Imaging della massa β-cellulare: perché e come

Lorenzo Piemonti
San Raffaele Diabetes Research Institute (HSR-DRI), Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

La visualizzazione con metodiche non invasive delle isole di Langerhans e la quantificazione della massa β-cellulare pancreatica sono state considerate un campo di studio ad alta priorità da parte del *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK) e dalla *Juvenile Diabetes Research Foundation* negli USA a partire dal 1999 (*Imaging pancreatic beta cell mass, function or inflammation; Release Date: July 29, 1999 RFA: DK-99-018*). In Europa, all'interno del settimo programma quadro per la ricerca, sono attualmente attivi almeno due consorzi che hanno come scopo primario lo studio e lo sviluppo di metodiche finalizzate all'imaging della β-cellula (*BetaImage; http://www.betaimage.eu/en/betaimage-consortium.php*, coordinato dal Prof. Martin Gotthardt del Radboud University Nijmegen Medical Centre, Olanda; VIBRANT: *In Vivo Imaging of Beta-cell Receptors by Applied Nano Technology; http://www.fp7-vibrant.eu/*; coordinato dal Dott. Theo Schotten del Center for Applied Nanotechnology di Amburgo, Germania). Ad oggi, in *ClinicalsTrial.gov* sono registrati otto studi clinici nell'uomo, finalizzati alla visualizzazione della massa β-cellulare: cinque nel paziente diabetico tipo 1 e tre nel paziente trapiantato con isole pancreatiche (Tabella 1). Tutto questo testimonia il notevole interesse della comunità scientifica per lo sviluppo di strumenti che permettano la visualizzazione diretta della massa β-cellulare. La misurazione quantitativa della massa di β-cellule e la visualizzazione spaziale delle sue componenti costituiscono uno strumento potenzialmente rivoluzionario nel campo del diabete. Infatti, metodi affidabili, sensibili, specifici e non invasivi per una completa caratterizzazione strutturale e funzionale della vita delle β-cellule pancreatiche *in vivo* rafforzerebbero la nostra comprensione della patofisiologia sia del diabete tipo 1 (DMT1) sia tipo 2 (DMT2). Per esempio, anche se alcuni dei fattori di rischio per lo sviluppo del diabete mellito legati allo stile di vita sono ben noti (come l'obesità nel caso del DMT2), i meccanismi fisiopatologici molecolari precisi sottesi e la tempistica con cui conducono alla diminuzione della massa delle β-cellule devono ancora essere chiariti. Allo stesso modo, esistono ancora molte incognite per quanto riguarda l'inizio, lo sviluppo e l'andamento temporale delle alterazioni delle isole di Langerhans nel DMT1. Inoltre, il continuo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per il diabete basati sulla farmacologia (per esempio nel DMT2 agonisti del recettore per *glucagon-like peptide* (GLP)-1 e inibitori della dipeptidilpeptidasi (DPP)-4 e nel DMT1 trattamento con immunomodulatori all'esordio mediante anticorpi monoclonali anti CD3, anti CD20 o trapianto autologo di midollo) o sulla sostituzione delle cellule (trapianto d'isole e trapianto di pancreas) richiede sempre con maggior forza la rapida elaborazione di metodi per la valutazione longitudinale *in vivo* della massa β-cellulare. In termini generali gli approcci fino ad ora prodotti per la stima della massa β-cellulare possono essere classificati in due grosse categorie: metodi invasivi e metodi non invasivi (Tabella 2). All'interno dei metodi non invasivi si possono poi identificare due sottogruppi: metodi indiretti che includono i test metabolici-funzionali e metodi diretti che comprendono in senso stretto le metodiche d'imaging β-cellulare.

Metodi invasivi per la valutazione della massa β-cellulare: risultati, limiti e potenzialità

I metodi invasivi per la stima della massa β-cellulare includono le metodiche che prevedono l'analisi diretta del tessuto pancreatico - in genere mediante microscopia ottica (immunoistochimica, immunofluorescenza, microscopia a scansione laser) - e la successiva valutazione morfometrica delle β-cellule. Caratteri-stica

Tabella 1 **Studi clinici registrati in ClinicalTrials.gov finalizzati alla visualizzazione della massa β-cellulare**

Numero identificativo	Condizione di studio	Imaging	Probe	Sponsor	Stato attuale
NCT00958997	Diabete tipo 1 e soggetti sani controllo	Tomografia a emissione di positroni	^{18}F-FP-DTBZ (^{18}F-AV-133)	Yale University	Non ancora aperto al reclutamento
NCT00771576	Diabete tipo 1 e soggetti sani controllo	Tomografia a emissione di positroni	[^{11}C]DTBZ	Columbia University	Aperto al reclutamento
NCT00351650	Diabete tipo 1 e soggetti sani controllo	Tomografia a emissione di positroni	[^{11}C]DTBZ	NIDDK	Completato
NCT00280085	Diabete tipo 1 e soggetti sani controllo	Risonanza magnetica	*Magnetic resonance perfusion imaging*	Pfizer	Interrotto
NCT00633763	Diabete tipo 1 e soggetti sani controllo	Tomografia a emissione di positroni Tomografia computerizzata	^{18}F-*Fallypride*	University of California, Irvine	Completato
NCT00453817	Trapianto di isole	Risonanza magnetica	Ferucarbotran *(iron-based MRI contrast agent)*	University Hospital, Geneva	Aperto al reclutamento
NCT01050166	Trapianto di isole	Risonanza magnetica	Ferucarbotran	Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic	Aperto al reclutamento
NCT00417131	Trapianto di isole	Tomografia a emissione di positroni Risonanza magnetica	2-[^{18}F]-2-deoxy-D-glucose	Uppsala University Hospital	Aperto al reclutamento

Tabella 2 **Metodi di valutazione della massa β-cellulare**

Metodi				Tecnica	Valutazione		Tempistica	Applicabilità
					Spaziale	Quantitativa		
Invasivi				Microscopia ottica, microscopia a scansione laser, tomografia a proiezione ottica	2D/3D	Complessa ma possibile	*Cross-sectional*	Uomo e animale
Non invasivi	Indiretti	Test metabolici		OGTT, IVGTT, test arginina, clamp iperglicemico	Non possibile	Sì	Longitudinale	Uomo e animale
	Diretti	Imaging delle isole	Ottico	Microscopia a scansione laser, *extended-focus optical coherence microscopy,* imaging con bioluminescenza	3D	Sì	Longitudinale	Animale
			Nucleare	Risonanza magnetica, tomografia a emissione di positroni, tomografia a emissione di fotone singolo	Per alcune metodiche possibile	Sì	Longitudinale	Uomo e animale

essenziale di questo tipo di approccio è la necessità di avere a disposizione il tessuto pancreatico, con il conseguente limite di applicazione ai soli studi *ex vivo*. Questo implica che nell'uomo, non essendo di fatto disponibile la possibilità di studiare il tessuto ottenuto da biopsie per le oggettive difficoltà di sottoporre pazienti a procedure bioptiche multiple del pancreas, i metodi invasivi sono applicabili esclusivamente su materiale autoptico o su tessuto recuperato durante interventi di resezione del pancreas. Un secondo problema correlato alla morfometria è la necessità di un largo campionamento del tessuto per ottenere una quantificazione affidabile della massa β-cellulare, procedura che implica quindi una notevole mole di lavoro. Nonostante questi limiti, i metodi invasivi rimangono, a oggi, uno dei cardini dello studio della massa β-cellulare nell'uomo. Sono stati i primi ad essere utilizzati poiché sono largamente basati sulla microscopia ottica (1–8). Tutte le informazioni disponibili sulla dinamica di crescita e sull'entità della replicazione e apoptosi delle β-cellule nell'uomo sia in fase prenatale sia postnatale derivano, di fatto, dagli studi di valutazione mediante metodi invasivi. Grazie a questo approccio è stato possibile dimostrare, per esempio, che la riduzione della massa β-cellulare è una caratteristica fondamentale del DMT1 che mostra all'esordio una distruzione tra il 67 e il 90% della massa originale. Analogamente, anche nei pazienti con DMT2 gli studi con metodiche d'indagine invasiva hanno mostrato una riduzione, seppur più modesta (20–50%), della massa β-cellulare (9–12). Durante la fase prenatale è stato possibile dimostrare che la differenziazione delle β-cellule inizia a partire dalla 9° settimana di gestazione, che la componente β-cellulare aumenta in modo lineare fino alla nascita, che la replicazione delle β-cellule è presente ad alte frequenze in tutte le fasi di vita prenatale e che, simultaneamente, l'apoptosi delle β-cellule è in corso a livelli relativamente elevati fino alla nascita (13). Fisiologicamente, nella fase postnatale la massa β-cellulare si espande diverse volte dalla nascita all'età adulta e il tasso relativo di crescita è più elevato durante l'infanzia per poi diminuire progressivamente con l'età adulta senza una fase secondaria di crescita durante l'adolescenza. Generalmente, un alto tasso di replicazione delle β-cellule è coincidente con la grande espansione della massa β-cellulare postnatale, implicando la proliferazione e non la neogenesi come meccanismo fisiologico primario per la crescita. Coerentemente, dopo la nascita le isole pancreatiche aumentano di dimensioni piuttosto che di numero (14). Accanto alla definizione delle variazioni legate allo sviluppo, i metodi invasivi hanno permesso di evidenziare che esiste una plasticità della massa β-cellulare nell'uomo, in genere accoppiata alla richiesta funzionale. Per esempio, si è visto che l'obesità è associata a un incremento tra il 20 e il 50% della massa β-cellulare rispetto ai soggetti normopeso (10, 15). Ugualmente anche la gravidanza appare associata a un aumento della massa β-cellulare (16). Un'eccezione all'incremento della massa β-cellulare legata all'aumentata richiesta funzionale pare essere la pancreasectomia: dopo una pancreasectomia parziale del 50% (17) non si sono evidenziate espansioni della massa β-cellulare nel pancreas rimanente, dimostrando che la plasticità delle β-cellule è dipendente dallo stimolo che produce una aumentata richiesta funzionale. Infine, i metodi invasivi hanno permesso di studiare le variazioni di massa β-cellulare in presenza di patologie del pancreas esocrino. Un esempio per tutti è il caso della pancreatite cronica dove è stato possibile mettere in evidenza la presenza di una diminuzione della massa β-cellulare del 29% (18).

Accanto al calcolo della massa, i metodi invasivi hanno tentato di valutare anche i meccanismi che regolano la plasticità β-cellulare. Infatti, oltre ai parametri di morfometria delle β-cellule (densità delle isole, area e diametro delle isole, frazione di area insulino-positiva del pancreas, frazione di area insulino-positiva intraisola, diametro nucleare e cellulare delle β-cellule, ecc.), sono stati nel tempo analizzati parametri come la proliferazione, l'apoptosi e la neogenesi β-cellulare. La proliferazione è stata valutata mediante doppia colorazione in immunoistochimica con anticorpi contro insulina e anticorpo MIB1 (che riconosce la proteina Ki67) ed espressa come percentuale delle cellule insulino-positive che esprimono la proteina Ki67. L'apoptosi è stata studiata utilizzando il metodo TUNEL (*Terminal Uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) che evidenzia la frammentazione del DNA ed è espressa come percentuale delle cellule insulino-positive e TUNEL-positive. Infine, la neogenesi è stata valutata mediante immunoistochimica con anticorpi contro insulina ed espressa come percentuale delle cellule duttali che esprimono insulina.

Sulla base di queste indagini, è stato suggerito che il meccanismo principale che regola nell'uomo dopo la nascita la plasticità delle β-cellule in condizioni fisiopatologiche sia il bilancio netto tra la proliferazione e l'apoptosi. Si deve però rilevare che in termini genera-

li questo tipo di studi presenta alcuni limiti. Per quanto riguarda la valutazione della proliferazione, la proteina Ki67 è espressa in tutte le fasi del ciclo cellulare ad eccezione di G_0 e di un breve periodo di G_1, costituendo effettivamente un buon marker di proliferazione ma, anche se non è espressa durante i processi di riparazione del DNA, è tracciabile, a volte, in cellule non proliferanti associata alla sintesi di RNA ribosomiale. Per quanto concerne la valutazione dell'apoptosi, l'affidabilità della metodica TUNEL su sezioni paraffinate non è sempre ottimale. Ugualmente, l'equazione positività per insulina nella cellula duttale uguale a neogenesi β-cellulare è un assunto non ancora dimostrato. Se a questi limiti tecnici-concettuali si somma che il tessuto autoptico utilizzato in questi studi spesso non è di qualità eccellente e che per definizione permette studi esclusivamente di tipo *cross-sectional*, appare evidente che i risultati riportati vadano valutati con prudenza.

L'impressionante progresso nel campo delle tecnologie d'imaging ottico ha consentito ai metodi invasivi di visualizzazione della massa β-cellulare un notevole avanzamento qualitativo negli ultimi anni. Attraverso la microscopia laser confocale a scansione, ad esempio, è stato possibile risolvere la citoarchitettura dell'isola umana in coltura, permettendo la quantificazione della massa β-cellulare intrainsulare (19, 20). Infatti, la microscopia laser confocale a scansione è una tecnica per ottenere immagini ad alta risoluzione ottica con selettività di profondità. La caratteristica fondamentale di questa microscopia è la sua capacità di acquisire immagini *in-focus* da profondità selezionata, un processo noto come sezionamento ottico. Le immagini sono acquisite punto per punto e poi ricostruite al computer, consentendo la valutazione tridimensionale dell'isola. In questo modo è stato possibile evidenziare che, a differenza delle isole murine e contrariamente a quanto di solito riportato nei libri di testo, nelle isole umane le cellule endocrine non sembrano avere localizzazioni anatomiche preferenziali. Nelle isole umane è costante una grossa variabilità nella composizione quantitativa delle cellule endocrine: le β-cellule rappresentano dal 28 al 75% del totale (mediana 53,9%), le cellule α dal 10 al 65% del totale (mediana 34,4%) e le cellule δ produttrici di somatostatina dall'1,2 al 22% (mediana 10,4%). In genere, le β-cellule non segregano in cluster e la gran parte (71%) mostra associazioni con altre cellule endocrine, suggerendo importanti interazioni paracrine. Inoltre, nelle isole umane la maggior parte delle cellule endocrine è allineata lungo i vasi sanguigni senza alcun particolare ordine o disposizione, indicando che la microcircolazione probabilmente non determina l'ordine delle interazioni paracrine.

Un secondo esempio di nuova tecnologia applicata al campo della valutazione della massa β-cellulare è la tomografia a proiezione ottica (*optical projection tomography*) (21, 22). Questa nuova tecnica di microscopia permette l'imaging 3D dei campioni biologici e ha due importanti vantaggi rispetto alla microscopia confocale: può visualizzare campioni con dimensioni maggiori (più di 1 cm di diametro) ed è in grado di visualizzare il tessuto anche in assenza di colorazioni specifiche con sostanze fluorescenti. Questo tipo di tecnica ha recentemente consentito di visualizzare la massa β-cellulare e la relazione con l'infiltrazione linfocitaria durante lo sviluppo del DMT1 nei modelli murini (topo NOD). Tuttavia, sia la microscopia confocale sia la tomografia a proiezione ottica richiedono la fissazione del campione e *immunolabelling* e, di conseguenza, non possono essere applicate *in vivo*.

Metodi non invasivi indiretti per la valutazione della massa β-cellulare: è la funzione il corrispettivo della massa?

I metodi non invasivi indiretti per la valutazione della massa β-cellulare sono basati sull'assunto che la funzione β-cellulare sia direttamente correlata alla massa β-cellulare e che, conseguentemente, la risposta secretoria insulinica sia proporzionale al numero di β-cellule presenti nel pancreas (23). Sulla base di quest'assunto, variazioni nella capacità secretoria insulinica sarebbero il riflesso di variazioni della massa β-cellulare e quindi quantificando la capacità secretoria insulinica è possibile quantificare la massa β-cellulare. Il vantaggio principale di quest'approccio risiede nel fatto che è possibile valutare senza grandi difficoltà, in modo ripetuto nel tempo, la funzione β-cellulare sia nell'uomo sia nell'animale. Infatti, la funzione β-cellulare *in vivo* è facilmente quantificata come secrezione insulinica in risposta a stimoli "fisiologici" durante test di stimolazione. I metodi più frequentemente utilizzati sono il test orale di tolleranza al glucosio (OGTT), il test di tolleranza al glucosio per via endovenosa (IVGTT), il test di stimolazione per via endovenosa con arginina (IVAST) e il potenziamento con glucosio della secrezione d'insulina arginina-indotta (GPAIS). Ciascuno di

questi test presenta vantaggi e limiti. L'OGTT è il più facile da eseguire e tiene conto dell'effetto delle incretine endogene che aumentano la secrezione d'insulina, ma non consente la rilevazione della risposta insulinica acuta (prima fase di secrezione d'insulina). L'IVGTT è stato progettato per esaminare direttamente la prima fase di secrezione d'insulina che è la risposta β-cellulare più sensibile agli effetti negativi dell'iperglicemia. Infatti, la perdita di secrezione insulinica di prima fase è un segno distintivo principale del DMT2 e questa risposta è diminuita quando i livelli di glucosio a digiuno sono maggiori di 100 mg/dL e assente quando i livelli sono maggiori di 115 mg/dL. L'IVGTT non è in grado di analizzare gli effetti delle incretine sulla secrezione d'insulina. L'IVAST ha il vantaggio di poter esaminare la risposta insulinica di prima fase, anche quando i livelli di glucosio a digiuno sono maggiori di 115 mg/dL ma, come l'IVGTT, non è in grado di valutare gli effetti delle incretine. GPAIS è stato ideato per accertare la massima risposta insulinica acuta (AIR) all'arginina. In termini pratici, un importante vantaggio dell'IVGTT e dell'IVAST è che la prima fase di secrezione d'insulina può essere stimata entro 15 minuti, mentre l'OGTT e il GPAIS richiedono tre ore e GPAIS necessita di un'infusione endovenosa di glucosio oltre all'iniezione di arginina.

La domanda centrale che ci si pone quando si parla dei metodi non invasivi indiretti è quanto sia veramente stretta la correlazione tra i risultati dei test metabolici e la massa β-cellulare. Se consideriamo la valutazione in condizioni di normoglicemia, gli studi nell'uomo che hanno affrontato questo problema sono pochi poiché la possibilità di modificare in modo quantitativo e controllato la massa β nell'uomo è limitata ad alcuni modelli clinici. Seaquist e Robertson (24), ad esempio, hanno valutato se i test di funzionalità delle β-cellule sono influenzati dalla rimozione del 50% della massa insulare. Hanno esaminato la risposta insulinica acuta al glucosio (AIRgluc), all'arginina (AIRarg) e all'arginina potenziata dal glucosio (AIRargMax) nei donatori sani viventi di pancreas sottoposti a emipancreasectomia. I risultati hanno chiaramente dimostrato che post pancreatectomia, a dispetto di livelli d'insulinemia e glicemia basale normali, i donatori di pancreas mostrano una diminuita capacità secretoria insulinica in risposta al glucosio e all'arginina, con una riduzione della riserva β-cellulare rispetto a soggetti controllo. Il modello ha ovviamente alcuni *caveat* poiché:

1. non permette di esaminare esattamente quanta massa β-cellulare è stata realmente asportata, stimandola del 50% dall'assunto che le isole abbiano una distribuzione uniforme nel pancreas;
2. assume che nessun fenomeno compensatorio (proliferazione, neogenesi o ipertrofia) modifichi la massa β-cellulare rimanente dopo la chirurgia.

Ad ogni modo, questo risultato ha evidenziato per la prima volta che, in presenza di normoglicemia, la risposta insulinica acuta è in grado di essere modificata da variazioni della massa β-cellulare e quindi possa essere utilizzata come misura indiretta delle modificazioni di massa. Un secondo modello di grande interesse per valutare la relazione tra massa e funzione è il trapianto di isole pancreatiche. Questo modello ha il vantaggio di determinare esattamente il numero d'isole infuse permettendo una misura accurata della massa β-cellulare. Tuttavia, anche questo modello ha alcuni *caveat* poiché, per esempio, assume che tutte le isole trapiantate siano vitali e sopravvivano all'infusione intraepatica. Inoltre, questo modello è a volte ulteriormente confuso dall'uso di farmaci immunosoppressivi per proteggere il trapianto dal rigetto, farmaci che possono avere importanti conseguenze sia sulla secrezione insulinica sia sulla resistenza insulinica dei tessuti periferici. Teuscher et al. (25) hanno valutato la correlazione tra la funzione cellulare espressa come risposta insulinica acuta e la massa β-cellulare trapiantata in pazienti normoglicemici in assenza di terapia insulinica sottoposti ad autotrapianto d'isole post-pancreasectomia totale per pancreatite cronica. I risultati hanno mostrato che AIRgluc, AIRarg e AIRargMax sono molto correlati con la massa delle isole trapiantate (rispettivamente r=0,84, r=0,65, r=0,81). Più di recente, Ryan et al. (26) hanno esaminato la stessa relazione nei pazienti tipo 1 che hanno raggiunto la condizione d'insulinoindipendenza e normoglicemia dopo trapianto allogenico d'isole e in trattamento con farmaci immunosoppressivi. Anch'essi hanno osservato che AIRarg è molto correlata con la massa delle isole trapiantate (r=0,79). È questa correlazione sufficiente a giustificare l'utilizzo dei metodi non invasivi indiretti per valutare la massa β-cellulare? La risposta è probabilmente no. Infatti, i dati nel complesso indicano che, prendendo in esame la migliore performance, i valori di coefficiente di correlazione tra massa e funzione sono nell'intervallo tra 0,80 e 0,85. Ciò significa che circa il 64–72% della variabilità del rapporto può essere spiegato dalle due variabili in esame e questo lascia circa il 30% della variazione non contabilizzata. Inoltre, la dimostrazione

che la secrezione insulinica stimolo-indotta riflette la massa di β-cellule è stata evidenziata quando i livelli di glucosio sono normali. Le β-cellule esposte anche a iperglicemia cronica lieve o a richiesta funzionale esacerbata sviluppano alterazioni della secrezione insulinica associate a modificazioni dell'espressione genica e proteica. Per esempio, la risposta insulinica acuta al glucosio può essere utilizzata esclusivamente in assenza d'iperglicemia o stress funzionale a digiuno. Analogamente, condizioni come l'obesità tendono a disaccoppiare la relazione funzione-massa, come dimostrato dal fatto che la massa è aumentata del 30–50%, a fronte di una capacità secretoria insulinica aumentata del 100% (27). Ad ogni modo, con tutti i loro limiti, questi metodi rimangono al momento gli unici utilizzabili in clinica tra i metodi non invasivi.

Metodi non invasivi diretti per la valutazione della massa β-cellulare: una possibilità non ancora disponibile

I metodi non invasivi diretti per la valutazione della massa β-cellulare sono basati sulle tecnologie d'imaging ottico o nucleare (Tabella 3). Indipendentemente dai limiti e dalla potenzialità che ogni tecnica può offrire, la visualizzazione della massa β-cellulare presenta difficoltà oggettive non facili da superare. Innanzitutto, le isole sono di piccole dimensioni (tra 50 e 500 μm) e, seppur numerose (circa 1 x 10^6), sono disperse nel tessuto e non rappresentano più dell'1–2% della massa totale del pancreas. Secondariamente, il pancreas ha nell'uomo una posizione di difficile accesso per lo studio con alcune metodiche (ecografia). Infine, la differenza in termini di densità ottica e nucleare ed ecogenicità tra il tessuto endocrino e quello esocrino non permette, in assenza di mezzi di contrasto, la visualizzazione delle isole con le metodiche disponibili nell'uomo. Il risultato di tutto questo è che nessuna delle tecniche d'imaging non invasive nell'uomo è in grado in questo momento di visualizzare la singola isola o la singola β-cellula. Nonostante questo, numerosi studi sono in corso al fine di sviluppare approcci che possano essere trasferiti nella valutazione clinica della massa β-cellulare. È necessario innanzitutto distinguere due grosse categorie di metodi non invasivi diretti: quelli basati su imaging ottico e quelli basati su imaging nucleare e risonanza magnetica.

I metodi basati su imaging ottico sono molto efficienti e stanno permettendo studi affidabili della massa β-cellulare e della struttura insulare *in vivo* nei modelli preclinici, ma difficilmente possono essere trasferiti

Tabella 3 **Metodiche non invasive dirette per la valutazione della massa β-cellulare**

Tecnica	Risoluzione spaziale	Profondità	Tempo di esecuzione	Agente di contrasto	Utilizzabilità in clinica	Costo
Microscopia a scansione laser (intravitale, confocale multiphoton)	1 μm	<400 μm	s-m	Fotoproteine, fluorocromi	Sviluppo limitato	+++
Bioluminescenza	Diversi mm	cm	m	Luciferine	No	++
Tomografia a proiezione ottica	10–20 μm	10 cm	s-m	Fotoproteine, fluorocromi	Sviluppo limitato	+++
Risonanza magnetica	10–100 μm	Nessun limite	m-h	Gadolinio, nanoparticelle di ossido di ferro	Sì	+++
Tomografia computerizzata	50 μm	Nessun limite	m	Iodio	Sì	++
Ecografia	50 μm	mm	m	Microbolle	Sì	++
Tomografia a emissione di positroni	1–2 mm	Nessun limite	m	^{18}F, ^{11}C, ^{15}O	Sì	+++
Tomografia a emissione di fotone singolo	0,5–5 mm	Nessun limite	m	^{99}mTc, ^{111}In coniugati	Sì	++

nell'uomo. Ad esempio, attraverso la microscopia intravitale è stato possibile recentemente esaminare, mediante *real-time imaging in vivo*, il rapporto tra il flusso del sangue intra-insulare e le cellule delle isole nel modello murino (28). I risultati hanno rivelato due modelli predominanti di flusso sanguigno nelle isole:

1. dall'interno all'esterno, in cui il sangue perfonde il *core* dell'isola costituito dalle β-cellule prima del perimetro dell'isola formato da cellule non-β;
2. dall'alto verso il basso, in cui il sangue perfonde l'isola da un lato all'altro indipendentemente dal tipo di cellula.

Quest'approccio prevede una risoluzione temporale di un millisecondo e una risoluzione spaziale di decimali di micron, permettendo in tempo reale immagini del flusso di sangue all'interno delle isole nel topo vivente, prestazioni che non sono raggiungibili con altri metodi. L'approccio della microscopia intravitale, associato alla possibilità di costruire modellistiche d'impianto delle isole in siti di facile e ripetibile accesso consente, inoltre, studi di tipo longitudinale della funzione e struttura delle isole. In un recente lavoro (29), per esempio, le isole sono state trapiantate nell'occhio del topo. Impiantate sull'iride le isole possono essere così ripetutamente visualizzate utilizzando l'occhio come una finestra naturale. Quest'approccio minimamente invasivo permette il monitoraggio longitudinale delle singole isole, la visualizzazione della loro vascolarizzazione, la visualizzazione della funzione e della morte delle β-cellule mediante microscopia a fluorescenza a due fotoni in combinazione con fluorocromi adeguati e modelli di topi transgenici che esprimono proteina fluorescente verde sotto il promotore dell'insulina. Una delle ultime frontiere dell'imaging ottico del pancreas è costituita dall'*extended-focus optical coherence microscopy* (xfOCM) (30). xfOCM è una metodica basata sulla tomografia a coerenza ottica, una modalità emergente d'imaging biomedico che sfrutta un raggio laser infrarosso analogamente a quello che fa un sonar con i fondali e riesce a ricostruire al computer la struttura corporea in due o tre dimensioni. Utilizzando xfOCM è stato possibile recentemente eseguire il primo imaging tridimensionale *in vivo* del pancreas murino (macro e microstruttura) con un approccio che non richiede alcuna marcatura specifica (30). In questa maniera le isole possono essere studiate nel loro ambiente naturale con la loro innervazione e vascolarizzazione nativa. Infine, la bioluminescenza è un'altra tecnica d'imaging ottico utile per valutare la massa β-cellulare in modelli di roditore (19). Per eseguire l'imaging mediante bioluminescenza una luciferasi (di solito ottenuta dalle lucciole) deve essere espressa dalla cellula d'interesse, cioè la β-cellula. Alla presenza del suo substrato (luciferina, adenosina trifosfato e Mg^{++}) la luciferasi catalizza una reazione di chemiluminescenza che emette luce visibile che può essere visualizzata al di fuori del corpo dei roditori utilizzando una fotocamera specializzata. La bioluminescenza detiene il vantaggio di avere un'elevata sensibilità con relativamente poco *background* di segnale e di permettere una quantificazione relativamente facile. Diversi gruppi hanno quindi trasferito con successo il gene *reporter* luciferasi nelle isole di roditore e umane in coltura e hanno utilizzato questo modello per valutare il destino delle isole dopo trapianto sotto la capsula renale o nel fegato di topi poiché la quantità di emissione di luce dalla luciferasi è proporzionale al numero d'isole trapiantate (31). Più recentemente sono stati generati topi transgenici che esprimono luciferasi nelle isole sotto il promotore dell'insulina (32). Questi modelli permettono la valutazione e la quantificazione della massa β-cellulare nativa in condizioni normali o per esempio in condizioni fisiopatologiche come l'obesità. Sebbene la maggior parte di questi metodi avrà uno scarso impatto sulla pratica clinica e sull'imaging *in vivo* nell'uomo, sono strumenti indispensabili e complementari per la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari del diabete.

I metodi basati su imaging nucleare e risonanza magnetica sono al momento gli unici che hanno la potenzialità di essere testati nell'uomo e sono in corso alcuni studi clinici pilota.

La tomografia a emissione di positroni (PET) e la tomografia a emissione di fotone singolo (SPECT) sono le due metodiche di medicina nucleare maggiormente studiate per la visualizzazione della massa β-cellulare nell'uomo. La tomografia a emissione di positroni è una metodica molto sensibile ma, per definizione, dà informazioni di tipo fisiologico, a differenza di TAC e RMN che invece forniscono dati di tipo morfologico del distretto anatomico esaminato. La procedura consiste nell'iniezione (generalmente per via endovenosa) di un isotopo tracciante con emivita breve, legato chimicamente a una molecola attiva a livello metabolico che si concentra nel tessuto da esaminare. Di conseguenza, il primo e più stringente requisito per il successo di un imaging non invasivo con le tecniche di medicina nucleare è riuscire a sviluppare una sonda che sia specificatamente localizzabile a livello delle β-cellule, cui

associare isotopi con breve tempo di dimezzamento, come ^{11}C (~20 min), ^{13}N (~10 min), ^{15}O (~2 min) e ^{18}F (~110 min). Il candidato prescelto per la generazione di sonde β-specifiche deve soddisfare i seguenti criteri:

1. essere un marcatore espresso esclusivamente dalle β-cellule e non da altre cellule del pancreas;
2. essere espresso in una quantità sufficiente per essere disponibile per la sonda d'imaging;
3. il tessuto circostante il pancreas essere privo di questo marcatore per evitare un elevato rapporto segnale fondo dagli organi contigui nel corso d'imaging.

Si stima che, per essere efficace, il marcatore deve essere presente sulle β-cellule in concentrazione almeno 100 volte, ma idealmente 1000 volte, superiore a quella del tessuto circostante (33).

Nei modelli preclinici e clinici sono stati proposti e studiati diversi candidati. Anticorpi in grado di legarsi a molecole di superficie specificatamente espresse sulle β-cellule sono stati tra i primi candidati a essere indagati. Sono riportate in letteratura almeno tre sonde sviluppate utilizzando anticorpi:

1. [^{111}In]IC2, un anticorpo che riconosce un epitopo sulfatidico galactosio-3-sulfato presente nei granuli d'insulina con un'ottima specificità per la β-cellula;
2. [^{125}I]R2D6, un anticorpo che riconosce un ganglioside che ha però una bassa specificità per le β-cellule;
3. [^{125}I]K14D10, un anticorpo che riconosce un bersaglio non ancora identificato sulla β-cellula con una bassa specificità.

Negli esperimenti *ex vivo* [^{111}In]IC2 è stato l'unico a dimostrare una potenzialità applicativa, essendo in grado di soddisfare i criteri di affinità e specificità richiesti per l'imaging *in vivo* (34). Purtroppo, le sue grandi dimensioni e la natura xenogenica (IgM di ratto) hanno condizionato risultati deludenti nei modelli preclinici *in vivo* in cui è stato testato, principalmente legati alla scarsa *clearance* dell'anticorpo dai tessuti. Perciò la modificazione e l'ingegnerizzazione della molecola per lo sviluppo di un anticorpo chimerico, associate a studi di biodistribuzione e tossicità, saranno necessarie prima che l'eventuale applicazione clinica possa avere successo.

Una seconda strategia ipotizzata è stata quella di utilizzare sonde che entrassero nel *machinery* del metabolismo del glucosio delle β-cellule, quali D-[U-^{14}C]-glucosio e ^{18}F-fluorodeossiglucosio ([(18)F] FDG). Essendo queste sonde già disponibili per la clinica, sono state testate in studi pilota nell'uomo, dove però hanno mostrato una specificità insufficiente per la visualizzazione della massa β-cellulare nativa nel pancreas. Il loro utilizzo è stato viceversa di successo per visualizzare la massa β-cellulare dopo trapianto d'isole (35). Infatti, il trapianto d'isole nell'uomo è un modello di studio molto interessante per testare le metodiche di visualizzazione della massa β-cellulare. A differenza della valutazione della massa β-cellulare nativa pancreatica, il trapianto d'isole permette la manipolazione e l'eventuale marcatura del tessuto *ex vivo* prima dell'infusione. Recentemente (35) questa possibilità è stata applicata in cinque pazienti in cui una frazione delle isole (23%) è stata marcata con [(18)F] FDG e mescolata con le restanti isole non marcate prima del trapianto intraportale. Una tomografia a emissione di positroni combinata con la tomografia computerizzata (PET/CT) è stata eseguita per 60 minuti durante e dopo il trapianto d'isole. La concentrazione di picco di radioattività nel fegato è stata evidenziata a 19 minuti dopo l'inizio dell'infusione delle isole e corrispondeva al solo 75% del previsto, indicando che parte delle isole è persa durante la procedura di trapianto. Nessun accumulo di radioattività è stato trovato nei polmoni. La distribuzione a livello epatico della radioattività è stata eterogenea, con ampie variazioni nella posizione e nella concentrazione. Nessun effetto collaterale attribuito alla procedura PET/CT è stato evidenziato. I risultati clinici di funzione in tutti i pazienti sono stati paragonabili a quelli precedentemente osservati, suggerendo che la procedura con il [(18)F] FDG non danneggia le isole e dimostrando che quest'approccio, perlomeno nel campo del trapianto delle isole, ha il potenziale per essere utilizzato in clinica per valutare la massa β-cellulare nelle prime ore dopo l'infusione.

Una terza strategia utilizzata è stata quella di sviluppare sonde che legano recettori espressi in modo selettivo sulle β-cellule. Per il recettore per il glucosio GLUT-2 si sono utilizzati [2-^{14}C]-alloxano, D-[^{3}H] mannoeptulosio e derivati marcati della streptozotocina. Quest'approccio è stato poco percorribile fondamentalmente per due motivi: le sonde mostrano una certa tossicità β-cellulare ma, soprattutto, una bassa specificità nell'uomo. La ragione di questo risiede nel fatto che l'espressione del recettore GLUT-2 sulle β-cellule umane è molto meno rilevante e specifica che nel topo e, quindi, meno utilizzabile come target per lo sviluppo d'imaging clinico. Analogamente sono state sviluppate e testate anche sonde che riconoscono il recettore per le sulfoni-

luree SUR1: derivati della tolbutamide, derivati della glibenclamide (tra questi 2-[^{18}F]-fluoroetossi-5-bromoglibenclamide che è stato utilizzato nell'uomo con dati negativi in PET per un basso segnale rispetto al rumore di fondo) e derivati della repaglinide (tra questi [^{18}F]- e [^{11}C]-repaglinide con dati negativi negli esseri umani in PET per insufficiente specificità per le β-cellule). Al momento, un approccio molto promettente è quello di impiegare sonde che riconoscono il recettore per il GLP-1, come [Lys^{40}(DTPA)]exendin-3 e [Lys^{40}(DTPA)]exendin-4 coniugati con [Ga 68] o [^{111}In] (36, 37), strategia che ha mostrato la capacità di visualizzare i tumori endocrini insulino-secernenti (38). Tra tutti i possibili recettori, l'approccio che nei modelli preclinici ha dimostrato maggior possibilità di successo è stato quello basato sull'utilizzo di sonde in grado di legare l'isoforma due del trasportatore vescicolare della monoamina (VMAT2). VMAT2 è una proteina integrale di membrana che agisce come trasportatore di monoamine (in particolare neurotrasmettitori come la dopamina, noradrenalina, serotonina, istamina) dal citoplasma cellulare alle vescicole sinaptiche. VMAT2 è espressa nelle terminazioni nervose dopaminergiche nel sistema nervoso centrale e dalle β-cellule, ma è assente dal pancreas esocrino e da molti altri tessuti intra-addominali (39). Sviluppato per l'imaging dei disordini del sistema nervoso centrale, il tracciante [^{11}C] di-idrotetrabenazina ([^{11}C] DTBZ) si lega a VMAT2 con alta specificità ed è stato utilizzato come marcatore di massa β-cellulare. Nel modello preclinico [^{11}C] DTBZ è stato in grado di distinguere animali diabetici da controlli sani (40) ed è stato valutato con successo per stimare i cambiamenti della massa β-cellulare nel tempo (41). Nell'uomo [^{11}C] DTBZ ha purtroppo deluso molte delle aspettative. È stato infatti testato in uno studio *cross-sectional* su volontari sani e pazienti con DMT1 di lunga durata (42) mostrando che, in contrasto con i risultati degli studi nel modello di DMT1 del roditore, nel pancreas diabetico tipo 1 permane una notevole capacità di segnale che risulta diminuita del solo 14% rispetto al controllo sano, rendendo la misurazione della massa β-cellulare difficile, se non addirittura impossibile.

La risonanza magnetica possiede una risoluzione spaziale in grado teoricamente di distinguere le singole isole e la singola β-cellula ma non ha né la sensibilità innata né la specificità per identificarle, in assenza di un agente di contrasto β-specifico. Come per le metodiche PET e SPECT, molecole specifiche per le β-cellule sono state coniugate con un mezzo di contrasto (in questo caso il gadolinio) per evidenziare la massa β-cellulare (per esempio Gd-G80BP che ha come target GLUT-2). Generalmente, i risultati ottenuti non sono stati particolarmente entusiasmanti. Accanto a quest'approccio si sono sviluppate anche strategie alternative. Per esempio, sulla base del fatto che le isole sono organi molto vascolarizzati che contribuiscono in modo significativo al flusso ematico totale del pancreas, si è testata l'ipotesi che sotto stimolo iperglicemico la perfusione del pancreas, studiata mediante risonanza magnetica, fosse differente nei diabetici tipo 1 rispetto ai controlli sani. Sono stati esaminati 17 volontari sani e 7 pazienti diabetici tipo 1. Purtroppo, nessun cambiamento nella perfusione è stato notato nel pancreas dei volontari sani o dei diabetici dopo stimolazione iperglicemica. Allo stesso modo, non si è evidenziata alcuna differenza significativa del flusso di sangue tra pazienti diabetici e volontari sani (43). Un altro esempio di strategia alternativa è quello dell'utilizzo del manganese come mezzo di contrasto. Infatti, il manganese entra nelle β-cellule attraverso i canali calcio voltaggio-dipendenti ed è in grado di dare un segnale rilevabile in risonanza magnetica, per cui si è ipotizzato che potesse essere impiegato per la visualizzazione della massa β-cellulare durante stimolazione con glucosio. Quest'approccio è stato testato con successo nel modello del roditore (44), mentre al momento non è risaputo se è in grado di funzionare nell'uomo.

La risonanza magnetica ha ottenuto maggiore successo nella visualizzazione della massa β-cellulare dopo trapianto d'isole nell'uomo. In questo contesto l'impiego della PET, seppur come descritto sopra già validato, è limitato dalla breve emivita dei rivelatori che impedisce un accurato monitoraggio al di là delle prime ore post-trapianto. Al contrario, studi su animali hanno dimostrato che il trapianto d'isole marcate con nano particelle di ossido di ferro superparamagnetico (SPIO) può essere visualizzato *in vivo* mediante risonanza magnetica e che il segnale rimane stabile nel tempo in assenza di distruzione β-cellulare (45–48). Su questa base, essendo già disponibile come mezzo di contrasto clinico per le lesioni epatiche, è stato possibile utilizzare SPIO per marcare *ex vivo* le isole prima dell'infusione nell'uomo (49). Le frazioni più pure di sette preparati d'isole umane sono state marcate con particelle superparamagnetiche di ossido di ferro e trapiantate in quattro pazienti con DMT1. Gli studi di risonanza magnetica pesati in T2 sono stati eseguiti prima e in momenti diversi dopo il trapianto. La valu-

tazione post-trapianto ha chiaramente visualizzato la presenza di spot ipointensi a livello epatico corrispondenti al tessuto trapiantato, validando la fattibilità e la sicurezza di quest'approccio nella pratica clinica.

Conclusioni

In passato gli studi sulla massa β-cellulare del pancreas sono stati principalmente eseguiti *ex vivo* mediante valutazioni morfologiche. Questi dati hanno permesso di identificare le alterazioni fisiopatologiche della massa β-cellulare nelle isole pancreatiche in condizioni come il diabete mellito e l'obesità. I test metabolici, analizzando il rilascio di ormoni come l'insulina plasmatica o il C-peptide combinati con calcoli più o meno sofisticati, hanno consentito di evidenziare la massa funzionale, gli stati di insulino-resistenza o il fallimento secretorio β-cellulare suggerendo la possibilità, in condizioni selezionate, di correlare la funzione endocrina con la massa β-cellulare. Oggi, di fronte al consolidamento dei concetti fisiopatologici che sovraintendono il fallimento secretorio β-cellulare, di fronte ai moderni protocolli di terapia cellulare come il trapianto di isole e a farmaci che sarebbero in grado di conservare o addirittura espandere la massa β-cellulare nel diabete mellito, è diventata molto impellente la ricerca di strumenti diretti non invasivi di misura della massa cellulare che possano essere eseguiti anche più volte nello stesso soggetto *in vivo*. Metodologicamente, la questione decisiva è sviluppare approcci che offrano significativi vantaggi rispetto ai metodi metabolici attualmente disponibili. Anche se al momento nessuna strategia testata nell'uomo è stata in questo senso sufficientemente valida, è molto probabile che nel prossimo futuro metodi di valutazione diretti non invasivi, mediante PET o risonanza magnetica della massa β-cellulare, saranno resi disponibili per gli studi clinici.

Bibliografia

1. Maclean N, Ogilvie RF. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. Diabetes 4: 367–376, 1955.
2. Saito K, Yaginuma N, Takahashi T. Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. Tohoku J Exp Med 129: 273–283, 1979.
3. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. Diabetologia 24: 366–371, 1983.
4. Faber OK, Binder C. C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. Diabetes 26: 605–610, 1977.
5. Kloppel G, Lohr M, Habich K, et al. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res 4: 110–125, 1985.
6. Westermark P, Wilander E. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. Diabetologia 15: 417–421, 1978.
7. Clark A, Wells CA, Buley ID, et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: Quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. Diabetes Res 9: 151–159, 1988.
8. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, et al. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. Diabetes 31: 694–700, 1982.
9. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, et al. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of japanese type II diabetic patients. Diabetologia 45: 85–96, 2002.
10. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 52: 102–110, 2003.
11. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. J Clin Endocrinol Metab 88: 2300–2308, 2003.
12. Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. Diabetes 53: 624–632, 2004.
13. Meier JJ, Kohler CU, Alkhatib B, et al. Beta-cell development and turnover during prenatal life in humans. Eur J Endocrinol 162: 559–568, 2010.
14. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. Diabetes 57: 1584–1594, 2008.
15. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, et al. Pancreatic beta-cell mass in european subjects with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 10 (Suppl 4): 32–42, 2008.
16. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 85: 818–820, 1978.
17. Menge BA, Tannapfel A, Belyaev O, et al. Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta-cell regeneration. Diabetes 57: 142–149, 2008.
18. Schrader H, Menge BA, Schneider S, et al. Reduced pancreatic volume and beta-cell area in patients with chronic pancreatitis. Gastroenterology 136: 513–522, 2009.
19. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem 53: 1087–1097, 2005.
20. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci USA 103: 2334–2339, 2006.
21. Alanentalo T, Hornblad A, Mayans S, et al. Quantification and three-dimensional imaging of the insulitis-induced destruction of {beta}-cells in murine type 1 diabetes. Diabetes 59: 1756–1764, 2010.
22. Alanentalo T, Loren CE, Larefalk A, et al. High-resolution three-

dimensional imaging of islet-infiltrate interactions based on optical projection tomography assessments of the intact adult mouse pancreas. J Biomed Opt 13: 054070, 2008.
23. Robertson RP. Estimation of beta-cell mass by metabolic tests: Necessary, but how sufficient? Diabetes 56: 2420–2424, 2007.
24. Seaquist ER, Robertson RP. Effects of hemipancreatectomy on pancreatic alpha and beta cell function in healthy human donors. J Clin Invest 89: 1761–1766, 1992.
25. Teuscher AU, Kendall DM, Smets YF, et al. Successful islet autotransplantation in humans: Functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass. Diabetes 47: 324–330, 1998.
26. Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, et al. Successful islet transplantation: Continued insulin reserve provides long-term glycemic control. Diabetes 51: 2148–2157, 2002.
27. Camastra S, Manco M, Mari A, et al. Beta-cell function in morbidly obese subjects during free living: Long-term effects of weight loss. Diabetes 54: 2382–2389, 2005.
28. Nyman LR, Wells KS, Head WS, et al. Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. J Clin Invest 118: 3790–3797, 2008.
29. Speier S, Nyqvist D, Kohler M, et al. Noninvasive high-resolution in vivo imaging of cell biology in the anterior chamber of the mouse eye. Nat Protoc 3: 1278–1286, 2008.
30. Villiger M, Goulley J, Friedrich M, et al. In vivo imaging of murine endocrine islets of Langerhans with extended-focus optical coherence microscopy. Diabetologia 52: 1599–1607, 2009.
31. Fowler M, Virostko J, Chen Z, et al. Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using in vivo bioluminescence imaging. Transplantation 79: 768–776, 2005.
32. Park SY, Bell GI. Noninvasive monitoring of changes in pancreatic beta-cell mass by bioluminescent imaging in MIP-luc transgenic mice. Horm Metab Res 41: 1–4, 2009.
33. Sweet IR, Cook DL, Lernmark A, et al. Systematic screening of potential beta-cell imaging agents. Biochem Biophys Res Commun 314: 976–983, 2004.
34. Moore A, Bonner-Weir S, Weissleder R. Noninvasive in vivo measurement of beta-cell mass in mouse model of diabetes. Diabetes 50: 2231–2236, 2001.
35. Eriksson O, Eich T, Sundin A, et al. Positron emission tomography in clinical islet transplantation. Am J Transplant 9: 2816–2824, 2009.
36. Gotthardt M, Lalyko G, van Eerd-Vismale J, et al. A new technique for in vivo imaging of specific GLP-1 binding sites: First results in small rodents. Regul Pept 137: 162–167, 2006.
37. Wild D, Behe M, Wicki A, Storch D, Waser B, Gotthardt M, Keil B, Christofori G, Reubi JC, Macke HR: Lys40(ahx-DTPA-111In)NH2]exendin-4, a very promising ligand for glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor targeting. J Nucl Med. 47:2025-2033, 2006
38. Brom M, Oyen WJ, Joosten L, et al. 68Ga-labelled exendin-3, a new agent for the detection of insulinomas with PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging 37: 1345–1355, 2010.
39. Anlauf M, Eissele R, Schafer MK, et al. Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors. J Histochem Cytochem 51: 1027–1040, 2003.
40. Simpson NR, Souza F, Witkowski P, et al. Visualizing pancreatic beta-cell mass with [11C]DTBZ. Nucl Med Biol 33: 855–864, 2006.
41. Freeby M, Goland R, Ichise M, et al. VMAT2 quantitation by PET as a biomarker for beta-cell mass in health and disease. Diabetes Obes Metab 10 (Suppl 4): 98–108, 2008.
42. Goland R, Freeby M, Parsey R, et al. 11C-dihydrotetrabenazine PET of the pancreas in subjects with long-standing type 1 diabetes and in healthy controls. J Nucl Med 50: 382–389, 2009.
43. Hirshberg B, Qiu M, Cali AM, et al. Pancreatic perfusion of healthy individuals and type 1 diabetic patients as assessed by magnetic resonance perfusion imaging. Diabetologia 52: 1561–1565, 2009.
44. Antkowiak PF, Tersey SA, Carter JD, et al. Noninvasive assessment of pancreatic beta-cell function in vivo with manganese-enhanced magnetic resonance imaging. Am J Physiol Endocrinol Metab 296: E573–578, 2009.
45. Berkova Z, Jirak D, Zacharovova K, et al. Labeling of pancreatic islets with iron oxide nanoparticles for in vivo detection with magnetic resonance. Transplantation 85: 155–159, 2008.
46. Evgenov NV, Medarova Z, Dai G, et al. In vivo imaging of islet transplantation. Nat Med 12: 144–148, 2006.
47. Evgenov NV, Medarova Z, Pratt J, et al. In vivo imaging of immune rejection in transplanted pancreatic islets. Diabetes 55: 2419–2428, 2006.
48. Tai JH, Foster P, Rosales A, et al. Imaging islets labeled with magnetic nanoparticles at 1.5 tesla. Diabetes 55: 2931–2938, 2006.
49. Toso C, Vallee JP, Morel P, et al. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. Am J Transplant 8: 701–706, 2008.