

Il progressivo declino della β -cellula pancreatica nel corso della storia del diabete: quali sono i veri protagonisti del misfatto?

Salvatore Piro

Università degli Studi di Catania, Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Laboratorio di Medicina Molecolare, Ospedale Garibaldi-Nesima, Catania

Quando pensiamo al diabete immaginiamo subito che, indipendentemente dal tipo, dall'esordio clinico e dalla durata della malattia, ci troveremo di fronte a uno scenario che porterà inevitabilmente al declino funzionale delle β -cellule pancreatiche. Per anni è stato presentato lo studio *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) con una slide rappresentativa in cui il diabetologo, in qualsiasi modo avesse cominciato a gestire il problema, si sarebbe scontrato con una massa β -cellulare ridotta almeno del 50% (1). Quindi, da questo momento in poi tutti gli sforzi sarebbero rivolti nel tentativo di arginare il declino inesorabile che nel tempo porterà alla perdita della frazione residua delle β -cellule rimanenti. Il quesito che dobbiamo porci invece è un altro: perché le β -cellule pancreatiche sono inesorabilmente destinate a perire nel corso della storia naturale della malattia? In questo scenario in cui si ricerca l'assassino è ancora corretto lasciare al centro delle indagini i protagonisti storici o alla luce delle nuove conoscenze di fisiopatologia converrebbe allargare le indagini anche ad altri indiziati? Così, come succede nei migliori gialli d'autore, quello che appare sin dall'inizio come l'indiziato principale finisce sempre, grazie alla trovata dell'autore, per essere assolto durante le indagini; tra gli spettatori invece si nasconde il killer, abile a mimetizzarsi e che spesso rimarrà impunito.

Nel corso della revisione della letteratura effettuata per la stesura di questo articolo mi sono imbattuto in una recente *review*, pubblicata da Paul Robertson (2) nella quale, immaginando il diabete come un film *western*, la β -cellula viene presentata come la vittima

alla quale è già stato sparato il primo colpo. Questo colpo, importante ma non decisivo, avrebbe steso a terra la vittima senza però finirla. A questo punto la β -cellula, divenuta vulnerabile, sa che in qualsiasi momento potrebbe arrivare il colpo definitivo; tuttavia non sempre appare chiaro da dove arriverà e soprattutto chi sarà l'artefice della seconda pallottola. In questa visione, secondo me, bisognerebbe evitare di sorvolare la scena come avvoltoi, pronti a far banchetto della preda; un'opera degna di Tarantino alla *Kill Bill* potrebbe rileggere gli *spaghetti western* e contrastare il destino apparentemente già segnato della β -cellula.

Protagonisti vecchi e nuovi

Il diabete mellito tipo 2 (DMT2) è considerato come una patologia complessa dove fattori genetici e ambientali contribuiscono all'insorgenza e alla storia naturale. È noto come la familiarità e la predisposizione genetica condizionano fortemente lo sviluppo del quadro clinico; questo è vero sia per l'insorgenza della sindrome sia per lo sviluppo delle complicanze. Tuttavia, la natura poligenica della malattia rende molto difficile l'identificazione di geni specifici in grado di essere considerati con sicurezza come i responsabili dell'esordio clinico. Lo studio del genoma umano ha contribuito a individuare loci genetici di rischio per lo sviluppo del DMT2 o alleli di suscettibilità per il tipo 1 (DMT1); sono stati identificati geni che concorrono al controllo dello sviluppo e della funzione delle β -cellule pancreatiche (3). Quando queste evidenze vengono trasferite in

modelli *in vivo* non sempre le cose coincidono. La genetica, seppur importante, necessita dell'interazione con l'ambiente per poter espletare il proprio corso.

È noto il caso dei gerbilli del deserto (*Psammomys obesus*), animali che l'evoluzione ha selezionato per vivere in condizioni di estrema carenza di cibo. In questi roditori, normalmente non diabetici, quando trasferiti dal deserto ai nostri laboratori, la dieta standard determina sviluppo del diabete (4). Questo è un modello di interazione geni/ambiente. Tale fenomeno è stato osservato anche per l'uomo; esempi di analisi di flussi migratori e successive indagini in popolazioni rimaste nelle terre di origine o trasferite in società occidentalizzate mostrano come lo stile di vita condizioni fortemente lo sviluppo di diabete e di obesità. Quindi, la sola presenza di geni candidati allo sviluppo della malattia, almeno per quando riguarda le patologie poligeniche, non è in grado di causarne l'esordio clinico. L'ambiente in cui viviamo spesso determina e condiziona l'attivazione della genetica.

Per quando riguarda l'eccesso di glucosio o di nutrienti quali gli acidi grassi liberi (FFA), che negli ultimi anni hanno fornito informazioni importanti per la comprensione della fisiopatologia del diabete, il loro ruolo potrebbe essere visto come ambiguo: sono essi che causano il deterioramento della β -cellula o è invece il deficit di secrezione insulinica che, inducendo iperglicemia e ipernefemia, alla fine determina ulteriore danno β -cellulare? Il quesito è aperto. Sicuramente l'esposizione cronica a iperglicemia (glucotossicità) o a ipernefemia (lipotossicità) o la loro combinazione (gluco-lipotossicità) provoca deterioramento e morte β -cellulare. Inoltre, l'insulino-resistenza, geneticamente presente o peggiorata dall'obesità, aggrava e perpetua il danno. I termini glucotossicità, lipotossicità e gluco-lipotossicità fanno parte oramai del vocabolario diabetologico ed esprimono il paradosso in cui elementi fisiologici e indispensabili per l'organismo, se presenti in eccesso, sono in grado di determinare danno. Inoltre, spesso la co-presenza di elevati livelli di glucosio e FFA è in grado di rafforzare l'effetto tossico. I termini glucotossicità (5) e lipotossicità (6) sono stati introdotti da Unger rispettivamente nel 1985 e nel 1995. Nel lavoro iniziale veniva portata avanti l'ipotesi secondo la quale l'iperstimolazione della β -cellula con glucosio causava deplezione dei granuli di insulina e affaticamento funzionale. Negli anni è stato dimostrato che nel tempo questo fenomeno è in grado di indurre apoptosi delle β -cellule (7). Allo stesso modo, l'ipernefemia cronica è

in grado di determinare danno e successivamente morte delle β -cellule pancreatiche. La combinazione di entrambi i fattori pare possa potenziare l'effetto. In un modello di isole di ratto normale, in assenza di predisposizione genetica, l'esposizione cronica a elevati livelli di glucosio e di FFA era in grado di provocare apoptosi delle β -cellule; la co-presenza di entrambi i fattori accelerava il manifestarsi dell'apoptosi. Questi effetti potevano essere prevenuti con l'utilizzo della nicotinamide, agente antiossidante (8). Seppur il termine gluco-lipotossicità sia molto più recente (9), l'analisi degli eventi che portano alla morte delle β -cellule sembra mostrare che le vie utilizzate sono comuni. Sembra infatti che l'ipernefemia determini accumulo di lipidi all'interno delle cellule e che questo sia favorito dall'iperglicemia. Poiché quindi l'iperglicemia rappresenta un prerequisito affinché si verifichi il danno indotto dagli FFA, forse sarebbe più appropriato parlare di gluco-lipotossicità. Esiste tuttavia uno spettro temporale in grado di spiegare il fenomeno. Infatti, da quando la β -cellula lavora perfettamente fino al punto di danno irreversibile, esistono dei momenti in cui i danni funzionali potrebbero essere ancora reversibili. Cercheremo in questo articolo di analizzare i dati in nostro possesso al fine di comprendere meglio la dinamica del danno e le eventuali strategie.

Glucotossicità

L'analisi della letteratura degli ultimi anni mostra come il deterioramento della β -cellula in corso di iperglicemia segue almeno tre fasi ben documentate: fase della desensibilizzazione, fase dell'esaurimento funzionale e fase di morte (spesso per apoptosi). La prima fase (o della desensibilizzazione) avviene quando l'esposizione all'iperglicemia si verifica per periodi brevi; in questa fase la β -cellula, attuando dei meccanismi di difesa o di ripresa, cessa temporaneamente di rispondere in maniera coordinata allo stimolo "glucosio". Riequilibrando le condizioni di glicemia la secrezione di insulina viene ripristinata (10). Quando lo stimolo diviene prolungato a un meccanismo di compenso funzionale subentra anche un cambio organico; la β -cellula esaurisce i granuli pronti per essere rilasciati (*readily releasable pool*, RRP) e inibisce, inoltre, l'espressione del gene dell'insulina. Se lo stimolo viene prolungato ancora si verificheranno danni strutturali che condurranno verso il suicidio della cellula attraverso l'at-

tivazione dei meccanismi di apoptosi. Queste teorie, ipotizzate circa un decennio fa, sono oggi rafforzate da dati *in vitro* ed evidenze *in vivo* che hanno contribuito alla conoscenza dei meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno. Tuttavia, il fatto che il danno β -cellulare rappresenti un *continuum* e che la β -cellula fino a un certo punto possa recuperare pone le basi speculative per identificare strategie di intervento atte a prevenire il deterioramento della massa β -cellulare.

Seppure l'esaurimento dei granuli secretori all'interno della β -cellula possa ipoteticamente costituire un fattore limitante, in realtà una β -cellula difficilmente riuscirebbe a terminare il suo quantitativo totale di granuli. Infatti, è noto come per singola β -cellula esistano circa 10.000 differenti granuli e, seppur compartimentalizzati in diverse fasi di maturazione, non è immaginabile pensare a un esaurimento totale di questi. Inoltre, anche durante le fasi di maggiore impegno secretorio si stima che una β -cellula rilasci non oltre 20 granuli per minuto (11). Questo, moltiplicato per il numero totale di β -cellule e di isole pancreatiche, difficilmente può tradursi in esaurimento delle riserve. Piuttosto, i meccanismi maturativi del granulo e le proteine di ancoraggio dei granuli alla membrana plasmatica potrebbero rappresentare un fattore limitante. È stato riportato che l'iperglicemia cronica risulta in grado di modulare alcuni fattori di trascrizione coinvolti sia nella sintesi dell'insulina sia nei processi di maturazione dei granuli. Per esempio, in cellule di criceto, le HIT-T15, è stato dimostrato come l'iperglicemia cronica possa ridurre l'espressione di PDX-1 (12) e di MafA (13), due fattori di trascrizione che normalmente attivano il promotore del gene dell'insulina. Un loro difetto esita in una minore trascrizione del gene dell'insulina. Inoltre, gli autori di questi lavori hanno mostrato come il ripristino delle condizioni di normoglicemia era in grado di normalizzare i livelli sia di PDX-1 sia di MafA. Come mai questo meccanismo dovrebbe verificarsi? Perché proprio nei casi di maggiore stimolazione l'insulina dovrebbe ridursi? Probabilmente perché l'aumento di richiesta trascrizionale potrebbe determinare la produzione di trascritti anomali in grado di danneggiare la β -cellula (14). Questo aspetto verrà esposto in dettaglio più avanti. Inoltre, è noto come l'iperglicemia possa causare l'aumento di proteine in grado di interferire con il normale ancoraggio dei granuli alla membrana plasmatica. Per esempio, in queste condizioni sembra essere indotta la proteina Rab27a, capace di interferire con il com-

plesso SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein SNAP receptor*), necessario per la fusione dei granuli alla membrana e per il rilascio all'esterno dell'ormone (15).

Lipotossicità

Gli acidi grassi non esterificati a lunga catena, chiamati anche acidi grassi liberi o FFA (*free fatty acids*), sono componenti essenziali per l'organismo. Essi forniscono energia alla maggior parte dei tessuti, in particolare durante i periodi prolungati di digiuno o durante l'esercizio fisico. In realtà, in condizioni fisiologiche gli acidi grassi sono tutt'altro che liberi, poiché circolano spesso legati a proteine e in particolare all'albumina. In queste circostanze, infatti, oltre che essere substrati energetici, rappresentano mediatori di attività enzimatiche, induttori di espressione genica, modulatori di canali ionici, ecc. Alla luce dei dati disponibili in letteratura, è quindi possibile sostenere che, mentre in condizioni fisiologiche sono regolatori indispensabili per numerosi processi dell'organismo, il loro aumento sopra-fisiologico può significare un danno per le cellule. Pertanto, è corretto immaginare che condizioni patologiche quali diabete, obesità o lipodistrofia, determinando aumento degli FFA, costituiscano condizioni pericolose per le cellule dell'organismo. Questo processo è stato definito negli ultimi anni lipotossicità o lipoapoptosi quando si arriva al danno cellulare finale. Tuttavia, l'azione citotossica è dipendente dalla lunghezza della catena degli FFA e dal grado di saturazione. È infatti noto come gli FFA insaturi sono meno pericolosi e citotossici degli FFA saturi (16). Negli ultimi quindici anni Unger e collaboratori hanno contribuito a definire nel dettaglio l'effetto deleterio degli FFA sulle isole pancreatiche (7). Utilizzando un modello animale, i ratti ZDF (*Zucker Diabetic Fatty rats*), che spontaneamente sviluppano DMT2 alla quattordicesima settimana di vita, sono riusciti a porre le basi per la comprensione dei meccanismi patogenetici che legano il danno β -cellulare e l'eccesso di FFA. Unger ha dimostrato che in questo modello, prima che insorga il diabete, si assiste a un aumento degli acidi grassi circolanti e successivamente compare l'iperglicemia. L'analisi delle isole pancreatiche di questi animali all'insorgenza del diabete mostrava un accumulo di trigliceridi intracellulari e il danno β -cellulare era direttamente proporzionale al grado di infarcimento di grasso dell'i-

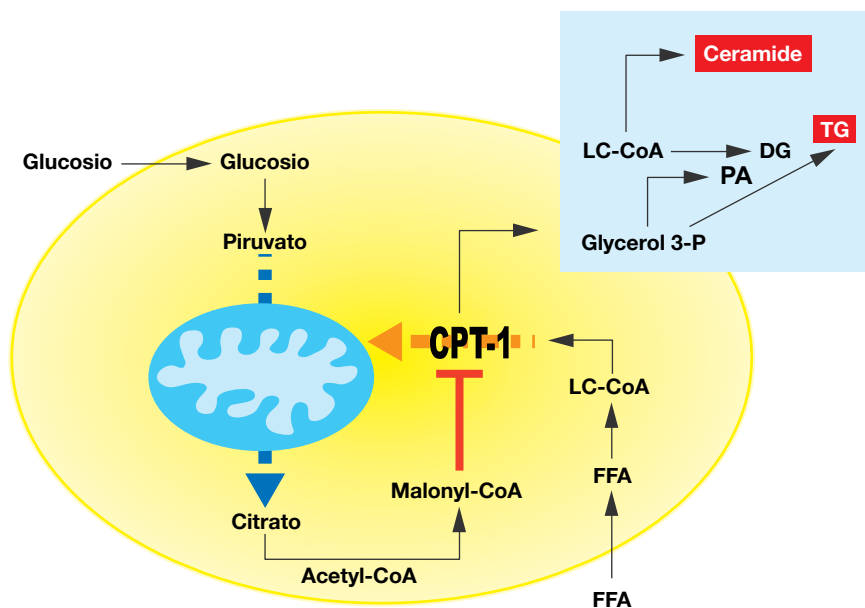
sola. Negli ultimi anni questo meccanismo di danno da grasso è stato riscontrato in molti altri tessuti, quali fegato, muscolo e tessuto cardiaco. La spiegazione fisiopatologica di questo processo risiede nel fatto che normalmente questi tessuti magri non sono fisiologicamente preposti all'accumulo di grassi come fonti di riserva energetica. L'aumento di trigliceridi al loro interno determina l'attivazione di vie metaboliche che portano al danno cellulare e all'apoptosi. È inoltre comunemente riconosciuto che l'incremento degli FFA causa insulino-resistenza. Randle nel 1963 (17) aveva ipotizzato l'esistenza di un ciclo metabolico (ciclo di Randle) in cui gli FFA, alterando il metabolismo del glucosio intracellulare, erano in grado di determinare insulino-resistenza. Questa ipotesi, pionieristica per gli anni in cui è stata formulata, negli ultimi 20 anni si è rivelata utilissima e illuminante per la comprensione dei delicati meccanismi che legano l'obesità, l'eccessivo introito alimentare, lo sviluppo di insulino-resistenza, l'insorgenza del DMT2 e il danno organico di fegato, muscolo, cuore e pancreas. È infatti noto come gli FFA siano in grado non solo di inibire l'azione dell'insulina a livello di svariati tessuti, ma ancora più in particolare di interferire con la captazione del glucosio, ostacolando la traslocazione del GLUT4 a livello dei cardiomiociti e del muscolo in generale (18). L'iperglicemia tipica del diabete potrebbe quindi in qualche modo essere prevenuta eliminando l'iper-accumulo non fisiologico di lipidi nei tessuti magri.

Glucotossicità e lipotossicità

Nonostante sia stato dimostrato che l'aumento dei livelli di glucosio e di FFA può causare il declino della funzione e della massa delle β -cellule, la loro combinazione potrebbe avere effetti di integrazione o addirittura di amplificazione sinergica (19, 20). Il termine gluco-lipotossicità, spesso utilizzato in letteratura, indica l'effetto deleterio determinato dal glucosio e dagli FFA simultaneamente presenti nelle condizioni sperimentali. Non c'è tuttavia univocità di pensiero nel ritenere egualmente indispensabili entrambi i componenti per spiegare l'etiopatogenesi del danno insulare. Esistono, infatti, aree di imprecisione nei dati ad oggi disponibili e, inoltre, non sempre è possibile riprodurre in vitro quello che naturalmente avviene *in vivo*. Spesso, le condizioni sperimentali, i modelli cellulari e il tipo di FFA utilizzati non riescono a replicare fedel-

mente quello che succede *in vivo*. Non tutti ritengono corretto associare i termini "gluco" e "lipo" con "tossicità"; quello che un componente potrebbe determinare in termini di morte cellulare (tossicità) per l'altro componente potrebbe invece essere limitato a un danno funzionale. È comunque certo che entrambi, glucosio e FFA, convergono all'interno della β -cellula a sovraccaricare i meccanismi metabolici che normalmente sono utilizzati dalle β -cellule per la normale funzionalità. Dall'ipotesi di partenza enunciata da Randle sono stati aggiunti nuovi elementi. Nel 1996 Prentki e Corkey (19) hanno aggiunto nuove informazioni e formulato nuove ipotesi; in condizioni di iperglicemia il sovraccarico di FFA determina formazione di precursori tossici e tra questi il ceramide. Infatti, nella β -cellula in condizioni di normoglicemia gli FFA vengono trasportati all'interno del mitocondrio dal CPT (*carnitine-palmitoyl-transferase*)-1 per essere β -ossidati. In condizioni di iperglicemia, quando anche gli FFA sono elevati, il glucosio viene indirizzato verso la formazione di segnali cataplerotici, generando da questi citrato e Malonyl-CoA all'interno del citosol. L'aumento del Malonyl-CoA, causando il blocco di CPT-1, determinerà la riduzione dell'ingresso degli FFA all'interno del mitocondrio per la β -ossidazione. L'accumulo di acidi grassi a catena lunga (LC-CoA) all'interno del citosol indurrebbe alterazione funzionale della β -cellula (20). Inoltre, l'iperglicemia e l'accumulo di LC-CoA attiverebbero geni lipogenetici tramite l'azione del sensore di energia AMP-chinasi (AMPK) (21). Questo è il momento etiopatogenetico in cui si forma ceramide, oltre che di- e trigliceridi, tossici per la β -cellula (Figura 1). Mentre è comunemente accettato che l'azione deleteria di glucosio e FFA si esplica attraverso la sintesi di ceramide e trigliceridi intracellulari, è ancora dibattuto se questo meccanismo, almeno all'inizio, possa essere un meccanismo di salvaguardia attuato dalla cellula. È infatti dimostrato che l'iniziale accumulo di trigliceridi all'interno del citosol potrebbe rappresentare una forma innocua di conservazione dell'eccesso di energia per proteggersi dalla lipotossicità (22). Recentemente, a conferma di questa ipotesi, Pipeleers e collaboratori hanno mostrato che indirizzando questo accumulo verso la formazione di acidi grassi neutri, tramite l'induzione di SCD (*stearoyl-CoA desaturase*), si riesce a proteggere la β -cellula dagli effetti deleteri degli acidi grassi saturi; questo meccanismo si verificherebbe tramite l'induzione di *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) α e LXR-RXR (23).

Figura 1 Rappresentazione schematica della formazione del ceramide



In condizioni di iperglicemia nella β -cellula pancreatica, quando anche gli FFA sono elevati, dal metabolismo del glucosio si formerebbe Malonyl-CoA all'interno del citosol. L'aumento del Malonyl-CoA, determinando blocco di CPT-1, determinerebbe aumento degli acidi grassi a catena lunga all'interno del citosol. Il blocco di CPT-1 causa la riduzione dell'ingresso degli FFA all'interno del mitocondrio. Gli acidi grassi non metabolizzati in presenza di glicerolo formerebbero mono, di e trigliceridi. Inoltre, una parte di questi grassi concorrerebbe alla formazione di ceramide. Figura prodotta secondo l'ipotesi formulata da Prentky et al. (19)

È quindi ipotizzabile salvare la β -cellula dal danno indotto da FFA e/o glucosio. È necessario comprendere meglio questi meccanismi.

Meccanismi cellulari che portano alla secrezione insulinica

La secrezione insulinica è un fenomeno complesso. La β -cellula, sentendo la presenza di nutrienti, adatta il suo lavoro e produce insulina al fine di mantenere l'omeostasi del glucosio, delle proteine e dei grassi. Le vie che portano alla secrezione insulinica sono numerose e molte di queste ancora non del tutto identificate. È chiaro tuttavia che alcune tappe e alcuni componenti cellulari rivestono maggiore importanza rispetto ad altri. Probabilmente, nel corso dei prossimi anni e in seguito alle nuove acquisizioni alcuni di questi punti fissi potrebbero subire importanti rivalutazioni.

Riguardo la secrezione insulinica bisogna identificare alcune vie metaboliche rilevanti e alcuni componenti cellulari che maggiormente sono riconosciuti come artefici principali per la produzione e la secrezione dell'ormone.

Le vie metaboliche individuate come indispensabili sono quelle che producono energia (in forma di ATP). Dopo il riconoscimento del glucosio da parte della β -cellula e l'internalizzazione ad opera prevalentemente del GLUT-2, glucotrasportatore specifico della β -cellula, il glucosio inizia ad essere scisso e metabolizzato ad opera della glucochinasi e dell'esochinasi. La presenza di GLUT-2, isoforma specifica per la β -cellula, conferisce a questa un privilegio nel riconoscimento del glucosio. La cinetica di legame del glucosio al GLUT-2 permette alla β -cellula di riconoscere il glucosio e di continuare a trasportarlo anche quando la glicemia diviene particolarmente alta, in modo da non saturare il processo di trasporto. Questo meccanismo consente al sistema di non esaurire la capacità di ingresso del glucosio, soprattutto per valori elevati di glicemia. GLUT-2 e glucochinasi (unità glucosensoria) dirigono il glucosio verso la metabolizzazione non ossidativa e, successivamente, dalla glicolisi verso l'ingresso del piruvato all'interno dei mitocondri. Nei mitocondri il piruvato subirà l'ossidazione definitiva e avverrà la produzione cospicua di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP è noto come punto chiave per la chiusura dei

canali del potassio (K^+) ATP-sensibili; questo in seguito determinerà apertura dei canali del calcio, depolarizzazione della membrana plasmatica e successiva liberazione dei granuli di insulina.

I componenti maggiormente coinvolti in questi processi sono sicuramente il mitocondrio, il reticolo endoplasmatico (ER), i canali di membrana e i granuli di insulina. Inoltre, la richiesta di ormone implica anche la trascrizione del gene dell'insulina (Figura 2).

Ognuna di queste tappe metaboliche e ogni componente cellulare possono divenire vittima e quindi subire e/o perpetuare il danno β -cellulare.

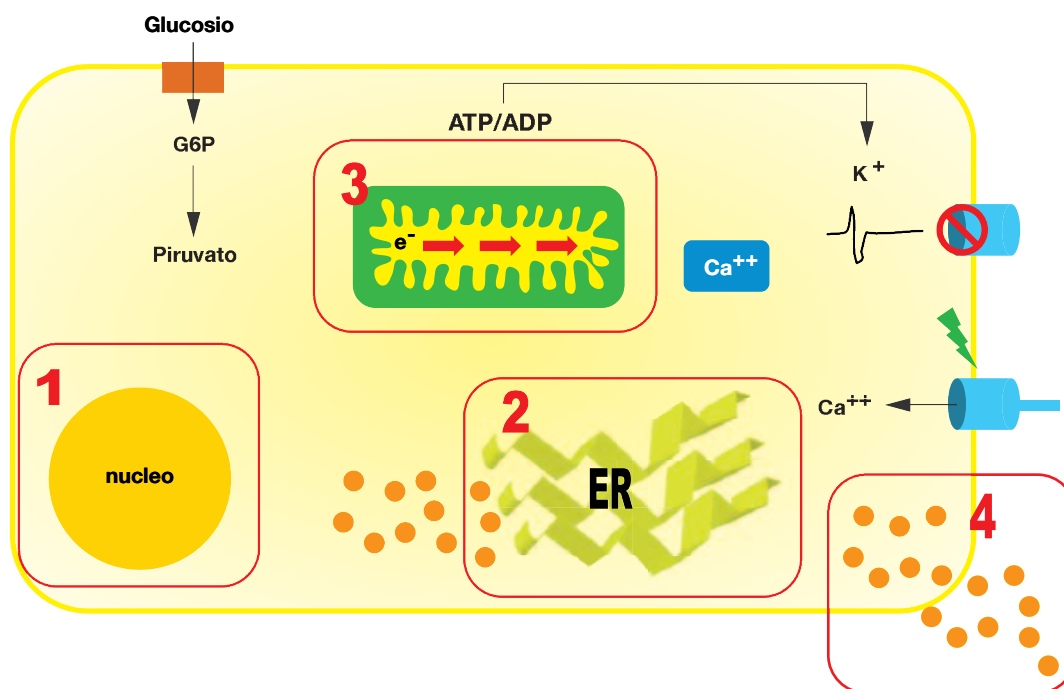
Gli artefici del danno, cioè coloro che spariranno la prima pallottola, potrebbero essere gli amici di sempre: il glucosio, gli acidi grassi e i nutrienti in genere che, in condizioni fisiologiche, rappresentano gli stimoli principali che determinano la fisiologica secrezione dell'ormone. Quando presenti cronicamente in alte concentrazioni da modulatori possono trasformarsi in perpetuatori di danno. In condizioni estreme, inoltre, l'utilizzo di farmaci sbagliati potrebbe aggravare il quadro.

Nella ricerca del colpevole - e soprattutto nell'analisi della prima e della successiva seconda pallottola - bisogna ricostruire la scena del delitto, chiamando come testimoni gli amici di sempre e gli spettatori momentanei.

Escludendo il substrato genetico, che ad oggi risulta ancora complicato e controverso per l'eterogeneità dei componenti e per la variabilità tra gli individui, bisogna partire dai punti fissi.

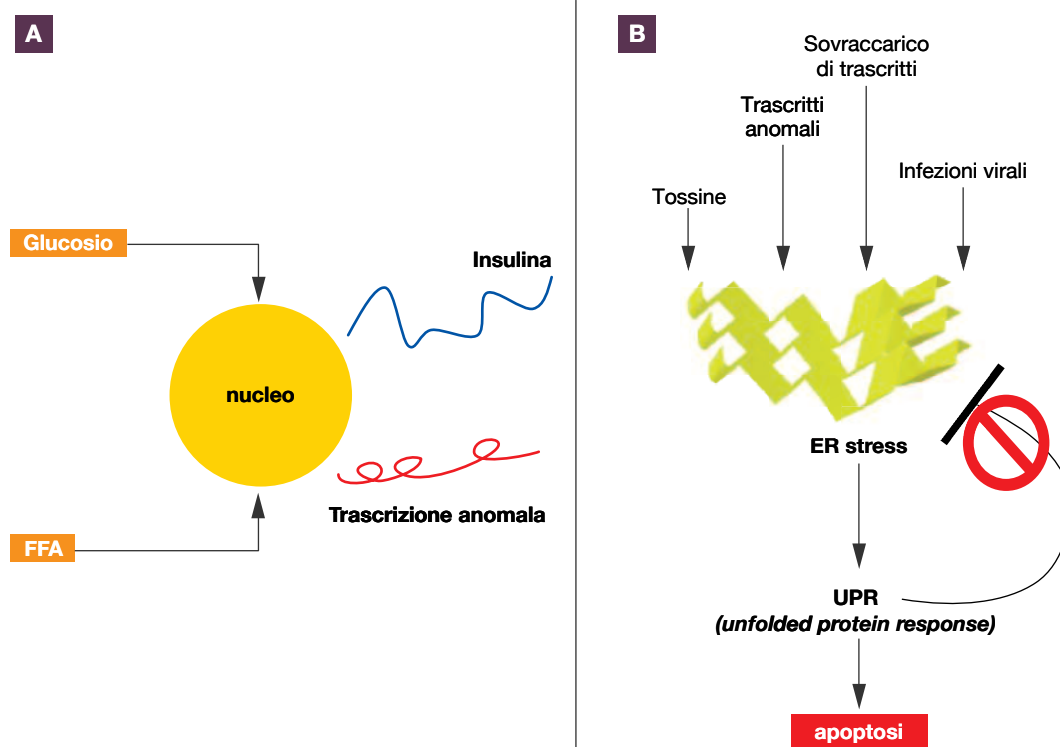
Quando alla β -cellula viene richiesto maggiore impegno dal punto di vista secretorio, un elemento certo esiste: la sintesi dell'ormone deve aumentare. Il gene dell'insulina viene maggiormente trascritto e tradotto. Anche se questo processo potrebbe sembrare semplice, in realtà potrebbe essere un punto di inizio del danno. Ipoteticamente, maggiore trascrizione e traduzione del gene dell'insulina potrebbe voler dire maggiore probabilità di formare trascritti anormali o prodotti di traduzione anomala; questo potrebbe riversarsi nelle tappe successive del processo, determinando danno (Figura 3A).

Figura 2 Rappresentazione schematica dei possibili punti vulnerabili della β -cellula



La β -cellula pancreatica, riconoscendo il glucosio, produce ATP. Dall'aumento del rapporto ATP/ADP si generano eventi che conducono alla chiusura dei canali del potassio ATP-sensibili. Questo causerà depolarizzazione della membrana plasmatica, apertura dei canali per il calcio e definitiva depolarizzazione della membrana, con rilascio dei granuli di insulina. Alcuni componenti sembrano essere vulnerabili alle perturbazioni metaboliche e potrebbero rappresentare obiettivi del danno cellulare. 1) nucleo della cellula, dove avviene l'attivazione del gene dell'insulina; 2) reticolo endoplasmatico; 3) mitocondrio; 4) granuli dell'insulina

Figura 3 L'iperglicemia e l'ipernefemia inducono stress del reticolo endoplasmatico



A. In condizioni di aumentata richiesta di insulina (gluco e lipotossicità) nelle prime fasi il gene dell'insulina viene maggiormente trascritto. La maggiore richiesta determina formazione di trascritti anomali che possono determinare danno del reticolo endoplasmatico.

B. Il reticolo endoplasmatico può subire danno dall'iper-lavoro richiesto in condizioni di gluco e lipotossicità. Inoltre, fattori ambientali possono alterarne la normale funzione. In caso di stress del reticolo endoplasmatico l'attuazione del fenomeno di UPR può rallentare il danno. In presenza di stimoli continui vengono avviati processi apoptotici

Vediamo che cosa è certo

In presenza di iperglicemia gli FFA alterano l'espressione del gene dell'insulina (14, 24); questo è noto in particolare per il palmitato che risulta in grado di modificare direttamente la trascrizione del gene dell'insulina (25). Questa alterazione sembra essere associata alla riduzione della stabilità di legame di PDX (*pancreas-duodenum homeobox*)-1 e di MafA con i promotori del gene dell'insulina (14). L'alterata stabilità dei promotori potrebbe in teoria ridurre il quantitativo di trascritto efficace per la traduzione o ancora, come dimostrato da Hagman, determinare formazione di trascritti anomali in grado di danneggiare l'ER (14). I meccanismi con cui gli FFA possono modificare l'espressione del gene dell'insulina non sono del tutto noti; sembra che il palmitato possa influenzare JNK tramite la formazione di ceramide (26). Infine, JNK altererebbe il legame di

PDX-1 a livello del promotore del gene dell'insulina (27). In queste condizioni, inoltre, è stata anche documentata una diminuzione dei livelli di ATF6 nelle β -cellule. ATF6 è noto essere un fattore di trascrizione che invece regola negativamente la trascrizione del gene dell'insulina (28). La riduzione di questo fattore di trascrizione potrebbe rappresentare un tentativo di rallentamento da parte della β -cellula per cercare di non appesantire ulteriormente l'ER.

Reticolo endoplasmatico

L'ER costituisce un organo essenziale per le cellule eucariote; in ogni sistema cellulare evoluto a livello dell'ER avvengono la formazione e l'assemblaggio delle proteine nella loro struttura tridimensionale finale. Un cattivo funzionamento dell'ER compromettereb-

be la sopravvivenza della cellula medesima. La β -cellula possiede un apparato di ER che risulta, come del resto per ogni altra cellula, fondamentale per la formazione delle proteine che compongono la cellula stessa. Inoltre, per la β -cellula l'ER riveste un ruolo fondamentale anche per l'assemblaggio dell'insulina, del suo recettore e di tutte le molecole che porteranno alla secrezione insulinica. In condizioni di maggiore richiesta di proteine l'ER deve far fronte a un maggiore carico di lavoro. L'ER, inoltre, è spesso sede di insulti esterni che potrebbero perturbarne la funzione; infezioni virali, citochine, tossine e farmaci spesso danneggiano questo organo. L'invecchiamento cellulare frequentemente passa attraverso il danno e il malfunzionamento di ER (29). Negli ultimi anni ER è stato messo in correlazione con il fallimento β -cellulare, sia per quanto riguarda il DMT1 (30) sia per il DMT2 (31). In letteratura sono molti i lavori che analizzano il ruolo di questo apparato; esistono ipotesi e teorie a supporto dell'importanza di ER per la sopravvivenza della β -cellula e per la produzione dell'insulina. Inoltre, è noto che condizioni di iperglicemia cronica o di eccesso di FFA, aumentando la richiesta dell'ormone, causano accumulo di mRNA che deve essere tradotto e quindi assemblato. Come già espresso prima, l'iperglicemia e gli FFA determinano maggiore frequenza di produzione di trascritti anomali del gene dell'insulina. Questo aumentato flusso di lavoro appesantirebbe ER e da questo partirebbero segnali di danno che indurrebbero l'apoptosi β -cellulare (29). Il processo di stress di ER potrebbe essere inizialmente prevenuto tramite meccanismi di rallentamento dell'attività che ER avvierebbe, in attesa del recupero. Questi meccanismi, noti come UPR (*unfolded protein response*), porterebbero all'ER e alla cellula un periodo di recupero in grado di permettere il ripristino del controllo; se tale periodo non dovesse essere sufficiente, la cellula andrebbe incontro ad apoptosi. UPR sarebbe quindi un regolatore tra la sopravvivenza e l'apoptosi della cellula (Figura 3B). Che questo sia vero per la β -cellula deriva anche dall'analisi di una rara forma di diabete genetico giovanile: la sindrome di Wolcott-Rallison (32). Nel 1972 Wolcott e Rallison descrissero questa sindrome in due fratelli e una sorella che avevano sviluppato diabete a insorgenza giovanile e che mostravano, inoltre, displasie multiple epifisarie. Venne dimostrato in seguito che questa sindrome era associata a una mutazione di EIF2AK3, gene codificante per PERK, con la risultante perdita di funzione (33). La riduzione di funzione di

PERK si associa alla diminuzione della fosforilazione di eIF2 α , substrato di PERK. La fosforilazione di eIF2 α risulta essenziale per mitigare i segnali di stress di ER e, in queste condizioni, l'iper-impegno di ER potrebbe esitare in segnali apoptotici per la β -cellula. Negli ultimi anni queste osservazioni sono state confermate in modelli *in vivo* (con l'utilizzo di animali transgenici) che ne hanno ribadito l'importanza (34, 35). Inoltre, lo studio di funzione di questi componenti ha chiarito il ruolo di UPR quale elemento fondamentale per il recupero della β -cellula. A supporto dell'importanza di questi meccanismi, bisogna citare un'altra rara sindrome genetica che determina diabete neonatale permanente. In questa sindrome i neonati affetti richiedono insulina entro il primo mese di vita. Il difetto genetico di questa manifestazione clinica pare risiedere in multiple mutazioni del promotore dell'insulina e tra questi IPF (*insulin promoter factor*)-1; questo difetto causa insulino-dipendenza permanente (36). Tale disordine, di tipo autosomico dominante, determina trascritti alterati del gene dell'insulina. Si ipotizza che questi trascritti anomali dell'insulina possano causare fenomeni di stress di ER; valicata la possibilità dell'attuazione di UPR, la β -cellula morirebbe per apoptosi. Anche per questa sindrome esistono modelli animali di studio: il topo Munich e il topo Akita (37, 38). In questi topi, con mutazioni note del gene dell'insulina, si assiste all'interno di ER a un accumulo di pro-insulina non ripiegata nella sua struttura tridimensionale. L'aumento di precursori immaturi induce stress severo di ER e avvia segnali apoptotici. Questi modelli animali, concepiti dopo l'identificazione delle rispettive sindromi genetiche, hanno contribuito non solo alla conferma dell'importanza di ER per la patogenesi del diabete mellito, ma hanno anche prodotto la prova che lo stress di ER è un punto chiave per l'induzione della morte della β -cellula. Inoltre, risulta consequenziale immaginare che fattori ambientali, quali virus o tossine, causando sintesi di proteine anomale, magari con azione di neo-antigeni, possano determinare stress di ER con lo stesso meccanismo. Queste sono solo evidenze iniziali, ma rappresentano campi di studio per traiettorie speculative future.

Mitocondrio

Che l'ER rivesta un ruolo importante nella patogenesi della morte β -cellulare è indiscusso. Tuttavia, ci si

chiede se il mitocondrio, altro fondamentale componente della β -cellula, possa essere il perpetratore del danno dell'ER oppure se, a sua volta, rappresenta la vittima. In condizioni di iperglicemia o di eccesso di FFA il mitocondrio è un protagonista di primo piano; è a questo livello che, con la produzione di energia, si formano i ROS (specie reattive dell'ossigeno) che danneggiano la β -cellula. È stato documentato che condizioni di stress di ER inducono segnali in grado di deteriorare secondariamente il mitocondrio (39). Potrebbe quindi essere il primitivo danno di ER a far scattare anche il danno mitocondriale oppure potrebbe essere il mitocondrio per primo, a causa del suo malfunzionamento, a inviare segnali in grado di determinare danno sull'ER.

Il mitocondrio rappresenta la centrale elettrica di tutte le cellule dell'organismo. Attraverso la catena respiratoria mitocondriale la maggior parte dei nutrienti viene scissa in H_2O e CO_2 , con produzione cospicua di energia. Durante questi processi di scissione un flusso di protoni, spinto dalla matrice mitocondriale verso lo spazio tra le creste, genera ATP. Nel corso della fosforilazione ossidativa mitocondriale una parte di energia viene anche trasformata in calore da processi disaccoppianti ad opera di proteine disaccoppianti (UCP) che sono indispensabili per la termoregolazione. In generale, un malfunzionamento mitocondriale è in grado di determinare insulino-resistenza soprattutto a livello muscolare ed epatico (40). Qui la riduzione dell'azione dell'insulina potrebbe verificarsi per un eccessivo accumulo di lipidi dentro le cellule (dovuto al malfunzionamento mitocondriale) o per l'esagerata produzione di precursori lipidici, quali LC-CoA e ceramide (40).

La β -cellula pancreatica dipende dal mitocondrio per la produzione di energia e per la secrezione di insulina. La sintesi di ATP è indispensabile per i processi che portano alla secrezione di insulina; dall'incremento dei livelli di ATP e dal conseguente aumento del rapporto ATP/ADP si attiva la depolarizzazione della membrana cellulare e quindi l'esocitosi dei granuli. In condizioni fisiologiche la secrezione di insulina non avviene senza ATP. In un modello di isole di ratto normale esposte cronicamente a elevati livelli di FFA o glucosio è stata documentata una alterazione della secrezione insulinica determinata dalla diminuzione dei livelli di ATP mitocondriale (riduzione del rapporto ATP/ADP). In questo modello è stato dimostrato come l'iperglicemia cronica o l'ipernefemia causava aumento dell'espressione di UCP-2 e quindi un disaccoppiamento del

metabolismo ossidativo mitocondriale. La modulazione dell'espressione di UCP-2 era in grado di ripristinare i normali livelli di ATP e la secrezione insulinica (41).

Tuttavia la β -cellula è anche una cellula con bassa capacità antiossidante; l'azione *scavenger* per i radicali liberi è molto bassa. Nel corso della produzione di ATP, durante la fosforilazione ossidativa, vengono generati radicali liberi dell'ossigeno in grado di danneggiare le membrane lipidiche e di indurre segnali di morte per la cellula. Se la capacità *scavenger* viene superata si attivano segnali deleteri per la β -cellula.

I segnali apoptotici che partono dal mitocondrio sono molteplici: rilascio del citocromo c, attivazione di *Bax* (proteina pro-apoptotica) e riduzione di *Bcl-2* (proteina anti-apoptotica), con conseguente attivazione delle caspasi. Ognuno di questi processi, molto ben studiato negli anni recenti, induce alla fine la morte delle β -cellule (42). Va inoltre ricordato che i ROS sono in grado di danneggiare il patrimonio genetico mitocondriale (mtDNA). Questa parte di DNA sembra essere molto importante per il mitocondrio stesso poiché detiene le informazioni per la sintesi di alcuni complessi della catena respiratoria.

Sono state riscontrate mutazioni del DNA mitocondriale nel 2% della popolazione con DMT2. Inoltre, sono stati osservati polimorfismi specifici nella popolazione di indiani Pima (43), nota per la maggiore predisposizione al DMT2. È noto che le isole di pazienti con DMT2 mostrano mitocondri alterati e malfunzionanti all'interno delle β -cellule (44). La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la funzione dei mitocondri e il loro adattamento durante le condizioni di iper-impegno potrebbe fornire elementi utili per la fisiopatologia del danno β -cellulare.

Granuli

Un altro bersaglio della β -cellula è rappresentato dai granuli di insulina e dall'apparato granulare contenuto all'interno della cellula. Normalmente è stimato che ogni β -cellula possieda almeno 10.000 granuli, divisi in compartimenti a differente grado di maturazione. Solo i granuli ancorati alla membrana sono pronti per la secrezione. Il processo maturativo è complicato e ogni tappa di questa via può costituire un punto critico di blocco del sistema. Negli ultimi anni si è indagato molto su questi processi. Il sistema di proteine di ancoraggio (noto come complesso SNARE) è rappresentato

da un insieme di proteine indispensabili per il procesamiento e la fusione del granulo alla membrana. È stato dimostrato che l'eccesso di FFA è in grado di indurre la sintesi di una proteina, la granulofilina (Rab27a) (15). Questa induzione, che avviene tramite SREBP1c, determina blocco della fusione del granulo alla membrana e quindi riduzione della secrezione di insulina. L'apparato di granuli e proteine costituisce un sistema complesso e molteplici punti rappresentano bersagli dell'iperglicemia e degli FFA. Nei prossimi anni la comprensione di questi sistemi aggiungerà informazioni importanti per futuri campi di ricerca.

Architettura dell'isola

L'isola pancreatica è composta non solo dalle β -cellule che producono insulina, ma anche dalle α , dalle δ e dalle cellule PP. Ogni tipo di cellula sintetizza ormoni specifici con ruoli noti; l'insieme del prodotto ormonale dell'isola concorre all'omeostasi glicemica. Alla luce delle nuove acquisizioni probabilmente non è più corretto credere alla relazione diabete = β -cellula. Il diabete è una patologia complessa e l'insulina non è l'unico ormone responsabile dell'omeostasi glicemica. Oltre al grado variabile di insulino-resistenza, geneticamente presente o indotto dall'obesità, è l'alterata funzione dell'isola *in toto* che deve essere valutata. La scena del delitto è ancora aperta; probabilmente la β -cellula non può essere considerata l'unica vittima. Alcuni elementi necessitano di essere analizzati e molti quesiti restano aperti. È noto infatti che la distribuzione delle diverse popolazioni cellulari all'interno dell'isola cambia nelle differenti specie animali e nell'uomo. Questa diversa conformazione spaziale potrebbe essere responsabile di differenti comportamenti secretori tra le varie specie.

Nel roditore è possibile riconoscere un *core* centrale di β -cellule e un mantello esterno di α , δ e cellule PP; nell'uomo questo non è riscontrabile. La distribuzione delle cellule all'interno dell'isola potrebbe essere la causa della risultante ormonale in uscita dal flusso sanguigno che irrori l'isola. Una distribuzione centro-periferia di cellule β e non β potrebbe spiegare un'azione diretta dell'insulina sulla secrezione di glucagone (effetto inibitorio ipoglicemizzante). L'analisi della conformazione spaziale dell'isola pancreatica nell'uomo mostra una distribuzione, tra le varie popolazioni cellulari, diversa rispetto ai roditori. Le nostre cono-

scenze attuali non ci permettono di capire il ruolo di queste distribuzioni cellulari. Tuttavia, l'analisi di questo fenomeno potrebbe contribuire alla comprensione della secrezione ormonale dell'isola e del ruolo relativo di ogni cellula per l'omeostasi glicemica.

Inoltre, l'isola pancreatica varia durante le fasi della vita intrauterina e adulta; la componente adattativa permette il mantenimento dell'omeostasi glicemica nelle varie fasi della vita (45). Tuttavia, è noto come alcuni soggetti falliscano nel tentativo di adeguarsi alle perturbazioni ambientali. Cosa determini questa mancata risposta non è ad oggi noto. La comprensione di questi meccanismi potrebbe determinare un avanzamento per lo studio della fisiopatologia del diabete.

α -cellule

All'interno delle isole pancreatiche esistono le α -cellule che secernono glucagone, ormone ad azione iperglicemizzante. Il glucagone, peptide di 29 aminoacidi, viene prodotto come pro-glucagone e processato successivamente ad opera di proconvertasi specifiche. Le α -cellule sembrano possedere un sistema secretorio molto simile alle β -cellule condividendo, quindi, vie che portano alla secrezione dell'ormone molto simili. Del resto, se si analizza la via di differenziazione che dai precursori staminali porta alle α e alle β -cellule, per alcuni momenti della differenziazione queste due tipologie cellulari appaiono identiche. Inoltre, in studi effettuati su cellule staminali è nota la co-presenza di insulina e glucagone in alcune fasi differenziative (46). È quindi probabile che per questo motivo l'apparato funzionale delle α -cellule ricalchi in molti punti quello delle β -cellule. Sulla superficie delle α -cellule si trovano gli stessi canali per il potassio sensibili all'ATP, canali per il calcio, per neurotrasmettitori (quale il GABA), per il sodio e per il cloro; tuttavia non è chiaro il loro funzionamento. È noto invece che il potenziale di membrana di queste cellule appare differente: - 60 mV per le α -cellule e - 40 mV per le β -cellule. Questa diversa azione elettrica potrebbe conferire un differente tempo di risposta agli stimoli elettrici e una diversa risposta ai nutrienti e ai livelli intracellulari di ATP. Inoltre, nelle α -cellule sembrano avere maggiore ruolo i livelli intracellulari di cAMP piuttosto che i livelli di ATP (47). Questo potrebbe essere utile per spiegare meglio il ruolo delle incretine e l'azione (diretta?) sulle α -cellule.

Per molti anni non è stato riconosciuto alle α -cellule un ruolo importante nella patogenesi del diabete. Alla luce delle nuove acquisizioni, invece, queste cellule necessitano di essere riconsiderate perché la loro azione iperglicemizzante potrebbe essere parte fondamentale per lo sviluppo dell'iperglicemia nel paziente con diabete. Già nel 1975 Unger e Orci avevano sottolineato questo aspetto, formulando l'ipotesi dell'equilibrio "bi-ormonale" (48): l'insulina, agendo sulle α -cellule, sarebbe in grado di bloccare la secrezione di glucagone. Oggi, anche dopo l'avvento delle incretine nella pratica clinica, questa ipotesi è stata rivalutata. All'iperglicemia del diabete concorrono anche il glucagone e l' α -cellula. Nel diabete, infatti, le α -cellule potrebbero essere irresponsive agli alti livelli di glucosio ed essere anche insulino-resistenti e quindi irresponsive all'azione dell'insulina. Recentemente è stato dimostrato come il palmitato presente cronicamente è in grado di indurre specifica insulino-resistenza in un sistema di α -cellule in coltura continua (49). In queste condizioni le cellule producono più glucagone e l'insulina non è in grado di bloccarne la secrezione. Questi dati, inoltre, sono anche stati ottenuti in un sistema di topi *knock-out* per il recettore insulinico a livello α -pancreatico (α IRKO) (50). Questi topi presentano iperglicemia e irresponsività all'insulina. Alla luce di queste osservazioni è quindi necessario inserire tra la lista dei tessuti insulino-resistenti anche le α -cellule pancreatiche. Questo effetto, che può essere indotto da condizioni ambientali (ipernefemia), determinando iperglicemia, concorrerebbe ad aggravare lo sforzo e l'iperlavoro richiesto alle β -cellule agonizzanti. Analizzare quindi il delitto solo dal punto di vista β -centrico potrebbe essere non corretto; probabilmente il fallimento β -cellulare è da considerare alla luce dell'organo "isola" nell'interezza. Inoltre, devono essere valutate anche le altre popolazioni cellulari dell'isola poiché è immaginabile che anche una loro disfunzione renda l'armonia dell'isola in qualche modo alterata.

Incretine

Nell'uomo e in molti mammiferi, in risposta all'ingestione di cibo, vengono prodotti ormoni in grado di preparare l'intestino alla digestione e il pancreas alla secrezione ormonale. Il *glucose-dependent insulinotropic peptide* (GIP) e il *glucagon-like peptide* (GLP)-1, noti come incretine, per molto tempo hanno avuto un

ruolo limitato nella fisiopatologia delle disfunzioni endocrine nel diabete. Oggi, invece, queste molecole costituiscono nuove prospettive per la gestione della malattia. Il GLP-1 in particolare, tramite analoghi o molecole che ne riducono la degradazione, rappresenta una nuova alternativa terapeutica per l'approccio fisiopatologico del diabete. Il GLP-1 determina secrezione insulinica coordinata con i livelli di glicemia e inoltre mostra evidenze di possibile preservatore della β -cellula (51). Ci stiamo quindi spostando verso un nuovo modo di gestire il diabete: non più un approccio finalizzato al raggiungimento della sola normoglicemia, ma un trattamento che moduli senza forzare il sistema. Negli anni è stato visto che l'utilizzo di secretagoghi, quali le sulfoniluree, a fronte di una più rapida azione normoglicemizzante, determina fallimento verosimilmente per un'azione apoptotica sulla β -cellula (52). Probabilmente forzare le β -cellule in maniera indiscriminata causa sofferenza e morte della vittima che ha già subito il primo colpo. Farmaci in grado di modulare la secrezione insulinica, in maniera coordinata con la funzione delle α -cellule e con l'isola intera rappresenterebbero una alternativa diversa e più fisiologica. Le incretine, infatti, sono anche in grado di regolare i livelli di glucagone; tuttavia restano ancora aperti molti quesiti circa l'azione diretta o indiretta (via cellule β e δ) delle incretine sui livelli di glucagone. Studi su pazienti con DMT1, privi di β -cellule, hanno confermato *in vivo* che il GLP-1 sembra avere un'azione diretta sulle α -cellule, determinando riduzione dei livelli di glucagone (53). Questo aumenterebbe le informazioni importanti a sostegno del fatto che queste terapie costituiscono un progresso fisiopatologico per il diabete. Inoltre, ci sono evidenze *in vitro* e in animali che esisterebbe una produzione locale, all'interno dell'isola, di GLP-1 (54). Questo aggiungerebbe speculazioni sul fatto che le incretine sono veramente indispensabili per la funzione e il tropismo dell'isola pancreatica.

Conclusioni

A questo punto delle indagini probabilmente sarà possibile stilare le prime conclusioni. Negli ultimi anni sono stati prodotti molti dati che hanno contribuito a chiarire meglio la scena del delitto. La glucotossicità e la lipotossicità sono fortemente indiziate e, assieme alla predisposizione genetica, concorrono a "stendere" la β -

cellula. Conosciamo le basi molecolari e biochimiche che conducono alla disfunzione e poi alla morte della β -cellula. Tuttavia molti quesiti restano insoluti; per esempio, l'accumulo di trigliceridi all'interno della β -cellula costituisce un sintomo della gluco e lipotossicità o una conseguenza? Inoltre, il riposo funzionale (UPR) del reticolo endoplasmatico è un meccanismo positivo di protezione o un fenomeno di declino per la β -cellula? Le variazioni di trascrizione del gene dell'insulina sono sempre da ritenersi positive (nel senso della compensazione alle richieste) oppure rappresentano già una prima richiesta di aiuto da parte della β -cellula? Convieni soffermarci solo sullo studio della β -cellula o dovremmo ripartire dallo studio dell'isola intera?

Sicuramente bisogna ammettere che molte delle manifestazioni descritte costituiscono un *continuum* per la β -cellula e potrebbero rappresentare la descrizione di una fase di adattamento a un iper-impegno richiesto. Prentki e Nolan descrivono questi fenomeni come "gluco-lipo adattamento" e potrebbero essere visti nelle prime fasi come processi positivi della cellula (55). Il fatto che solo alcuni soggetti nelle stesse identiche condizioni sviluppano iperglicemia potrebbe risiedere nel fatto che una diversa componente genetica differenzia gli individui tra di loro; i soggetti predisposti potrebbero essere maggiormente vulnerabili. È chiaro comunque che i tempi sono cambiati. Un lavoro recente pubblicato su *Nature* (56) solleva nuovi interrogativi: le α -cellule possono addirittura essere i precursori delle β -cellule. In questo lavoro gli autori dimostrano come, in assenza di β -cellule, le α possono passare da uno stato di differenziazione a un altro, rimpiazzando le vecchie β -cellule morte. È quindi possibile immaginare che nel corso della nostra vita una parte di β -cellule sia ottenuta dal patrimonio di α già presenti. In questo contesto le incretine circolanti o prodotte all'interno dell'isola potrebbero contribuire nel corso della vita alla ripopolazione dell'isola di β -cellule man mano che si perdono. Queste speculazioni tuttavia necessitano di conferme e di ulteriori analisi. Nelle more dovremmo cercare di interpretare meglio i segnali già noti che arrivano dalle β -cellule, già colpite e stese al suolo in attesa di ricevere l'ulteriore colpo definitivo che le finirà. Secondo Poitout (57, 58), che potrebbe anche leggersi *Poirot* (noto commissario), uno dei primi segnali da cogliersi in questi processi è la riduzione dell'espressione del gene dell'insulina; questo potrebbe contribuire al mancato mantenimento delle riserve intracellulari di ormone. Questo fenomeno, in

realtà, precede sia la diminuzione della secrezione insulinica sia la riduzione della massa β -cellulare e lo sviluppo dell'iperglicemia. Se questi segni vengono trascurati e se la nostra risposta viene indirizzata verso l'ulteriore lavoro richiesto alla β -cellula, magari utilizzando farmaci impropri, è certo che il secondo colpo verrà sparato e la β -cellula inevitabilmente soccomberà sotto gli occhi inermi di noi spettatori.

Bibliografia

1. U.K. Prospective Diabetes Study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: A progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44: 1249–1258, 1995.
2. Robertson RP. Beta-cell deterioration during diabetes: What's in the gun? *Trends Endocrinol Metab* 20: 388–393, 2009.
3. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881–885, 2007.
4. Neshler R, Gross DJ, Donath MY, et al. Interaction between genetic and dietary factors determines beta-cell function in *Psammomys obesus*, an animal model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 731–737, 1999.
5. Unger RH, Grundy S. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: Implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28: 119–121, 1985.
6. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44: 863–870, 1995.
7. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, et al. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* 273: 32487–32490, 1998.
8. Piro S, Anello M, Di Pietro C, et al. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: Possible role of oxidative stress. *Metabolism* 51: 1340–1347, 2002.
9. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: Role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl 3): S405–413, 2002.
10. Anello M, Rabuazzo AM, Degano C, et al. Fast reversibility of glucose-induced desensitization in rat pancreatic islets. Evidence for an involvement of ionic fluxes. *Diabetes* 45: 502–506, 1996.
11. Anello M, Gilon P, Henquin JC. Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas: Perturbations of Ca^{2+} regulation prevail over changes in insulin content. *Br J Pharmacol* 127: 1883–1891, 1999.
12. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 92: 514–519, 1993.
13. Harmon JS, Stein R, Robertson RP. Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mech-

- anism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280: 11107–11113, 2005.
14. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280: 32413–32418, 2005.
15. Kato T, Shimano H, Yamamoto T, et al. Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metab* 4: 143–154, 2006.
16. Morgan NG, Dhayal S, Diakogiannaki E, Welters HJ. The cytoprotective actions of long-chain mono-unsaturated fatty acids in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36: 905–908, 2008.
17. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i: 785–789, 1963.
18. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171–176, 2000.
19. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45: 273–283, 1996.
20. Poitout V, Robertson RP. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339–342, 2002.
21. Ruderman N, Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: Targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3: 340–351, 2004.
22. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3077–3082, 2003.
23. Hellemans KH, Hannaert JC, Denys B, et al. Susceptibility of pancreatic beta cells to fatty acids is regulated by LXR/PPARalpha-dependent stearyl-coenzyme A desaturase. *PLoS One* 4: e7266, 2009.
24. Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, et al. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49: 532–536, 2000.
25. Moore PC, Ugas MA, Hagman DK, et al. Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 53: 2610–2616, 2004.
26. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335 (Pt 3): 465–480, 1998.
27. Kaneto H, Xu G, Fujii N, et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 277: 30010–30018, 2002.
28. Seo HY, Kim YD, Lee KM, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology* 149: 3832–3841, 2008.
29. Fonseca SG, Burcin M, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 9: 763–770, 2009.
30. Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182: 1625–1634, 1995.
31. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4: 245–254, 2006.
32. Wolcott CD, Rallison ML. Infancy-onset diabetes mellitus and multiple epiphyseal dysplasia. *J Pediatr* 80: 292–297, 1972.
33. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, et al. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25: 406–409, 2000.
34. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7: 1153–1163, 2001.
35. Ladiges WC, Knoblaugh SE, Morton JF, et al. Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* 54: 1074–1081, 2005.
36. Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15040–15044, 2007.
37. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 103: 27–37, 1999.
38. Herbach N, Rathkolb B, Kemter E, et al. Dominant-negative effects of a novel mutated *Ins2* allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich *Ins2C95S* mutant mice. *Diabetes* 56: 1268–1276, 2007.
39. Luciani DS, Gwiazda KS, Yang TL, et al. Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death. *Diabetes* 58: 422–432, 2009.
40. Szendroedi J, Roden M. Mitochondrial fitness and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 51: 2155–2167, 2008.
41. Patane G, Anello M, Piro S, et al. Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes* 51: 2749–2756, 2002.
42. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13: 1423–1433, 2006.
43. Johannsen DL, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 9: 780–786, 2009.
44. Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48: 282–289, 2005.
45. Rhodes CJ. Type 2 diabetes--a matter of beta-cell life and death? *Science* 307: 380–384, 2005.
46. Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Mansouri A. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123: 501–512, 2006.
47. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28: 84–116, 2007.
48. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* i: 14–16, 1975.
49. Piro S, Maniscalchi ET, Monello A, et al. Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 151: 4197–4206, 2010.
50. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, et al. Insulin signaling in alpha

- cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 9: 350–361, 2009.
51. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144: 5149–5158, 2003.
 52. Maedler K, Carr RD, Bosco D, et al. Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 501–506, 2005.
 53. Kielgast U, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 on alpha- and beta-cell function in C-peptide-negative type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2492–2496, 2010.
 54. Kilimnik G, Kim A, Steiner DF, et al. Intra-islet production of GLP-1 by activation of prohormone convertase 1/3 in pancreatic alpha-cells in mouse models of beta-cell regeneration. *Islets* 2: 149–155, 2010.
 55. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802–1812, 2006.
 56. Thorel F, Nepote V, Avril I, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464: 1149–1154, 2010.
 57. Poitout V, Amyot J, Semache M, et al. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta* 1801: 289–298, 2010.
 58. Leibowitz G, Uckaya G, Oprescu AI, et al. Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure. *Endocrinology* 143: 3214–3220, 2002.

