

Rassegna

Alterazioni funzionali e di massa delle beta-cellule nel diabete di tipo 2

P. Marchetti, R. Mancarella, V. D'Aleo

Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Sezione Metabolismo, Università di Pisa, Pisa

Corrispondenza: prof. Piero Marchetti, Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Sezione Metabolismo, Ospedale Cisanello, via Paradisa 2, 56124 Pisa
e-mail: marchant@immr.med.unipi.it

G It Diabetol Metab 2008;28:19-25

Pervenuto in Redazione il 15-10-2007

Accettato per la pubblicazione il 21-01-2008

Parole chiave: diabete tipo 2, beta-cellule, apoptosi, metformina, incretine

Key words: type 2 diabetes, beta-cells, apoptosis, metformin, incretins

RIASSUNTO

Il diabete mellito di tipo 2 rappresenta la forma più frequente di diabete nell'uomo ed è caratterizzato da difetti della beta-cellula associati a ridotta sensibilità dei tessuti periferici all'azione dell'insulina. Le beta-cellule mostrano, nel diabete di tipo 2, una significativa riduzione di numero e volume, alterazione questa dovuta ad aumentata morte per fenomeni apoptotici, non compensata da adeguata rigenerazione. Sono inoltre presenti deficit quantitativi e qualitativi della secrezione insulinica. A tutto ciò contribuiscono fattori genetici e acquisiti. Numerosi polimorfismi di geni in grado di influenzare la sopravvivenza e la funzione della beta-cellula sono stati descritti recentemente, ed è questo un settore in evoluzione continua. Tra i fattori acquisiti, assumono particolare importanza la glucotossicità e la lipotossicità, vale a dire i danni indotti dalla prolungata esposizione delle beta-cellule a elevate concentrazioni, rispettivamente, di glucosio o acidi grassi. Di interesse e incoraggianti appaiono alcuni dati che dimostrano come la sofferenza della beta-cellula nel diabete di tipo 2 possa essere direttamente prevenuta o fatta regredire da adeguati trattamenti farmacologici.

SUMMARY

Beta-cell defects in human type 2 diabetes

Type 2 diabetes, the most common form of diabetes in humans, results from a combination of genetic and acquired factors that impair beta-cell function and tissue insulin sensitivity. However, growing evidence is showing that the beta-cell is central to the development and progression of this form of diabetes. Reduced islet and/or insulin-containing cell mass or volume in type 2 diabetes has been reported by several authors. Furthermore, studies with isolated type 2 diabetic islets have directly shown both quantitative and qualitative defects of glucose-stimulated insulin secretion. The impact of genotype in affecting beta-cell function and survival is a very fast growing field or research, and several gene polymorphisms have been associated with this form of diabetes. Among acquired factors, glucotoxicity (the damage induced by prolonged exposure to increased glucose levels) and lipotoxicity (the damage due to increased free fatty acid concen-

trations) are likely to play an important role. Interestingly, pharmacological intervention can improve several defects of type 2 diabetes islet cells in vitro, suggesting that prevention or reversal of the disease might be possible.

Introduzione

La forma più comune di diabete mellito è il diabete di tipo 2, caratterizzato dalla presenza di ridotta sensibilità all'insulina (insulino-resistenza) da parte dei tessuti periferici e insufficiente secrezione insulinica a livello delle beta-cellule pancreatiche¹⁻⁴. Nella storia naturale del diabete di tipo 2 è l'insulino-resistenza a comparire per prima, il che impone un lavoro aggiuntivo alle beta-cellule per compensare la ridotta efficacia dell'insulina prodotta⁴⁻⁸. Quando poi le cellule beta non riescono più a far fronte alle aumentate necessità, la produzione di insulina diminuisce e il diabete si evidenzia clinicamente, progredendo negli anni a seguire⁴⁻⁸. Nel presente articolo discuteremo gli aspetti principali riguardanti le alterazioni delle beta-cellule nel diabete di tipo 2, e mostriamo come almeno una parte di tali alterazioni possa essere considerata reversibile.

Le beta-cellule pancreatiche

Le beta-cellule sono le cellule endocrine maggiormente rappresentate nelle isole pancreatiche (Tab. 1). A loro volta, le isole sono strutture rotondeggianti od ovali, il cui pur ragguardevole numero (in una persona di circa 70 kg ci possono essere da 300.000 a 1.500.000 isole) rappresenta non più dell'1-2% del volume totale del pancreas. Le dimensioni delle isole pancreatiche vanno da pochi micrometri a 200-300 μm di diametro, ed è stato calcolato che in una isola di medie dimensioni (150 μm di diametro) sono presenti circa 1000-1500 cellule beta, ciascuna delle quali contiene circa 10.000 granuli di insulina.

La normale funzione beta-cellulare dipende essenzialmente dall'integrità dei meccanismi che regolano la sintesi e il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule beta. Il regolatore più importante della secrezione insulinica è il glucosio, anche se numerosi altri nutrienti, così come vari ormoni, neurotrasmettitori e farmaci possono influenzare il rilascio dell'ormone^{9,10}. Classicamente, si ritie-

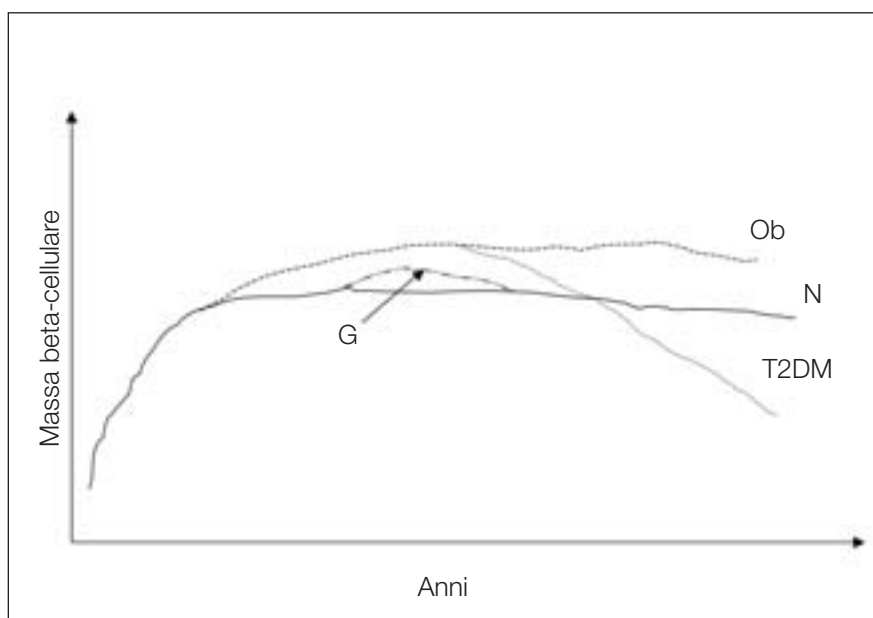
ne che il glucosio, dopo essere entrato nella beta-cellula a opera di specifici gluco-trasportatori (in particolare il GLUT2 e, nell'uomo, anche il GLUT1), venga fosforilato dall'enzima glucochinasi e quindi avviato lungo la cascata glicolitica. Il piruvato che ne deriva entra nel mitocondrio e, attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici e i successivi eventi a livello della catena respiratoria mitocondriale, si arriva alla produzione di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP induce la chiusura, a livello della membrana cellulare, dei canali del potassio ATP-dipendenti, cui conseguono depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, ingresso nella cellula di ioni calcio. Quest'ultimo evento determina, infine, attraverso meccanismi complessi e non ancora del tutto identificati, l'esocitosi dei granuli di insulina. Peraltro, il metabolismo del glucosio determina anche, a livello mitocondriale, la produzione di altri metaboliti che, attraverso meccanismi ancora poco noti, contribuiscono all'esocitosi dei granuli di insulina. Da sottolineare infine che, nel percorso che porta al rilascio di insulina, alcuni secretagoghi agiscono distalmente. Le sulfaniluree, per esempio, legandosi a recettori specifici che si trovano sui canali del potassio ATP-dipendenti, determinano direttamente la chiusura di tali canali¹¹. L'aminoacido arginina, dal canto suo, entrando nella beta-cellula causa, per la presenza di cariche negative nella sua struttura, depolarizzazione della membrana cellulare e conseguente apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti¹². Dal punto di vista dinamico, poi, il rilascio di insulina da parte della beta-cellula in risposta al glucosio riconosce principalmente una prima fase, rapida, della durata di pochi minuti, e una seconda fase, più prolungata^{9,10}. Inoltre, la secrezione è pulsatile, con onde oscillatorie della durata di 8-10 minuti e ampiezza modulabile^{9,10}.

Per quanto riguarda la massa beta-cellulare, i principali meccanismi che la regolano sono l'apoptosi (una particolare forma di morte cellulare programmata), le dimensioni delle singole beta-cellule, la replicazione (cioè la mitosi di cellule beta preesistenti) e la neogenesi (cioè la formazione di nuove beta-cellule da precursori)^{13,14}. Quanto a lungo sopravviva una beta-cellula nell'uomo non è noto, ma si ritiene che la "spettanza di vita" di una cellula beta normale possa essere di vari anni. Peraltro, è noto che la massa beta-cellulare ha una sua plasticità (Fig. 1). Nei primi anni di vita, essa aumenta notevolmente, grazie a marcati fenomeni replicativi e di neogenesi¹³. Successivamente, si raggiunge una sorta di equilibrio che viene poi mantenuto, di solito, durante la vita adulta. Con l'avanzare dell'età, i fenomeni apoptotici tendono a prevalere su quelli rigenerativi e la massa cellulare si riduce leggermente. La plasticità delle beta-cellule può essere apprezzata in alcune situazioni fisiologiche o patologiche. Durante la gravidanza, per esempio, la massa beta-cellulare quasi raddoppia, per far fronte alle esigenze metaboliche e ormonali. Ciò è sostanzialmente dovuto a fenomeni replicativi, mediati dalla prolattina e dal lattogeno placentare. Dopo il parto, il tasso di replicazione diminuisce, mentre aumenta quello dell'apoptosi, così da raggiungere di nuovo l'equilibrio^{13,14}. In caso di sovrappeso/obesità, l'insulino-resistenza che ne deriva viene com-

Tabella 1 Principali cellule endocrine pancreatiche.

Tipo	Percentuale relativa	Ormone prodotto
Cellule alfa	20-30%	Glucagone
Cellule beta	60-70%	Insulina
Cellule delta	5-15%	Somatostatina
Cellule PP	5-10%	Polipeptide pancreatico

Figura 1 Rappresentazione esemplificativa dell'andamento della massa beta-cellulare in varie condizioni. N: situazione normale; Ob: obesità senza diabete; T2DM: diabete mellito di tipo 2; G: gravidanza.



pensata da un accentuato tasso di replicazione e neogenesi, e dall'aumento di dimensioni delle singole beta-cellule^{13,14}. Nei soggetti con diabete di tipo 2 la massa beta-cellulare diminuisce, apparentemente in maniera inesorabile, con il passare degli anni.

Le beta-cellule nel diabete di tipo 2

Nel diabete mellito di tipo 2 fattori genetici e acquisiti, non del tutto noti e attraverso meccanismi in buona parte ancora da chiarire, concomitano nel determinare il deficit di funzione e di massa delle beta-cellule (Tab. 2). Dal punto di vista funzionale, il comportamento della secrezione insulinica da parte della beta-cellula nel corso della storia naturale del diabete di tipo 2 è variabile, con livelli di insulinemia che, in termini assoluti, possono essere aumentati, normali o ridotti, ma che, relativamente alle concentrazioni circolanti

del glucosio, sono, per definizione, insufficienti a garantire una normale glicemia^{15,16}. Il difetto funzionale più precoce è la progressiva riduzione, fino alla scomparsa, della prima fase della secrezione insulinica cui, nel tempo, si aggiunge un deficit anche a carico della seconda fase del rilascio dell'ormone. Di rilievo è il fatto che la secrezione di insulina in risposta a stimoli diversi dal glucosio (per esempio arginina e sulfaniluree) è parzialmente conservata, sia nella quantità sia nella dinamica, anche a vari anni dalla diagnosi^{17,18}, a dimostrazione che nelle beta-cellule dei pazienti diabetici tipo 2 i granuli che contengono l'ormone ci sono ancora (almeno in parte) e sono pronti a essere rilasciati al di fuori della cellula, anche se il glucosio non riesce a far giungere il giusto segnale. Dal punto di vista dinamico, oltre alle alterazioni a carico della prima fase della secrezione insulinica, nel diabete mellito tipo 2 sono presenti difetti della normale pulsilità del rilascio dell'ormone. Studi condotti con isole purificate di soggetti non diabetici hanno dimostrato che il segnapassi capace di regolare le oscillazioni rapide dell'attività della beta cellula è intrinsecamente presente nell'isola di Langerhans, così da conferire un andamento della secrezione caratterizzato da un periodo, scarsamente o per niente influenzato da perturbazioni metaboliche o farmacologiche, di circa 10 minuti, e un'ampiezza di entità variabile, modulabile dalle concentrazioni di glucosio e dalla presenza di farmaci e ormoni¹⁹. Da questo punto di vista, alcuni dati indicano che le isole diabetiche mantengono una pulsilità del loro rilascio di insulina, mentre l'ampiezza delle oscillazioni è ridotta rispetto a quella di isole di controllo, soprattutto in risposta al glucosio²⁰. Un ulteriore aspetto relativo al deficit funzionale della beta-cellula nel diabete di tipo 2 è l'aumentato rapporto tra proinsulina e insulina. Come sappiamo, nelle cellule beta la proinsulina è efficientemente convertita a insulina e C-peptide, cosicché nel granulo maturo la quantità di proinsulina è minima. Probabilmente perché sollecitata

Tabella 2 Principali alterazioni della secrezione insulinica nel diabete mellito di tipo 2.

Alterazioni quantitative	Alterazioni qualitative
Ridotta secrezione in risposta al glucosio (alterazione precoce)	Perdita della prima fase della secrezione
Ridotta secrezione in risposta ad altri secretagoghi (alterazione più tardiva)	Perdita della normale pulsilità
	Aumentato rapporto proinsulina/insulina

in maniera anomala, la beta cellula nel diabete tipo 2 non riesce a procedere adeguatamente alla trasformazione della proinsulina, che viene rilasciata in quantità significativamente più elevata²¹.

La riduzione della massa beta-cellulare nel diabete di tipo 2 dipende sostanzialmente da una riduzione del numero totale di isole nel pancreas, da una diminuzione delle beta-cellule nelle isole e da una minore quantità di granuli di insulina per beta-cellula^{18,22-26}. In particolare, in uno studio pubblicato poco tempo fa e che poneva attenzione non solo al volume e alla massa delle beta-cellule, ma anche al tasso di apoptosi e rigenerazione, venivano esaminati i pancreas di soggetti obesi o normopeso, con o senza alterata glicemia a digiuno (IFG) o diabete di tipo 2²⁶. È stato così osservato che i soggetti con alterata glicemia a digiuno e quelli con diabete avevano una marcata riduzione (circa il 50%) del volume beta-cellulare, dovuto a un significativo aumento dell'apoptosi (3 volte più elevata nel diabete associato a obesità e 10 volte più alta nei diabetici non in sovrappeso), non compensato da meccanismi rigenerativi adeguati alle necessità.

Cause di danno beta-cellulare nel diabete di tipo 2

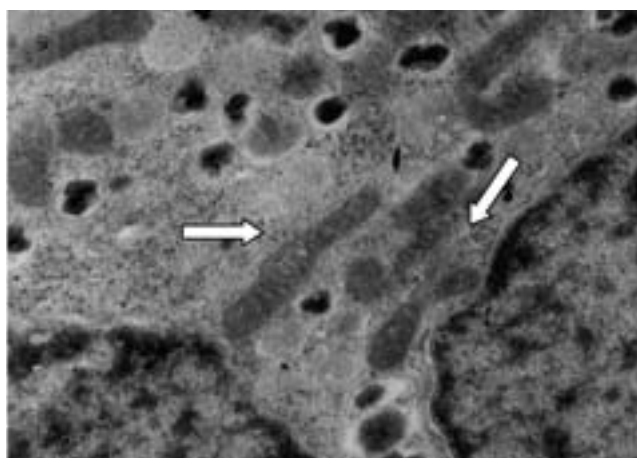
Come già accennato, nel diabete mellito di tipo 2 vari fattori genetici e acquisiti contribuiscono alla riduzione della funzione e della sopravvivenza della beta-cellula. Numerosi geni sono stati associati ad alterazioni beta-cellulari e tra questi ve ne sono che codificano per vari fattori di trascrizione, per proteine coinvolte nel metabolismo del glucosio, per molecole implicate nel segnale insulinico e vari altri²⁷⁻³⁰. Un esempio interessante dell'influenza delle caratteristiche genetiche sulla funzione e sulla sopravvivenza delle beta-cellule è dato dal polimorfismo dell'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1) noto come Arg972 (in cui l'arginina sostituisce la glicina, essendo questo l'aminoacido normalmente presente in posizione 972 di IRS-1)³¹. I soggetti portatori di questo polimorfismo hanno ridotti livelli di insulina e C-peptide e le beta-cellule con il polimorfismo hanno una quantità minore di granuli di insulina maturi, con un corrispondente aumento del numero dei granuli immaturi. Inoltre, tali beta-cellule rilasciano meno insulina e più proinsulina, rispetto ai controlli, in risposta al glucosio. Infine, il tasso di apoptosi è circa il doppio nelle isole con il polimorfismo, un effetto questo associato a una maggiore attività delle caspasi 9 e 3 (proteine esecutrici dell'apoptosi), nonché a un'alterata funzione della via del segnale insulinico che porta all'attivazione di PI3-chinasi e Akt. Più recentemente, è stato osservato che mutazioni puntiformi del gene che codifica per il fattore di trascrizione TCF7L2 si associa a una diminuzione della secrezione di insulina, proporzionale all'ammontare del gene trascritto e associata, peraltro, a un'aumentata trascrizione del gene per l'insulina³².

Tra i fattori acquisiti, certamente la glucotossicità (dovuta a

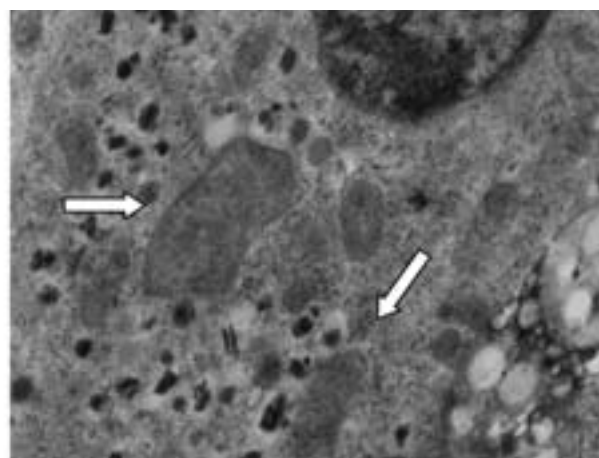
prolungata esposizione a elevate concentrazioni di glucosio) e la lipotossicità (causata da eccessivi livelli di acidi grassi) svolgono un ruolo importante nell'influenzare la sopravvivenza delle beta-cellule³³⁻³⁵. Per esempio, in uno studio dove isole pancreatiche umane sono state esposte per 5 giorni a una concentrazione di glucosio di 300 mg/dl, è stato osservato un tasso di apoptosi significativamente più elevato rispetto a quanto accadeva in presenza di glucosio 100 mg/dl³⁶. Un aumento dell'apoptosi, valutato mediante microscopia elettronica, è stato dimostrato anche allorquando l'esposizione ad alto glucosio (300 mg/dl) veniva alternata ogni 24 ore con quella a glucosio normale (100 mg/dl). In effetti, se queste condizioni sperimentali (che cercano di mimare la condizione *in vivo*, in cui non si hanno livelli di glucosio costantemente elevati) vengono mantenute per 5 giorni, l'apoptosi aumenta di varie volte rispetto a quanto misurato nelle isole di controllo³⁷. È verosimile che molti degli effetti delle elevate concentrazioni di glucosio siano mediati dalla produzione di radicali liberi dell'ossigeno, prodotti sia attraverso il metabolismo mitocondriale (in accordo con l'evidenza secondo cui i mitocondri di beta-cellule preesposte ad alto glucosio presentano evidenti alterazioni morfologiche, come riportato nella figura 2) sia attraverso altre vie, tra cui di particolare importanza sembra essere quella delle esosamine³⁶. Tutto questo porta a un aumento dello stress ossidativo, così come dimostrato in isole di Langerhans di soggetti non diabetici coltivate in presenza di alto glucosio e anche in isole ottenute da pazienti con diabete di tipo 2^{17,24,37}.

Alcuni studi condotti con isole pancreatiche umane hanno aiutato a comprendere come e attraverso quali meccanismi la lipotossicità danneggia le beta-cellule. L'esposizione delle isole umane per 48 ore a un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi (FFA) è risultata in effetti in grado di aumentare di varie volte il tasso di apoptosi beta-cellulare³⁸. Tale effetto veniva completamente prevenuto se si inibivano le caspasi (esecutrici dell'apoptosi), e parzialmente impedito se si bloccava la formazione di ceramide, un prodotto derivante dal metabolismo degli FFA. Inoltre, l'aumentata apoptosi si associava a una diminuzione dell'espressione genica di Bcl2, una molecola con proprietà antiapoptotiche. Peraltro, è stato successivamente dimostrato che i vari FFA hanno effetti diversi: sarebbero gli acidi grassi saturi a lunga catena (palmitico e stearico in particolare) a essere dannosi per le beta-cellule, mentre l'acido oleico sembrerebbe addirittura avere un effetto protettivo^{34,35}. Infine, è da sottolineare come alcuni autori ritengano che gli acidi grassi siano tossici per la beta-cellula particolarmente (o forse soltanto) quando associati ad alte concentrazioni di glucosio (condizione definita di gluco-lipotossicità)³⁴.

Un altro aspetto su cui si discute è il possibile ruolo che l'amilina (proteina co-secreta con l'insulina) può avere nel determinare il danno beta-cellulare. Alcuni autori hanno infatti evidenziato che l'aumentata attività beta-cellulare in caso di insulino-resistenza induce anche una maggiore produzione di amilina che finirebbe per formare aggregati fibrillari e infine depositi di amiloide capaci di alterare la funzione e la sopravvivenza delle beta-cellule^{39,40}.



Beta-cellula normale



Beta-cellula esposta ad alto glucosio

Figura 2 A seguito dell'esposizione a elevate concentrazioni di glucosio, i mitocondri (frecce) delle beta-cellule mostrano varie alterazioni morfologiche, tra cui rigonfiamento e minore definizione delle creste e della matrice.

Il danno beta-cellulare nel diabete di tipo 2 può essere reversibile

In questo complesso scenario, un aspetto di particolare importanza è se la beta-cellula può essere in qualche modo recuperata, dal punto di vista funzionale e di sopravvivenza. Alcuni studi sono stati in effetti eseguiti in tal senso. Quando si sono valutate le caratteristiche di secrezione e di sopravvivenza di isole pancreatiche umane esposte ad alte concentrazioni di glucosio o acidi grassi liberi, è stato dimostrato che vari composti farmacologici (tra cui metformina e rosiglitazone) possono prevenire i danni dovuti a tali alterazioni metaboliche^{41,42}. Di maggior interesse, ovviamente, sono tuttavia gli studi che hanno valutato isole di Langerhans ottenute da pazienti con diabete di tipo 2, e alcune informazioni utili sono disponibili in tal senso. Per esempio, è stato osservato che l'incubazione di isole diabetiche con antiossidanti è in grado di ridurre lo stress ossidativo che accompagna il diabete mellito di tipo 2 anche a livello beta-cellulare (Fig. 3)¹⁷. A ciò si associano un miglioramento della secrezione insulinica (Fig. 3) e un aumento dell'espressione genica di molecole fondamentali per il normale funzionamento delle beta-cellule tra cui, evidentemente, l'insulina (Fig. 3), ma anche altre proteine quali, per esempio, i trasportatori di glucosio. Tra i farmaci attualmente utilizzati nel trattamento del diabete mellito di tipo 2, la metformina si è dimostrata capace di migliorare le caratteristiche delle beta-cellule diabetiche¹⁸. In effetti, l'incubazione di isole ottenute da pazienti con diabete di tipo 2 in presenza di concentrazioni terapeutiche di tale molecola ha determinato un recupero funzionale e di sopravvivenza delle beta-cellule, associato a riduzione dello stress ossidativo e con cambiamenti positivi a livello molecolare che comprendevano aumentata espressione di insulina, gluco-trasportatori e proteine implicate nella protezione dall'apoptosi. Più recentemente,

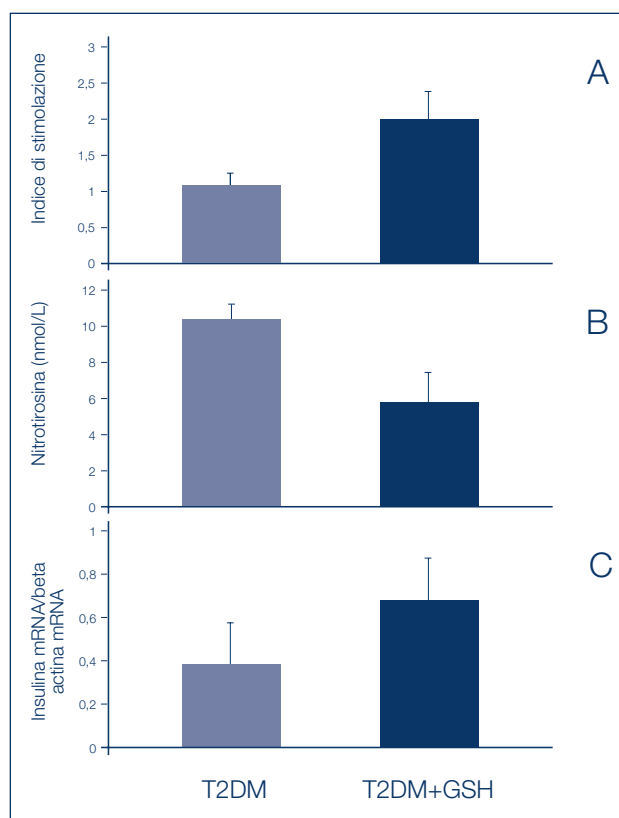


Figura 3 L'aggiunta di un antiossidante (GSH) al mezzo di coltura delle isole pancreatiche diabetiche (T2DM) determina un miglioramento della secrezione insulinica (A), una riduzione dello stress ossidativo (B) e una migliore espressione del gene per l'insulina (C) (adattata dalla voce bibliografica³⁷).

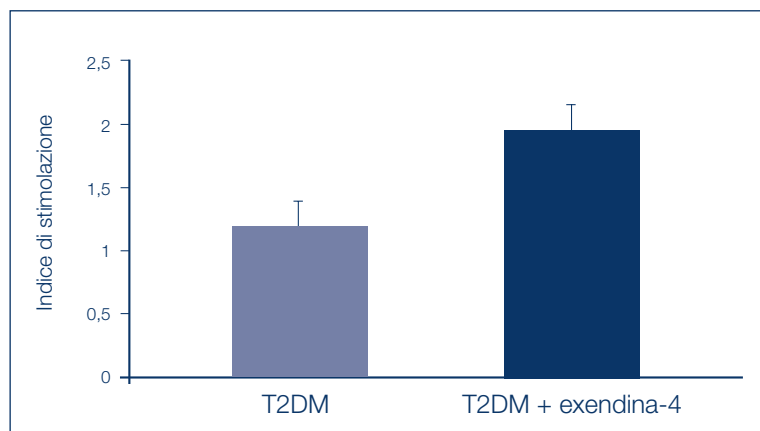


Figura 4 La preincubazione con exendina-4 migliora la secrezione insulinica da parte di isole pancreatiche diabetiche (T2DM) (adattata dalla voce bibliografica⁴⁴).

particolare attenzione è stata rivolta al ruolo delle incretine (in particolare GLP-1 e relativi analoghi) nel modulare le caratteristiche delle beta-cellule. Tali molecole, infatti, si sono dimostrate capaci, in vari modelli sperimentali, di migliorare la funzione insulinosecretoria, di proteggere dall'apoptosi, e di favorire il differenziamento beta-cellulare⁴³. È stato altresì dimostrato che isole di Langerhans preparate da pazienti diabetici ed esposte a exendina-4 (un mimetico del GLP-1) recuperano la capacità di secernere insulina in risposta al glucosio (Fig. 4) ed esprimono fattori di differenziamento e rigenerazione quali PDX-1 e proteina Ki67⁴⁴.

Conclusioni

Esiste chiara evidenza secondo cui le alterazioni delle beta-cellule nel diabete tipo 2 sono sia qualitative sia quantitative; tali alterazioni sono caratterizzate, in particolare, dalla incapacità di rispondere in maniera congrua ai secretagoghi (in particolare al glucosio), dalla perdita della normale dinamica del rilascio insulinico e dalla riduzione della massa beta-cellulare. È stato peraltro dimostrato come vari fattori, genetici e acquisiti, contribuiscano all'insorgenza e alla progressione del danno beta-cellulare. Una sempre maggiore comprensione dei meccanismi responsabili di tale danno sta contribuendo allo sviluppo di strategie di intervento capaci di prevenire e auspicabilmente far regredire le lesioni delle beta-cellule nel diabete di tipo 2.

Bibliografia

- American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 2006;29(suppl 1):S43-8.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature 2001;414:782-7.
- American Diabetes Association. *Classification of diabetes*. Diabetes 2001 Vital Statistics 5-8.
- Leahy JL. *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res 2005;36:197-209.
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. *An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment*. Regul Pept 2007;29 [Epub ahead of print].
- Bonora E. *Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible?* Nutr Metab Cardiovasc Dis 2008;18:74-83.
- Wajchenberg BL. *Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment*. Endocr Rev 2007;28:187-218.
- Kahn SE. *The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes*. Diabetologia 2003;46:3-19.
- Ferrannini E, Mari A. *Beta-cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal*. Diabetologia 2004;47:943-56.
- Malaisse WJ. *Physiology, pathology and pharmacology of insulin secretion: recent acquisitions*. Diabetes Metab 1997;23(suppl 3):6-15.
- Henquin JC. *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose*. Diabetes 2000;49:1751-60.
- Ahren B. *Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass*. Horm Metab Res 2004;36:775-81.
- Cerasi E, Neshler R, Gadot M, Gross D, Kaiser N. *Insulin secretion in obese and non obese NIDDM*. Diabetes Res Clin Pract 1995;28:S27-37.
- Rhodes CJ. *Type 2 diabetes – a matter of beta-cell life and death?* Science 2005;307:380-4.
- Halban PA. *Cellular sources of new pancreatic beta-cells and therapeutic implications for regenerative medicine*. Nat Cell Bio 2004;6:1021-5.
- Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC. *Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes*. Diabetes 2002;51(suppl 1):S109-16.
- Ferrannini E, Mari A. *Beta-cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal*. Diabetologia 2004;47:943-56.
- Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S et al. *Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes*. Diabetes 2005;54:727-35.
- Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M et al. *Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin*. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5535-41.
- Marchetti P, Scharp DW, Mclear M, Gingerich R, Finke E, Olack B et al. *Pulsatile insulin secretion from isolated human pancreatic islets*. Diabetes 1994;43:827-30.

21. Lin JM, Febregat ME, Gomis R, Bergsten P. *Pulsatile insulin release from islets isolated from three subjects with type 2 diabetes*. Diabetes 2002;51:988-93.
22. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet 2005;365:1333-46.
23. Saito K, Iwama N, Takahashi T. *Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas*. Tohoku J Exp Med 1978;124:177-86.
24. Gepts W, Lecompte PM. *The pancreatic islets in diabetes*. Am J Med 1981;70:105-15.
25. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. *Reduced beta cell mass and expression of oxidative stress related DNA damage in the islets of Japanese type 2 diabetic patients*. Diabetologia 2002;45:85-96.
26. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH et al. *Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes in Korea*. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2300-8.
27. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes 2003;52:102-10.
28. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D et al. *A genome wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature 2007;445:881-5.
29. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL et al. *A genome wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants*. Science 2007;316:1341-5.
30. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PIW, Chen H et al. *Genome wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science 2007;316:1331-6.
31. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H et al. *Replication of genome wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes*. Science 2007;316:1336-41.
32. Marchetti P, Lupi R, Federici M, Marselli L, Masini M, Boggi U et al. *Insulin secretory function is impaired in isolated human islets carrying the gly972 arg IRS-1 polymorphism*. Diabetes 2002;51:1419-24.
33. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P et al. *Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes*. J Clin Invest 2007;117:2155-63.
34. Kaise N, Leibowitz G, Nesher R. *Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus*. J Pediatr Endocrinol Metab 2003;16:5-22.
35. Poitout V, Robertson RP. *Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity*. Endocrinology 2002;143:339-42.
36. Prentki M, Nolan CJ. *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest 2006;116:1802-12.
37. Andreozzi F, D'Alessandris C, Federici M, Laratta E, Del Guerra S, Del Prato S et al. *Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of IRS-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells*. Endocrinology 2004;145:2845-57.
38. Del Guerra S, Grupillo M, Masini M, Lupi R, Bugliani M, Torri S et al. *Gliclazide protects human beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose*. Diabetes Metab Res Rev 2007;23:234-8.
39. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C et al. *Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated*. Diabetes 2002;51:1437-42.
40. Hoppener JWM, Lips CJM. *Role of amyloid in type 2 diabetes mellitus*. Intern J Biochem Cell Biol 2006;38:726-36.
41. Ritzel RA, Meier JJ, Lin CY, Veldhuis JD, Butler PC. *Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets*. Diabetes 2007;56:65-71.
42. Lupi R, Del Guerra S, Tellini C, Giannarelli R, Coppelli A, Lorenzetti M et al. *The biguanide compound metformin prevents desensitization of human pancreatic islets induced by high glucose*. Eur J Pharmacol 1999;364:205-9.
43. Lupi R, Del Guerra S, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Mosca F et al. *Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty-acids. Evidence for a role PPAR- γ 2 in the modulation of insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;286:E560-567.
44. Drucker DJ, Nauck MA. *The incretin system: glucagon like peptide 1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet 2006;368:1696-1705.
45. Lupi R, Mancarella R, Del Guerra S et al. *Effects of exendin-4 on human type 2 diabetes islets*. Diabetes Obes Metab 2008;14 [Epub ahead of print].