jr: Immune mechanism in Grave' disease. *Endocr Rev* 6:183-187;1985.
- 36) A.L. Vichery, E. Hamlin: Struma lymphomatosa (Hashimoto's thyroiditis). *N Engl J Med* 264:226-230;1961.

- 37) H. Maagoe, I. Reintoft, H.E. Christiansen, J. Simonsen, E.F. Mogensen: Lymphocitic thyroiditis: correlation between morphological, immunological and clinical findings. *Acta Med Scand* 201:299-306;1977.
- 38) L.L. Shane, Q.J. Valenzi, L. Sobrevilla, N. Gabrilove: Chronic thyroiditis: a potentially confusing clinical picture. *Am J Med Sci* 250:532-537;1965.
- 39) R. Volpé: Autoimmune in the endocrine system. *Endocrinology* 20:19-111;1981.
- 40) E.A. Calder, M.G. Lennan, W.J. Irvine: Lymphocyte cytotoxicity induced by preincubation with serum from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 15:467-470;1973.
- 41) L.J. DeGroot, J. Quintans: The causes of autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 10:537-557;1989.
- 42) J.C. Mc Afee, M.L. Thakur: Survey of radioactive agents for in vitro labelling of fagocytic leukocytes. I Soluble agents. *J Nucl Med* 17:480-487;1976.
- 43) M.L. Thakur, R.E. Coleman, M.J. Welch: Indium111-labelled leukocytes for the localization of abscesses: preparation, analysis, tissue distribution and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med* 89:217-228;1977.
- 44) I. Virgolini, C. Müller, P. Fitscha, P. Chiba, H. Sinzinger: Radiolabelling autologous monocytes with 111-indium-oxine for reinjection in patients with atherosclerosis. In: *Radiolabelled Cellular Blood Elements*. H. Sinzinger & M.L. Thakur Eds. Wiley-Liss Pbl. New York 1990, pp. 271-280.
- 45) A. Heyns, H. Pieters, A.C. Steyn: Isolation and labelling with In-111 of a viable population of blood monocytes. In: *Radiolabelled Cellular Blood Elements*. H. Sinzinger & M.L. Thakur Eds. Wiley-Liss Pbl. New York 1990, pp. 261-270.
- 46) T.B. Issekutz, A.C. Issekutz, H.Z. Movat: The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am J Pathol* 103:47-55;1981.
- 47) S.F. Oluwole, R.A. Fawwaz, K. Engelstad, T.S.T. Wang, M.A. Hardy: Migration patterns of indium-111 labeled dendritic cells in the rat. In: *Radiolabelled Cellular Blood Elements*. H. Sinzinger & M.L. Thakur Eds. Wiley-Liss Pbl. New York 1990, pp. 247-256.
- 48) K. Uno, M. Tsukuda, K. Kushida, Y. Ono, S. Yanoma, T. Ono, M. Saito, N. Arimizu: Clinical experience with In-111 labeled LAK cells and TILS for tumor localization. In: *Radiolabelled Cellular Blood Elements*. H. Sinzinger & M.L. Thakur Eds. Wiley-Liss Pbl. New York 1990, pp. 239-245.

- 49) B. Mukherji, O. Arnbjarnarson, L.A. Spitznagle: Biodistribution of In-111 labeled tumor sensitized autologous lymphocytes in cancer patients. In: Cellular immunotherapy of cancer. R.L. Truitt, R.P. Gale, M. Burtin Eds. Alan R Liss Pbl. New York 1987, pp. 325-334.
- 50) A.M. Peters, H.J. Dampure, S. Osman, R.J. Hawker, B.L. Henderson, H.J. Hodgson, J.D. Kelly, R.D. Neirinckx, J.P. Lavender: Preliminary clinical experience with Tc-<sup>99m</sup>-HM-PAO for labelling leucocytes and imaging infections. *Lancet* 2:945-949;1986.
- 51) K.K. Solanki, S.J. Mather, M.Al. Janabi, K.E. Britton: A rapid method for the preparation of <sup>99m</sup>Tc hexametazime-labelled leucocytes. *Nucl Med Comm* 9:753-761;1988.
- 52) D.A. Goodwin, J.R. Heckman, L.F. Fajardo, A. Calin, S.J. Propst, C.I. Diamanti: Kinetics and migration of Indium111-labelled lymphocytes. In: Medical Radiology Imaging. International Atomic Energy Agency Pbl. Vienna 1981, vol. 1, pp. 487-497.
- 53) T. Issekutz, W. Chin, J.B. Hay: Measurement of lymphocyte traffic with indium-111. *Clin Exp Immunol* 39:215-221;1980.
- 54) J. Wagstaff, C. Gibson, N. Thatcher et al: A method for following human lymphocyte traffic using Indium111-oxine labelling. *Clin Exp Immunol* 43:435-442;1981.
- 55) P. Pozzilli, C. Pozzilli, P. Pantano, M. Negri, D. Andreani, A.G. Cudworth: Tracking of indium-111-oxine labelled lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 19:111-116;1983.
- 56) D.A. Goodwin, B.A. Finston, S.I. Smith: The distribution and dosimetry of In 111-labelled leukocytes and platelets in human. 3rd Radiopharmaceutical Dosimetry Symposium, HHS Publication FDA 81:88-101;1981.
- 57) A.W. Segal, P. Deteix, R. Garcia et al: Indium 111-labelled leukocytes: a detrimental effect on neutrophil and lymphocyte function and an improved method of cell labelling. *J Nucl Med* 19:1238-1244;1978.
- 58) J. Wagstaff, C. Gibson, N. Thatcher et al: Human lymphocyte traffic assessed by Indium111-oxine labelling: clinical observations. *Clin Exp Immunol* 43:443-449;1981.
- 59) D.J. Silvester, S.L. Walters: Dosimetry of radiolabeled blood cells. *Int J Nucl Biol* 10:141-144;1983.

- 60) M.L. Thakur, J.G. Mc Afee: The significance of chromosomal aberrations in Indium111-labelled lymphocytes. *J Nucl Med* 25:922-927;1984.
- 61) E.E. Watson: Cell labelling: radiation dose and effects. *J Nucl Med* 24:637-640;1983.
- 62) J.P. Lavender, J.M. Goldman, R.N. Arnot et al: Kinetics of Indium111-labelled lymphocytes in normal subjects and patients with Hodgkin's disease. *Br Med J* 2:797-799;1977.
- 63) A.W. Segal, M.L. Thakur, R.N. Arnot, J.P. Lavender: Indium111-labelled leukocytes for localization of abscesses. *Lancet* 2:1056-1058; 1976.
- 64) J. Wagstaff, C. Gibson, N. Thatcher et al: The migratory properties of Indium111-labelled lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 49:283-291;1981.
- 65) A. Kaldany, T. Hill, S. Wentworth, S.J. Brink, J.A. D'Elia, M. Clouse, J.S. Soeldner: Trapping of peripheral blood lymphocytes in the pancreas of patients with acute-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31:463-466;1982.
- 66) D.J. Silvester, S.L. Waters: Dosimetry of radiolabelled blood cells. *Int J Nucl Biol* 10:141-144;1983.
- 67) C.S. Marcus: Labelling with Indium111 has detrimental effects on human lymphocytes. *J Nucl Med* 25:406-407;1984.
- 68) P. Pozzilli, A. Signore, C. Pozzilli: Detrimental effect on Indium111 on human lymphocytes? *J Nucl Med* 25:830;1984.
- 69) H. Sinn, D.J. Silvester: Simplified cell labelling with Indium111 acetylacetone. *Br J Rad* 52:758-759;1979.
- 70) A. Signore, M. Sensi, C. Pozzilli, M. Negri, G.L. Lenzi, P. Pozzilli: Effect of unlabelled Indium-oxine and Indium-tropolone on the function of isolated human lymphocytes. *J Nucl Med* 26:612-615; 1985.
- 71) H.J. Dampure, S. Osman: A review of methods of separating and radiolabelling human leucocytes. *Nucl Med Comm* 9:681-685;1988.
- 72) K. Streule, M. De Schrijver, R. Fridrich: <sup>99</sup>Tcm-labelled HSA-nanocolloid versus <sup>111</sup>In oxine-labelled granulocytes in detecting skeletal septic process. *Nucl Med Comm* 9:56-67;1988.
- 73) M. De Schrijver, K. Streule, R. Senekowitsch, R. Fridrich: Scintigraphy of inflammation with nanometer-sized colloidal tracers. *Nucl Med Comm* 8:895-908;1987.

- 74) C.B. Styles, R.B. Schmidt, S. Holt: Detection of abscesses with diffusible tracers. *Int J Nucl Med Biol* 12:145-149;1985.
- 75) P. Thedrez, J. Paineau, Y. Jacques, J.F. Chatal, A. Pelegrin, C. Bouchaud, J.P. Soullou: Biodistribution of an anti IL2R monoclonal antibody in rat recipients of a heart allograft and its use as a rejection marker in gamma scintigraphy. *Transplantation* 48:367-371;1989.
- 76) A.J. Fischmann, B.A. Khaw, H.W. Strauss: Quo Vadis Radioimmune Imaging. *J Nucl Med* 30:1911-1915;1990.
- 77) A.G. Siccardi, G.L. Buraggi, L. Callegaro, A.C. Colella, P.G. De Filippi, G. Galli, G. Mariani, R. Masi, R. Palumbo, P. Riva: Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabelled F(ab)<sub>2</sub> fragments of an anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody: a multicenter study. *Cancer Res* 49:3095-3103;1989.
- 78) F. Buchegger, C.M. Haskell, M. Schreyer: Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigens for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. *J Exp Med* 158:413-427;1983.
- 79) J.F. McAfee: What is the best method for imaging focal infections? *J Nucl Med* 31:413-416;1990.
- 80) D. Block, M. Ogtrop, J.W. Arndt, J.A.J. Camps, R.I.J. Feitsma, W. Goedermans, E.K.J. Pauwels: Detection of inflammatory lesions with radiolabelled immunoglobulins. *Eur J Nucl Med* 16:303-305;1990.
- 81) A.J. Fischmann, R.H. Rubin, B.A. Khaw, R.J. Callahan, R. Wilkinson, F. Keech, M. Nedelman, S. Dragotakes, P.B. Kramer, G.M. LaMuraglia, S. Lind, H.W. Strauss: Detection of acute inflammation with <sup>111</sup>In-labelled nonspecific polyclonal IgG. *Semin Nucl Med* 28:335-344;1988.
- 82) R.J. Robb, A. Munck, K.A. Smith: T-cell growth factor receptors: quantitation, specificity and biological relevance. *J Exp Med* 154:1455-1474;1981.
- 83) D.L. Gallina, D. Pelletier, P. Doherty, S.B. Koevary, R.M. Williams, A.A. Like, W.L. Chick, A.A. Rossini: <sup>111</sup>Indium-labelled lymphocytes do not image or label the pancreas of BB/W rat. *Diabetologia* 28:143-147;1985.
- 84) A. Signore, A. Parman, P. Pozzilli, D. Andreani, P.C.L. Beverley: Detection of activated lymphocytes in endocrine pancreas of BB/W rats by injection of <sup>123</sup>Iodine labelled interleukin-2: an early sign of Type 1 diabetes. *Lancet* 2:536-540;1987.
- 85) A. Signore, P. Pozzilli, G. Tamburrano, D. Andreani: The in vivo visualization of insulinitis: a new marker of prediabetes. *Adv Exp Med Biol* 246:119-125;1988.

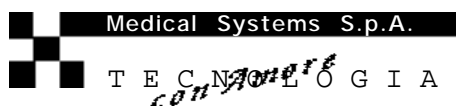
- 86) A. Signore, M. Chianelli, P.C.L. Beverley, P. Pozzilli: In vivo labelling of activated T lymphocytes by i.v. injection of  $^{123}\text{I}$ -labelled interleukin-2 for detection of insulinitis in Type 1 diabetes mellitus. In: Radiolabelled Cellular Blood Elements. H. Sinzinger & M.L. Thakur Eds. Wiley-Liss Pbl. New York 1990, pp. 229-238.
- 87) D.A. Goodwin: Cell labelling with oxine chelates of radioactive metal ions: techniques and clinical implications. *J Nucl Med* 19:557-561;1978.
- 88) H.J. Dampure, S. Osman, F. Brady: The labelling of blood cells in plasma with  $^{111}\text{In}$ -tropolonate. *Br J Radiol* 55:247-249;1982.
- 89) P. Pozzilli, A. Signore, C. Pozzilli, P. Pantano, M. Negri: Autoimmunità tiroidea: evidenza dell'infiltrato linfocitario nella tiroide dopo somministrazione di linfociti autologhi marcati con indio-111. In: *Immunologia, attualità e prospettive*. G. Danieli e M. Montroni Eds. Il pensiero Scientifico Pbl. Roma 1983, pp. 599-602.



## Indice

Istruzioni per gli Autori.....	pag.	2
Editoriale.....	»	3
Introduzione.....	»	5
L'autoimmunità endocrina.....	»	6
Ruolo dei markers genetici nella diagnosi precoce delle endocrinopatie autoimmuni .....	»	8
Il diabete mellito di Tipo 1: patogenesi e storia naturale .....	»	11
Cenni sulla patogenesi della malattia di Graves' e della tiroidite di Hashimoto .....	»	14
Tecniche immunoscintigrafiche.....	»	17
L'immunoscintigrafia mediante cellule marcate .....	»	17
L'uso dei linfociti radiomarcati .....	»	21
L'immunoscintigrafia mediante ligandi recettoriali radiomarcati.....	»	22
L'uso di anticorpi anti-linfociti .....	»	24
L'uso dei frammenti F(ab) <sub>2</sub> e Fab .....	»	26
L'uso delle immunoglobuline umane policlonali aspecifiche.....	»	28
L'uso delle citochine.....	»	28
L'uso della interleuchina-2.....	»	30
L'immunoscintigrafia per la diagnosi precoce del diabete mellito di Tipo 1 .....	»	33
L'immunoscintigrafia nella patologia autoimmune della tiroide.....	»	38
Bibliografia .....	»	41
Indice .....	»	49
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio.....	»	50
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio letterario.....	»	52
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio Edizione Spagnola.....	»	52
Videoteca Medical Systems.....	»	53

## 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  $\beta$ -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 fluoroimmunologico*. 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., Gnassi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.

34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *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 coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allerge-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.



**Caleidoscopio**  
*Collana monografica di Medicina*  
anno 9, numero 65

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassu  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
Tel. Fax e Modem (079) 270464

**Responsabile Commerciale**

Alessandra Pater



**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi  
Angelo Maggio

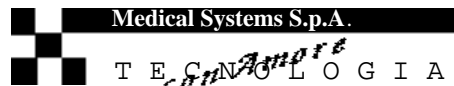
**Segretaria di Direzione**

Fiorella Gaggero

**Servizio Abbonamenti**

Marisa Pasquali  
Giuseppe Gambetta

**Editore**



Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 809737- 802257.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola-

Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica,

The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

**Stampa**

ATA-Azienda Tipografi Associati

Via G. Torti, 32 C Rosso

16143 Genova - Tel. 010 503320

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: Settembre 1991

Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

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 ESENTI IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)