

Diabete e Ricerca

CASO SARDEGNA: LABORATORIO “VIVENTE” SUL DIABETE MELLITO TIPO 1

Marco Songini

**Struttura Complessa di Diabetologia – Ospedale San Michele
Azienda Ospedaliera “G. Brotzu” - Cagliari**

Introduzione

Il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) rappresenta una delle più gravi forme cliniche di diabete mellito. La malattia colpisce prevalentemente i bambini e gli adolescenti, ma non è rara la sua comparsa in età adulta e senile. L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte misconosciuta, anche se è ampiamente accettato che l'origine del disturbo sia multifattoriale, particolarmente legata ad un'interazione fra predisposizione genetica da una parte e fattori ambientali dall'altra. Ne consegue lo sviluppo di una risposta autoimmunitaria, soprattutto mediata da linfociti T autoreattivi, che alla fine determina la distruzione delle cellule beta insulari del pancreas. È oggi noto che particolari combinazioni genetiche degli antigeni HLA possono contribuire al rischio di sviluppare la malattia, così come sono state definite nei particolari le lesioni anatomopatologiche che si evidenziano nelle isole pancreatiche al momento della diagnosi, ma resta tuttora insoluto come si inneschi, e soprattutto che cosa determini, l'inizio dell'aggressione autoimmunitaria. L'attacco autoimmune può iniziare anche diversi anni prima della manifestazione clinica della malattia. Infatti, le indagini eseguite in ampie coorti di parenti di primo grado di pazienti affetti da IDDM, di gemelli omozigoti ma discordanti per la malattia, di casi con patologia endocrina autoimmune e di bambini in età scolare, hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-isola pancreatica ICA, determinati con la classica tecnica dell'immunofluorescenza indiretta, prima della manifestazione clinica della malattia.

Successivamente sono stati individuati nuovi autoanticorpi anti-isola pancreatica, che sono risultati essere ulteriori marcatori sierologici predittivi della malattia. Fra questi vanno ricordati gli autoanticorpi anti-insulina (IAA), gli autoanticorpi anti-GAD (GADA) e gli autoanticorpi contro gli antigeni triptici insulari di 37kD/40kD; più recentemente, è stato dimostrato che questi due ultimi antigeni appartengono alla famiglia delle proteine tirosina-fosfatasi, e denominati rispettivamente IA-2b (o fogrina) e IA-2ic.

Come già accennato, il rischio di sviluppare l'IDDM è strettamente associato a ben definiti alleli dei geni che codificano le molecole HLA, un dato confermato anche a livello molecolare. In linea generale, più del 90% dei bambini di razza caucasica affetti da IDDM posseggono gli aplotipi HLA-DR3 e/o HLA-DR4, mentre l'aplotipo HLA-DR2 è raramente presente e rappresenta così un allele di protezione.

Successivi studi hanno dimostrato un'ancora più stretta associazione fra la malattia e gli alleli DQ del complesso HLA, e precisamente la combinazione di arginina in posizione 53 del DQA1 (DQa 53-Arg) e l'assenza di acido aspartico in posizione 57 del DQB1 (DQb57-non-Asp), determinerebbero un rischio ancora più alto per l'insorgenza di IDDM. A questo riguardo è importante sottolineare che questo tipo di combinazione è frequentemente presente nella razza caucasica, ma solamente una piccola frazione di essa sviluppa l'IDDM.

In merito alla relazione fra fattori ambientali ed IDDM, resta da confermare se virus comuni, quali i Coxsakie, il CMV, etc., possano giocare un ruolo rilevante nell'eziologia della malattia, anche se recentemente è stato segnalato che i virus Coxsakie sarebbero dei potenziali agenti causali, almeno nella prima infanzia. È stato anche ipotizzato che alcuni virus appartenenti alla famiglia dei virus lenti potrebbero indurre la risposta autoimmunitaria contro le beta cellule pancreatiche.

Alcuni dati ottenuti su altre malattie autoimmuni, come ad esempio la malattia di Basedow, la sindrome di Sjögren, l'artrite reumatoide e, più di recente, la cirrosi biliare primitiva tenderebbero a sostenere quest'ultima ipotesi, ma sono necessarie ulteriori conferme. Allo stesso modo, restano da approfondire gli studi riguardanti il ruolo che i superantigeni potrebbero svolgere nella patogenesi dell'IDDM con alcuni studi che indicherebbero un possibile coinvolgimento di particolari retrovirus endogeni ed altri che però non hanno potuto confermare questi dati.

La inaspettata concordanza Finlandia-Sardegna per l'alta incidenza dell'IDDM in Europa

Nel 1989, la Comunità Europea iniziò a finanziare un progetto, il cui obiettivo era di definire il più accuratamente possibile gli aspetti epidemiologici dell'IDDM in diversi stati europei. Questo studio, chiamato all'inizio 'EURODIAB-ACE' (EUROpe and DIABetes-Aethiology of Childhood diabetes on Epidemiological basis) ed oggi 'EURODIAB-TIGER' (EUROpe and DIABetes-Type I Genetic Epidemiology Resource), è tuttora in corso e si prefigge di monitorare l'incidenza di IDDM in una popolazione di 30 milioni di bambini europei, di età compresa tra 0 e 14 anni, e di studiare dettagliatamente gli aspetti genetici e immunologici tipici della malattia. Più recentemente, il limite superiore dell'età era stato esteso fino a 29 anni. I dati raccolti nel decennio in cui lo studio è stato condotto hanno continuato a confermare l'esistenza di un gradiente europeo Nord-Sud, con le più alte incidenze di IDDM rilevate in Finlandia e negli altri stati della penisola Scandinava, mentre le più basse incidenze sono riscontrate a livello dei Paesi che si affacciano sul Mediterraneo.

Queste osservazioni si accordano con quelle che indicavano che l'incidenza di IDDM diminuiva progressivamente, anche globalmente, da Nord a Sud, con valori minimi registrati a livello dei paesi ubicati intorno all'Equatore. Cominciano però ad affiorare delle eccezioni a questa tendenza. Infatti, dati apparsi di recente hanno dimostrato che nel Kuwait, un'area geografica con bassa presenza di IDDM nel 1983, l'incidenza della malattia è salita drammaticamente nella successiva decade.

Indipendentemente da queste nuove informazioni, il quadro europeo sembra mantenersi stabile, dove è stato stimato che i bambini finlandesi continuano ancora oggi ad avere un rischio di malattia 10 volte superiore a quello dei bambini greci.

Inaspettatamente, dallo studio Eurodiab-Ace, emerse, per la prima volta, che esisteva un'elevata incidenza di IDDM in Sardegna, un'isola che si trova nel mezzo

della cosiddetta area 'fredda' mediterranea per la malattia, ed i cui valori si avvicinano però a quelli registrati in Finlandia.

Di un interesse particolare è anche l'informazione che l'incidenza dell'IDDM è andata progressivamente aumentando nell'isola a partire dalla metà degli anni 60', il che suggerirebbe che, se si ipotizza una certa modificazione ambientale avvenuta all'interno dell'isola, tale cambiamento dovrebbe essere datato attorno al periodo della seconda guerra mondiale, tenendo conto del lungo periodo di latenza che, sappiamo, precede l'esordio acuto della malattia. Incredibilmente, una simile ascesa nel tempo è stata anche registrata in Finlandia, dove l'incidenza dell'IDDM è progressivamente aumentata a partire dagli anni 70'.

Il fatto che la Finlandia e la Sardegna siano ai vertici della drammatica piramide dell'incidenza dell'IDDM in Europa, pone certamente degli intriganti quesiti, a cui però non è facile dare una risposta. Di fatto, le popolazioni di queste due distanti aree geografiche sono geneticamente molto differenti, come dimostrato da studi volti a definire, attraverso la valutazione di numerosi marcatori genetici, le zone di insediamento delle varie etnie, sia dai loro movimenti migratori attraverso i secoli sia dall'evoluzione delle loro caratteristiche linguistiche. A livello genetico, esistono anche differenze per quanto riguarda il profilo HLA. Sebbene la frequenza degli aplotipi DR3 e DR4 sia particolarmente alta sia in Finlandia che in Sardegna, il loro rapporto reciproco è invertito, essendo la prevalenza di DR4 dell'84% nella popolazione finlandese e del 44% in quella sarda, mentre per il DR3 la prevalenza è rispettivamente del 42% e del 73%. È importante sottolineare inoltre che il DR3 è riscontrabile nel 50% della popolazione sarda e solo nel 16% di quella finlandese.

Anche riguardo al profilo delle combinazioni di altri aplotipi HLA collegati al rischio di IDDM esistono importanti differenze: mentre nella popolazione sarda le combinazioni più frequenti nei pazienti con IDDM sono A30-B18-DR3 e A2-B18-DR2 e DQ1, nei pazienti finlandesi le combinazioni maggiormente prevalenti sono A1-B8-DR3 e A2-B62-DR4 e DQ8. Come è stato precedentemente ricordato, la presenza di DR2 conferisce una protezione rispetto all'IDDM e ad altre malattie autoimmuni (per esempio la malattia di Basedow) nella maggior parte della razza caucasica, inclusi i finlandesi. Tuttavia, la Sardegna rappresenta ancora una volta un'eccezione a questa regola, poichè questo tipo di allele è frequentemente riscontrabile sia negli individui con IDDM che con malattia di Basedow. Curiosamente, inoltre, all'interno dell'isola si riscontra un'eterogeneità nella distribuzione del DR2 cosicché, se nella popolazione che vive nel Sud dell'isola tale allele rappresenta un fattore di rischio di IDDM, in quella che vive nelle aree centro-orientali esso diventa un fattore di protezione. Riguardo al DBb57-non-asp, il 100% dei pazienti sardi con IDDM possedevano questo allele, rispetto al 73% di altri caucasici, al 74% degli americani di colore e al 5% dei giapponesi affetti dalla stessa malattia. Se si considera poi la condizione omozigote, DQa53-arg/ DQa53-arg-DQb57-non-asp/ DQb57-non-asp, che determina il massimo rischio di IDDM (diminuendo qualora altri aminoacidi siano presenti nelle stesse posizioni), anche questa combinazione è stata rilevata con elevata frequenza della popolazione sarda. Va sottolineato, tuttavia, che tale combinazione allelica è frequentemente riscontrata anche in altre popolazioni che vivono alla stessa latitudine, ad esempio in Spagna, dove la prevalenza della malattia è però di gran lunga inferiore rispetto alla Sardegna.

Il progetto 'IDDM-Sardegna'

Se la Finlandia e la Sardegna rappresentano le aree del mondo con la più alta incidenza di IDDM, chiaramente gli sforzi atti a comprendere l'eziopatogenesi della malattia non possono che concentrarsi in queste due aree. Da quasi una decade, il nostro gruppo di lavoro è impegnato in Sardegna. Storicamente, la Sardegna presenta una particolare omogeneità etnica che si è mantenuta nei secoli ed è difficilmente riscontrabile in altre regioni. L'isola quindi rappresenta un osservatorio epidemiologico unico, dove le dinamiche e gli eventi che portano all'insorgenza dell'IDDM possono essere studiati approfonditamente. L'obiettivo principale del progetto era, e continua ad essere, quello di disegnare le mappa sia dell'incidenza dell'IDDM conclamato nell'isola che della prevalenza del pre-IDDM, con l'intento finale di individuare le relative aree ad alta e bassa frequenza collegate alla malattia.

A questo primo obiettivo, sono state successivamente inserite altre linee di ricerca, che si collegano allo studio dell'IDDM (es, lo studio del diabete gestazionale, lo studio degli emigranti sardi) e di altre patologie autoimmuni (es, la malattia celiaca e quella tiroidea autoimmune). In questa rassegna, riassumeremo lo stato dell'arte per quanto riguarda alcuni dei maggiori studi inseriti nel progetto 'IDDM-Sardegna', e precisamente:

- la continuazione del Registro IDDM conclamato (The Eurodiab-Ace Project);
- lo studio dei bambini in età scolare;
- lo studio dei neonati;
- lo studio degli emigranti sardi;
- lo studio ecologico e ambientalistico;
- lo studio della malattia celiaca subclinica.

La continuazione del Registro IDDM conclamato (Eurodiab-Ace Project)

I dati raccolti finora continuano a indicare che l'incidenza di IDDM in Sardegna è più elevata rispetto ad altre regioni italiane (es. Lombardia, Lazio e Sicilia orientale), le quali mantengono i bassi livelli di incidenza già segnalati per l'area mediterranea in generale (da 7 a 11 nuovi casi all'anno per 100.000 abitanti). Nella popolazione studiata in Sardegna (da 0 a 29 anni d'età), l'incidenza di IDDM nel periodo 1989-94 è stata di 26 casi all'anno per 100.000 abitanti, ma aumentava fino a 35/100.000/anno se si consideravano i casi di età fra 0-14 anni. Interessante è il dato che l'incidenza si è mostrata variabile nelle 4 province sarde. Nella fascia d'età 0-29 anni, l'incidenza di IDDM a Cagliari (CA) era di 28, a Nuoro (NU) e Oristano (OR) di 26 e a Sassari (SS) di 21 casi/100.000/anno, mentre nella fascia d'età 0-14 anni le incidenze erano di 45 (OR), 38 (CA), 35 (NU) e 30 (SS) casi/100.000/anno. In generale, si è osservata una prevalenza dell'IDDM nel sesso maschile nell'età 0-14 anni. Sebbene questi dati si allineano a quelli riportati in altri paesi ad elevata incidenza della malattia (es, la Finlandia), non è facile spiegare la differente distribuzione dell'incidenza di IDDM nelle 4 province sarde.

Un'analisi epidemiologica/statistica più approfondita, condotta con i metodi bayesiani, ha evidenziato aree più 'calde' e aree più 'fredde' per l'incidenza dell'IDDM nell'isola, anche se tuttavia va precisato che, nonostante questa evidenziazione, non si è trovata una differenza statisticamente significativa tra le aree più 'calde' e quelle più 'fredde' per l'IDDM conclamato. La ragione della mancata significatività va ricercata nel fatto che l'incidenza della malattia nell'isola è generalmente alta, ma va anche precisato che in alcune zone centro-occidentali

dell'isola la mappa d'incidenza ha presentato zone più 'calde' di quelle riscontrate in Finlandia. Al momento, stiamo analizzando la distribuzione geografica dei casi riportati nell'isola nel periodo 1994-98, da cui potrebbero emergere segnali di spostamenti 'ad onda' dei nuovi casi di IDDM da un'area ad un'altra dell'isola, come è stato già notato in Finlandia in un'analisi retrospettiva dei dati epidemiologici raccolti sull'incidenza della malattia in quel paese (Akerblom H, comunicazione personale).

Lo studio dei bambini in età scolare

Al fine di identificare le aree 'calde' di pre-diabete all'interno dell'isola, è stata arruolata una coorte di circa 10.000 bambini provenienti dalle scuole elementari e medie delle 4 province. La fase di reclutamento è iniziata nel 1986 nelle province di CA, OR e NU, che hanno contribuito al 70% dell'intera coorte. Nel 1994 si è unita al progetto anche la provincia di SS, che ha fornito così il rimanente 30%. A questo proposito va ricordato che l'indagine sul territorio fu ufficialmente condotta per ottenere dati epidemiologici e clinici sulla prevalenza del gozzo endemico e sul grado di carenza iodica nei vari paesi visitati, e quindi non c'era alcun pregiudizio per quanto riguardava la raccolta di dati non solo sull'IDDM, ma anche su altri tipi di malattie autoimmuni e non.

In riferimento al pre-IDDM, in tutti i bambini partecipanti allo studio sono stati determinati gli ICA e la loro prevalenza è risultata circa del 5 % (³ 5 JDF-u), la più alta al mondo assieme alla Finlandia. Lo studio immunologico è stato inoltre allargato al dosaggio dei GADA ed a quello degli IA-2icA. Al maggio 1998, in 8.448 bambini, provenienti da 36 paesi delle quattro province sarde, sono state misurate le 3 specificità autoanticorpali. Di questi, 2.080 provenivano da 7 paesi della provincia di CA, 1.730 da 5 paesi di OR, 1.661 da 12 paesi di NU e 2.977 da 12 paesi di SS. In CA (6.3%) ed in SS (5.2%) si sono registrate la più alte prevalenze di ICA \square 5 JDF-u, rispetto a quelle rilevate ad OR (2.8%) ed a NU (3.4%), mentre CA, OR e SS hanno mostrato la più alta prevalenza di ICA \geq 20 JDF-u (1.5%) rispetto a quella di NU (0.5%). In SS si è registrata la più bassa prevalenza di GADA (1.0% vs OR= 2.4%, NU= 1.7% e CA=1.6%), mentre la prevalenza di IA-2icA è risultata più alta nelle province di CA (1%) e di OR (1%) rispetto a quella di NU (0.5%) e di SS (0.3%). La prevalenza di una combinazione di 2 o 3 autoanticorpi anti-isola pancreatici è risultata più elevata nelle province di OR (1%) e di CA (0.8%) rispetto a quella di SS (0.5%) e di NU (0.4%) (Figura 2). Inoltre, se nella combinazione di autoanticorpi veniva considerata la presenza di ICA \geq 20 JDF-u, allora le differenze fra le varie province si accentuano ulteriormente, essendo più elevate a OR (0.7%) e CA (0.6%) rispetto a NU (0.1%) e a SS (0.2%).

In sintesi, il fatto di aver trovato le più alte prevalenze di combinazioni di autoanticorpi anti-isola pancreatici nelle province di OR e di CA che, come emerso dai dati dello studio Eurodiab-Ace, sono anche le 2 province con la più alta incidenza di IDDM in Sardegna, ha permesso di identificare come sovrapponibili le aree a più alta concentrazione di potenziali pre-diabetici e di diabetici conclamati nell'isola.

Dopo un periodo medio di follow up di 5.5 anni (range 3-11 anni), 18 bambini (7 maschi e 11 femmine) hanno sviluppato il diabete, con una latenza compresa fra 2 mesi e 5 anni, dal momento in cui erano entrati nello studio. A parte un caso, nessuno di loro aveva familiarità per IDDM nel gentilizio di primo grado. Di questi, 6 provenivano dalla provincia di CA, 6 da quella di OR, 5 da quella di SS e 1 da quella

di NU. A parte due casi, che erano risultati negativi per tutti e 3 gli autoanticorpi quando analizzati all'entrata nello studio, i rimanenti 16 pazienti erano risultati positivi per uno o più autoanticorpi, precisamente: 2 casi per 1 solo autoanticorpo, 8 casi per 2 autoanticorpi e 6 casi per tutti e 3 gli autoanticorpi determinati. Alla luce di queste informazioni si è potuto calcolare la sensibilità, la specificità ed il valore predittivo dei diversi autoanticorpi, sia presi singolarmente che nelle loro varie combinazioni.

Dai dati si può evincere che:

- 1) gli ICA da soli, sia 35 che 20 JDF-u, e la combinazione di 2 o 3 autoanticorpi sono i marcatori sierologici con la maggiore sensibilità;
- 2) a parte per gli ICA 35 JDF-u e GADA presi singolarmente, gli altri marcatori e le relative combinazioni hanno tutte un'elevata specificità (> 99%);
- 3) il migliore potere predittivo è dato dalla combinazione di ICA 20 JDF-u con IA-2icA (34.5 %).

Lo studio finora condotto ha permesso di quantificare, per la prima volta, il rischio relativo conferito dalla presenza di 3 dei 4 marcatori autoanticorpali dell'IDDM (gli IAA non sono ancora stati determinati) per l'eventuale sviluppo della malattia in una popolazione scolare non selezionata.

Per quanto riguarda un bambino sardo, qualora esso venga trovato positivo per 2 o 3 autoanticorpi al momento del primo dosaggio, il rischio di diventare diabetico nell'arco di 6 anni è del 24.1%. Da questo si può dedurre che, a differenza dei casi 'familiari', dove il rischio conferito dalla stessa combinazione autoanticorpale è del 90% proiettato in 10 anni di osservazione, nei cosiddetti casi 'sporadici', senza cioè familiarità per l'IDDM, la presenza di una simile combinazione autoanticorpale determina apparentemente un rischio molto minore di sviluppare l'IDDM. Queste osservazioni sono particolarmente intriganti, se si considera che questi dati sono stati ottenuti in una popolazione che vive in un'area ad alto rischio per la malattia. Esse inoltre rinforzano il concetto di eterogeneità dell'IDDM, per cui si deve necessariamente ipotizzare che, nei casi sporadici, nuovi o aggiuntivi marcatori autoanticorpali siano necessari per aumentare il grado di predittività del futuro sviluppo della malattia.

Lo studio dei neonati

L'obiettivo di questa parte del progetto è di allargare l'identificazione degli individui pre-diabetici e di indagare la storia naturale dell'IDDM fin dalla nascita, affrontando l'analisi delle variabili immunologiche, genetiche e ambientali, che nell'insieme contribuiscono a determinare l'elevata incidenza di IDDM in Sardegna. A questo scopo, è previsto un reclutamento di 30.000 neonati, provenienti da 18 diversi centri pediatrici dislocati nelle 4 province dell'isola, ed un follow up annuo per la durata di 5 anni. Circa 19.000 bambini sono già stati arruolati nello studio ed in 15.000 di essi sono stati dosati gli ICA a livello del sangue refluo dal cordone ombelicale (61). La prevalenza di ICA per titoli 35 JDF-u è stata del 2.3%, mentre per titoli 20 JDF-u è risultata dello 0.6%. Sono stati reclutati 2.959 bambini al primo anno, 1.148 al secondo e 388 al terzo anno di vita. La prevalenza degli ICA 35 JDF-u è progressivamente aumentata, passando dal 0.18% del primo anno, al 0.78% del secondo e al 1.80% del terzo anno di follow up. Nel primo e secondo anno, inoltre, si sono evidenziati i GADA nello 0.6% e 1.5% dei sieri analizzati (rispettivamente, di 2.125 e di 399 bambini) e gli IA-2icA nello 0.1% e 1.3% (rispettivamente, di 2.117 e

di 399 bambini). Al maggio 1998, 11 bambini, appartenenti alla coorte iniziale, hanno sviluppato l'IDDM in un periodo variabile tra 15 e 33 mesi. Dei 9 bambini di cui abbiamo i dati sierologici, solo 1 era ICA positivo alla nascita, mentre 3 erano diventati positivi per almeno 2 autoanticorpi nei campioni di siero prelevati prima della diagnosi, ed un altro, negativo nei campioni di siero dosati prima della diagnosi, si positivizzò per i tre autoanticorpi quando sviluppò la malattia. Degli altri 2 bambini, anch'essi positivi per 2 o 3 autoanticorpi al momento della diagnosi, non si possiedono i dati serologici prima dell'esordio della malattia (non si sono presentati al follow up). A questi dati si deve aggiungere che lo screening autoanticorpale ha portato alla individuazione di 22 bambini che al primo anno di vita mostrarono prevalentemente la presenza dei GADA e poche erano le eccezioni che avevano 2 autoanticorpi, misurabili nello stesso siero. Il successivo follow up ha però evidenziato la comparsa aggiuntiva degli altri marcatori sierologici. Ad oggi, nessuno di questi bambini ha sviluppato l'IDDM.

Dai dati finora emersi, si possono trarre le seguenti conclusioni, anche se preliminari:

- 1) i GADA tendono a comparire prima degli ICA e degli IA-2icA (non abbiamo ancora misurato gli IAA, gli autoanticorpi che più frequentemente si riscontrano nei bambini in tenera età);
- 2) tutti e 3 gli autoanticorpi aumentano sensibilmente la loro comparsa nel corso degli anni;
- 3) in Sardegna, nel periodo della prima infanzia, si riscontra un'elevata incidenza di IDDM associata ad una precoce ed elevata presenza di autoanticorpi antiisola pancreatica.

Lo studio degli emigranti Sardi

Questo è uno studio il cui ultimo obiettivo è di valutare il ruolo della genetica, in rapporto all'impatto ambientale, sull'incidenza dell'IDDM nella popolazione emigrata dalla Sardegna. A questo proposito, abbiamo valutato la prevalenza di IDDM negli emigranti sardi in provincia di Pavia, attraverso un'indagine che si è avvalsa di più fonti di informazione per la sua validazione epidemiologica (questionari postali, colloqui telefonici, archivi delle autorizzazioni per la prescrizione delle siringhe da insulina dei Distretti Sanitari dell'A.S.L. di Pavia, etc.) . Dei circa 2.252 sardi residenti in Pavia, 10 sono risultati diabetici (con una prevalenza del 4.4/1.000, che standardizzata per età sulla popolazione italiana è risultata del 2.63/1.000). Tre di essi avevano sviluppato l'IDDM prima di emigrare a Pavia, mentre negli altri sette la malattia è insorta dopo l'insediamento nella nuova area geografica. Il dato che più ci è parso interessante è che, mentre l'età media di insorgenza dell'IDDM dei 3 sardi che hanno sviluppato la malattia quando ancora risiedevano in Sardegna era di 14 anni ($\pm ds$ 2 anni), negli altri 7 la malattia si è manifestata ad un'età media significativamente superiore ($32.8 \pm ds$ 8.2 anni). L'età di insorgenza della malattia, in relazione all'età di emigrazione, indicherebbe un periodo di latenza più lungo negli individui emigrati in età più giovane anche se, in ragione dell'esiguo numero di casi, non è stata raggiunta la significatività statistica. Resta comunque confermato che, anche negli emigranti sardi, la prevalenza di IDDM è significativamente più elevata rispetto a quella riscontrata tra la popolazione italiana residente in altre regioni della Penisola. La nostra analisi si estenderà presto a quantificare la prevalenza dell'IDDM nei figli di famiglie con uno o entrambi i genitori sardi, per contribuire a chiarire così i dati discordanti finora emersi in studi condotti in altre regioni italiane, dove è stata

segnalata sia una bassa prevalenza di IDDM, ad esempio in Piemonte, sia un'incidenza sovrapponibile a quella registrata in Sardegna, come nel Lazio e in Lombardia.

Lo studio ecologico e ambientalistico

È stato verificato l'impatto di alcuni fattori ambientali e la loro possibile connessione con l'IDDM in Sardegna, tra questi:

- 1) l'impatto stagionale sull'insorgenza della malattia, dove si conferma l'esistenza di picchi di incidenza in autunno ed in inverno, similmente ad altri Paesi in cui lo stesso fenomeno è stato precedentemente studiato. Si conferma inoltre che, anche in Sardegna, l'IDDM colpisce più il sesso maschile di quello femminile;
- 2) l'effetto della temperatura, delle precipitazioni e del contenuto di nitriti/nitrati nelle acque potabili. La provincia di SS che, come precedentemente annotato, ha la più bassa incidenza di IDDM rispetto alle altre province sarde, è risultata la più fredda e con più piovosità ed, inaspettatamente, con la più alta concentrazione di nitriti/nitrati nelle acque potabili;
- 3) la non sovrapposizione fra aree ad alta incidenza di pregressa malaria, talassemia e deficienza di G-6-P;
- 4) l'effetto dell'ingestione di latte vaccino (formula) rispetto all'allattamento al seno.

L'indagine è stata condotta nella provincia di SS, ma non si è trovata alcuna differenza tra i bambini poi diventati diabetici ed i due tipi di alimentazione assunti nei primi mesi di vita.

Lo studio della malattia celiaca subclinica

Su circa 1.600 bambini in età scolare, provenienti da 7 paesi del nord della Sardegna (provincia di Sassari), è stata condotta una valutazione serologica alla ricerca degli autoanticorpi correlati alla malattia celiaca (AGA-IgG, AGA-IgA e AEA). Nei bambini trovati positivi per una combinazione di 2 o 3 anticorpi associati al rischio di sviluppare la celiachia, è stata effettuata anche un'indagine bioptica di accertamento diagnostico. Come per l'IDDM, è emersa un'elevata prevalenza non solo di una positività autoanticorpale celiaco-correlata, ma anche della stessa malattia subclinica (10.5/1.000 individui in età compresa fra 6-14 anni), confermata dall'aspetto di 'mucosa piatta' alla biopsia intestinale.

Gli obiettivi a lungo termine del Progetto 'IDDM-Sardegna'

Combinando i risultati dello studio dei bambini in età scolare e dei neonati con i dati forniti dallo studio Eurodiab-Ace, sarà possibile identificare non solo le 'aree calde' di incidenza di IDDM, ma anche le 'aree calde' del pre-diabete, che rappresenterebbero così le zone ad elevato rischio per lo sviluppo futuro della malattia. Sarà solo a compimento dell'analisi epidemiologica, genetica e immunologica che diventerà possibile chiarire la distribuzione ed il numero di tali aree, e le eventuali fluttuazioni spaziali e temporali dell'insorgenza dell'IDDM. Quando si disporrà di questi dati, verrà condotta un'indagine ecologica selettiva, rispettivamente nelle aree ad alto e basso rischio di malattia e di pre-malattia, nel tentativo di identificare quelli che potrebbero essere i fattori causali e/o promotori del

meccanismo aggressivo che si è instaurato nell'isola contro le beta cellule pancreatiche.

Considerazioni generali

In Sardegna, dove vivono un milione e mezzo di abitanti, ci sono circa 220 nuovi casi di IDDM all'anno, solo nella fascia di età 0-29 anni. Il numero totale si aggira su circa 10.000 pazienti con malattia conclamata, sparsi in tutta l'isola al di sotto dei 30 anni.

Se si considera poi che non si conosce la prevalenza di IDDM al di sopra dei 30 anni e che il 15-20% dei casi di NIDDM sono in realtà casi di IDDM a lenta progressione verso l'insulina dipendenza (vide infra), si può stimare che il numero di pazienti con IDDM in Sardegna si aggiri attorno ai 15.000-20.000 casi. Combinando le proiezioni sia dell'IDDM che del NIDDM, il numero sale a circa 50.000 unità. È facile quindi dedurre come il diabete mellito in Sardegna stia assumendo i connotati di una malattia epidemica.

L'eziologia dell'IDDM è tuttora ignota, e non è escluso che fattori esogeni possano agire in stadi precoci della vita, addirittura durante la fase fetale. Restano ancora argomento di discussione le ipotesi eziologiche legate ai derivati del latte vaccino in corso di svezzamento e al ruolo dei virus Coxsackie nei soggetti con IDDM della prima

infanzia . Tuttavia, non sono ancora disponibili dati che riguardano la storia naturale dell'IDDM risalente dal momento della nascita e monitorata negli anni successivi ad essa, e lo studio dei neonati in Sardegna aiuterà senz'altro a identificare la sequenza e il tempo di comparsa dei vari autoanticorpi anti-isola pancreatica in una popolazione ad elevato rischio della malattia. Insieme allo studio dei bambini in età scolare, lo studio dei neonati offrirà l'opportunità di chiarire le differenze che ci potrebbero essere fra 'casi sporadici' e 'casi familiari', e di sviluppare quindi accurati e selettivi modelli di predizione e di prevenzione.

Vantaggi a lungo termine nella predizione e prevenzione dell'IDDM

Gli individui che risulteranno positivi ai vari autoanticorpi anti-isola pancreatica, particolarmente se presenti in combinazione e quindi conferendo un più elevato rischio di sviluppare l'IDDM, trarranno sicuramente beneficio da una diagnosi tempestiva e da un precoce trattamento insulinico. In questo modo, sarà possibile correggere e migliorare il grado di controllo glico-metabolico in tempi brevi ed adeguati e quindi ridurre il rischio delle complicanze a lungo termine, tipiche della malattia. Sarà inoltre disponibile una banca di sieri ed altro materiale biologico che permetterà, sulla base dei dati e delle conoscenze che progressivamente emergeranno, di condurre nuove e mirate ricerche volte all'identificazione di nuove specificità autoanticorpali e al discernimento dei fattori eziologici dell'IDDM, e di individuare e programmare nuove strategie di intervento preventivo. Da ultimo, quando saremo in grado di identificare con precisione gli individui ad alto rischio di IDDM, sarà possibile condurre nuovi e mirati trials di prevenzione (es, l'utilizzo di nicotinamide, di insulina o l'esclusione delle proteine del latte vaccino nei primi mesi di vita). Questi trials sono già stati avviati in altri centri di ricerca ed i risultati dovrebbero apparire nei prossimi 2-3 anni. Qualora i risultati saranno soddisfacenti, ci troveremo in una situazione ideale per applicare un'efficace e sicura terapia preventiva su una popolazione selezionata e ad elevato rischio di IDDM come in

Sardegna. In altre parole, saremo in grado di pianificare, per la prima volta e in tempi brevi, una reale strategia preventiva della malattia diabetica.

Autoimmunità e diabete mellito non-insulino dipendente

Come è stato a più riprese precisato, è ormai ampiamente riconosciuto che i meccanismi patogenetici dell'IDDM sono riconducibili ad un processo autoimmune che, da ultimo, esercita il suo deleterio effetto contro le beta cellule delle isole pancreatiche. L'attacco inizia spesso diversi anni prima dell'esordio della malattia conclamata e può essere monitorato attraverso la determinazione e la successiva valutazione predittiva degli autoanticorpi anti-isola pancreatica (ICA, IAA, GADA, IA-2icA e IA-2b). Tale processo si verifica più frequentemente, ma non esclusivamente, in età giovanile. Infatti, non è raro porre la diagnosi di IDDM anche in soggetti in età adulta o senile. Tuttavia, la forma di diabete mellito tipica di queste due ultime fasce d'età è rappresentata dal NIDDM dove, nella maggior parte dei pazienti, la produzione endogena di insulina è conservata, o addirittura aumentata, e l'iperglicemia è riconducibile a difetti di interazione recettoriale a livello dei tessuti periferici. Purtroppo, è esperienza dei diabetologi che in una percentuale di pazienti con NIDDM, dopo mesi o anni di trattamento dietetico e/o con ipoglicemizzanti orali, si verifica una graduale compromissione della funzione beta cellulare e il controllo glico-metabolico può essere ripristinato solo con la somministrazione di insulina, come in corso di IDDM. È stato quindi ipotizzato che, in questi casi, il NIDDM potesse essere riconducibile a una forma di IDDM a lenta evoluzione, chiamata a volte 'latente', 'di tipo 1/2 o 'diabete autoimmune latente dell'adulto' (LADA), caratterizzata anch'essa dalla presenza dei marcatori autoanticorpali tipici dell'IDDM. Risalgono alla fine degli anni 70' le prime segnalazioni al riguardo, quando si evidenziò che alcuni pazienti con NIDDM possedevano gli ICA. La caratterizzazione di questo tipo di pazienti e, soprattutto, il tentativo di individuarli precocemente all'interno della popolazione affetta da NIDDM, diventarono così una delle nuove sfide della diabetologia dell'ultimo decennio. Uno dei dati che successivamente emerse era che, fra i pazienti con NIDDM che necessitavano di un trattamento precoce con insulina, la prevalenza degli ICA e/o degli alleli DR3 e DR4 era più elevata rispetto a quei pazienti, sempre con NIDDM, che continuavano invece un trattamento non-insulinico. Quando poi entrambi questi fenomeni erano presenti contemporaneamente nello stesso paziente, era possibile documentare una precoce compromissione della sua funzione beta cellulare pancreatica. Praticamente, per la prima volta, venivano individuati, anche in una proporzione di pazienti con NIDDM, gli stessi fattori di rischio già ampiamente documentati nell'IDDM.

La scoperta dei GADA diede un ulteriore impulso in questa direzione, in quanto si intuì che, come per gli ICA, anche questi altri marcatori dell'IDDM sarebbero sicuramente tornati utili nel predire il futuro trattamento insulinico in pazienti con NIDDM. L'intuizione non tardò ad avverarsi. I GADA furono trovati in una proporzione di pazienti con NIDDM e la loro presenza si correlava con la difficoltà di mantenere un soddisfacente controllo metabolico con la terapia convenzionale (es, dieta e farmaci ipoglicemizzanti orali). Si arrivò così alla conclusione che la determinazione dei soli GADA avrebbe presto rimpiazzato il più indaginoso dosaggio degli ICA, al fine di individuare i pazienti con LADA. Tuttavia, l'impressione fu che questa conclusione fosse un po' affrettata e non del tutto confortata da dati definitivi, soprattutto se si teneva conto che i vari studi, in cui erano stati dosati solo i GADA in

pazienti con NIDDM, erano stati condotti su casistiche numericamente piccole, molto raramente i dosaggi autoanticorpali erano stati condotti in cieco e, nella maggior parte dei casi, i pazienti venivano selezionati con uno stato metabolico ormai scompensato, e quest'ultimo criterio di scelta chiaramente introduceva un bias confondente. Per arrivare a conclusioni valide, capaci cioè di indicare alla comunità diabetologica quale dei due dosaggi, i GADA o gli ICA, fosse il più idoneo nel predire la futura insulino-dipendenza nel NIDDM, si avvertì la necessità di avere a disposizione dati che emergessero da uno studio prospettico di grosse dimensioni, che escludesse il più possibile i vari bias confondenti, di cui certamente peccavano gli studi precedenti.

L'UK Prospective Diabetes Study' (UKPDS), iniziato da Robert Turner ad Oxford una decina di anni fa, offriva le migliori garanzie per risolvere il dilemma, (oserei dire, shecksperiano, "ICA o non ICA", 'GADA o non GADA'), di quale fosse il test di elezione per l'identificazione dei LADA nel NIDDM. L'UKPDS seguiva un protocollo che prevedeva di reclutare tutti i pazienti al momento della diagnosi di NIDDM, di classificarli da un punto di vista clinico, di monitorarli ad intervalli regolari per i classici parametri ematochimici, metabolici e di funzionalità beta cellulare, e di valutare a distanza di 6 anni l'effetto della terapia convenzionale (dieta e farmaci antidiabetici orali), rispetto alla necessità di introdurre la terapia insulinica per mantenere un controllo metabolico il più possibile ottimale. Un materiale così ben catalogato offriva quindi la possibilità non solo di quantificare la presenza degli ICA e/o dei GADA, ma soprattutto il loro valore predittivo, calcolato sia singolarmente che in combinazione.

I sieri di 3.672 pazienti con NIDDM neodiagnosticato, di età compresa fra 25 e 65 anni, furono analizzati per la presenza di ICA e GADA. La determinazione degli ICA fu eseguita nel nostro laboratorio di Londra, mentre quella dei GADA fu eseguita a Melbourne, nel laboratorio di Paul Zimmet. Entrambi i laboratori eseguirono le determinazioni dei due autoanticorpi in cieco. I risultati ottenuti mostrarono che circa il 16% dell'intera coorte possedeva almeno uno dei due autoanticorpi. La presenza di entrambi gli autoanticorpi si associava a un body mass index (BMI) più basso, ad un'iperglicemia più severa e ad una compromissione della funzione beta cellulare più marcata, soprattutto nei soggetti in età avanzata. Anche la prevalenza dei due autoanticorpi non è risultata uniforme nelle differenti fasce d'età, ma si è registrata una frequenza più elevata nei pazienti di età inferiore a 35 anni (35%) e una più bassa in quelli con più di 55 anni (9%), mentre entrambi gli autoanticorpi erano presenti rispettivamente nel 20% e nel 2% dei pazienti appartenenti alle due differenti fasce d'età. Va tuttavia sottolineato che, in numero assoluto, la maggior parte dei casi con una positività autoanticorpale era nel gruppo di età più avanzata.

Anche il valore predittivo dei due autoanticorpi nel determinare il rischio di un precoce trattamento insulinico, calcolato sia sulla presenza del singolo autoanticorpo che sulla loro combinazione, è risultato dipendente dall'età dei pazienti.

Nei pazienti d'età inferiore ai 45 anni, gli ICA o i GADA erano individualmente dei marcatori affidabili per predire il futuro trattamento insulinico e la loro associazione aumentava di poco il loro potere predittivo. Nei pazienti in età superiore ai 45 anni, la migliore predittività dell'insuccesso della terapia convenzionale era dato dalla presenza di ICA e GADA simultaneamente presenti nello stesso paziente, ma diminuiva invece di molto quando questa fosse stata calcolata in base alla presenza di uno solo dei due autoanticorpi.

In conclusione, l'UKPDS ha dato valide indicazioni riguardo alla modalità di screening che dovrebbe essere applicata ai pazienti con NIDDM alla diagnosi, al fine di individuare con anticipo i potenziali pazienti con IDDM latente. Se da una parte lo studio ha confermato il ruolo predittivo degli ICA e dei GADA sul futuro trattamento insulinico nell'IDDM, dall'altra ha evidenziato che la determinazione di più specificità autoanticorpali rappresenta la strategia più sicura ed efficace per cogliere questo obiettivo, soprattutto nei pazienti in età più avanzata.

Lo studio deve ora essere completato, allargandolo al dosaggio degli altri autoanticorpi anti-isola pancreatica (IAA, IA-2icA, Ia-2βA), alla tipizzazione HLA e alla misurazione di altri autoanticorpi organo-specifici. In questo modo, si potranno ottenere ulteriori utili informazioni circa la storia naturale dell'IDDM latente nell'ambito del NIDDM e della sua possibile relazione con la poliendocrinopatia autoimmune, e disegnare così nuovi modelli di predizione e prevenzione sempre più attendibili ed efficaci, come nel caso dell'IDDM in età giovanile.

Ringraziamenti

Sin dal suo inizio, il progetto 'IDDM-Sardegna' ha usufruito del generoso supporto della 'Autoimmune Diseases Charitable Trust' (ADCT), della 'Associazione Sarda per lo Studio e la Ricerca dell'IDDM in Sardegna' (ASRIS), del Ministero della Sanità Italiano, dell'Istituto Superiore di Sanità e della British Diabetic Association.

Si ringraziano anche le seguenti Istituzioni per il loro altrettanto generoso supporto allo stesso progetto:

Bayer Diagnostic-Italia (Milano), Glaxo Wellcome (Londra), Laboratori Guidotti (Pisa), Lifescan-Italia (Milano), Novo-Nordisk (Copenhagen), Banco di Roma (Filiale di Londra).

Lo studio immunologico nell'ambito del 'UKPDS' è stato supportato dalla Wellcome Trust (Londra).