

STIFF-MAN SYNDROME E DIABETE MELLITO DI TIPO I: UNA COMUNE PATOGENESI AUTOIMMUNE ? *

M. SOLIMENA (a) e F. FOLLI (b)

(a) Consiglio Nazionale delle Ricerche, Centro Infrastrutture Cellulari, Dipartimento di Farmacologia Medica, Università degli Studi, Milano

(b) VII Clinica Medica, Università degli Studi, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

Riassunto. - *La stiff-man syndrome (SMS) è una rara malattia del sistema nervoso centrale (SNC) ad eziologia sconosciuta, per la quale evidenze clinico-farmacologiche suggeriscono una specifica alterazione di sistemi inibitori neuronali GABAergici. Abbiamo studiato un caso di SMS associato ad epilessia e diabete mellito di tipo I. Mediante tecniche immunoistochimiche ed elettroforetiche abbiamo dimostrato la presenza, sia nel siero che nel liquido cefalo-rachidiano, di un elevato titolo di IgG dirette contro l'acido glutammico decarbossilasi (GAD). La GAD è l'enzima limitante nella sintesi del GABA nel SNC. GAD e GABA sono presenti in alte concentrazioni anche nelle β -cellule del pancreas. Questa è la prima dimostrazione diretta di un possibile coinvolgimento del sistema GABAergico nella patogenesi della SMS.*

Summary (Stiff-man syndrome and type I diabetes mellitus: a common autoimmune pathogenesis?). - *Stiff-man syndrome (SMS) is a rare disorder of the central nervous system of unknown etiology, in which clinico-pharmacological evidence suggests an impairment of inhibitory GABAergic pathways. We have studied a case of SMS associated with epilepsy and type I diabetes mellitus. Using light microscopy immunohistochemistry and western blot analysis, we have shown the presence both in serum and cerebrospinal fluid of a high level of IgGs directed against glutammic acid decarboxylase (GAD). GAD is the rate limiting enzyme in the biosynthesis of GABA in the CNS. GAD and GABA are also present in the β -cells of pancreatic islets. This is the first direct demonstration of a possible involvement of the GABAergic system in the pathogenesis of SMS.*

Introduzione

La stiff-man syndrome (SMS) è una rara malattia del sistema nervoso centrale (SNC) ad eziopatogenesi sconosciuta. Clinicamente è caratterizzata dalla presenza di

rigidità muscolare e spasmi dolorosi a riposo, conseguenti alla simultanea attivazione di muscoli agonisti ed antagonisti [1, 2]. Evidenze clinico-farmacologiche suggeriscono che all'origine della malattia possa esservi una alterata funzionalità dei sistemi inibitori GABAergici spinali o sovra-spinali che controllano l'attività dei motoneuroni [3].

Questo studio riporta il caso di una paziente di 49 anni che, tre anni dopo la comparsa della SMS associata ad epilessia, aveva sviluppato un diabete mellito autoimmune insulino-dipendente. La presenza di autoanticorpi rivolti verso diversi organi endocrini nel siero della paziente e del fenotipo HLA DR3/4 [4], altamente predisponente per malattie autoimmuni, ci avevano indotto ad ipotizzare che anche la malattia neurologica potesse avere una patogenesi autoimmune.

Materiali, metodi e risultati

Gli studi sul liquido cefalo-rachidiano della paziente evidenziavano la presenza di un elevato livello di IgG ed un indice di Link patologico (1,2, valori normali (v.n.) < 0,7). L'isoelettrofocusing delle proteine del liquido cefalo-rachidiano, eseguito secondo la metodica di Metha *et al.* [5] dimostrava la presenza di bande oligoclonali (dato non mostrato). L'indice di Link patologico e le bande oligoclonali indicavano un'attiva sintesi intratecale di IgG.

Per verificare la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni del SNC, sia il siero che il liquido cefalo-rachidiano della paziente erano utilizzati come fonti di anticorpi in esperimenti di immunoistochimica indiretta su tessuto cerebrale di ratto come precedentemente descritto [6]. Entrambi producevano una immunocolorazione identica, intensa e specifica in tutte le regioni della sostanza grigia di cervello di ratto esaminate. Il quadro di marcatura era prevalentemente costituito da punti intensamente immunoreattivi, spesso disposti a delineare il profilo di corpi cellulari e dendriti. Questa distribuzione suggeriva una predominante localizzazione della immunoreattività

* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

in una sottopopolazione maggioritaria di sinapsi. Bassi livelli d'immunoreattività erano inoltre osservabili in alcuni corpi cellulari neuronali e in una sottopopolazione di assoni in alcuni tratti della sostanza bianca. La Fig. 1 mostra due sezioni sagittali di corteccia cerebellare di ratto immunocolorate con il liquido cefalo-rachidiano (a) ed il siero (b).

La distribuzione della immunoreattività in sezioni di corteccia cerebrale umana appariva analoga a quella precedentemente descritta nei tessuti di ratto [6].

Gli esperimenti di controllo venivano eseguiti utilizzando numerosi sieri di soggetti sani, di pazienti affetti da diabete insulino-dipendente (positivi o negativi per la presenza di autoanticorpi contro le isole pancreatiche), e di pazienti affetti da epilessia in trattamento cronico con barbiturici o benzodiazepine. Nessuno dei sieri utilizzati riproduceva il quadro descritto in precedenza, anche quando utilizzato a concentrazioni 10 volte superiori rispetto al siero della paziente.

La distribuzione della immunoreattività ottenuta con il siero ed il liquido cefalo-rachidiano della paziente nelle diverse regioni cerebrali esaminate era compatibile con il riconoscimento esclusivo di sinapsi GABAergiche. In

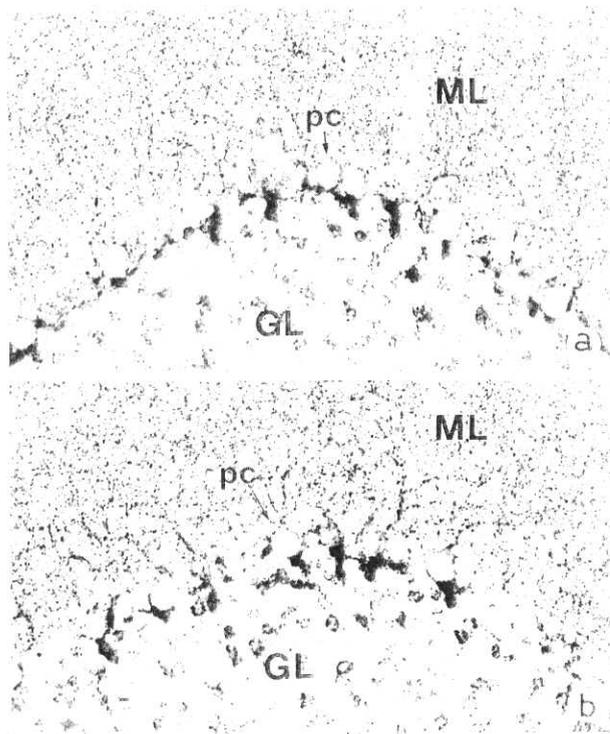


Fig. 1. - Sezioni sagittali di corteccia cerebellare di ratto colorate mediante la tecnica dell'immunoperoxidasi indiretta. Fonti primarie di IgG erano: in a) il liquido cefalo-rachidiano diluito 1:10; in b) il siero della paziente diluito 1:150. La immunoreattività appare in nero. La distribuzione della marcatura è uguale nei due casi. Nello strato molecolare (ML) la immunoreattività è distribuita in modo discreto sotto forma di punti compatibili con strutture sinaptiche. L'immunocolorazione alla base delle cellule di Purkinje (pc) identifica le terminazioni GABAergiche delle cellule a canestro. Nello strato dei granuli (GL) sono visibili le sinapsi GABAergiche intorno alle varicosità delle fibre muscolari. Nelle cellule non neuronali non è apprezzabile alcuna immunoreattività.

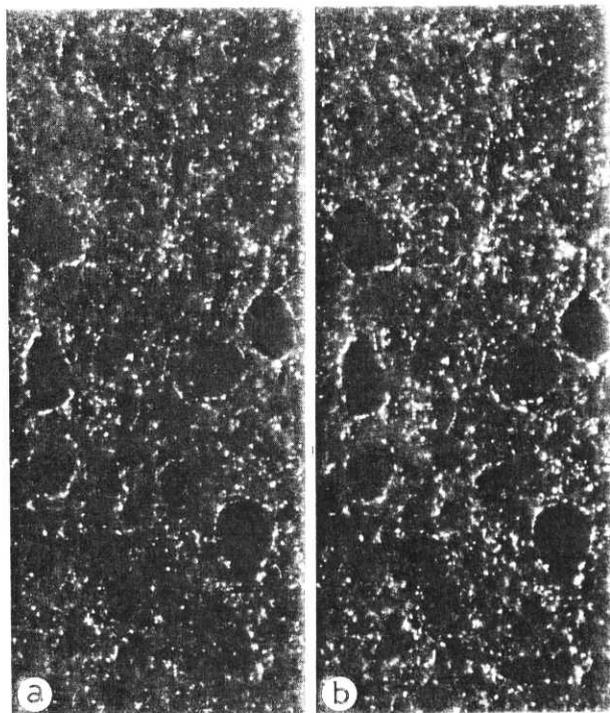


Fig. 2. - Sezione coronale di corteccia cerebrale di ratto, strato V. Doppia immunofluorescenza indiretta utilizzando: in a) il siero della paziente (immunorodamina) diluito 1:20 ed in b) il siero anti-GAD (immunofluoresceina) diluito 1:100 quali sieri primari. Anche in questo caso la distribuzione della immunoreattività appare identica. In particolare è visibile il profilo di alcuni neuroni sottolineato da terminali nervosi immunofluorescenti.

esperimenti di doppia immunofluorescenza su tessuto di ratto ed umano, la marcatura prodotta dal siero e dal liquido cefalo-rachidiano della paziente risultava sovrapponibile a quella ottenuta utilizzando un antisiero di pecora diretto contro la glutammicodecarbossilasi (GAD). Un esempio è mostrato nella Fig. 2. La GAD è l'enzima limitante per la biosintesi del GABA ed è concentrata nei terminali nervosi GABAergici [7]. Gli anticorpi anti-GAD sono utilizzati quali *marker* delle sinapsi GABAergiche.

L'identità d'immunocolorazione era osservata anche nelle doppie marcature condotte su colture cerebellari primarie di topo ottenute secondo la metodica descritta da Weber e Schachner [8] (dato non mostrato).

Al di fuori del SNC, la GAD è presente in diversi tessuti. In particolare, le β -cellule delle isole pancreatiche contengono elevate concentrazioni di GAD e di GABA [9]. In esperimenti di doppia immunofluorescenza su tessuto pancreatico la colorazione prodotta dagli autoanticorpi della paziente risultava identica a quella ottenuta con il siero anti-GAD. Per determinare l'esatta natura della/e proteine riconosciute dagli autoanticorpi della paziente veniva utilizzata la tecnica dell' *immunoblot* [10]. In breve, partendo da omogenati totali di corteccia cerebrale di ratto ed umana le proteine erano dapprima separate mediante SDS-gel elettroforesi e trasferite poi su carta di nitrocellulosa. Le proteine trasferite erano quindi incubate con i diversi sieri e con il liquido cefalo-rachidiano della

paziente e finalmente il legame tra antigene ed anticorpo era evidenziato mediante l'uso di I¹²⁵-proteina A, che possiede un'elevata affinità per la porzione Fc delle IgG.

Sia il liquido cefalo-rachidiano che il siero della paziente contenevano autoanticorpi diretti contro una proteina con peso molecolare di circa 60.000 Da, con mobilità elettroforetica corrispondente alla banda evidenziata dal siero anti-GAD.

Discussione

L'identificazione della GAD quale bersaglio principale degli autoanticorpi della paziente è molto stimolante, dal momento che la maggior parte degli autori concorda sul coinvolgimento di sistemi neuronali GABAergici nella patogenesi della SMS [3]. Infatti le benzodiazepine, che costituiscono il trattamento di prima scelta nella SMS [3], agiscono principalmente potenziando la trasmissione dei neuroni GABAergici [11].

La SMS è associata ad epilessia in circa il 10% dei casi [12]. Una alterata funzionalità del sistema GABAergico è stata proposta anche in alcune forme d'epilessia [13], da cui la nostra stessa paziente era affetta.

È interessante la comparsa nel presente caso, tre anni dopo l'insorgenza della patologia neurologica, di diabete di tipo I. Altri casi di associazione tra SMS e diabete mellito sono stati riportati [1, 2]. I neuroni e le cellule endocrine condividono numerose proprietà biochimico-funzionali [14]. In particolare le cellule β -insulari del pancreas contengono elevate concentrazioni di GAD e di GABA.

I dati illustrati in questo lavoro dimostrano che il processo autoimmune descritto potrebbe essere all'origine della malattia neurologica. Sebbene gli autoanticorpi contro la GAD non possano ritenersi primariamente patogenetici, in quanto la GAD ha localizzazione intracellulare, i nostri dati avvalorano l'ipotesi che all'origine della SMS vi sia un deficit del sistema GABAergico e suggeriscono, almeno in questo caso, una possibile comune patogenesi autoimmune di una sindrome che coinvolge due differenti popolazioni cellulari, neuroni GABAergici e β -cellule del pancreas, entrambe in grado di sintetizzare GABA.

Ringraziamenti

Il siero anti-GAD ci è stato gentilmente fornito dal Dr. E. Mugnaini (Storrs, CT, USA). Ringraziamo inoltre il Dr. C. Giorgi (Istituto Neurologico Besta, Milano), i Dr. M. Marinelli e A. Carenini (Istituto Scientifico S. Raffaele), il Dr. R. Canger (Ospedale S. Paolo, Milano) e P. Tinelli (presso il nostro Dipartimento) per la loro gentile collaborazione. Ringraziamo infine il Prof. Clementi per la discussione critica del manoscritto ed il Prof. Lanzavecchia nel cui laboratorio sono stati condotti gli esperimenti sulle colture cellulari.

M. Solimena, e F. Folli usufruiscono di una borsa di studio rispettivamente della "Fondazione E. Trabucchi" e dell'Istituto Scientifico S. Raffaele.

Questo progetto è stato condotto in collaborazione con A. Vicari, S. Denis-Donini, G.C. Comi, G. Pozza e P. De Camilli.

Ricevuto il 27 febbraio 1988.

Accettato il 7 aprile 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. MOERSCH, F.P. & WOLTMAN, H.W. 1956. Progressive fluctuating muscular rigidity and spasm (stiff-man syndrome): report of a case and some observations in 13 other cases. *Mayo Clin. Proc.* **31**: 421-427.
2. GORDON, E.E., JANUSZKO, D.M. & KAUFMAN, L. 1966. A critical survey of stiff-man syndrome. *Am. J. Med.* **42**: 582-599.
3. BOIARDI, A., CRENNNA, P., BUSSONE, G., NEGRI, S. & MERATI, B. 1980. Neurological and pharmacological evaluation of a case of stiff-man syndrome. *J. Neurol.* **223**: 127-133.
4. BOSI, E., VICARI, A., COMI, G.C., COMOLA, M., CANAL, N., POZZA, G. & BOTTAZZO, G.F. 1988. Association of stiff-man syndrome and type I diabetes with islet cells and other autoantibodies. *Arch. Neurol.* **45**: 246-247.
5. METHA, P.D. & PATRICK, A.B. 1983. Detection of oligoclonal bands in unconcentrated CSF: isoelectric focusing and silver staining. *Neurology* **33**: 1365-1368.
6. DE CAMILLI, P., MILLER, P.E., LEVITT, P., WALTER, U. & GREENGARD, P. 1984. Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neuroscience* **11**: 761-817.
7. MUGNAINI, E. & OERTEL, W.H. 1985. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. GABA and neuropeptides in the CNS*. Part I. A. Bjorklund & T. Hokfelt (Eds). Elsevier, Amsterdam. Vol. 4. pp. 436-608.
8. WEBER, A. & SCHACHNER, M. 1984. Maintenance of immunocytoologically identified Purkinje cells from mouse cerebellum in monolayer culture. *Brain Res.* **311**: 119-130.
9. VINCENT, S.R., HOKFELT, T., WU, J.Y., ELDE, R.P., MORGAN, L.M. & KIMMEL, J.R. 1983. Immunohistochemical studies of the GABA system in the pancreas. *Neuroendocrinology* **36**: 197-204.
10. BURNETTE, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.

11. HAEFELY, W., KYBURZ, E., GEREKCE, M. & MOHLER, H. 1985. Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure-activity relationship of their agonist and antagonist. In: *Advances in drug research*. B. Testa. (Ed.). Academic Press, London. Vol. 14. pp. 165-322.
12. MARTINELLI, P., PAZZAGLIA, P., MONTAGNA, P., COCCAGNA, G., RIZZUTO, N., SIMONATI, S. & LUGARES, E. 1978. Stiff-man syndrome associated with nocturnal myoclonus and epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **41**: 458-462.
13. RIBAK, C. 1985. Axon terminals of GABAergic chandelier cells are lost at epileptic foci. *Brain Res.* **326**: 251-260.
14. DE CAMILLI, P. & NAVONE, F. 1987. Regulated secretory pathways in neurons and relation to the regulated secretory pathway of endocrine cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **43**: 461-479.