

100 anni dopo l'insulina: cosa ancora non sappiamo della sua secrezione nel diabete di tipo 2

100 years after insulin: what is still unknown about its secretion in type 2 diabetes

Gianfranco Di Giuseppe, Teresa Mezza, Francesca Cinti e Andrea Giaccari

Centro per le Malattie Endocrine e Metaboliche, Fondazione Policlinico Universitario
"Agostino Gemelli" IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2201c>

ABSTRACT

β-cell dysfunction is a well-known feature of type 2 diabetes mellitus. In particular, it has been shown that defects in 1st phase insulin secretion play a fundamental role in the natural history of the disease. In this review, we highlight the clinical relevance of 1st phase impairment, focusing on its connection with post meal hyperglycemia and diabetic complications; we further evaluate possible therapeutic strategies aimed at improving β-cell secretory machinery and providing a durable control of the disease. In conclusion, we discuss the clinical relevance of C-Peptide sampling in detecting secretory defects.

KEYWORDS

Insulin secretion, C-Peptide, β-cell, differentiation, pathogenesis, type 2 diabetes.

INTRODUZIONE

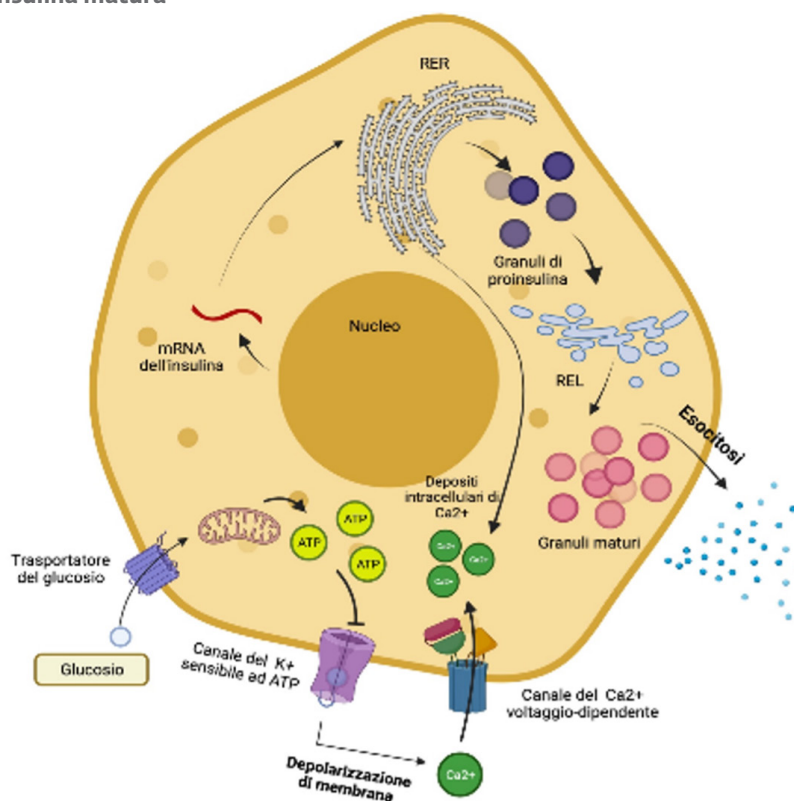
Il diabete mellito di tipo 2 (DMT2) è un disordine metabolico eterogeneo, caratterizzato da difetti della funzione β-cellulare e dalla ridotta risposta dei tessuti periferici target all'insulina. Tuttavia, la sola insulino-resistenza non è sufficiente a spiegare il declino metabolico che accompagna la comparsa del diabete. È stato dimostrato, infatti, che l'iperglicemia manifesta è associata anche al declino della funzione β-cellulare (1-2), nonché al malfunzionamento del complesso meccanismo a feedback che regola l'azione e la secrezione insu-

linica (3). In aggiunta, le evidenze provenienti dagli ultimi anni di ricerca scientifica dimostrano che anche la riduzione della massa β-cellulare funzionale rappresenta una caratteristica fondamentale della patogenesi del DMT2, ponendosi alla base dell'insufficienza assoluta o relativa di insulina (4). Nel complesso scenario fisiopatologico della genesi del DMT2, lo studio del timing e dell'interrelazione tra insulino-resistenza, secrezione insulinica, modificazioni della glicemia plasmatica, funzione e massa β-cellulare è tuttora argomento di studio: è ancora ampiamente dibattuto se il deficit di secrezione insulinica e la conseguente iperglicemia siano la risultante del deficit di funzione β-cellulare, della riduzione della massa e/o della combinazione di entrambi (5-7). SCOPO di questa rassegna è offrire un aggiornato resoconto sulla stretta interrelazione tra funzionalità β-cellulare e secrezione insulinica ed ambiente insulare, sottolineandone la rilevanza clinica e le conseguenti implicazioni diagnostico-terapeutiche nella gestione del DMT2.

SECREZIONE INSULINICA: MECCANISMI FISIOLGICI E DISFUNZIONALI

All'interno di un pancreas umano possono essere conteggiati svariati milioni di isole di Langerhans e ciascuna di esse contiene circa 2000 cellule endocrine ormono-secerenti. Gli ormoni prodotti dalle insule rivestono un im-

Figura 1 ♦ Schema generale della sintesi dell'insulina e della GSIS (*Glucose Stimulated Insulin Secretion*): l'insulina viene originariamente sintetizzata come proinsulina all'interno del RER (*Reticolo Endoplasmatico Rugoso*) ed immagazzinata in granuli che maturano all'interno del REL (*Reticolo Endoplasmatico Liscio*). L'entrata del glucosio attraverso il trasportatore GLUT2 ed il suo metabolismo intracellulare determinano aumento del rapporto ATP/ADP, con chiusura dei canali K^+_{ATP} e conseguente depolarizzazione di membrana e attivazione dei canali Ca^{2+} -voltage dipendenti. L'aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare determina la fusione dei granuli maturi con la membrana citoplasmatica e la conseguente esocitosi di insulina matura



portante ruolo nella regolazione dell'omeostasi metabolica: in particolare, l'azione complementare dell'insulina e del glucagone regola strettamente l'omeostasi glucidica nei mammiferi. L'insulina è un ormone anabolico la cui azione è responsabile dello storage di "carburante metabolico", in opposizione alla funzione catabolica del glucagone che promuove la mobilizzazione e l'ossidazione dei metaboliti immagazzinati (8). La secrezione insulinica ad opera delle β -cellule è fortemente stimolata dall'aumento delle concentrazioni di glucosio plasmatico in fase post-prandiale (GSIS, *Glucose Stimulated Insulin Secretion*) e potenziata dall'azione di peptidi, ormoni ed acidi grassi (FFAs, *Free Fatty Acids*) provenienti dal tratto gastrointestinale e dalle α -cellule: queste ultime, in risposta ai FFAs ed aminoacidi prodotti durante il digiuno, sono responsabili della secrezione di glucagone, la cui produzione è invece inibita dall'aumento delle concentrazioni di glucosio ed insulina. La somatostatina, prodotta dalle δ -cellule,

sopprime sia la secrezione di insulina che di glucagone (9-10). La rottura dell'omeostasi metabolica e l'alterazione dell'interazione tra questi due ormoni chiave sono difetti fondamentali nella genesi del DMT2, caratterizzato sia dall'incapacità delle β -cellule di rispondere all'aumento della richiesta insulinica dalla periferia, sia dall'aumento dei livelli circolanti di glucagone (8). Una disamina approfondita dei meccanismi fisiopatologici della secrezione insulinica e della correlazione tra essi e la funzione β -cellulare è necessaria per comprendere le ripercussioni cliniche sulla genesi e storia naturale del DMT2.

Fisiologia della β -cellula e della secrezione insulinica

Le β -cellule sono responsabili della produzione di insulina, sintetizzata inizialmente come pre-proinsulina. Durante il processo maturativo, la pre-proinsulina, a seguito di modificazioni conformazionali ad opera di peptidi del reticolo endoplasmatico (ER), viene convertita in proinsu-

lina. In seguito, la proinsulina viene trasportata dall'ER all'apparato di Golgi (GA), dove entra nelle vescicole secretorie immature e viene in seguito clivata in insulina e C-peptide. Una volta matura, è immagazzinata in granuli finché la secrezione è stimolata. Lo stimolo fisiologico principale per l'avvio ed il mantenimento della secrezione insulinica è l'aumento dei livelli circolanti di glucosio plasmatico che intercorre in fase post-prandiale (11): attraverso il trasportatore GLUT2, una proteina carrier implicata anche nel sensing del glucosio nella β -cellula, il glucosio entra in ambiente citoplasmatico e viene successivamente catabolizzato. Il risultato del catabolismo glucidico è l'aumento del rapporto ATP/ADP intracellulari che causa la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti (K^+_{ATP}); ciò porta alla depolarizzazione di membrana e all'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, con conseguente aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare che innesca la fusione dei granuli secretori preformati con la membrana citoplasmatica, con conseguente esocitosi dell'insulina (12) (Fig. 1).

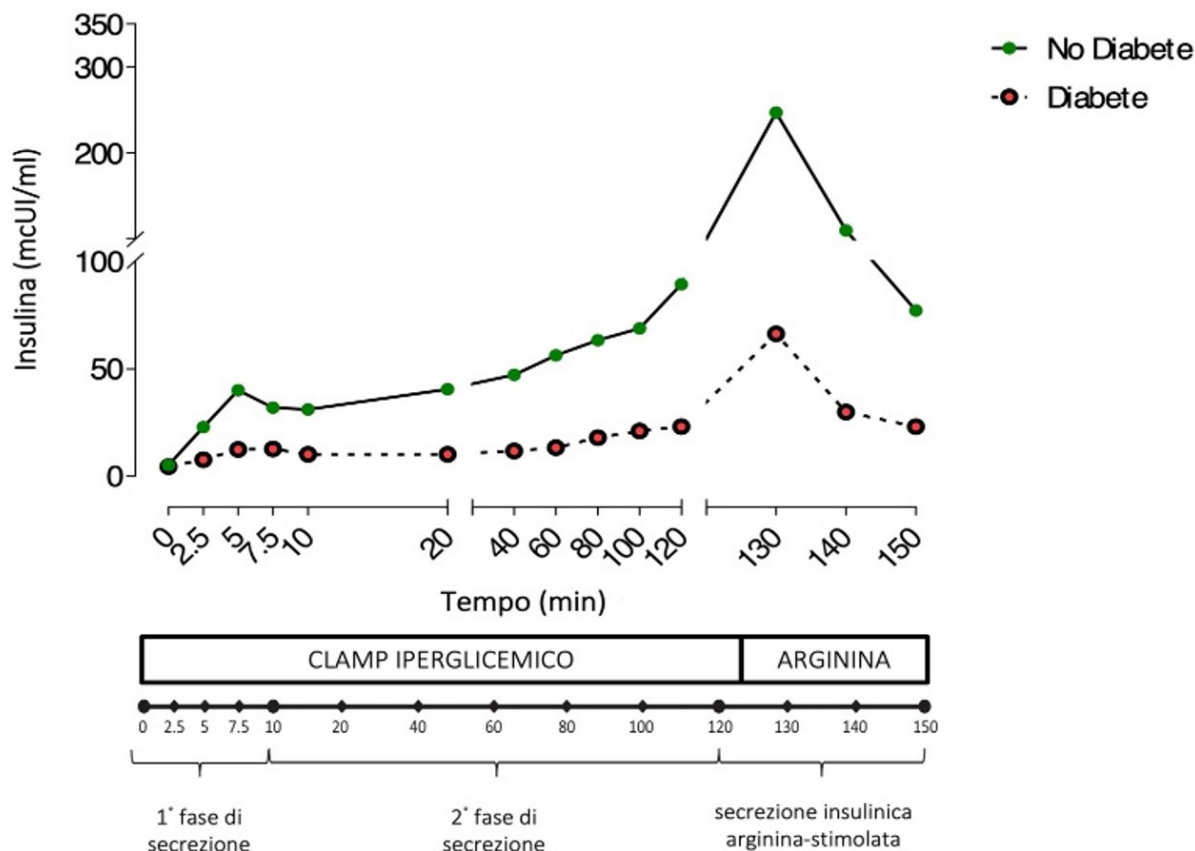
Tale pathway di secrezione, noto come *triggering pathway*, è largamente responsabile della cosiddetta “prima fase” di secrezione insulinica, caratterizzata da un rapido aumento ed in seguito da una rapida discesa del rate di secrezione che intercorre nei primi 10-20 minuti in seguito allo stimolo iperglicemico. Il pathway di secrezione temporaneamente successivo, denominato *amplifying pathway*, coinvolge una serie di stimoli secondari che permettono la prosecuzione della secrezione insulinica ad un rate più basso ma costante durante l'intera fase postprandiale per svariate ore. Tale pathway è attivato anche in presenza di concentrazioni massimali di Ca^{2+} intracellulare ed è largamente connesso a meccanismi indipendenti dai canali K^+_{ATP} (13). Questo periodo corrisponde alla “seconda fase” di secrezione insulinica, responsabile del continuo rilascio di un grande numero di granuli immagazzinati all'interno degli storage β -cellulari e della secrezione di circa il 60-70% di insulina in risposta ad uno stimolo iperglicemico sostenuto nel tempo (Fig. 2). La regolazione di questo pathway è fine e complessa: negli ultimi anni, lo studio dei meccanismi biochimici ha permesso di identificare numerosi amplificatori della GSIS, tra cui il metabolismo anaplerotico del piruvato ed il conseguente aumento del rapporto NADPH/NADP⁺ citosolici, i prodotti del ciclo dei pentoso-fosfati, il GTP di origine mitocondriale e i FFAs (8).

Nel contesto dei processi metabolici che regolano la secrezione insulinica, menzione particolare meritano i due ormoni GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) e GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1*). Essi sono i principali attori del cosiddetto “effetto incretinico”, responsabile di una maggiore secrezione insulinica in risposta ad un carico di glucosio orale rispetto ad una somministrazione endovenosa. Il GIP è secreto dalle cellule K situate nella mucosa duodenale e del digiuno superiore, mentre il GLP-1 è prodotto dalle cellule L localizzate prevalentemente nell'ileo. I due ormoni possono essere considerati segnali endocrini di provenienza intestinale diretti alle insule, finalizzati a modulare la secrezione di insulina e glucagone in maniera glucosio-dipendente (14). Le β -cellule posseggono, a livello della membrana cellulare, recettori per il GIP (GIPRs) e per il GLP-1 (GLP-1Rs) che, una volta stimolati dal legame col rispettivo ligando, attivano l'adenilato ciclasi provocando l'aumento delle concentrazioni di cAMP che a sua volta attiva la proteinchinasi A (PKA) (15). Tale pathway non è in grado di provocare il rilascio di granuli insulinici preformati in quanto solo l'iperglicemia può indurre la chiusura dei K^+_{ATP} e la successiva cascata metabolica necessaria per la fusione dei granuli con la membrana cellulare: per tali ragioni, l'azione insulinotropica delle incretine richiede necessariamente un effetto permissivo da parte dell'iperglicemia (16).

In aggiunta ai multipli meccanismi metabolici di signaling appena descritti, la secrezione insulinica è strettamente regolata dal crosstalk delle β -cellule con le altre cellule endocrine insulari, in particolare le α -cellule, tramite la secrezione dei peptidi derivati dal proglucagone (17-19). I segnali paracrini provenienti dalle altre cellule insulari governano la funzione β -cellulare tramite pathway di trasduzione del segnale che tipicamente convergono nell'aumento dei livelli di cAMP nelle β -cellule e nell'amplificazione della GSIS (8).

Nella maggior parte degli individui con alterata tolleranza glucidica (ICT, *Impaired Glucose Tolerance*) o diabete conclamato si osserva una riduzione della risposta insulinica precoce al glucosio (prima fase), laddove si assiste ad un enhancement della seconda fase (20-21): tali dati suggeriscono che un certo grado di disfunzione β -cellulare esista già allo stadio di prediabete e che il peggioramento dei difetti inerenti il complesso ingranaggio secretorio possano fortemente influenzare l'esordio e la storia naturale del DMT2.

Figura 2 ♦ Andamento medio della secrezione insulinica ottenuta durante infusione endovenosa continua di glucosio (clamp iperglicemico) e dopo stimolazione con 5 g di L-arginina in soggetti non diabetici (linea continua) e diabetici (linea tratteggiata). Si osserva che la prima e la seconda fase di secrezione insulinica e la secrezione insulinica arginina-stimolata sono ridotte nel gruppo dei diabetici



Il fallimento della β -cellula

Sebbene il declino della funzionalità insulinare sia stato tradizionalmente associato alla morte e alla riduzione della massa β -cellulare (22), le più recenti evidenze suggeriscono che tale processo caratteristico della storia naturale del DMT2 possa essere dovuto ad un complesso network di interazioni tra l'ambiente e differenti pattern molecolari (23). In uno stato di eccesso nutrizionale quale l'obesità spesso si riscontrano iperglicemia e dislipidemia, entrambi fattori favorevoli all'insulino-resistenza e la *low grade inflammation*. In queste circostanze, le β -cellule, con una certa variabilità individuale dovuta a diversi fattori di suscettibilità genetica, sono soggette a stimoli tossici tra cui l'infiammazione cronica, lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress), lo stress ossidativo e la deposizione di amiloide che hanno il potenziale di portare, in ultimo, alla completa perdita dell'integrità insulinare (22). L'eccesso

di FFAs e l'iperglicemia conducono alla disfunzione β -cellulare inducendo ER stress tramite l'attivazione del pathway pro-apoptotico UPR (*Unfolded Protein Response*). Lo stress metabolico derivante dalla lipo- e glucotossicità è in grado di attivare il pathway UPR attraverso numerosi meccanismi, tra cui: inibizione della pompa sarco/endoplasmatica SERCA, responsabile della mobilizzazione di ioni Ca^{2+} dall'ER; attivazione del recettore dell'inositolo trifosfato (IP_3); tossicità diretta sull'omeostasi dell'ER. La glucotossicità, inoltre, è stata inoltre ritenuta la causa di un nuovo meccanismo di fallimento β -cellulare descritto nel DMT2: la dedifferenziazione. Sembra infatti che le β -cellule, sottoposte ad uno stress cronico, scelgano la via della dedifferenziazione, un processo che permette loro di "spegnersi", ovvero di tornare ad uno stato di cellula progenitrice, in attesa di condizioni metaboliche più favorevoli per risvegliarsi (24-25). Il meccanismo attraverso

il quale viene indotta la dedifferenziazione non è ancora noto, ma dati recenti sembrano suggerire un coinvolgimento dell'innervazione noradrenergica. Un'aumentata innervazione noradrenergica è stata infatti descritta nelle isole di soggetti affetti da DMT2, in correlazione con un significativo aumento della percentuale di β -cellule dedifferenziate, suggerendo indirettamente un rapporto tra i due fenomeni (26-27).

In aggiunta, l'iperglicemia cronica causa l'aumento della sintesi di proinsulina e di polipeptide amiloide insulare (IAPP) nelle β -cellule, portando all'accumulo in esse di insulina "mal ripiegata" (*misfolded*), di IAPP e di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (28); questi eventi alterano la fisiologica mobilitazione di Ca^{2+} dall'ER, favoriscono i segnali proapoptotici e la degradazione degli mRNA della proinsulina, inducono il rilascio di interleuchina (IL)-1 β che richiama i macrofagi ed aumenta la flogosi insulare (23).

Come accennato precedentemente, è necessario che la secrezione insulinica sia finemente regolata per soddisfare precisamente la domanda metabolica. Per tale ragione, la corretta integrità insulare deve essere conservata per permettere alle β -cellule di soddisfare il fabbisogno metabolico. In condizioni patologiche, tuttavia, i meccanismi appena descritti possono portare alla rottura dell'integrità e dell'organizzazione insulare e contribuire all'inefficiente regolazione della secrezione di insulina e glucagone, determinando l'iperglicemia. Anche l'aumento delle concentrazioni sieriche di proinsulina e, conseguentemente, del rapporto proinsulina-insulina è un difetto ben noto nel DMT2, tanto che l'alterata secrezione di proinsulina è stata individuata come marker di disfunzione β -cellulare (29). Tali difetti della sintesi dei precursori dell'insulina o dell'insulina stessa, assieme all'alterazione dei meccanismi secretori, possono portare infine ad una alterata secrezione insulinica, espressione della disfunzione β -cellulare e cardine dell'insorgenza e progressione del DMT2 (11).

NUOVE PROSPETTIVE SULLA SECREZIONE INSULINICA E FUNZIONALITÀ β -CELLULARE: IL MODELLO DELLA PANCREASECTOMIA PARZIALE

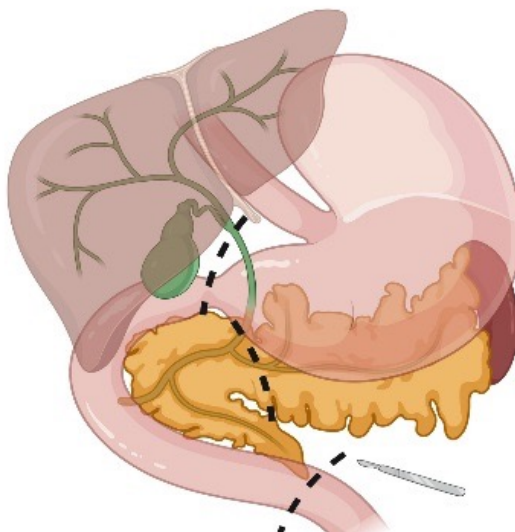
Nonostante sia ben stabilito che il DMT2 sia la risultante della progressiva perdita di secrezione insulinica da parte delle β -cellule su un background di insulino-resi-

stenza, l'attuale correlazione tra perdita di massa e funzione β -cellulare è ancora ampiamente dibattuta. Una delle maggiori sfide nell'identificare i pathways che regolano l'omeostasi insulare e, di conseguenza, la funzione β -cellulare è la difficoltà di ottenere campioni di tessuto umano di qualità appropriata per i processi di analisi; in aggiunta, nella maggior parte dei casi, tali campioni derivano da donatori deceduti, in assenza di un adeguato profilo metabolico ed ormonale.

Negli ultimi anni il nostro ed altri gruppi di ricerca (30) hanno sfruttato l'opportunità di ottenere biopsie pancreatiche da campioni chirurgici di pazienti sottoposti a pancreasectomia parziale. Questo modello di studio ci ha permesso di esaminare a fondo la morfologia insulare di individui studiati nel dettaglio dal punto di vista metabolico. Inoltre, la chirurgia stessa è diventata un nuovo modello per studiare gli adattamenti metabolici conseguenti alla rimozione acuta della massa β -cellulare. La duodenocefalopancreasectomia, infatti, è una procedura chirurgica che comprende l'asportazione in blocco della testa del pancreas, del duodeno, del dotto biliare comune, della colecisti e dei linfonodi loco-regionali, con mantenimento del piloro allo sbocco gastrico (Fig. 3).

La continuità del tratto gastrointestinale è successivamente restituita mediante il confezionamento di diverse anastomosi (pancreatico-digiunale, epatico-digiunale, gastro-enterica e/o gastro-digiunale) (31). Per ragioni anatomiche (la testa-corpo del pancreas è vascolarizzata da rami provenienti dall'arteria gastroduodenale, mentre la coda è vascolarizzata da rami dell'arteria splenica), tutti i pazienti sottoposti a tale procedura chirurgica subiscono virtualmente la medesima resezione parziale ($\approx 50\%$), mantenendo all'incirca la stessa porzione di pancreas endocrino residuo. Per tali motivi, la pancreasectomia parziale può essere considerata un "modello umano" che ci ha permesso di esaminare: 1) le conseguenze metaboliche della rimozione acuta del $\approx 50\%$ della massa insulare; 2) gli effetti dell'aumentato workload β -cellulare sul $\approx 50\%$ massa insulare residua; 3) il rapporto tra deficit di massa e deficit secretorio β -cellulare ed il loro rispettivo peso nella patogenesi del DMT2 (29, 32). Ciò è stato possibile grazie ad un'analisi metabolica approfondita a cui abbiamo sottoposto i pazienti prima e dopo l'intervento chirurgico e che constava dei seguenti test metabolici dinamici: 1) test di tolleranza orale al glucosio (OGTT, *Oral Glucose Tolerance Test*), gold standard per la diagnosi di IGT e di

Figura 3 ♦ **Tecnica chirurgica di duodenocefalopancreasectomia.** Le linee tratteggiate corrispondono schematicamente ai margini di resezione e delimitano le strutture rimosse in blocco (testa del pancreas, colecisti e via biliare comune, duodeno).



diabete mellito; 2) clamp euglicemico iperinsulinemico (EHC, *Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp*), gold standard per lo studio dell'insulino-resistenza; 3) clamp iperglicemico (HC, *Hyperglycemic Clamp*) con stimolazione all'arginina, gold standard per lo studio delle fasi di secrezione insulinica e misura indiretta di massa β -cellulare; 4) test del pasto misto (MMT, *Mixed Meal Test*), utile per quantificare la risposta insulare all'aumentata richiesta β -cellulare e per lo studio dell'effetto incretinico. I dati ottenuti, di cui offriamo una trattazione sintetica di seguito, ci hanno permesso di fare luce sulla complessa interrelazione tra insulino-resistenza e meccanismi adattativi insulari che permettono una secrezione insulinica efficace rispetto all'aumentata domanda periferica, nonché di approfondire e chiarire i meccanismi sottostanti il deficit β -cellulare ed il loro contributo nell'insorgenza e progressione del DMT2.

All'origine dell'iperinsulinemia compensatoria: ruolo della plasticità insulare

Una caratteristica dimostrata sia nei roditori (33-34) che negli umani (35-37) è l'abilità del pancreas di compensare all'insulino-resistenza tramite un aumento della massa β -cellulare ed un aumento della secrezione insulinica. Infatti, la massa β -cellulare è dinamica e capace di adattarsi a condizioni fisiologiche e patologiche per mante-

nere la normoglicemia (38-40). Studi precedenti suggeriscono che il numero e la massa delle β -cellule aumentano in risposta all'obesità (38), ma non vengono chiarite le tempistiche né l'origine delle nuove β -cellule.

Per valutare i cambiamenti nella morfologia insulare e far luce sui meccanismi alla base dell'aumentata secrezione insulinica in risposta all'insulino-resistenza rispetto all'insulino-sensibilità, abbiamo studiato pazienti non diabetici in lista per duodenocefalopancreasectomia e li abbiamo divisi in insulino-sensibili (IS) ed insulino-resistenti (IR) sulla base dei valori ottenuti al clamp euglicemico prima dell'intervento chirurgico; abbiamo inoltre effettuato analisi immunoistochimiche sulle sezioni di pancreas rimosse durante la chirurgia. Nelle insule degli IR rispetto agli IS abbiamo riscontrato un aumento della dimensione media delle insule; la dimensione media delle insule, inoltre, correlava inversamente col valore di glucose uptake (indice di insulino-sensibilità) nell'intera coorte (41). In aggiunta, abbiamo dimostrato che l'aumento della dimensione delle insule è verosimilmente dovuta ad un aumento del numero delle β -cellule (iperplasia) e che le β -cellule degli IR rappresentavano una popolazione di cellule relativamente giovani. Abbiamo inoltre ipotizzato che il meccanismo principale dell'iperplasia β -cellulare negli IR è la neogenesi, piuttosto che la proliferazione (41) e poiché studi precedenti

avevano riportato la potenziale nascita di nuove β -cellule a partire da cellule duttali, abbiamo dimostrato la presenza di cellule doppio-positive per CK19 (marker duttale) ed insulina, con una percentuale media maggiore negli IR. In aggiunta, sulla base di precedenti studi che proponevano la trans-differenziazione delle α -cellule come sorgente di nuove β -cellule, abbiamo dimostrato la presenza all'immunostaining di cellule doppio-positive per insulina e glucagone, con una percentuale media maggiore negli IR.

I nostri dati confermano l'impatto dell'insulino-resistenza sulla morfologia insulare ed in particolare sull'aumento dell'area β -cellulare come meccanismo per compensare l'aumentata richiesta insulinica e permettere una secrezione efficace rispetto al fabbisogno metabolico.

Difetti precoci di secrezione: il ruolo dell'aumentato workload β -cellulare

Come accennato precedentemente, il DMT2 è caratterizzato da elevati livelli plasmatici di proinsulina e, di conseguenza, da un aumento del rapporto proinsulina-insulina: una delle ipotesi a riguardo è che l'aumento della domanda secretoria sulle β -cellule causata dall'insulino-resistenza e l'iperglicemia determinino il rilascio di granuli con un maggior contenuto relativo di proinsulina e mediatori di essa. Inoltre, è stato dimostrato che un elevato rapporto proinsulina-insulina è fortemente correlato col grado di riduzione della capacità secretoria (42).

Per indagare la correlazione tra l'iperproinsulinemia e l'aumento della domanda secretoria, abbiamo studiato pazienti non diabetici in lista per duodenocefalopancreasectomia e li abbiamo sottoposti a EHC, HC e MMT prima e dopo la chirurgia. Come atteso, abbiamo riscontrato una significativa diminuzione del rate di secrezione insulinica basale (ISR, *Insulin Secretion Rate*) e totale, della β CGS (β -Cell Glucose Sensitivity, indice di funzione β -cellulare) e della secrezione insulinica arginina-dipendente calcolata al HC (misura indiretta di massa β -cellulare) dopo l'intervento chirurgico. Correggendo tali parametri nel post-operatorio per la secrezione insulinica arginina-dipendente, abbiamo dimostrato l'aumentato workload secretorio sul $\approx 50\%$ di massa β -cellulare residua (29).

Abbiamo successivamente dimostrato che la pancreasectomia induce un aumento del rapporto proinsulina-insulina nell'intera coorte, ma, dividendo i soggetti in insulino-sensibili ed insulino-resistenti, abbiamo sco-

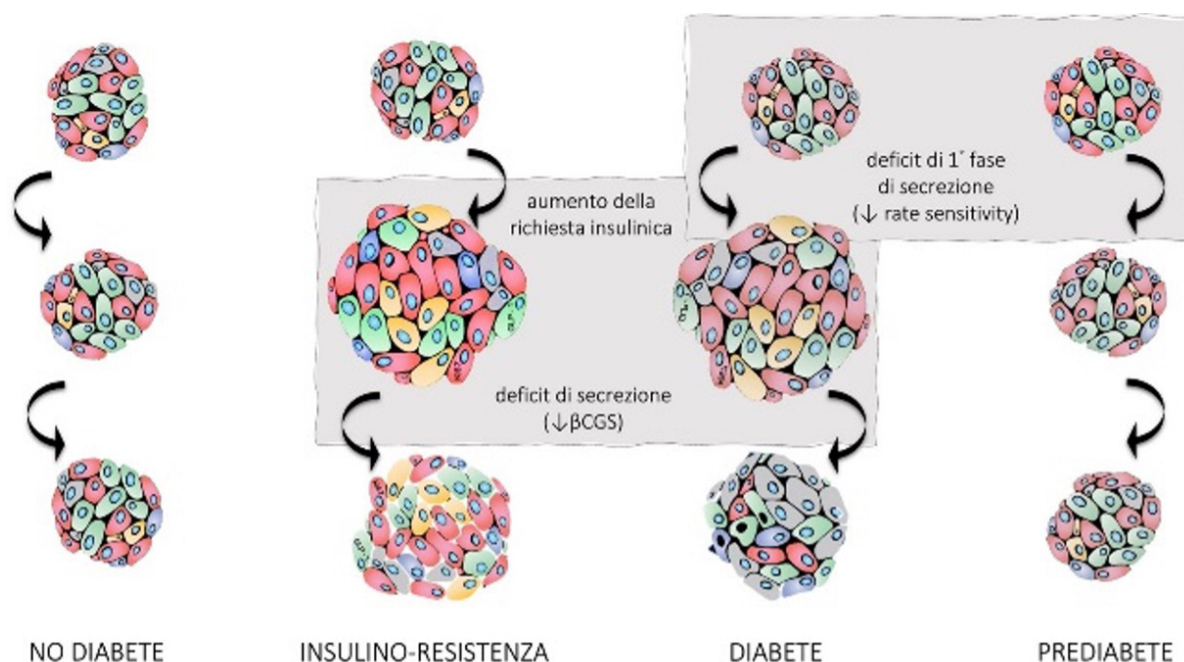
perto che gli insulino-sensibili mostravano una riduzione del rapporto proinsulina-insulina basale, laddove gli insulino-resistenti mostravano un aumento del rapporto del rapporto proinsulina-insulina basale e totale. Abbiamo inoltre dimostrato una correlazione inversa tra il valore di glucose uptake (indice di insulino-sensibilità) e il rapporto proinsulina-insulina basale e totale.

I nostri dati dimostrano che l'aumentato workload β -cellulare provocato dalla pancreasectomia altera i processi di secrezione insulinica (rapporto proinsulina-insulina) e tali difetti diventano evidenti soprattutto in presenza di insulino-resistenza.

All'origine del diabete: un problema di "fase"?

La disfunzione e la perdita di massa β -cellulare contribuiscono entrambi alla patogenesi dell'iperglicemia nel DMT2. Tuttavia, da una parte alcuni studi suggeriscono che la perdita di massa β -cellulare avvenga prima dell'alterazione funzionale, dall'altra vi sono evidenze che in realtà la perdita di massa predisponga ad un'alterata omeostasi glucidica (32). Partendo da tali presupposti, abbiamo studiato soggetti non diabetici in lista per duodenocefalopancreasectomia e li abbiamo sottoposti a OGTT, HC e MMT prima e dopo l'intervento chirurgico per valutare i cambiamenti nella capacità secretoria β -cellulare e per indagare se i difetti secretori preesistenti possano predire eventuali disordini glucidici dopo una riduzione acuta della massa β -cellulare. Abbiamo suddiviso i pazienti sulla base della tolleranza glucidica post-intervento in post-NGT (pazienti che rimanevano con normale tolleranza glucidica) post-IGT (pazienti che mostravano alterata tolleranza glucidica) e post-DM (pazienti che diventavano diabetici): tutti sperimentavano una riduzione della β CGS dopo la chirurgia ma confrontando tali dati con quelli preoperatori abbiamo scoperto che il peggioramento della β CGS era significativamente più marcato in chi risultava IGT o diabetico dopo chirurgia rispetto a chi preservava la normale tolleranza glucidica. Abbiamo inoltre riscontrato una riduzione della rate sensitivity (indice di prima fase di secrezione insulinica) già nel preoperatorio nei post-IGT mentre, dopo la chirurgia, abbiamo osservato una differenza significativa nella rate sensitivity nei 3 gruppi. Questo dato ha evidenziato come il deficit della prima fase di secrezione è presente già in condizioni di prediabete e predice alterazioni del metabolismo glucidico dopo rimozione acuta

Figura 3 ♦ Dall'alto verso il basso vengono descritti i possibili scenari di storia naturale delle modifiche della secrezione di insulina. Rispetto al NO DIABETE, la presenza di INSULINO-RESISTENZA determina un aumento della richiesta insulinica, con un conseguente deficit di secrezione (glucose sensitivity) tuttavia non sufficiente a determinare diabete franco. Solo il deficit di prima fase, se accompagnato da una condizione di insulino-resistenza e deficit di glucose sensitivity, determina DIABETE franco. Il solo deficit di prima fase, senza insulino-resistenza, può non essere sufficiente a determinare franca iperglicemia ma solo PREDIABETE



della massa β -cellulare. Inoltre, utilizzando modellistica matematica sui dati ottenuti dal clamp iperglicemico, gold standard per la valutazione della secrezione insulinica, abbiamo confermato che la prima fase di secrezione risultava già alterata prima della chirurgia e si riduceva ulteriormente e in maniera diversa nei 3 gruppi in seguito a chirurgia, mentre la seconda fase era simile nei tre gruppi prima della pancreasectomia, sebbene differisse significativamente dopo chirurgia.

Il nostro studio dimostra che difetti preesistenti nella funzione β -cellulare in soggetti non diabetici predicono il rischio di sviluppare iperglicemia dopo la pancreasectomia parziale, un modello di riduzione acuta di massa β -cellulare. Solo i soggetti con un deficit di prima fase di secrezione ed una ridotta β CGS diventano diabetici o sviluppano alterata tolleranza glucidica dopo la chirurgia, suggerendo che tali difetti preesistenti del meccanismo di secrezione delle β -cellule potrebbero essere motore dello sviluppo di iperglicemia. In particolare, abbiamo dimostrato che i soggetti con maggiore β CGS e ISR di prima fase rimangono NGT nonostante la perdita del $\approx 50\%$

di massa β -cellulare e la riduzione della secrezione insulinica di prima e seconda fase; di contro i soggetti con minore β CGS e ISR di prima fase diventano IGT, ma solo i soggetti con ridotta β CGS, ISR di prima fase e, soprattutto, rate sensitivity sviluppano diabete dopo la chirurgia. Tale riscontro dimostra l'ipotesi che la perdita della prima fase di secrezione insulinica è il difetto chiave nello sviluppo di iperglicemia quando la massa insulare funzionale è insufficiente.

In sintesi, i nostri studi dimostrano la straordinaria plasticità delle insule e delle cellule esocrine pancreatiche in risposta all'aumentata richiesta di insulina nel tentativo di garantire una secrezione insulinica efficace rispetto all'aumentata richiesta metabolica nello stato di prediabete. Abbiamo infine dimostrato che il deficit di prima fase di secrezione e la riduzione della β CGS potrebbero essere delle alterazioni precoci in grado di predire la diagnosi di DMT2 (Fig. 4).

DALLA TEORIA ALLA PRATICA: CONSIDERAZIONI CLINICHE E TERAPEUTICHE SUL DEFICIT DI PRIMA FASE

Nonostante numerosi fattori (es. insulino-resistenza, mancata soppressione del glucagone endogeno e persistenza di elevati livelli di FFAs durante i pasti eCc.) possano influenzare le escursioni glicemiche prandiali, è ormai ben noto che il denominatore comune dell'iperglicemia postprandiale può essere riconosciuto nel deficit di prima fase di secrezione (43). È stata dimostrata una forte correlazione inversa tra efficacia della prima fase di secrezione insulinica ed incremento glicemico iniziale durante somministrazione di glucosio e.v. (44); altra correlazione inversa è stata osservata tra i livelli di insulina rilevati a 30' dal carico orale di glucosio e la glicemia a 2 h (45), a dimostrazione del fatto che una efficace prima fase di secrezione insulinica impatta positivamente sulla tolleranza glucidica garantendo livelli di glucosio postprandiale più fisiologici. È stato inoltre dimostrato sia su modelli animali che umani che l'insulina rilasciata in prima fase agisce in prima battuta a livello epatico, inibendo prontamente la produzione endogena di glucosio ed evitando i picchi glicemici postprandiali. Nel DMT2 nello specifico, il deficit di prima fase è una delle più precoci e comuni anomalie a determinare un ruolo patogenetico sulle escursioni glicemiche postprandiali. Inoltre, è stato osservato che l'iperglicemia postprandiale sembra essere correlata alla risposta tissutale che potrebbe essere alla base dello sviluppo di complicanze macro- e microangiopatiche attraverso meccanismi quali: aumento del filtrato glomerulare e del flusso renale; aumento del flusso ematico a livello retinico; riduzione della velocità di conduzione a livello delle terminazioni nervose sensitive e motorie; disfunzione endoteliale NO-mediata; stato procoagulativo; aumento delle proteine di adesione; stress ossidativo; glicazione non enzimatica delle proteine (43). Altri numerosi studi (46-50) hanno dimostrato una correlazione diretta tra iperglicemia postprandiale ed incremento della mortalità cardiovascolare, in maniera indipendente rispetto ai valori di glicemia a digiuno.

Considerando che l'iperglicemia postprandiale è una caratteristica precoce di numerosi pazienti all'esordio del DMT2, appare evidente che la normalizzazione dei valori di glicemia postprandiale dovrebbe essere considerato

un importante obiettivo terapeutico all'interno di una terapia personalizzata già nelle prime fasi di malattia. Sebbene l'utilizzo della terapia con sulfaniluree, largamente prescritta negli ultimi 30 anni, sia stato progressivamente abbandonato nella pratica clinica per l'entità degli effetti collaterali (ipoglicemia, aumento di peso) e per la scarsa safety cardiovascolare, è noto il suo effetto stimolatorio sulla secrezione insulinica in pazienti con DMT2; in particolare, i derivati dell'acido benzoico (glinidi) hanno dimostrato di ridurre le escursioni glicemiche postprandiali tramite uno stimolo secretorio che "simula" la prima fase di secrezione (43).

I DPP4-inibitori, che rappresentano un possibile approccio terapeutico per la gestione del DMT2, hanno dimostrato effetti benefici sulla prima fase di secrezione insulinica: in particolare, vildagliptin ha dimostrato di migliorare significativamente la risposta insulinica di prima fase dopo 3 mesi di trattamento sia in pazienti diabetici (51) che con alterata tolleranza al glucosio dopo 6 settimane di trattamento (52), a dimostrazione che il trattamento con vildagliptin provoca l'aumento dei livelli di GIP, potenziando la secrezione insulinica. Successivi studi hanno dimostrato la durability di vildagliptin, in particolare in associazione alla metformina, in pazienti con neodiagnosi di DMT2 nel garantire benefici a lungo termine nel controllo glicemico rispetto alla metformina in monoterapia (53). Questi dati suggeriscono che i DPP4-inibitori hanno la capacità di migliorare parzialmente la disfunzione β -cellulare agendo in primis sul deficit di prima fase di secrezione tramite un meccanismo passante per il potenziamento dell'effetto incretinico deficitario e della secrezione insulinica GIP/GLP1-dipendente. A riguardo, già nel 1992, Nathan et al. (54) avevano dimostrato che un'infusione della durata di 30' di GLP-1 provocava un aumento della secrezione insulinica in fase prandiale: come atteso, l'aumento precoce delle concentrazioni ematiche di insulina durante l'infusione riduceva il picco iperglicemico postprandiale. L'effetto sul controllo delle glicemie postprandiali perdurava anche dopo l'interruzione dell'infusione di GLP-1, a dimostrazione del fatto che la modulazione precoce dell'iperglicemia postprandiale può produrre un miglioramento complessivo del metabolismo glucidico anche in assenza di ridotti livelli di insulina plasmatica. Al giorno d'oggi, gli agonisti recettoriali del GLP-1 (GLP-1 RAs, *GLP-1 Receptor Agonists*) sono largamente utilizzati nella gestione terapeutica del

DMT2. I GLP-1 RAs hanno dimostrato numerosi effetti benefici sulla funzionalità β -cellulare, garantendo agli individui affetti da DMT2 un controllo glicemico duraturo e prevenendo la glico-lipotossicità (55-56). In particolare, la somministrazione giornaliera di liraglutide ha prodotto, in confronto al placebo, un incremento della prima e seconda fase di secrezione insulinica, un aumento della secrezione insulinica arginina-stimolata (57-59) nonché un aumento dell'HOMA-B, dei livelli di C-peptide ed una riduzione del rapporto proinsulina-insulina, a dimostrazione del beneficio già a livello dei processi cellulari che regolano la funzione secretiva delle β -cellule (60). In accordo con tali dati, un recente studio (61) ha dimostrato che la somministrazione settimanale di semaglutide, rispetto al placebo, migliora significativamente il controllo glicemico e la funzionalità β -cellulare dei soggetti trattati, impattando positivamente su tutti i parametri di funzionalità insulare, incluse l'aumento della prima e seconda fase di secrezione insulinica e riducendo le concentrazioni di glucagone e glicemia a digiuno e postprandiali.

In sintesi, è possibile affermare che i meccanismi molecolari precedentemente elencati che concorrono alla genesi della disfunzione β -cellulare, ed in particolare del deficit di prima fase di secrezione, hanno una diretta ripercussione sulla clinica del DMT2 già nelle prime fasi della sua storia naturale, in particolare sull'iperglicemia postprandiale che correla direttamente con l'insorgenza delle complicanze tipiche della malattia. Partendo da tali presupposti, appare evidente che trattamenti farmacologici mirati al miglioramento ed al ripristino della prima fase di secrezione possano sensibilmente modificare la storia naturale della patologia: all'interno di questo scenario, le classi farmacologiche DPP4-inibitori e GLP-1RAs hanno dimostrato effetti benefici diretti sulla prima fase di secrezione, seppur in mancanza di dati robusti inerenti la durability.

SECREZIONE INSULINICA E C-PEPTIDE: DUE FACCE DELLA STESSA MEDAGLIA?

Partendo da questi presupposti, appare evidente che identificare eventuali difetti primitivi della funzione β -cellulare in individui a rischio o con neodiagnosi di DMT2 potrebbe essere una strategia valida per indirizza-

re i processi clinici decisionali al fine di ripristinare precocemente la funzionalità β -cellulare residua.

Sin dalla scoperta della proinsulina, il dosaggio del C-peptide plasmatico ed urinario è stato utilizzato per svariati anni come biomarker di disfunzione β -cellulare poiché è secreto in quantità equimolare con l'insulina ma non viene processato a livello epatico. Come dimostrano i nostri studi, il C-peptide può essere utilizzato, attraverso opportuna modellistica matematica, per studiare la capacità secretoria insulinica endogena ma, in un setting prettamente clinico, l'utilità del dosaggio del C-peptide è tuttora dibattuta. L'utilizzo di test di stimolazione con dosaggio del C-peptide è attualmente considerato il gold-standard nello studio della secrezione insulinica (62), in quanto permette di valutare i cambiamenti dinamici della risposta β -cellulare allo stimolo provocativo.

Il test al glucagone (GST, *Glucagon Stimulation Test*), il test all'arginina, il MMT e l'OGTT sono considerati oramai test validati per la stima della capacità secretiva residua in individui affetti da diabete autoimmune (63), sebbene numerosi fattori confondenti (es. i valori di glucosio plasmatico ed in particolare l'ipoglicemia, il differente effetto incretinico, l'insulino-resistenza e la funzionalità renale, la presenza di iperglicemia già prima dello stimolo con conseguente gluco-tossicità) debbano essere considerati nell'interpretazione dei risultati. È importante considerare che i valori di C-peptide rilevati sotto stimolo dipendono dalla natura dello stimolo stesso (es. somministrazione e.v. di glucagone vs pasto); inoltre, un recente studio ha dimostrato una maggiore validità e ripetibilità del test di stimolazione all'arginina rispetto al test al glucagone per la valutazione della funzionalità β -cellulare residua (64). Rispetto ai test di provocazione, il dosaggio del C-peptide a digiuno è espressione della risposta statica delle β -cellule ai valori di glucosio plasmatici, laddove il C-peptide "random" (non a digiuno) risente primariamente dell'effetto incretinico del pasto precedente. Rispetto ai test di stimolazione, le misurazioni a digiuno e random sono più facilmente utilizzabili in pratica clinica poiché più economiche e meglio tollerate dai pazienti.

Ad oggi, l'utilizzo del C-peptide per indirizzare le decisioni cliniche nella gestione del DMT2 è ostacolato dalla mancanza di evidenze che mostrino un chiaro beneficio del dosaggio del C-peptide in termini di valutazione del

rischio e risposta alla terapia. Come discusso precedentemente, nella storia naturale del DMT2 è presente una fase prodromica caratterizzata da iperinsulinemia in risposta all'insulino-resistenza che precede il declino funzionale β -cellulare: in questa fase livelli elevati di C-peptide sono associati ad un maggior rischio di progressione verso il diabete manifesto, con una relazione più forte rispetto ai soli livelli di insulina (65-66): da ciò si evince che il solo utilizzo del C-peptide per la stima della funzione β -cellulare nel DMT2 può essere fortemente influenzato dalla concomitante insulino-resistenza e pertanto fuorviante per le decisioni cliniche. In generale, la maggior parte dei potenziali utilizzi clinici del C-peptide nel DMT2 sono solo ipotetici: ad oggi, non esistono evidenze sull'utilizzo del C-peptide nella pratica clinica se non sotto stimolazione e con opportuna modellistica matematica. Studi clinici futuri saranno necessari per chiarire l'utilità del C-peptide nella diagnostica differenziale del diabete e nel processo clinico di decision making; sarà inoltre necessario valutare ed eventualmente stabilire, mediante un approccio di medicina di precisione, chiari cut-off del C-peptide che possano trovare un utilizzo clinico efficace.

CONCLUSIONI

I dati presentati in questa rassegna confermano l'importanza della disfunzione β -cellulare e dell'alterazione dei meccanismi secretivi nella patogenesi e successiva evoluzione del DMT2. Utilizzando la pancreasectomia parziale come modello, abbiamo dimostrato come l'aumentato workload β -cellulare provochi già alterazioni dei fisiologici meccanismi di secrezione (aumento del rapporto proinsulina-insulina) e come difetti funzionali preesistenti – in particolare il deficit di prima fase – giochino un importante ruolo predittivo sull'insorgenza del DMT2 in pazienti non diabetici sottoposti alla medesima riduzione quantitativa di massa insulare.

Enfatizziamo la rilevanza clinica del deficit di prima fase nella storia naturale del DMT2, la connessione con l'iperglicemia postprandiale e le conseguenze di quest'ultima sull'omeostasi metabolica.

Studi futuri saranno necessari per individuare un marker precoce capace di rilevare difetti secretori precoci, allo scopo di intervenire sui pazienti a rischio migliorando precocemente la funzionalità β -cellulare e bloccando

o rallentando all'origine la discesa verso il deficit relativo ed assoluto di insulina.

BIBLIOGRAFIA

1. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15(3): 318-68, 1992.
2. Lillioja S, Mott DM, Howard BV, Bennett PH, Yki-Järvinen H, Freymond D, et al. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N Engl J Med* 318(19): 1217-25, 1988.
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365(9467): 1333-46, 2005.
4. Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47(3): 581-9, 2004.
5. Li L, Krznar P, Erban A, Agazzi A, Martin-Levilain J, Supale S, et al. Metabolomics Identifies a Biomarker Revealing In Vivo Loss of Functional β -Cell Mass Before Diabetes Onset. *Diabetes* 68(12): 2272-86, 2019.
6. Taylor R, Al-Mrabeh A, Sattar N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7(9): 726-36, 2019.
7. Weir GC, Gaglia J, Bonner-Weir S. Inadequate β -cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8(3): 249-56, 2020.
8. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(2): 142-58, 2021.
9. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179(4068): 77-9, 1973.
10. Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 14(7): 404-14, 2018.
11. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebara S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 21(17), 2020.
12. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9(1): 25-53, 2013.

13. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52(5): 739-51, 2009.
14. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 20(Suppl 1):5-21, 2018.
15. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(2): E199-206, 2004.
16. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1239-46, 2002.
17. Capozzi ME, Svendsen B, Encisco SE, Lewandowski SL, Martin MD, Lin H, et al. β Cell tone is defined by proglucagon peptides through cAMP signaling. *JCI Insight* 4(5), 2019.
18. Svendsen B, Larsen O, Gabe MBN, Christiansen CB, Rosenkilde MM, Drucker DJ, et al. Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Signaling. *Cell Rep* 25(5): 1127-34.e2, 2018.
19. Zhu L, Dattaroy D, Pham J, Wang L, Barella LF, Cui Y, et al. Intra-islet glucagon signaling is critical for maintaining glucose homeostasis. *JCI Insight* 5, 2019.
20. Pigon J, Giacca A, Ostenson CG, Lam L, Vranic M, Efendic S. Normal hepatic insulin sensitivity in lean, mild noninsulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81(10): 3702-8, 1996.
21. Polonsky KS. Evolution of beta-cell dysfunction in impaired glucose tolerance and diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 Suppl 4:S124-7, 1999.
22. Christensen AA, Gannon M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 19(9): 81, 2019.
23. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care* 37(6): 1751-8, 2014.
24. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of beta-Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101(3): 1044-54, 2016.
25. Accili D, Talchai SC, Kim-Muller JY, Cinti F, Ishida E, Ordelheide AM, et al. When beta-cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes Obes Metab* 18(Suppl 1): 117-22, 2016.
26. Cinti F, Mezza T, Severi I, Suleiman M, Cefalo CMA, Sorice GP, et al. Noradrenergic fibers are associated with beta-cell dedifferentiation and impaired beta-cell function in humans. *Metabolism* 114: 154414, 2021.
27. Hampton RF, Jimenez-Gonzalez M, Stanley SA. Unraveling innervation of pancreatic islets. *Diabetologia* 2022.
28. Yamamoto WR, Bone RN, Sohn P, Syed F, Reissaus CA, Mosley AL, et al. Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell. *J Biol Chem* 294(1): 168-81, 2019.
29. Mezza T, Ferraro PM, Sun VA, Moffa S, Cefalo CMA, Quero G, et al. Increased β -Cell Workload Modulates Proinsulin-to-Insulin Ratio in Humans. *Diabetes* 67(11): 2389-96, 2018.
30. Mezza T, Cefalo CMA, Cinti F, Quero G, Pontecorvi A, Alfieri S, et al. Endocrine and Metabolic Insights from Pancreatic Surgery. *Trends Endocrinol Metab* 31(10): 760-72, 2020.
31. Traverso LW, Longmire WP. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy a follow-up evaluation. *Ann Surg* 192(3): 306-10, 1980.
32. Mezza T, Ferraro PM, Di Giuseppe G, Moffa S, Cefalo CM, Cinti F, et al. Pancreaticoduodenectomy model demonstrates a fundamental role of dysfunctional β cells in predicting diabetes. *J Clin Invest* 131(12), 2021.
33. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47(3): 358-64, 1998.
34. Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88(4): 561-72, 1997.
35. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2300-8, 2003.
36. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1): 102-10, 2003.
37. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion

- and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81(2): 435-41, 1988.
38. Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, Rizza RA, Butler PC. β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care* 36(1): 111-7, 2013.
 39. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* 53(10): 2167-76, 2010.
 40. Patti ME, McMahon G, Mun EC, Bitton A, Holst JJ, Goldsmith J, et al. Severe hypoglycaemia post-gastric bypass requiring partial pancreatectomy: evidence for inappropriate insulin secretion and pancreatic islet hyperplasia. *Diabetologia* 48(11): 2236-40, 2005.
 41. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Clemente G, Hu J, Pontecorvi A, et al. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. *Diabetes* 63(3): 994-1007, 2014.
 42. Røder ME, Porte D, Schwartz RS, Kahn SE. Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2): 604-8, 1998.
 43. Del Prato S, Tiengo A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 17(3): 164-74, 2001.
 44. Bruce DG, Storlien LH, Furler SM, Chisholm DJ. Cephalic phase metabolic responses in normal weight adults. *Metabolism* 36(8): 721-5, 1987.
 45. Mitrakou A, Kelley D, Mookan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 326(1): 22-9, 1992.
 46. Donahue RP, Abbott RD, Reed DM, Yano K. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. Honolulu Heart Program. *Diabetes* 36(6): 689-92, 1987.
 47. Lowe LP, Liu K, Greenland P, Metzger BE, Dyer AR, Stamler J. Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men. The Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study. *Diabetes Care* 20(2): 163-9, 1997.
 48. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. *European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet* 354(9179): 617-21, 1999.
 49. Barzilay JI, Spiekerman CF, Wahl PW, Kuller LH, Cushman M, Furberg CD, et al. Cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: comparison of American Diabetes Association criteria for diabetes mellitus with WHO criteria. *Lancet* 354(9179): 622-5, 1999.
 50. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, Schulze J, Schwanebeck U, Schmechel H, et al. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia* 39(12): 1577-83, 1996.
 51. Horie A, Tokuyama Y, Ishizuka T, Suzuki Y, Marumo K, Oshikiri K, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin has the capacity to repair β -cell dysfunction and insulin resistance. *Horm Metab Res* 46(11): 814-8, 2014.
 52. Utzschneider KM, Tong J, Montgomery B, Udayasankar J, Gerchman F, Marcovina SM, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves beta-cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 31(1): 108-13, 2008.
 53. Del Prato S, Foley JE, Kothny W, Kozlovski P, Stumvoll M, Paldanius PM, et al. Study to determine the durability of glycaemic control with early treatment with a vildagliptin-metformin combination regimen vs. standard-of-care metformin monotherapy-the VERIFY trial: a randomized double-blind trial. *Diabet Med* 31(10): 1178-84, 2014.
 54. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsos S, Habener JF. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 15(2): 270-6, 1992.
 55. Garber AJ. Incretin effects on β -cell function, replication, and mass: the human perspective. *Diabetes Care* 34 Suppl(2): S258-63, 2011.
 56. Portha B, Tourrel-Cuzin C, Movassat J. Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass. *Exp Diabetes Res* 2011: 376509, 2011.
 57. Vilsbøll T, Brock B, Perrild H, Levin K, Lervang HH, Kølendorf K, et al. Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hypergly-

- caemia in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 25(2): 152-6, 2008.
58. Kondo Y, Satoh S, Osada UN, Terauchi Y. Early liraglutide treatment improves β -cell function in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *Endocr J* 62(11): 971-80, 2015.
 59. Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, et al. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53(5): 1187-94, 2004.
 60. Zinman B, Gerich J, Buse JB, Lewin A, Schwartz S, Raskin P, et al. Efficacy and safety of the human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes (LEAD-4 Met+TZD). *Diabetes Care* 32(7): 1224-30, 2009.
 61. Kapitza C, Dahl K, Jacobsen JB, Axelsen MB, Flint A. Effects of semaglutide on beta cell function and glycaemic control in participants with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetologia* 60(8): 1390-9, 2017.
 62. Palmer JP, Fleming CA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. *Diabetes* 53(1): 250-64, 2004.
 63. Pozzilli P, Maddaloni E, Buzzetti R. Combination immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 11(5): 289-97, 2015.
 64. Robertson RP, Raymond RH, Lee DS, Calle RA, Ghosh A, Savage PJ, et al. Arginine is preferred to glucagon for stimulation testing of β -cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307(8): E720-7, 2014.
 65. Sokooti S, Kieneker LM, Borst MH, Muller Kobold A, Kootstra-Ros JE, Gloerich J, et al. Plasma C-Peptide and Risk of Developing Type 2 Diabetes in the General Population. *J Clin Med* 9(9), 2020.
 66. Kim JD, Kang SJ, Lee MK, Park SE, Rhee EJ, Park CY, et al. C-Peptide-Based Index Is More Related to Incident Type 2 Diabetes in Non-Diabetic Subjects than Insulin-Based Index. *Endocrinol Metab (Seoul)* 31(2): 320-7, 2016.