

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla Biomedicina

Tesi di Laurea

**MODULAZIONE DELLA SECREZIONE DI GLP-1 E
FUNZIONALITÀ ALFA-CELLULARE PANCREATICA:
EFFETTO DELL'INIBIZIONE DEL
COTRASPORTATORE SODIO-GLUCOSIO**

Relatori:

Prof. Stefano Del Prato

Dott. Roberto Lupi

Candidata:

Sabrina Rosaria Paparo

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

Riassunto	III
Abstract	IV
Capitolo 1. Introduzione	- 1 -
1.1. Cenni sul diabete mellito	- 3 -
1.2. Il diabete mellito di tipo 2	- 4 -
1.3. Struttura del pancreas	- 7 -
1.3.1. <i>Le cellule beta pancreatiche</i>	- 9 -
1.3.1.1. <i>Glucotossicità e lipotossicità</i>	- 11 -
1.4. La cellula alfa	- 13 -
1.5. L'iperglucagonemia.....	- 16 -
1.6. Le incretine	- 21 -
1.6.1. <i>GLP-1 e la secrezione del glucagone</i>	- 25 -
1.6.2. <i>Il sistema glucosensorio e la secrezione del GLP-1</i>	- 26 -
1.7. Terapie basate su ormoni incretinici.....	- 29 -
1.8. I cotrasportatori sodio - glucosio	- 32 -
1.8.1. <i>Florizina</i>	- 37 -
Capitolo 2. Scopo della tesi	- 42 -
Capitolo 3. Materiali e metodi	- 43 -
3.1. Linea cellulare alfa TC1 clone 6	- 43 -
3.2. Coltura cellulare	- 44 -
3.2.1. <i>Recupero di cellule crioconservate</i>	- 44 -
3.2.2. <i>Crioconservazione delle cellule</i>	- 45 -
3.2.3. <i>Subcultura cellulare</i>	- 46 -
3.2.4. <i>Tripsinizzazione per studi sperimentali</i>	- 47 -
3.2.5. <i>Conta cellulare</i>	- 48 -
3.2.6. <i>Disegno sperimentale</i>	- 49 -
3.3. Valutazione dell'attività metabolica cellulare	- 49 -

3.4.	Valutazione dell'apoptosi e della necrosi cellulare	- 51 -
3.5.	Valutazione dello stress ossidativo cellulare	- 53 -
3.6.	Estrazione dell'RNA totale.....	- 56 -
3.7.	Misurazione dell'RNA tramite spettrofotometro	- 58 -
3.8.	Retrotrascrizione dell'RNA totale.....	- 59 -
3.9.	PCR Real-Time	- 61 -
3.10.	Estrazione delle proteine	- 69 -
3.11.	Dosaggio proteico con metodo Bradford	- 70 -
3.12.	Western Blot.....	- 72 -
3.13.	Valutazione della secrezione di GLP-1 totale e del glucagone con metodo ELISA	- 79 -
3.13.1.	<i>Principio generale della metodica ELISA.....</i>	- 79 -
3.13.2.	<i>Valutazione della secrezione di GLP-1 totale.....</i>	- 80 -
3.13.3.	<i>Valutazione della secrezione di glucagone</i>	- 82 -
3.14.	Analisi statistica	- 83 -
Capitolo 4.	Risultati	- 84 -
4.1.	Caratteristiche della linea cellulare studiata	- 84 -
4.2.	Studio della presenza di SGLT1 e SGLT2 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte ad alto glucosio e FFA.	- 85 -
4.2.1.	<i>Studi di espressione genica</i>	- 85 -
4.2.2.	<i>Studi di espressione proteica</i>	- 88 -
4.3.	Studio della presenza di SGLT1 e SGLT2 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte ad alto glucosio con e senza Florizina...-	93 -
4.3.1.	<i>Studi di espressione genica e proteica</i>	- 93 -
4.3.2.	<i>Studi funzionali</i>	- 102 -
4.3.3.	<i>Attività metabolica cellulare</i>	- 104 -
4.3.4.	<i>Valutazione del tasso di apoptosi e necrosi cellulare</i>	- 105 -
4.3.5.	<i>Valutazione dello stress ossidativo</i>	- 106 -
Capitolo 5.	Discussione dei risultati.....	- 108 -
Bibliografia		- 114 -

Riassunto

Il diabete mellito è una sindrome eterogenea comprendente varie forme cliniche, di cui le più frequenti sono il diabete di tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans, e il diabete di tipo 2 in cui sono presenti, oltre alla carenza di insulina, fenomeni di resistenza all'azione dell'ormone. In questi ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nello studio e nella valutazione funzionale delle isole pancreatiche, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva. Sono strutture che contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule beta produttrici di insulina (60-80%) e le cellule alfa produttrici di glucagone (20-30%). In questi anni i ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta-pancreatiche, andando a studiarne i meccanismi che regolano la funzionalità e la sopravvivenza. Tuttavia, in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle cellule alfa nella funzionalità insulinare. Il glucagone è il risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente. L'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale porta, infatti, attraverso clivaggi successivi, dal proglucagone al glucagone nelle cellule alfa e al GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) e GLP-2 (Glucagon-Like Peptide 2) nelle cellule L dell'intestino. Recentemente, nel nostro laboratorio è stato condotto uno studio in cui è stata valutata la secrezione e la funzione del GLP-1 in una linea cellulare di alfa cellule murine esposte o meno a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito tipo 2, i cui risultati preliminari sembrano indicare che l'iperglicemia potrebbe indurre nelle alfa cellule pancreatiche un incremento dell'espressione dell'enzima PC1/3, con aumento della secrezione di GLP-1 nella sua forma totale e attiva. Questo potrebbe avere un effetto protettivo sulle alfa cellule stesse, mediato da un aumento della concentrazione di GLP-1 attivo nel terreno di coltura, associato ad una riduzione della necrosi, un aumento della vitalità ed un aumento della funzionalità cellulare.

Abstract

Diabetes mellitus is a clinically and genetically heterogeneous groups of metabolic disorders characterized by abnormally high levels of glucose in the blood. The most frequent clinical forms are type 1 diabetes, characterized by a total deficiency of insulin secretion due to autoimmune destruction of the beta cells of the islets of Langerhans, and type 2 diabetes, characterized by an insulin deficient associated to phenomena of peripheral resistance to the action of the hormone. There have been significant advances in the study and functional assessment of the pancreatic islets, which are no more than 1-2% of the total pancreatic mass. They are structures that contain various types of endocrine cells, of which the most represented are the insulin-producing beta cells (60-80%) and glucagon-secreting alpha cells (20-30%). In recent years, researchers have focused their attention mainly on the beta cells, studying the mechanisms that regulate synthesis and release of insulin, as well as the total mass of the cells themselves. However, in the literature there are few studies on the role of alpha cells in the functionality of the islets. Alpha cells synthesize and release glucagon. This hormone is the final result of a series of changes in the proglucagone, which represents the real polypeptide resulting from transcription of the corresponding gene. The action of proteolytic enzymes tissue-specific that leads, through subsequent cleavage, from proglucagone to glucagon in alpha cells and to Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) and Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2) in intestinal L cells. Recently, in our laboratory was performed a study to assess the secretion and function of GLP-1 in a cell line of murine alpha cells, exposed or not to metabolic perturbations typical of type 2 diabetes mellitus, seem to indicate that hyperglycemia could induce an increased expression of the enzyme PC1/3, with increased secretion of GLP-1 in its total and active form. This could have a protective effect on alpha cells themselves, mediated by an increase in the concentration of active GLP-1 form in the culture medium of the cells exposed to high glucose, associated with a reduction of necrosis, an increase in metabolic activity and an increase of cell function.

Capitolo 1. Introduzione

Il diabete mellito è una malattia che si manifesta con un'instabilità persistente dei livelli glicemici ematici e comprende varie forme cliniche di cui, le più frequenti, sono il diabete di tipo 1, caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina per la distruzione autoimmune delle cellule beta pancreatiche e il diabete di tipo 2, caratterizzato da insulino-resistenza periferica che porta nel tempo a deficit secretorio dell'ormone^{1,2,3,4,5}. L'organo colpito è il pancreas, in particolare la sua parte endocrina: le isole di Langerhans, che costituiscono non più dell'1-2% della massa pancreatica complessiva, sono popolate da cellule beta produttrici di insulina (60-80%), cellule alfa secernenti glucagone (20-30%) e cellule delta che rilasciano somatostatina (1-2%). In questi ultimi anni i ricercatori hanno focalizzato l'attenzione principalmente sullo studio delle cellule beta pancreatiche, andando a studiarne sia la funzionalità (sintesi e secrezione dell'insulina) che la vitalità cellulare, tuttavia in letteratura sono presenti pochi studi riguardo al ruolo delle alfa cellule nella fisiopatologia insulare. Le cellule alfa pancreatiche sintetizzano e rilasciano glucagone a partire dal proglucagone, mentre, dallo stesso precursore, nelle cellule L dell'intestino sono prodotti Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) e Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2), grazie all'azione di enzimi proteolitici aventi specificità tissutale: l'enzima Pro-ormone Convertasi 2 (PC2) presente maggiormente nelle cellule alfa e l'enzima Pro-ormone Convertasi 1/3 (PC1/3) predominante nelle cellule L intestinali^{6,7,8}. Il GLP-1 ha suscitato grande interesse come strumento

¹ Brunton Stephen. *"Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder."* Postgraduate medicine 121.5 (2009): 68-81.

² Lau, David CW. *"Metabolic syndrome: perception or reality?"* Current atherosclerosis reports 11.4 (2009): 264-271.

³ Goldberg Elad and Ilan Krause. *"Infection and type 1 diabetes mellitus—A two edged sword?"* Autoimmunity reviews 8.8 (2009): 682-686.

⁴ Concannon Patrick, Stephen S. Rich and Gerald T. Nepom. *"Genetics of type 1A diabetes."* New England Journal of Medicine 360.16 (2009): 1646-1654.

⁵ Bode Bruce W. *"Defining the importance of daily glycemic control and implications for type 2 diabetes management."* Postgrad Med 121.5 (2009): 82-93.

⁶ Janssen P. et al. *"Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2."* Alimentary pharmacology & therapeutics 37.1 (2013): 18-36.

⁷ Donnelly Dan. *"The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands."* British journal of pharmacology 166.1 (2012): 27-41.

farmacologico per il trattamento del diabete di tipo 2 perché è in grado di stimolare l'esocitosi dei granuli di insulina a livello delle beta cellule pancreatiche, di inibire la secrezione di glucagone da parte delle alfa cellule e di stimolare la proliferazione delle cellule beta. Verificata quindi l'influenza dell'iper glucagonemia e dell'insulino-resistenza nello sviluppo e nella progressione del diabete di tipo 2, il GLP-1 è importante proprio per la sua azione glucagonostatica, per il suo effetto insulintropico e poiché si trova stranamente diminuito nei pazienti con questa malattia^{9,10}. Mentre in vivo solo piccole quantità di GLP-1 raggiungono il pancreas in forma bioattiva, alcune osservazioni indicano che questa incretina potrebbe essere prodotta a livello delle isole pancreatiche umane. Recentemente, è stato pubblicato un lavoro prodotto nel nostro laboratorio in cui sono stati effettuati studi morfologici, funzionali e molecolari dimostrando la presenza e analizzando le varie caratteristiche di un sistema di produzione locale di GLP-1 negli aggregati cellulari umani del Langerhans, in particolare in quelli ottenuti da pazienti con diabete mellito tipo 2¹¹. Inoltre, sempre nel nostro laboratorio, è stato condotto uno studio per valutare la secrezione e la funzione del GLP-1 in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche murine esposte, o meno, a perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito di tipo 2. I risultati preliminari sembrano indicare che l'iperglicemia potrebbe indurre un incremento dell'espressione dell'enzima PC1/3 nelle alfa cellule, con conseguente aumento della secrezione di GLP-1, sia nella sua forma totale che attiva. L'aumento della concentrazione di GLP-1 attivo nel terreno di coltura è associato a una riduzione della necrosi e a un aumento dell'attività metabolica e della funzionalità cellulare, che fa pensare ad un effetto protettivo del GLP-1 sulle alfa cellule stesse. Inoltre è stato evidenziato che l'IL-6 sarebbe in grado di mediare l'interazione fra tessuti insulino-sensibili e la

⁸ Holst Jens Juul. "The physiology of glucagon-like peptide 1." *Physiological reviews* 87.4 (2007): 1409-1439.

⁹ Yu Bao-Sheng and An-Ru Wang. "Glucagon-like peptide 1 based therapy for type 2 diabetes." *World Journal of Pediatrics* 4.1 (2008): 8-13.

¹⁰ Avogaro A. "Cardioprotective effects of glucagon-like peptide-1: preclinical and clinical data." *Giornale italiano di cardiologia* (2006) 12.12 Suppl 2 (2011): 17-24.

¹¹ Marchetti P. et al. "A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets." *Diabetologia* 55.12 (2012): 3262-3272.

produzione di GLP-1, suggerendo un ruolo di questa interleuchina nella regolazione della secrezione di insulina.

1.1. Cenni sul diabete mellito

Il diabete mellito (DM) è un disordine metabolico a eziologia multipla caratterizzato da iperglicemia, frutto di difetti nella secrezione di insulina o nell'azione di quest'ormone. Spesso entrambi gli aspetti sono presenti in uno stesso paziente e non è chiaro quale dei due sia la causa primaria dell'iperglicemia. Diversi processi patogenetici sono coinvolti nello sviluppo del diabete mellito. I principali sono rappresentati dalla distruzione autoimmune delle cellule beta del pancreas con conseguente deficit di insulina e da alterazioni che si traducono nella resistenza all'azione dell'ormone. L'insufficiente azione dell'insulina deriva da inadeguata secrezione e/o diminuita risposta dei tessuti bersaglio a questo importante ormone. La presenza di una marcata iperglicemia può manifestarsi clinicamente attraverso diversi sintomi che includono: poliuria, polidipsia, perdita di peso, a volte associata a polifagia e offuscamento della vista. Alcune delle principali complicanze per i pazienti diabetici includono retinopatia con potenziale perdita della vista, nefropatia che può portare a un'insufficienza renale, neuropatia periferica con il rischio di ulcere al piede, amputazioni, e neuropatia autonoma in grado di causare conseguenze a livello genitourinario, gastrointestinale, cardiovascolare e disfunzioni sessuali. Inoltre è stato riscontrato che i pazienti con diabete hanno una maggiore incidenza di malattie cardiovascolari aterosclerotiche, delle arterie periferiche, e cerebrovascolari. Nelle persone diabetiche si trovano spesso anche ipertensione e anomalie del metabolismo delle lipoproteine¹².

Il diabete mellito ha un grande rilievo sociale ed esercita un notevole impatto socio-economico sui vari sistemi nazionali per l'entità della sua diffusione e la gravità delle sue complicanze. Nel 2011 le persone affette da diabete erano 366 milioni, mentre 280 milioni erano coloro con un alto rischio di svilupparlo. Si prevede che fra 20 anni il numero delle persone con diabete salirà a 552 milioni e

¹² American Diabetes Association. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care 37.Supplement 1 (2014): S81-S90.

398 milioni saranno le persone con un alto rischio.¹³ Secondo i dati Istat 2009, in Italia 2.9 milioni di persone soffrono di diabete, in altre parole il 4.8% della popolazione. Nell'arco di un periodo relativamente breve (dal 2000 al 2012) la percentuale di malati in Italia è passata dal 3.7% al 5.5% (dati ISTAT 2012)¹⁴. In base ai dati 2007-2009 del sistema di sorveglianza Passi (Progressi delle aziende sanitarie per la salute in Italia), la prevalenza del diabete in Italia cresce con l'età: nella fascia tra 50-69 anni quasi una persona su otto (12%) ha una diagnosi di diabete. È inoltre più diffuso tra gli uomini (6%), nelle persone senza alcun titolo di studio o con la sola licenza elementare (15%), in quelle con molte difficoltà economiche percepite (9%) e nelle persone sovrappeso (7%) e obese (14%). Nonostante sia difficile fornire delle stime precise sul costo delle cure sanitarie per il diabete in Italia e nel Mondo, è indubbio come queste influiscano pesantemente sulle finanze dei vari sistemi sanitari nazionali. Secondo la Banca Mondiale, per fronteggiare il diabete nel mondo si spendono 400 miliardi di dollari l'anno; in Italia ciascun paziente costa al Servizio sanitario nazionale 2589 euro l'anno¹⁵.

1.2. Il diabete mellito di tipo 2

Ci sono due principali forme di diabete mellito¹⁶. Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM), anche detto diabete insulino-dipendente o diabete ad insorgenza giovanile, rappresenta solo il 5-10% dei casi di diabete mellito¹² ed è caratterizzato da deficit più o meno totale di secrezione di insulina, dovuto alla distruzione autoimmune delle cellule beta delle isole di Langerhans¹⁶. Nello sviluppo di questa forma di diabete svolge, quindi, un ruolo importante, l'immunità acquisita attraverso risposte immunitarie umorali (anticorpi) e cellulari

¹³ International Diabetes Federation. "Global Diabetes Plan 2011–2021." (2012).

¹⁴ Consoli Agostino. "Italian barometer diabetes report 2013. L'impatto del diabete in Europa e in Italia."

¹⁵ Fonte: *diabete.net* e *diabete Italia*

¹⁶ Zimmet Paul, K.G Alberti, and Jonathan Shaw. "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* 414.6865 (2001): 782-787

(cellule T), dirette contro antigeni self delle isole pancreatiche^{17,18,19}. Oltre ai fattori ambientali, di cui si sa ancora poco, concorrono nello sviluppo del diabete di tipo 1 anche i fattori genetici¹². La predisposizione genetica che aumenta il rischio di T1DM del 40% è rappresentata dall'antigene umano leucocitario (HLA, Human Leukocyte Antigen) che codifica per proteine localizzate sulla superficie cellulare, che interagiscono con le cellule del sistema immunitario^{19,20}.

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM), in precedenza indicato come diabete non insulino dipendente o diabete con insorgenza in età adulta, è la forma clinica più frequente tra gli individui con diabete mellito e rappresenta circa il 90-95% dei casi¹². Le due principali alterazioni fisiopatologiche di questa forma di diabete sono: una ridotta sensibilità all'azione dell'insulina (insulino-resistenza) a livello dei tessuti bersaglio quali il muscolo, il fegato e il tessuto adiposo, e una riduzione della secrezione insulinica da parte delle cellule beta pancreatiche²¹. Il risultato, in entrambi i casi, è il conseguente incremento dei livelli di glucosio nel sangue e quindi l'iperglicemia. Il diabete di tipo 2 è spesso diagnosticato dopo molti anni poiché l'iperglicemia si sviluppa gradualmente e nelle prime fasi non è caratterizzato da sintomi particolarmente evidenti¹². Inizialmente la tolleranza al glucosio può essere mantenuta a spese di un'aumentata secrezione di insulina, quindi individui insulino-resistenti sono caratterizzati da iperinsulinemia compensatoria^{22,23}. Il diabete diventa clinicamente evidente quando, l'ipersecrezione di insulina da parte delle cellule beta pancreatiche, diminuisce e

¹⁷ Bottazzo GianFranco, Alejo Florin-Christensen and Deborah Doniach. "Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies." *The Lancet* 304.7892 (1974): 1279-1283.

¹⁸ Christie Michael R. et al. "Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM: studies with identical twins." *Diabetes* 41.7 (1992): 782-787.

¹⁹ Fu Zhuo, Elizabeth R. Gilbert and Dongmin Liu. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." *Current diabetes reviews* 9.1 (2013): 25

²⁰ Pugliese Alberto. "Genetics of type 1 diabetes." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 33.1 (2004).

²¹ Lupi, R. et al. "Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger." *Diabetes & metabolism* 33.5 (2007): 340-345

²² Kahn Steven E. "The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *The American journal of medicine* 108.6 (2000): 2-8.

²³ Marchetti Piero et al. "Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89.11 (2004): 5535-5541.

non riesce più a compensare l'insulino-resistenza^{23,24,25,26}. Al contrario dei pazienti con T1DM che devono, ai fini della loro sopravvivenza, necessariamente assumere dosi di insulina esogena (di qui la definizione di diabete insulino-dipendente) per prevenire lo sviluppo della chetoacidosi, gli individui con T2DM non dipendono da essa. Tuttavia l'insulina esogena può essere necessaria se non si riesce a controllare i livelli di glucosio nel sangue attraverso la dieta o agenti orali ipoglicemizzanti²⁷. I livelli di insulinemia, nei pazienti con diabete di tipo 2, possono essere aumentati, normali, o ridotti ma, relativamente alle concentrazioni circolanti del glucosio, sono per definizione insufficienti a garantire una normale glicemia²⁸. Siccome i livelli di glucosio nel sangue sono molto alti, questi individui, dovrebbero avere livelli di insulina ancora più elevati affinché le cellule beta pancreatiche abbiano una normale funzione¹². Il diabete di tipo 2 ha un'eziologia multifattoriale, poiché è causato sia da fattori genetici che ambientali. Probabilmente intervengono difetti a carico di più geni coinvolti nella produzione di insulina e nel metabolismo del glucosio. Esistono dunque differenti possibili cause che portano all'insorgenza di questo tipo di diabete e tra i fattori ambientali hanno un'importanza prioritaria, l'obesità e l'inattività fisica. Anche l'età favorisce la comparsa del diabete, poiché essa si accompagna a una riduzione fisiologica della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. Il rischio di sviluppare questa forma di diabete aumenta quindi con l'età, l'obesità, e la mancanza di attività fisica²⁹.

²⁴ Atkinson Mark A. and Noel K. Maclaren. "The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." *New England Journal of Medicine* 331.21 (1994): 1428-1436.

²⁵ Polonsky Kenneth S., Jeppe Sturis and Graeme I. Bell. "Non-insulin-dependent diabetes mellitus—a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance." *New England Journal of Medicine* 334.12 (1996): 777-783.

²⁶ Del Guerra Silvia et al. "Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes." *Diabetes* 54.3 (2005): 727-735.

²⁷ Zimmet Paul, K.G. Alberti, and Jonathan Shaw. "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* 414.6865 (2001): 782-787

²⁸ Prentki Marc and Christopher J. Nolan. "Islet β cell failure in type 2 diabetes." *Journal of Clinical Investigation* 116.7 (2006): 1802.

²⁹ Marchetti Piero. "La β -cellula nel diabete mellito di tipo 2." *Grandangolo in Diabetologia La secrezione insulinica* 2 (2002).

1.3. Struttura del pancreas

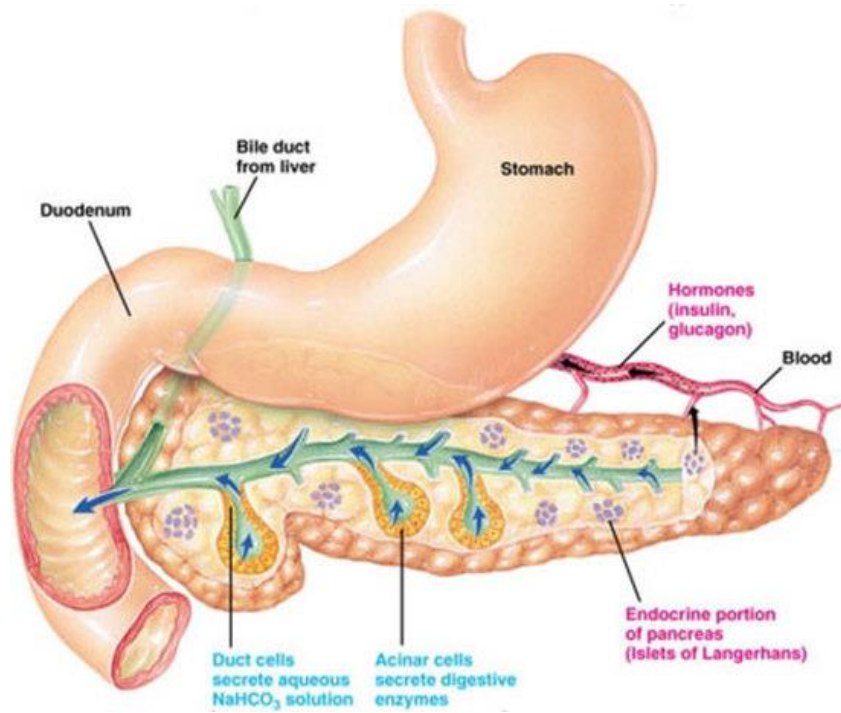
Il pancreas è una voluminosa ghiandola situata nello spazio retroperitoneale della cavità addominale; ha una forma allungata, nell'adulto può raggiungere una lunghezza di 20-25 cm, e pesa circa 80 g. È costituito da due popolazioni cellulari morfologicamente e funzionalmente distinte. La componente esocrina del pancreas è formata da cellule acinose enzima-secerenti, mentre la componente endocrina comprende cinque differenti tipi di cellule ormone-secerenti: le alfa cellule (α -cellule) glucagone-secerenti, le beta cellule (β -cellule) insulina-secerenti, le cellule delta (δ -cellule) che rilasciano somatostatina, le cellule epsilon (ϵ -cellule) che producono grelina e infine le cellule polipeptide pancreatico (PP)-secerenti. Tutti questi ormoni sono coinvolti nella regolazione del metabolismo dei nutrienti e nell'omeostasi del glucosio. Le cellule della componente endocrina si aggregano per formare le isole del Langerhans³⁰ che sono costituite dal 70% circa di cellule beta, 20% di cellule alfa, meno del 10% di cellule delta e meno del 5% di cellule PP³¹. Nelle isole pancreatiche di roditore la maggior parte delle cellule beta sono localizzate nel cuore dell'isola, circondate da un mantello di cellule alfa, delta e PP. La chiara segregazione dei diversi tipi di cellule in differenti regioni dell'isola suggerisce quindi una suddivisione anatomica. La citoarchitettura delle isole pancreatiche umane invece non mostra tale suddivisione. La maggior parte delle cellule alfa, beta, e delta è allineata lungo i vasi sanguigni senza un particolare ordine, suggerendo che la microcircolazione delle isole non determina l'ordine delle interazioni paracrine^{31,32}.

³⁰ Pan Fong Cheng and Chris Wright. *"Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland."* Developmental Dynamics 240.3 (2011): 530-565.

³¹ Cabrera Over et al. *"The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function."* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103.7 (2006): 2334-2339.

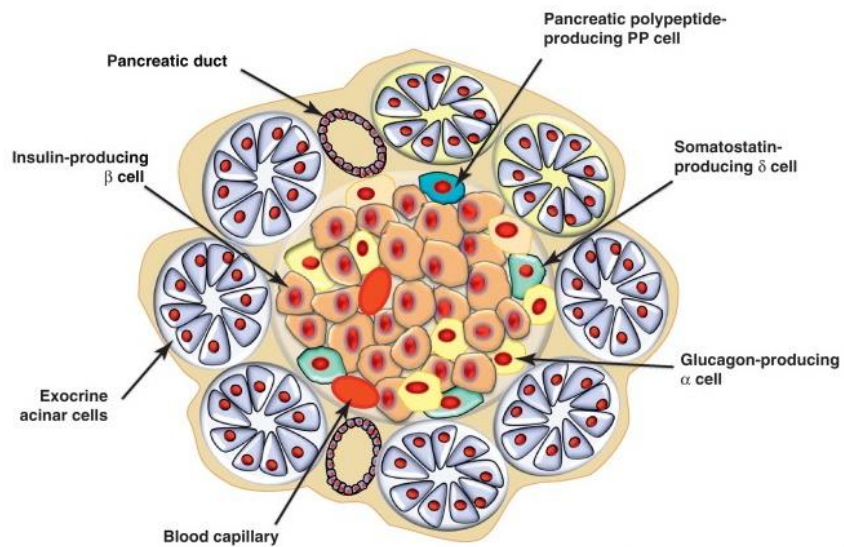
³² Gromada Jesper, Isobel Franklin and Claes B. Wollheim. *" α -Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains."* Endocrine reviews 28.1 (2007): 84-116.

Figura 1. Struttura del pancreas



Fonte: www.olivelab.org

Figura 2. Isolotto pancreatico



Fonte: www.cell.com

1.3.1. Le cellule beta pancreatiche

Le cellule beta rappresentano la popolazione cellulare più numerosa nell'isola di Langerhans. Esse rispondono a molti nutrienti presenti nella circolazione sanguigna, che includono il glucosio e altri monosaccaridi, gli aminoacidi e gli acidi grassi. Tuttavia è il glucosio il più importante stimolo per la secrezione insulinica poiché è il principale componente del cibo e può essere accumulato immediatamente dopo l'ingestione di un pasto. La secrezione di insulina indotta dal glucosio, nell'uomo e nel roditore è, infatti, molto maggiore se confrontata con quella stimolata da proteine e grassi. L'ingestione orale di 75 g di glucosio provoca un aumento nel plasma dell'insulina dal suo livello basale (20-30 pmol/l) a 250-300 pmol/l in 30 minuti, mentre l'intake della stessa quantità di grassi o di grassi più proteine porta a un innalzamento insulinico di solo 50-60 pmol/l nei soggetti umani³³.

Le cellule beta non sembrano avere recettori per il glucosio legati alla membrana plasmatica, ma possiedono diversi sensori che rilevano i livelli di questo zucchero in circolo. Il glucosio entra nella cellula beta attraverso un meccanismo di diffusione facilitata mediata da un gluco-trasportatore, precisamente GLUT2³⁴. Questo trasportatore ha una bassa affinità per il glucosio con una $K_m=17$ mmol/l ed è espresso anche in altri tessuti come fegato, reni e sulla membrana basolaterale delle cellule assorbenti dell'intestino³⁵. Dopo essere entrato nella cellula beta, il glucosio è fosforilato dall'enzima glucochinasi, un'esochinasi con una bassa affinità per il glucosio ($K_m=6$ mmol/l) che non è inibita dal suo stesso prodotto, ed è poi avviato alla cascata glicolitica. Il piruvato che ne deriva, entra nel mitocondrio e, attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici e i successivi eventi a livello della catena respiratoria mitocondriale, si arriva alla produzione di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP induce la chiusura, a livello della membrana cellulare, dei canali del potassio ATP-dipendenti, che

³³ Chang T. W. and Alfred L. Goldberg. "The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle." *Journal of Biological Chemistry* 253.10 (1978): 3685-3693.

³⁴ Fu Zhuo, Elizabeth R. Gilbert and Dongmin Liu. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." *Current diabetes reviews* 9.1 (2013): 25.

³⁵ Zhao Feng-Qi and Aileen F. Keating. "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Current genomics* 8.2 (2007): 113.

portano alla depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e l'ingresso degli ioni calcio nella cellula. Quest'ultimo evento determina, infine, l'esocitosi dei granuli che contengono insulina³⁴. L'aumento della concentrazione intracellulare del calcio è il principale segnale che innesca il rilascio di insulina da parte delle cellule beta, tuttavia ci sono altri segnali intracellulari attivati dal glucosio che svolgono un ruolo in questo processo come cAMP, cGMP, inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3), e DAG³⁶. Di questi segnali attivati, uno dei più importanti nel potenziare la secrezione di insulina è cAMP^{37,38,39}. Tra le varie molecole che sono in grado di attivare il pathway del cAMP ci sono due incretine: GIP prodotto dalle cellule intestinali enteroendocrine K e GLP-1 dalle cellule L dell'intestino tenue, in seguito all'ingestione di glucosio^{40,41}. L'attivazione della PKA (proteina chinasi cAMP-dipendente) per mezzo del legame con due molecole di cAMP permetterà la fosforilazione di proteine coinvolte nell'esocitosi dell'insulina⁴².

³⁶ Gromada Jesper et al. "CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells." *The Journal of physiology* 518.3 (1999): 745-759.

³⁷ Henquin J-C. "The interplay between cyclic AMP and ions in the stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells." *Archives Of Physiology And Biochemistry* 93.1 (1985): 37-48.

³⁸ Charles M. Arthur et al. "Adenosine 3', 5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release." *Science* 179.4073 (1973): 569-571.

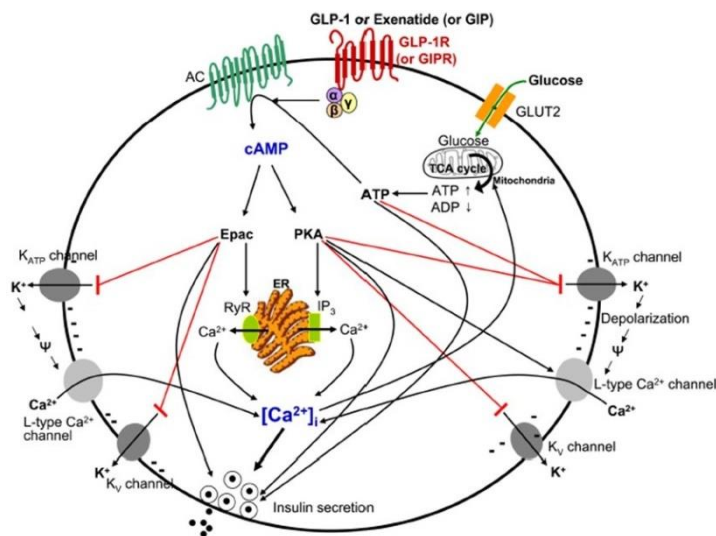
³⁹ Gonzalo Susana and Maurine E. Linder. "SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway." *Molecular biology of the cell* 9.3 (1998): 585-597.

⁴⁰ Drucker Daniel J. "Minireview: the glucagon-like peptides." *Endocrinology* 142.2 (2001): 521-527.

⁴¹ Meier Juris J. et al. "Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited." *Regulatory peptides* 107.1 (2002): 1-13.

⁴² Jones, Peter M., and Shanta J. Persaud. "Protein Kinases, protein Phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic β -Cells." *Endocrine Reviews* 19.4 (1998): 429-461.

Figura 3. Meccanismo di secrezione dell'insulina in cellule beta pancreatiche.



Fonte: slideplayer.it

1.3.1.1. Glucotossicità e lipotossicità

Il glucosio e gli acidi grassi liberi (FFA) sono i due principali nutrienti del metabolismo energetico nella maggior parte degli organismi e hanno un ruolo importante nell'equilibrio della cellula beta⁴³. Queste cellule, infatti, sono fisiologicamente preposte per rispondere a stimoli, quali glucosio e acidi grassi liberi, presenti nell'organismo. Tuttavia, tali nutrienti sono in grado di danneggiare sia la funzione che la vitalità delle beta cellule pancreatiche, se permangono per molto tempo ad alte concentrazioni⁴⁴. La presenza di elevati livelli di glucosio e acidi grassi, per un breve periodo, aumenta la vitalità e la funzione di queste cellule, ma gli effetti di una cronica iperglicemia e iperlipidemia, indicati rispettivamente con i termini di glucotossicità e lipotossicità, hanno conseguenze negative sulla beta cellula poiché contribuiscono a un progressivo danneggiamento dell'omeostasi del glucosio, che è una caratteristica del diabete di tipo 2.

⁴³ Oh Yoon Sin. "Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids." *Anatomy & cell biology* 48.1 (2015): 16-24.

⁴⁴ Ohneda Akira et al. "Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 46.3 (1978): 504-510.

L'iperglicemia cronica altera la secrezione dell'insulina glucosio-indotta e l'espressione genica di quest'ormone attraverso una diminuita attività di due fattori di trascrizione: PDX-1 (Pancreatic-Duodenum homeobox-1) e RIPE3b1 (activator of the Rat Insulin Promoter Element 3b), e aumenta inoltre il tasso di apoptosi. Il meccanismo di glucotossicità è in parte generato da un cronico stress ossidativo e produce cambiamenti irreversibili al contrario della deplezione dei depositi di insulina o della desensibilizzazione della cellula beta, che consiste in un temporaneo stato di refrattarietà a stimoli da parte del glucosio, che sono reversibili^{45,46}.

L'aumento della concentrazione degli acidi grassi liberi è una caratteristica tipica del diabete e una prolungata esposizione a elevati livelli di FFA, che derivano, in gran parte, dalla digestione dei lipidi introdotti con la dieta, ha effetti negativi sulla cellula beta. La tossicità degli FFA dipende da diversi parametri: concentrazione di quelli non legati, livelli di non saturazione e lunghezza della catena⁴⁷. Studi in vitro in particolare, ma anche esperimenti su modelli animali sottolineerebbero che, solo in presenza dell'iperglicemia, i lipidi hanno un effetto nocivo sulle cellule beta poiché gli acidi grassi non sono ossidati nei mitocondri e vengono smistati verso pathway di esterificazione, accumulando esteri di Acil CoA a lunga catena nel citoplasma^{48,49}. L'esposizione prolungata delle beta cellule agli acidi grassi aumenta il rilascio basale dell'insulina, ma ne inibisce la secrezione glucosio indotta; inoltre in presenza di elevati livelli di glucosio, gli acidi grassi inibiscono l'espressione genica dell'insulina^{50,51}.

⁴⁵ Poitout Vincent and R. Paul Robertson. "Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* 143.2 (2002): 339-342.

⁴⁶ Robertson R. Paul et al. " β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes." *Diabetes* 53.suppl 1 (2004): S119-S124.

⁴⁷ Deguil Julie et al. "Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape." *Traffic* 12.3 (2011): 349-362.

⁴⁸ Prentki Marc et al. "Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity Role in β -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes." *Diabetes* 51.suppl 3 (2002): S405-S413.

⁴⁹ Yaney G. C. and B. E. Corkey. "Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 46.10 (2003): 1297-1312.

⁵⁰ Gremlich Sandrine et al. "Fatty acids decrease *IDX-1* expression in rat pancreatic islets and reduce *GLUT2*, *glucokinase*, *insulin*, and *somatostatin* levels." *Journal of Biological Chemistry* 272.48 (1997): 30261-30269.

⁵¹ Ritz-Laser Beate et al. "Glucose-Induced Preproinsulin Gene Expression Is Inhibited by the Free Fatty Acid Palmitate 1." *Endocrinology* 140.9 (1999): 4005-4014.

1.4. La cellula alfa

Le alfa cellule rappresentano circa il 20% dell'intera popolazione di un'isola pancreatica. La principale funzione espletata da queste cellule è rappresentata dalla produzione e secrezione di glucagone. Tale ormone rappresenta il principale regolatore dell'omeostasi del glucosio, contrastando l'azione insulinica, specialmente durante l'ipoglicemia.

La secrezione del glucagone da parte delle alfa cellule è regolata da una molteplicità di nutrienti, fattori neurali e ormonali, ma è l'ipoglicemia il più importante stimolo glucagone-tropico. Possono stimolarne il rilascio anche alcuni amminoacidi, in particolare l'arginina, l'attivazione del sistema nervoso autonomo, l'acetilcolina, le catecolamine, i glucocorticoidi e gli ormoni gastrointestinali, quali il Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) e la colecistochinina (CCK). La secrezione del glucagone è invece inibita da alti livelli di glucosio, dall'insulina, amilina, somatostatina e GLP-1^{52,53}.

Il principale sito di azione del glucagone è il fegato a livello del quale, nei periodi lontani dai pasti, stimola la produzione di glucosio attraverso la gluconeogenesi e la glicogenolisi e, contemporaneamente, inibisce la glicolisi e la glicogenesi^{54,55}. In corrispondenza della membrana plasmatica degli epatociti è presente il recettore del glucagone (Gcgr), associato a proteine G, al quale si lega l'ormone peptidico innescando l'amplificazione di cascate di trasduzione del segnale e la regolazione di fattori di trascrizione. Gcgr è legato alla via di segnalazione mediata dal Ca^{2+} e agisce attraverso l'attivazione dell'enzima adenilato ciclasi, che catalizza la conversione dell'ATP in AMP ciclico determinandone l'aumento intracellulare. La produzione di glucosio epatico è necessaria, per mantenere durante la fase di digiuno, livelli di glucosio plasmatico

⁵² Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.

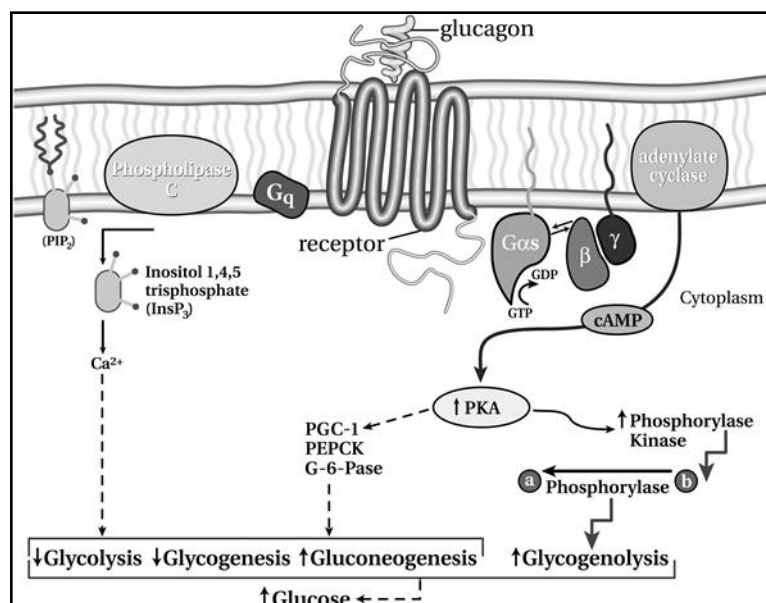
⁵³ Drews Gisela, Peter Krippeit-Drews and Martina Düfer. "Electrophysiology of islet cells." *The Islets of Langerhans*. Springer Netherlands, 2010. 115-163.

⁵⁴ Exton John H. et al. "Gluconeogenesis in the perfused liver: The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosine 3', 5'-monophosphate and insulin." *The American journal of medicine* 40.5 (1966): 709-715.

⁵⁵ Unger R. H. "The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus." *Annual review of medicine* 28.1 (1977): 119-130.

in grado di soddisfare le esigenze di organi come il cervello. L'ingestione di carboidrati nei soggetti sani induce l'aumento dei livelli glicemici e quindi il rilascio dell'insulina e la soppressione della secrezione del glucagone⁵⁶.

Figura 4. Meccanismo di azione del glucagone



Fonte: ajpendo.physiology.org

L'aumento dei livelli plasmatici di glucosio, in seguito all'ingestione di un pasto ricco di carboidrati o l'infusione di glucosio determina una riduzione dei livelli di glucagone. Studi dose-risposta hanno dimostrato che le cellule alfa sono molto più sensibili all'azione del glucosio rispetto alle cellule beta^{57,58}; infatti per inibire la secrezione di glucagone saranno necessarie concentrazioni di glucosio più basse rispetto a quelle che serviranno per stimolare il rilascio dell'insulina.

⁵⁶ Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." Rev Diabet Stud 8.3 (2011): 369-381

⁵⁷ Hahn H-J., M. Ziegler and E. Mohr. "Inhibition of glucagon secretion by glucose and glyceraldehyde on isolated islets of Wistar rats." FEBS letters 49.1 (1974): 100-102.

⁵⁸ Marliss Errol B. et al. "Insulin and glucagon release from monolayer cell cultures of pancreas from newborn rats." European journal of clinical investigation 3.1 (1973): 16-26.

Le cellule alfa di ratto esprimono glucochinasi e il trasportatore del glucosio GLUT1, un'isoforma a più alta affinità per il glucosio rispetto a GLUT2, presente sulle cellule beta^{59,60}. L'assenza di GLUT2 e la bassa espressione di GLUT1 determinano un uptake di glucosio dieci volte più basso rispetto alla beta cellula, ma comunque più alti del flusso metabolico totale, suggerendo che il trasporto nell'alfa cellula non è un fattore limitante per il metabolismo del glucosio⁵⁹.

L'effetto degli acidi grassi liberi (FFA) sulla secrezione del glucagone varia nelle diverse specie e condizioni sperimentali^{61,62}. Un'esposizione a breve termine a FFA inibisce la secrezione di glucagone nel porcellino d'india, mentre una stimolazione acuta con palmitato in cellule di ratto o topo, come le cellule α -TC1/6 induce il rilascio di glucagone^{63,64,65}. La lunghezza della catena degli acidi grassi liberi influenza la secrezione del glucagone nelle isole pancreatiche di topo: maggiore è la lunghezza della catena degli FFA saturi e maggiore sarà la risposta di glucagone. L'esposizione a lungo termine delle cellule α -TC1/6 al palmitato stimola la secrezione di glucagone in maniera dose-dipendente senza influenzare il contenuto di quest'ormone⁶⁶.

⁵⁹ Heimberg Harry et al. "Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic α - and β -cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization." *Journal of Biological Chemistry* 270.15 (1995): 8971-8975.

⁶⁰ Tu Jian, Bernard E. Tuch and Zhaoyi Si. "Expression and Regulation of Glucokinase in Rat Islet β - and α -Cells during Development 1." *Endocrinology* 140.8 (1999): 3762-3766.

⁶¹ Edwards J.C. and K.W. Taylor. "Fatty acids and the release of glucagon from isolated guinea-pig islets of Langerhans incubated in vitro." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 215.2 (1970): 310-315.

⁶² Gross R. and P. Mialhe. "Free fatty acids and pancreatic function in the duck." *Acta endocrinologica* 112.1 (1986): 100-104.

⁶³ Bollheimer L. Cornelius et al. "Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations." *Metabolism* 53.11 (2004): 1443-1448.

⁶⁴ Hong Jing et al. "The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro." *Metabolism* 54.10 (2005): 1329-1336.

⁶⁵ Olofsson Charlotta S. et al. "Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic α -cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium." *Diabetes* 53.11 (2004): 2836-2843.

⁶⁶ Hong Jing et al. "Stevioside counteracts the α -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290.3 (2006): E416-E422.

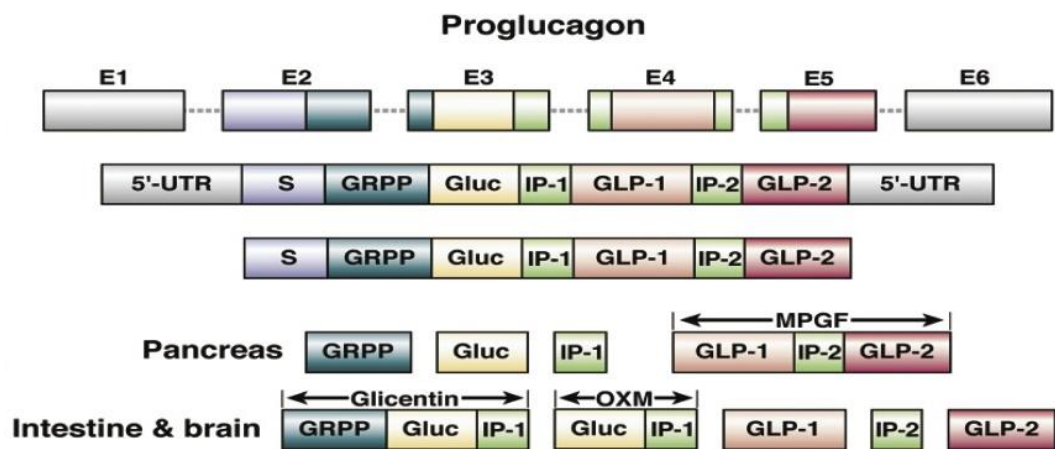
1.5. L'iperglucagonemia

Il glucagone è un ormone peptidico costituito da 29 amminoacidi e secreto dalle cellule alfa del pancreas. Tale ormone è il risultato di una serie di modifiche a carico del proglucagone, che rappresenta il reale polipeptide derivante dalla trascrizione del gene corrispondente, espresso nelle alfa cellule del pancreas endocrino, nelle cellule L dell'intestino e nel cervello, principalmente nell'ipotalamo e nel talamo. Il proglucagone, una molecola costituita da 160 amminoacidi, è sottoposto all'azione di enzimi proteolitici con specificità tissutale. Nelle alfa cellule, la presenza della Pro-ormone Convertasi 2 (PC2) permette di processare il proglucagone e ottenere il glucagone, il polipeptide glicentina-connesso (GRPP, Glicentin-Related PolyPeptide) dall'estremità N-terminale, IP-1 (Intervening Peptide 1) e il frammento maggiore del proglucagone (MPGF), che contiene la sequenza non processata di GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1), IP-2 (Intervening Peptide 2) e GLP-2 (Glucagon-Like Peptide-2). Nelle alfa cellule il prodotto principale è il glucagone, mentre il GLP-1 è formato solo in piccole quantità. Nelle cellule L della mucosa intestinale, invece, la presenza della Pro-ormone Convertasi 1/3 (PC1/3), e l'assenza di PC2, determina la biosintesi di GLP-1, GLP-2 e glicentina, che è ulteriormente processata in GRPP e oxintomodulina, contenente il glucagone. È stato dimostrato che topi deficienti per PC2 presentano al massimo piccole quantità di glucagone maturo circolante^{67,68}.

⁶⁷ Gromada Jesper, Isobel Franklin and Claes B. Wollheim. "*α-Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains.*" *Endocrine reviews* 28.1 (2007): 84-116.

⁶⁸ Christensen Mikkel et al. "*The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy.*" *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.

Figura 5. Meccanismo di clivaggio del proglucagone nel pancreas e intestino.



Fonte: www.gastrojournal.org

In un soggetto sano i livelli di glucagone diminuiscono in seguito ad un pasto ricco di carboidrati o all'ingestione orale di glucosio, e si riduce la produzione epatica stimolata dal glucagone⁶⁹. Al contrario nei pazienti con diabete di tipo 2, i livelli plasmatici di glucagone non sono adeguatamente soppressi dopo l'ingestione di un pasto e la produzione epatica di glucosio si mantiene a livelli simili alla condizione di digiuno, contribuendo all'iperglicemia post-prandiale^{70,71}. L'iperglucagonemia, nella fase post-prandiale, è aggravata dall'intake orale di glucosio, rispetto a una somministrazione endovenosa che produce la stessa variazione dei livelli plasmatici di glucosio, indicando che fattori che derivano dall'intestino contribuirebbero ad alterare la risposta del glucagone in questa condizione o che una quantità misurabile di glucagone sarebbe rilasciata dall'intestino^{72,73,74}.

⁶⁹ Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.

⁷⁰ Rizza Robert A. "Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy." *Diabetes* 59.11 (2010): 2697-2707.

⁷¹ Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.

⁷² Hare Kristine J. et al. "Inappropriate glucagon response after oral compared with isoglycemic intravenous glucose administration in patients with type 1 diabetes." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298.4 (2010): E832-E837.

Anche a digiuno, le concentrazioni di glucagone si sono rivelate più alte rispetto ai corrispondenti livelli glicemici⁷⁵. Nei pazienti con diabete di tipo 2 un'eccessiva secrezione di glucagone, l'insulino-resistenza epatica e grave deficit di insulina causerebbero un'elevata produzione epatica di glucosio che provoca un aumento dei livelli glicemici nel sangue, determinando l'iperglicemia a digiuno. Un ulteriore contributo deriva dalla diminuzione della massa beta-cellulare che concorre a un aumento relativo del rapporto tra alfa e beta cellule nelle isole pancreatiche, anche se la massa delle cellule alfa è comparabile a quella dei soggetti non diabetici. È stato proposto in alcuni lavori che in questi pazienti gli epatociti hanno una maggiore sensibilità all'azione del glucagone, ma ciò non è stato confermato in altri studi^{76,77}.

Evidenze sempre più convincenti hanno dimostrato che in aggiunta ad un'ipoinsulinemia relativa, tutti i tipi di pazienti diabetici sono quindi caratterizzati da iperglucagonemia. Non è ancora chiaro se gli elevati livelli di glucagone sono dovuti alla disfunzione delle cellule alfa oppure a un'alterazione del sistema di regolazione a monte. Siccome il sistema nervoso centrale e autonomo svolge un ruolo fondamentale nel regolare la secrezione a livello delle isole pancreatiche, è stato suggerito che una disregolazione neurale potrebbe essere strettamente legata all'iperglucagonemia.

Ci sono prove che dimostrano che l'insulina, attraverso un meccanismo paracrino, regola la secrezione di glucagone da parte delle alfa cellule che possiedono i recettori per l'insulina⁷⁸, suggerendo la possibilità che la disfunzione delle beta cellule potrebbe contribuire ad alterare la funzione delle cellule alfa. Alcuni

⁷³ Holst Jens Juul et al. "Regulation of glucagon secretion by incretins." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13.s1 (2011): 89-94.

⁷⁴ Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.

⁷⁵ Baron Alain D. et al. "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics." *Diabetes* 36.3 (1987): 274-283.

⁷⁶ Nielsen Michael F. et al. "Assessment of hepatic sensitivity to glucagon in NIDDM: use as a tool to estimate the contribution of the indirect pathway to nocturnal glycogen synthesis." *Diabetes* 46.12 (1997): 2007-2016.

⁷⁷ Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.

⁷⁸ Bansal Pritpal and Qinghua Wang. "Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295.4 (2008): E751-E761.

autori, però, suggeriscono che in realtà la disfunzione delle alfa cellule si potrebbe sviluppare con l'età, poiché in adolescenti con diabete di tipo 2 la disregolazione della secrezione del glucagone non è significativa⁷⁷.

La concentrazione del glucagone è inappropriata considerando l'ambiente glicemico; ciò potrebbe essere dovuto a un'alterazione nella secrezione o nel rilevamento del glucosio. Il meccanismo molecolare che sta alla base della perdita della sensibilità al glucosio deve essere completamente determinato nell'uomo e rimane ancora non chiaro nei modelli animali. Da dati di letteratura è emerso che negli individui sani si ha una cessazione della secrezione del glucagone, in seguito ad uno stimolo di carboidrati che però non si verifica nei pazienti con diabete di tipo 2^{79,80}. Inoltre in questi soggetti le cellule beta hanno un'alterata sensibilità per il glucosio con un indebolimento del rialzo dell'insulina plasmatica. Altra caratteristica dei pazienti diabetici è l'evidenza che i livelli di glucagone rimangono alla concentrazione che hanno nel periodo pre-prandiale nonostante la marcata iperglicemia a digiuno e a livello post-prandiale. È stato dimostrato che anche gli amminoacidi oppure un pasto ricco di proteine, stimolano una grande secrezione di glucagone. I livelli di glicemia necessaria per sopprimere il rilascio del glucosio arginina-mediato sono elevati nei soggetti diabetici, suggerendo che la sensibilità dell'alfa cellula agli effetti soppressivi del glucosio è diminuita. Il ruolo dell'iperglucagonemia potrebbe essere riassunto nell'effetto che l'ormone ha a livello del fegato dove stimola la produzione di glucosio nella fase di digiuno e l'incremento di questa produzione riflette l'aumento della gluconeogenesi nei pazienti con diabete di tipo 2^{81,82}. Questo è associato a un'alterata soppressione insulina-mediata della produzione di glucosio⁸³. Questi dati sono stati supportati dall'evidenza che la somatostatina riduce la concentrazione del glucagone

⁷⁹ Müller Walter A. et al. "Abnormal alpha-cell function in diabetes: response to carbohydrate and protein ingestion." *New England Journal of Medicine* 283.3 (1970): 109-115.

⁸⁰ Burcelin Rémy, Claude Knauf and Patrice D. Cani. "Pancreatic α -cell dysfunction in diabetes." *Diabetes & metabolism* 34 (2008): S49-S55.

⁸¹ Gastaldelli Amalia et al. "Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study." *Diabetes* 49.8 (2000): 1367-1373.

⁸² Consoli Agostino et al. "Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM." *Diabetes* 38.5 (1989): 550-557.

⁸³ Basu Rita, W. Frederick Schwenk and Robert A. Rizza. "Both fasting glucose production and disappearance are abnormal in people with "mild" and "severe" type 2 diabetes." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287.1 (2004): E55-E62.

circolante, abbassa la glicemia a digiuno e la produzione epatica di glucosio⁸⁴. La cellula alfa “diabetica” è resistente all’azione che l’insulina e il glucosio esercitano sulla soppressione del glucagone e questo potrebbe teoricamente spiegare l’iper glucagonemia a digiuno e un’esagerata risposta post-prandiale da parte del glucagone.

Recenti studi hanno dimostrato che l’iper glucagonemia nei pazienti con diabete di tipo 2 è aggravata dall’intake orale di glucosio, ma non dalla sua infusione intravenosa^{85,86}. A giocare quindi un ruolo importante nell’esagerata risposta del glucagone in seguito ad una somministrazione di glucosio è l’alterata sensibilità dell’alfa cellula al glucosio. Neanche una maggiore insulino-resistenza a livello dell’alfa cellula potrebbe spiegare lo squilibrio nelle risposte del glucagone in seguito alla somministrazione orale di glucosio; nonostante la risposta insulinica sia più alta durante una somministrazione orale di glucosio rispetto a un’infusione intravenosa di una quantità di glucosio che determina la stessa variazione glicemica. Questo ha portato a pensare che elementi, che derivano dai nutrienti, stimolino il tratto gastrointestinale che avrebbe un ruolo importante nelle alterate risposte postprandiali del glucagone, e diversi ormoni che derivano dall’intestino hanno un effetto sulla secrezione del glucagone. È stato, infatti, recentemente valutato il ruolo degli ormoni incretinici GIP e GLP-1, importanti per le loro proprietà insulintropiche, sulla secrezione delle alfa cellule pancreatiche e nell’iper glucagonemia post-prandiale nei soggetti con diabete di tipo 2⁸⁷.

⁸⁴ Baron Alain D. et al. "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics." *Diabetes* 36.3 (1987): 274-283.

⁸⁵ Knop F.K. et al. "Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic iv glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus." *Diabetologia* 50.4 (2007): 797-805.

⁸⁶ Meier J. J. et al. "Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects." *Diabetologia* 50.4 (2007): 806-813.

⁸⁷ Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.

1.6. Le incretine

Le incretine (intestine secretion insulin) sono ormoni rilasciati dal tratto gastrointestinale nella circolazione sanguigna in risposta all'ingestione di nutrienti. Sono in grado di stimolare il rilascio di sostanze dal pancreas endocrino, aumentano la secrezione di insulina glucosio-indotta, riducendo così i livelli glicemici. L'ipotesi che esiste una comunicazione tra l'intestino e il pancreas endocrino è confermata dal fatto che la somministrazione orale di glucosio provoca un maggiore aumento dei livelli plasmatici di insulina rispetto alla stessa quantità di glucosio somministrata per via intravenosa. Il primo ormone incretinico a essere stato scoperto è il Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) capace di inibire la secrezione acida dello stomaco nei cani⁸⁸. Studi successivi hanno mostrato che il GIP può anche stimolare la secrezione di insulina negli animali e nell'uomo. Siccome l'effetto inibitorio sulla secrezione acida si verifica solo a dosi farmacologiche, mentre l'ormone incretinico agisce a livelli fisiologici, è stato rinominato: Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide in quanto potenzia la secrezione dell'insulina glucosio-dipendente. Il GIP è rilasciato dalle cellule K dell'intestino tenue, in risposta all'ingestione di glucosio o grassi; attraverso l'azione sul tessuto adiposo promuove l'accumulo di energia, inibisce l'apoptosi della beta cellula e stimola la proliferazione degli osteoblasti favorendo la formazione dell'osso.

Il secondo ormone incretinico ad essere stato scoperto è il Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) che ha un'omologia del 50% con il glucagone ed è rilasciato dalle cellule L intestinali. GLP-1 esercita azioni glucoregolarie, rallentando lo svuotamento gastrico e inibendo la secrezione del glucagone glucosio-dipendente. Lo stimolo primario della secrezione del GLP-1 è l'ingestione di un pasto particolarmente ricco di grassi e carboidrati⁸⁹. Nei roditori e nell'uomo il rilascio dell'ormone incretinico avviene in due fasi: una prima fase precoce, con un picco dopo 15-30 minuti e l'altra più tardiva dopo 30-60 minuti. Siccome la maggior

⁸⁸ Brown J.C. et al. "*Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide.*" Recent progress in hormone research 31 (1974): 487-532.

⁸⁹ Brubaker PL. "*The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis.*" Ann N Y Acad Sci 1070 (2006):10-26.

parte delle cellule L che rilasciano il GLP-1 si trova nella parte distale dell'intestino tenue, si pensava fosse improbabile che la prima fase della secrezione dell'ormone incretinico potesse essere mediata dal diretto contatto dei nutrienti con le cellule L. Alcuni studi avevano, infatti, dimostrato che il sistema nervoso autonomo, i neurotrasmettitori come GRP (Gastrin Releasing Peptides) e l'acetilcolina, e GIP potessero contribuire al rapido rilascio del GLP-1 in seguito all'ingestione di nutrienti. La seconda fase o fase tardiva del rilascio del GLP-1 sarebbe invece mediata dai nutrienti digeriti che entrano in contatto con le cellule L⁹⁰. Tuttavia sembrerebbe che le cellule L si trovano lungo tutto l'intestino tenue, quindi anche la fase precoce potrebbe essere stimolata dal diretto contatto tra i nutrienti e le cellule L che sono localizzate nella regione più prossimale^{91,92}. Sebbene quindi la bassa densità di queste cellule nei tratti prossimali dell'intestino avesse fatto inizialmente ipotizzare che la fase precoce della secrezione fosse indirettamente scatenata da segnali nervosi o fattori ormonali, è oggi universalmente riconosciuto che la bassa percentuale di cellule L presenti a livello del duodeno sia sufficiente per provocare il rilascio precoce di GLP-1⁹¹.

Numerose vie di segnalazione intracellulari, che includono PKA, PKC, calcio e MAPK possono attivare il rilascio del GLP-1; il glucosio ne promuove la secrezione attraverso il suo metabolismo e la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti⁹³; zuccheri non metabolizzabili invece ne inducono il rilascio attraverso un meccanismo dipendente dai sodio-glucosio cotrasportatori⁹⁴; acidi grassi liberi insaturi a lunga catena mediante il GRP120, recettore accoppiato a proteine G che è molto espresso nell'intestino. Sulla base dei pochi studi presenti, in vivo e in vitro, emerge che l'insulina, la somatostatina, e il neuropeptide galanina possono inibire la secrezione del peptide incretinico.

⁹⁰ Roberge J.N. and P. L. Brubaker. "Secretion of Proglucagon-Derived Peptides in Response to Intestinal Luminal Nutrients." *Endocrinology* 128.6 (1991): 3169-3174.

⁹¹ Mortensen Kristine et al. "GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine." *Regulatory peptides* 114.2 (2003): 189-196.

⁹² Theodorakis Michael J. et al. "Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290.3 (2006): E550-E559.

⁹³ Reimann Frank and Fiona M. Gribble. "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells." *Diabetes* 51.9 (2002): 2757-2763.

⁹⁴ Gribble Fiona M. et al. "A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line." *Diabetes* 52.5 (2003): 1147-1154.

In vivo sono secrete diverse forme del GLP-1: GLP-1 (1-37) e GLP-1 (1-36)NH₂ sarebbero inattive, mentre GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36)NH₂ sono quelle biologicamente attive, prodotte dall'azione di PC1/3 e avrebbero la stessa potenza nel stimolare la secrezione insulinica. La presenza del gruppo NH₂ aumenta l'emivita di queste incretine nel plasma, e la maggior parte del GLP-1 in circolo è presente come GLP-1 (7-36)NH₂⁹⁵.

L'attivazione del recettore del GLP-1 (GLP-1R) sulle cellule beta porta alla secrezione di insulina glucosio-dipendente, ne induce la proliferazione, aumenta la resistenza cellulare all'apoptosi e quindi la massa delle beta cellule. Il GLP-1 inibisce la secrezione del glucagone e stimola quella della somatostatina, dal legame al suo recettore presente sulle cellule delta somatostatina-secernenti⁹⁶. Il meccanismo invece attraverso il quale inibisce il rilascio del glucagone non è chiaro, probabilmente attraverso il legame diretto alla cellula alfa per mezzo del GLP-1R⁹⁷. Un'altra possibilità è l'inibizione indiretta mediata dalla secrezione dell'insulina e/o somatostatina. L'ormone esercita anche una serie di attività a livello extra-pancreatico: rallentamento dello svuotamento gastrico; regolazione dell'appetito; riduzione del peso corporeo, mediata da una riduzione dell'apporto calorico e da effetti diretti e indiretti a livello dell'apparato gastrointestinale e del sistema nervoso centrale; vasodilatazione endotelio-mediata; miglioramento della funzione contrattile cardiaca nella cardiopatia^{98,99}. L'azione del GLP-1 a livello del fegato, tessuto adiposo e muscolo si verifica mediante un meccanismo indiretto¹⁰⁰.

⁹⁵ Orskov Cathrine et al. "Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans." *Diabetes* 43.4 (1994): 535-539.

⁹⁶ Fehmann Hans C. and Joel F. Habener. "Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7-37) on a somatostatin secreting cell line." *FEBS letters* 279.2 (1991): 335-340.

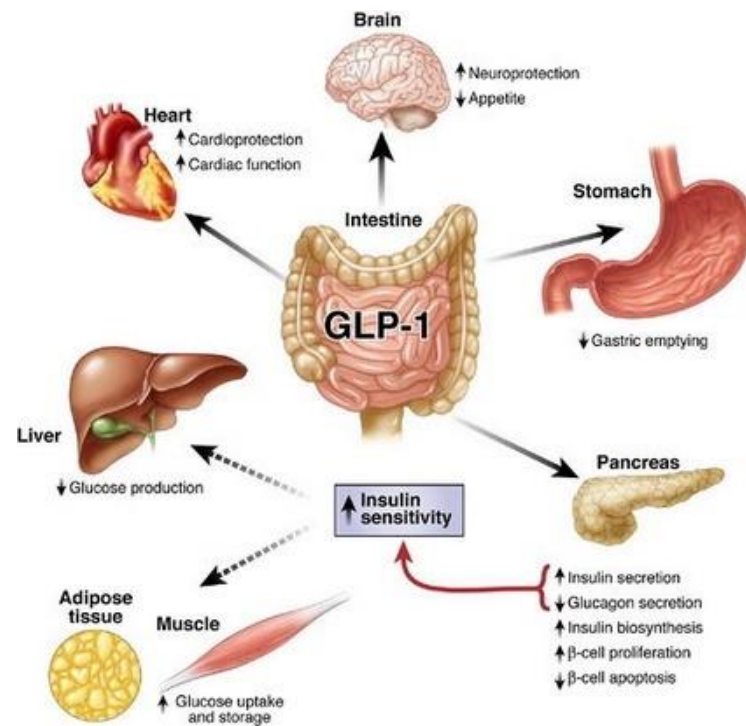
⁹⁷ Heller R. Scott, Timothy J. Kieffer and Joel F. Habener. "Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing α -cells of the rat endocrine pancreas." *Diabetes* 46.5 (1997): 785-791.

⁹⁸ Nauck M.A. et al. "Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM." *Diabetologia* 39.12 (1996): 1546-1553.

⁹⁹ McIntosh Christopher HS, Scott Widenmaier and Su-Jin Kim. "2 Pleiotropic Actions of the Incretin Hormones." *Vitamins and hormones* 84 (2010): 21.

¹⁰⁰ Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2131-2157.

Figura 6: Effetti del GLP-1 a livello dei tessuti periferici.

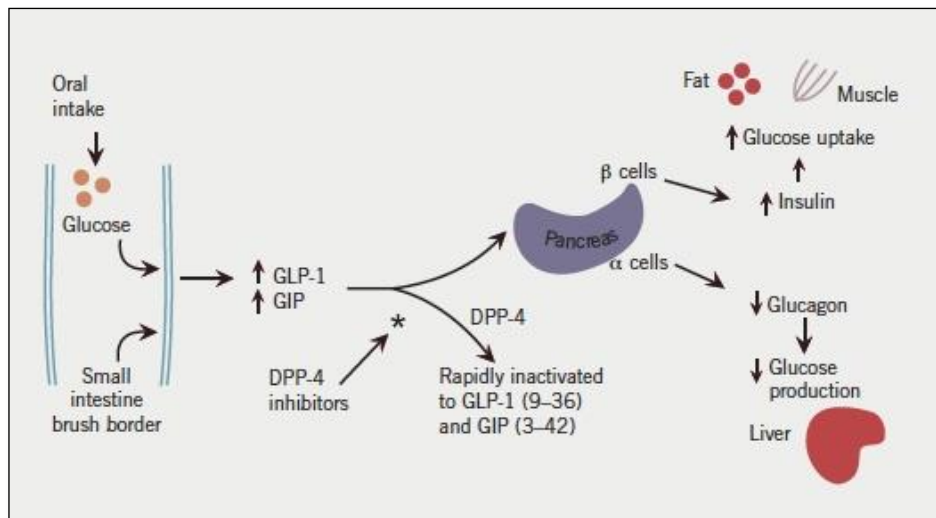


Fonte: 2012.igem.org

Il GLP-1 ha un'emivita di soli 2 minuti essendo inattivato dall'azione enzimatica del DiPeptidil Peptidasi 4 (DPP-4). Questa serina proteasi è espressa in una varietà di tessuti e tipi cellulari; è presente come proteina solubile nella circolazione sanguigna e si trova anche sulla superficie delle cellule endoteliali in una posizione adiacente al sito di secrezione del GLP-1, in modo che questo sia inattivato prima che entri nel sistema circolatorio. La rapida degradazione del GLP-1 e GIP da parte di questo enzima ha portato allo sviluppo di agosti del recettore del GLP-1 resistenti alla degradazione e inibitori del DPP-4 per il trattamento del diabete di tipo 2. Si è partiti dall'evidenza che soggetti con questo tipo di diabete sono caratterizzati dalla diminuzione della secrezione di insulina e del GLP-1 stimolato dai nutrienti¹⁰¹.

¹⁰¹ Vilsbøll Tina et al. "Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients." *Diabetes* 50.3 (2001): 609-613.

Figura 7. Meccanismo di azione di GIP e GLP-1.



Fonte: bjcardio.co.uk

1.6.1. GLP-1 e la secrezione del glucagone

Kreymann¹⁰² e altri hanno dimostrato, in un piccolo gruppo di soggetti, che l'infusione intravenosa di GLP-1, che mimava i livelli post-prandiali, sopprime significativamente la secrezione di glucagone. Nel 1988 è stato dimostrato, in studi preclinici, l'effetto glucagonostatico del GLP-1 usando pancreas isolati di porcellino d'india che sono stati perfusi con piccole quantità di GLP-1 provocando la soppressione della secrezione del glucagone¹⁰³. Quindi, sembra ormai evidente il ruolo fisiologico del GLP-1 sull'inibizione della secrezione di glucagone. Da studi in soggetti sani è emerso che il GLP-1 inibisce la secrezione del glucagone a tutti i livelli di glucosio¹⁰⁴. Sempre in un gruppo di non diabetici, è stato dimostrato l'impatto del GLP-1 sulla produzione di glucosio endogeno a digiuno. In questi studi, il GLP-1 è stato infuso mimando sia le basse che le alte

¹⁰² Kreymann B. et al. "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." *The Lancet* 330.8571 (1987): 1300-1304.

¹⁰³ Ørskov C., J.J. Holst and O. V. Nielsen. "Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach." *Endocrinology* 123.4 (1988): 2009-2013.

¹⁰⁴ Vilsbøll Tina et al. "Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects." *Regulatory peptides* 114.2 (2003): 115-121.

concentrazioni fisiologiche ed è emerso che, anche a livelli bassi, c'è una diminuzione del tasso di glucagone. Per spiegare il meccanismo attraverso il quale il GLP-1 sopprime la secrezione dell'ormone nell'uomo, è stata proposta l'ipotesi di una regolazione a livello dell'isola pancreatica: una ridotta secrezione dell'insulina avrebbe delle conseguenze sulle risposte secretorie delle alfa cellule. Pertanto, l'effetto che il GLP-1 ha sulla secrezione del glucagone sarebbe secondario agli effetti dell'ormone incretinico sulla beta cellula, con conseguente aumento dei livelli di insulina e/o amilina, conosciuti come soppressori della secrezione del glucagone^{105,106,107}.

Ancora oggi il meccanismo attraverso il quale la secrezione del glucagone è inibita dal GLP-1 è controverso. Studi preclinici hanno mostrato che la somatostatina rilasciata dalle vicine cellule delta svolge un ruolo centrale nell'inibizione paracrina delle alfa cellule, dall'altra parte il GLP-1 agisce anche attraverso l'attivazione di neuroni afferenti parasimpatici¹⁰⁸.

1.6.2. Il sistema glucosensorio e la secrezione del GLP-1

Nonostante l'interesse del GLP-1 come agente anti-diabetico, si conosce ancora poco il meccanismo, attraverso il quale gli zuccheri presenti all'interno del lume intestinale, provocano la secrezione di questa incretina nelle cellule L intestinali. La presenza di lunghi e sottili processi citoplasmatici che protrudono verso il lume dell'intestino¹⁰⁹, permette a queste cellule di entrare in contatto diretto con i nutrienti. L'evidente capacità di tali cellule di essere "sensibili" ai

¹⁰⁵ Gedulin Bronislava R., Timothy J. Rink and Andrew A. Young. "Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats." *Metabolism* 46.1 (1997): 67-70.

¹⁰⁶ Unger R. H. "Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances." *Diabetologia* 28.8 (1985): 574-578.

¹⁰⁷ Raju Bharathi and Philip E. Cryer. "Loss of the Decrement in Intra-islet Insulin Plausibly Explains Loss of the Glucagon Response to Hypoglycemia in Insulin-Deficient Diabetes Documentation of the Intra-islet Insulin Hypothesis in Humans." *Diabetes* 54.3 (2005): 757-764.

¹⁰⁸ De Heer J. et al. "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas." *Diabetologia* 51.12 (2008): 2263-2270.

¹⁰⁹ Eissele, R. et al. "Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man." *European journal of clinical investigation* 22.4 (1992): 283-291.

nutrienti proviene da molteplici studi condotti principalmente su tre linee cellulari: le GLUTag e le STC-1 di origine murina, e le NCI-H716, di origine umana.

Gli effetti del glucosio sul sistema incretinico sono stati studiati, negli ultimi anni, in modo molto dettagliato ed è emerso che nell'uomo e nel roditore sembra essere proprio il glucosio uno dei principali stimoli nella secrezione del GLP-1^{110,111}. Studi sulla linea cellulare GLUTag hanno recentemente dimostrato che basse concentrazioni (0.5 mmol/l) di glucosio stimolano la secrezione del GLP-1 e innescano un potenziale d'azione attraverso un meccanismo che coinvolge la chiusura dei canali potassio ATP-dipendenti (K_{ATP})¹¹². Anche nelle cellule beta pancreatiche sono presenti questi canali i quali vengono inibiti dall'ATP e attivati dal MgADP: l'aumento del rapporto ATP/MgADP, che si verifica in seguito all'incremento del glucosio nel plasma, determina la chiusura dei canali K_{ATP} , la depolarizzazione della membrana, l'apertura dei canali calcio voltaggio-dipendenti, l'entrata del calcio e il rilascio dell'insulina^{113,114}. Nelle cellule GLUTag è stato dimostrato il coinvolgimento dei canali Ca^{2+} di tipo L voltaggio-dipendenti in risposta ai nutrienti¹¹⁵. Le caratteristiche della secrezione del GLP-1 glucosio-dipendente sono state studiate in preparati di ileo umani perfusi ed è emerso che, non solo zuccheri metabolizzabili come glucosio, fruttosio e galattosio sono potenti stimoli per il rilascio del GLP-1, ma anche quelli non metabolizzabili quali metil- α -piranoside e il 3-O-metilglucosio ne

¹¹⁰ Elliott R.M. et al. "Glucagon-like peptide-1 (7–36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns." *Journal of Endocrinology* 138.1 (1993): 159-166.

¹¹¹ Jacobsen Siv Hesse et al. "Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects." *Obesity surgery* 22.7 (2012): 1084-1096.

¹¹² Reimann Frank and Fiona M. Gribble. "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells." *Diabetes* 51.9 (2002): 2757-2763.

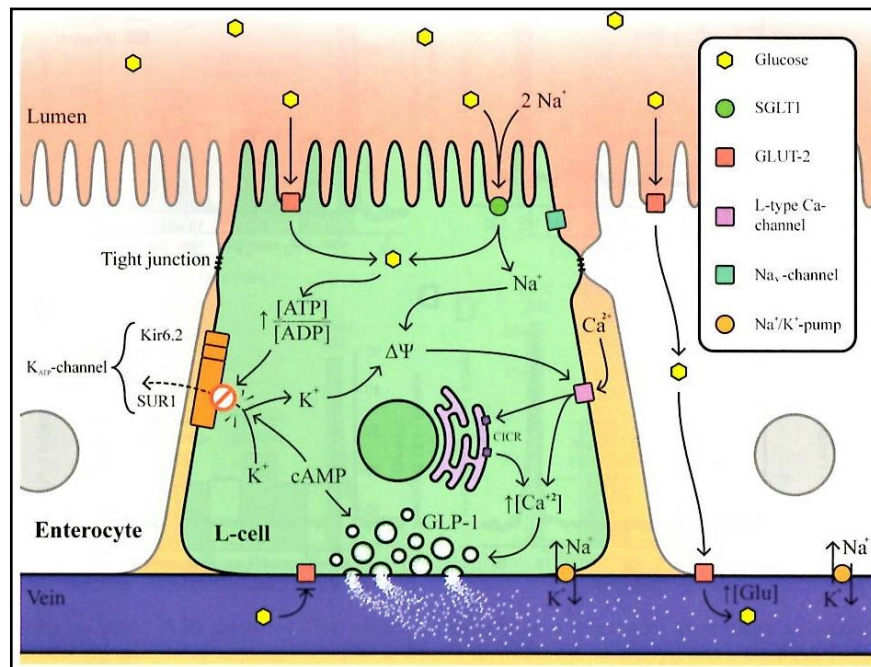
¹¹³ Rorsman P. "The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint." *Diabetologia* 40.5 (1997): 487-495.

¹¹⁴ Schuit Frans C. et al. "Glucose sensing in pancreatic β -cells a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus." *Diabetes* 50.1 (2001): 1-11.

¹¹⁵ Sidhu S. S. et al. "Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca^{2+} in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUTag." *The Journal of physiology* 528.1 (2000): 165-176.

innescherebbero la secrezione^{116,117}. Questi risultati non possono essere tutti spiegati da un meccanismo che determina la chiusura del canale K_{ATP} in risposta ad un aumento del metabolismo della cellula L. Ulteriori studi sull'ileo perfuso hanno dimostrato che gli effetti del glucosio, galattosio, metil- α -piranoside e il 3-O-metilglucosio sono sodio-dipendenti, suggerendo il coinvolgimento dei cotrasportatori sodio-glucosio (SGLT)^{118,119}.

Figura 8: La cellula L intestinale ed i sistemi glucosensori: possibile meccanismo per la secrezione del GLP-1 glucosio-dipendente.



Fonte: Holst et al. "Molecular mechanisms of glucose-stimulated GLP-1 secretion from perfused rat small intestine." *Diabetes* 64.2 (2015): 370-382

¹¹⁶ Rayner C.K. et al. "Effects of intraduodenal glucose and fructose on antropyloric motility and appetite in healthy humans." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278.2 (2000): R360-R366.

¹¹⁷ Sugiyama K. et al. "Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption." *Digestion* 55.1 (1994): 24-28.

¹¹⁸ Shima Kenji et al. "Relationship between molecular structures of sugars and their ability to stimulate the release of glucagon-like peptide-1 from canine ileal loops." *Acta endocrinologica* 123.4 (1990): 464-470

¹¹⁹ Ritzel U. et al. "Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum." *Acta diabetologica* 34.1 (1997): 18-21.

1.7. Terapie basate su ormoni incretinici

I soggetti con diabete di tipo 2 sono caratterizzati da iperglucagonemia a digiuno e nella fase postprandiale, dovuta a un'umentata produzione epatica di glucosio glucagone-mediata. Il glucagone svolge un ruolo centrale nell'omeostasi del glucosio e ciò ha portato a cercare potenziali target per un'eventuale terapia. Oggi sono disponibili diversi farmaci che hanno un profondo effetto sulle alfa cellule pancreatiche. La caratteristica di queste componenti farmacologiche è che non essendo state sviluppate per correggere l'iperglucagonemia diabetica, non agiscono solo a livello delle alfa cellule, tuttavia la soppressione del glucagone che ne deriva è considerata essere vantaggiosa. Negli ultimi anni farmaci ipoglicemizzanti basati su ormoni incretinici, quali il GLP-1, sono stati usati per il trattamento del diabete di tipo 2, mentre agenti che hanno come target la via di segnalazione del glucagone, attraverso l'antagonismo o il disaccoppiamento del recettore Gcgr, sono ancora in fase di sviluppo clinico¹²⁰. Le terapie basate sulle incretine comprendono due classi di farmaci: agonisti del recettore del GLP-1 e inibitori del DPP-4, che agiscono aumentando la via di segnalazione del recettore del GLP-1 attraverso rispettivamente, la somministrazione di un analogo esogeno del GLP-1 oppure aumentando i livelli endogeni dell'ormone incretinico^{121,122}. Questi farmaci stimolano la secrezione di insulina e riducono la concentrazione plasmatica del glucagone, rallentano lo svuotamento gastrico e inibiscono l'intake di cibo¹²³. Siccome i cambiamenti dei livelli plasmatici del glucagone sono molto più pronunciati dei rispettivi livelli di insulina, in seguito ad un uso cronico degli inibitori, c'è la tendenza di attribuire un predominante effetto farmacologico di questi farmaci sull'inibizione dell'alfa cellula. Poiché la riduzione dei livelli plasmatici di glucagone ha effetti vantaggiosi sul controllo del glucosio nei pazienti con T2DM, sarebbe importante capire quali sono i meccanismi che

¹²⁰ Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." Rev Diabet Stud 8.3 (2011): 369-381.

¹²¹ Deacon Carolyn F. and Bo Ahrén. "Physiology of incretins in health and disease." The review of diabetic studies: RDS 8.3 (2011): 293.

¹²² Garber Alan J. "Incretin therapy--present and future." Rev Diabet Stud 8.3 (2011): 307-322.

¹²³ Holst Jens Juul. "The physiology of glucagon-like peptide 1." Physiological reviews 87.4 (2007): 1409-1439.

agonisti del recettore del GLP-1 e inibitori del DPP-4 esercitano sulla repressione della secrezione del glucagone¹²⁴.

Il meccanismo attraverso il quale avviene l'inibizione della secrezione di glucagone non è ancora chiaro, anche se alla base sembrerebbe esserci un effetto paracrino: locali incrementi dei livelli di insulina e di altri prodotti della beta cellula sembrerebbero inibire la secrezione delle alfa cellule; è noto, infatti, che l'insulina inibisce il rilascio del glucagone. Nei pazienti diabetici di tipo 1 senza una residua funzione beta cellulare, è comunque evidente l'effetto inibitorio del GLP-1, suggerendo il coinvolgimento di altri meccanismi¹²⁵. La secrezione del glucagone potrebbe essere inibita, in maniera paracrina, dal rilascio della somatostatina prodotta dalle vicine cellule delta pancreatiche. Questa ipotesi è supportata da studi in pancreas di ratti perfusi, dove la forte inibizione dell'ormone incretinico è abolita da anticorpi anti-somatostatina e antagonisti del recettore 2 della somatostatina¹²⁶. Da studi in vivo sull'uomo è emerso che l'effetto inibitorio del GLP-1 viene meno quando i livelli di glucosio sono al di sotto dei normali livelli a digiuno, e in condizioni ipoglicemiche la secrezione del glucagone non è ostacolata dall'ormone incretinico. Al contrario la soppressione del glucagone aumenta ad alti livelli di glucosio.

L'osservazione che il GLP-1 e GIP sono rapidamente inattivati dall'azione del DPP-4, e che quindi questo ha un ruolo importante nell'azione delle incretine, ha suscitato grande interesse e ha portato allo sviluppo di inibitori del DPP-4¹²⁷. Questi inibitori orali aumentano la concentrazione plasmatica degli ormoni incretinici endogeni, impedendo la loro rapida inattivazione da parte di questo enzima. L'inibizione del DPP-4 ha quindi un effetto sui livelli del glucagone attraverso un aumento dei due ormoni incretinici, ma è il GLP-1 che ha il

¹²⁴ Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.

¹²⁵ Creutzfeldt Werner OC et al. "Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7-36) amide in type I diabetic patients." *Diabetes care* 19.6 (1996): 580-586.

¹²⁶ De Heer, J. et al. "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas." *Diabetologia* 51.12 (2008): 2263-2270.

¹²⁷ Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2131-2157.

maggior effetto glucagonostatico. Trials clinici con inibitori del DPP-4 in pazienti con diabete di tipo 2 hanno dimostrato una convincente riduzione dei livelli del glucagone^{128,129,130}. La soppressione del glucagone è stata osservata sia in trattamenti cronici che acuti^{131,132}. Alcuni studi hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di glucagone è dose-dipendente¹³³ sia a digiuno che nella fase post-prandiale; tuttavia non si trova questa evidenza in altri lavori. Considerando gli effetti dell'inibizione del DPP-4 sulle alfa cellule è emerso, da recenti studi, che oltre ad esserci una riduzione postprandiale dei livelli di glucagone, c'è anche un'augmentata risposta del glucagone in clamp ipoglicemici. L'inibizione del DPP-4 potrebbe modulare la secrezione dell'alfa cellula, sia in risposta agli effetti soppressivi dell'iperglicemia che a quelli stimolatori dell'ipoglicemia¹³⁴.

Due inibitori del DPP-4, Vildagliptin e Sitagliptin, hanno completato la fase tre del programma del trial clinico, in soggetti con T2DM. Questi agenti sono ben tollerati e non sono associati a ipoglicemia se assunti come unici farmaci antidiabetici. Aumentano i livelli plasmatici degli ormoni incretinici in seguito all'ingestione di un pasto, la secrezione di insulina glucosio-stimolata e riducono il tasso di proinsulina-insulina, migliorando la funzionalità della beta cellula¹²⁷.

¹²⁸ DeFronzo Ralph A. et al. "Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study." *Current Medical Research and Opinion* 24.10 (2008): 2943-2952.

¹²⁹ Ahrén B.O. et al. "Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89.5 (2004): 2078-2084.

¹³⁰ DeFronzo Ralph A. et al. "The efficacy and safety of saxagliptin when added to metformin therapy in patients with inadequately controlled type 2 diabetes with metformin alone." *Diabetes care* 32.9 (2009): 1649-1655.

¹³¹ Balas Bogdan et al. "The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92.4 (2007): 1249-1255.

¹³² Herman Gary A. et al. "Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91.11 (2006): 4612-4619.

¹³³ Chacra A.R. et al. "Saxagliptin added to a submaximal dose of sulphonylurea improves glycaemic control compared with uptitration of sulphonylurea in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial." *International journal of clinical practice* 63.9 (2009): 1395-1406.

¹³⁴ Ahrén Bo et al. "Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94.4 (2009): 1236-1243.

Il trattamento con agonisti per il recettore del GLP-1 potenzia l'effetto del GLP-1 endogeno sulla riduzione della secrezione del glucagone. Nei pazienti diabetici ripetute somministrazioni portano a una riduzione dei livelli di glucagone sia a digiuno che nella fase postprandiale. I livelli di insulina e C-peptide, invece, durante un trattamento a lungo termine rimangono invariati e sono ridotti a causa dei bassi livelli di glicemia. Emerge, quindi, l'effetto glucagonostatico di questi agenti che si va a sommare a quello insulinotropico. L'analogo farmacologico del GLP-1 è l'Exendin-4, un peptide di 39 amminoacidi estratto dalla saliva di una lucertola. Exendin-4, avendo la glicina in posizione 2, non è un substrato del DPP-4 e, quindi, rimane in circolo più a lungo, abbassando significativamente i livelli di glucosio.

1.8. I cotrasportatori sodio - glucosio

Il glucosio è la principale fonte di energia negli eucarioti e nell'uomo, ed è il fondamentale combustibile che produce l'energia per regolare l'attività metabolica. In quanto molecola polare, il glucosio non è solubile nel doppio strato fosfolipidico e quindi necessita di specifiche proteine di trasporto, chiamati glucosio trasportatori per attraversare la membrana plasmatica^{135,136}. Esistono due famiglie di trasportatori del glucosio strutturalmente affini: quella mediante diffusione facilitata, che comprende tredici isoforme (GLUT 1-12 e HMIT), e la famiglia dei cotrasportatori sodio-glucosio (SGLT), della quale sono state identificate sei isoforme¹³⁷. I trasportatori del glucosio svolgono un ruolo essenziale nel mantenimento dei livelli di glicemia nel sangue, promuovendone l'assorbimento nei diversi tipi di cellule, mentre quando i suoi livelli in circolo diminuiscono ne permettono il rilascio dal fegato. Inoltre, questi trasportatori sono responsabili dell'assorbimento del glucosio che proviene dalla dieta a livello

¹³⁵ Bell Graeme I. et al. *"Molecular biology of mammalian glucose transporters."* Diabetes care 13.3 (1990): 198-208

¹³⁶ Sabino-Silva R. et al. *"The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy."* Brazilian Journal of Medical and Biological Research 43.11 (2010): 1019-1026.

¹³⁷ Zhao Feng-Qi and Aileen F. Keating. *"Functional properties and genomics of glucose transporters."* Current genomics 8.2 (2007): 113.

intestinale, e nei reni del suo riassorbimento dal filtrato glomerulare. Il trasporto trans-epiteliale nelle cellule dell'intestino tenue, dei tubuli renali prossimali e dei condotti delle ghiandole salivari, avviene mediante l'azione coordinata degli SGLT, che si trovano a livello della membrana luminale e permettono un afflusso di glucosio, e dei GLUT, posti a livello della membrana basolaterale, che ne consentono l'efflusso¹³⁸.

Gli SGLT costituiscono una grande famiglia di proteine di membrana coinvolte nel trasporto di glucosio, aminoacidi, vitamine, osmoliti, e alcuni ioni. Nelle cellule epiteliali, dell'intestino tenue e nei tubuli contorti prossimali del rene, il glucosio è rispettivamente assorbito e riassorbito contro il suo gradiente elettrochimico attraverso un meccanismo di trasporto attivo, che utilizza il gradiente del sodio generato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi presente sulla membrana basolaterale¹³⁷. Anche se sono state descritte 6 isoforme di sodio-glucosio cotrasportatori, le proteine più importanti sono SGLT1 e SGLT2, codificate rispettivamente dai geni SLC5A1 e SLC5A2^{139,140}.

SGLT1 è una proteina di membrana costituita da 662 amminoacidi con un peso molecolare di 75 kDa. È espressa principalmente nell'intestino tenue, ma è stata individuata anche in altri tessuti, come nel rene, nel cuore, nelle ghiandole salivari parotidi e sottomandibolari^{141,142}. Ha alta affinità ($K_m=0.8$ mM) ma scarsa capacità di trasporto per il glucosio¹⁴³, ed è specificamente inibita dalla Florizina. Per ogni molecola di glucosio, SGLT1 trasporta due ioni sodio che sono successivamente pompati fuori dalla cellula attraverso la Na^+/K^+ ATPasi, mantenendo così il gradiente elettrochimico del sodio. Il glucosio è accumulato

¹³⁸ Hediger Matthias A. and David B. Rhoads. "Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters." *Physiological Reviews* 74.4 (1994): 993-1026.

¹³⁹ Wright Ernest M. and Eric Turk. "The sodium/glucose cotransport family SLC5." *Pflügers Archiv* 447.5 (2004): 510-518.

¹⁴⁰ Wright E.M., B. A. Hirayama and D. F. Loo. "Active sugar transport in health and disease." *Journal of internal medicine* 261.1 (2007): 32-43.

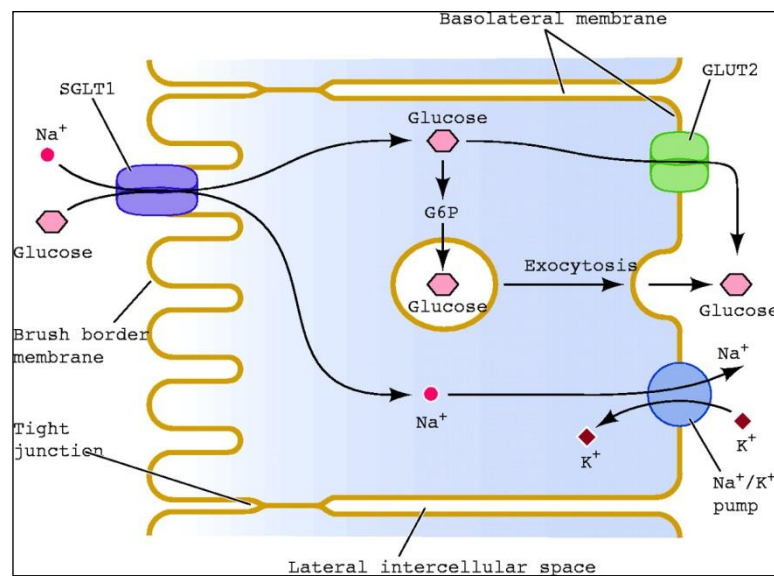
¹⁴¹ Sabino-Silva R. et al. " Na^+ -glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow." *Journal of Membrane Biology* 228.2 (2009): 63-69.

¹⁴² Zhou Lubing et al. "Human cardiomyocytes express high level of Na^+ /glucose cotransporter 1 (SGLT1)." *Journal of cellular biochemistry* 90.2 (2003): 339-346. .

¹⁴³ Hediger Matthias A. and David B. Rhoads. "Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters." *Physiological Reviews* 74.4 (1994): 993-1026.

all'interno della cellula ed è in seguito riversato nell'interstizio secondo il suo gradiente di concentrazione, attraverso i trasportatori di diffusione facilitata. Il legame dei due ioni sodio al cotrasportatore permette un cambiamento conformazionale nel sito di legame del glucosio, aumentando l'affinità del trasportatore per questo substrato: attraverso un secondo cambiamento conformazionale, il sodio e il glucosio sono rilasciati all'interno della cellula. Negli ultimi anni è stato dimostrato che, oltre ai due ioni Na^+ e alla molecola di glucosio, la proteina SGLT1 è anche in grado di trasportare circa 264 molecole di H_2O . Il trasporto accoppiato di acqua avviene a causa di cambiamenti strutturali della proteina durante il ciclo di trasporto che sono indotti dai ligandi sodio e glucosio¹⁴⁴.

Figura 9. Meccanismo di trasporto attivo del glucosio mediato da SGLT1.



Fonte: physiologyonline.physiology.org

¹⁴⁴ Wright Ernest M. et al. "Surprising versatility of Na^+ -glucose cotransporters: SLC5." *Physiology* 19.6 (2004): 370-376.

La proteina SGLT2 è costituita da 672 aminoacidi. Originariamente descritta come cotrasportatore di aminoacidi, è stata riconosciuta solo in un secondo momento come trasportatore del glucosio. A differenza di SGLT1, SGLT2 ha bassa affinità per il glucosio ($K_m=1.6 \text{ mM}$)¹³⁷, ma alta capacità di trasporto. Per ogni molecola di glucosio, trasporta uno ione Na^+ . Il gene che codifica per SGLT2 (SLC5A2) è prevalentemente espresso nel rene, tuttavia è stata evidenziata una bassa espressione di mRNA anche in ghiandole mammarie, fegato, polmoni, intestino, muscolo scheletrico, e milza¹³⁷. SGLT2 è molto espresso nella membrana luminale del segmento S1 del tubulo prossimale renale, dove è responsabile del riassorbimento del glucosio dal filtrato glomerulare. Infatti, più del 90% di glucosio filtrato è riassorbito nei segmenti iniziali del tubulo prossimale tramite SGLT2^{145,146}.

L'attività dei trasportatori presenti sulla membrana è regolata, direttamente o indirettamente, dalle proteine chinasi (PK). Gli effetti diretti si verificano attraverso fosforilazione del trasportatore, cambiandone così la cinetica. Da studi nell'intestino tenue di ratto è stato dimostrato che, l'attivazione dei recettori β -adrenergici induce la fosforilazione di SGLT1 attraverso la PKA, migliorando la funzione del cotrasportatore e aumentando così il trasporto del glucosio¹⁴⁷. Meccanismi indiretti comportano cambiamenti nel tasso di inserimento o di recupero dei trasportatori dalla membrana plasmatica. Hirsch e altri hanno dimostrato, in ovociti di *Xenopus laevis*, che la PK regola il trasporto di glucosio SGLT1-indotto dal controllo della distribuzione dei trasportatori tra il compartimento intracellulare e la membrana plasmatica. L'attivazione di PKA e PKC, rispettivamente, aumenta e diminuisce la velocità massima del trasporto di Na^+ /glucosio, un evento accompagnato da un aumento e diminuzione,

¹⁴⁵ Wells Rebecca G. et al. "Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 263.3 (1992): F459-F465.

¹⁴⁶ Wright Ernest M. et al. "Surprising versatility of Na^+ -glucose cotransporters: SLC5." *Physiology* 19.6 (2004): 370-376.

¹⁴⁷ Ishikawa Yasuko, Takafumi Eguchi and Hajime Ishida. "Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine: Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1357.3 (1997): 306-318.

rispettivamente, del contenuto proteico di SGLT1 nella membrana plasmatica¹⁴⁸. È stato ipotizzato che l'aumento dell'attività β -adrenergica potrebbe contribuire a migliorare l'assorbimento intestinale del glucosio attraverso la traslocazione di SGLT1.

Recenti studi hanno dimostrato che i livelli di espressione genica e proteica di SGLT1 nelle biopsie duodenali, sono 3-4 volte maggiori nei soggetti diabetici rispetto ai controlli. I soggetti con diabete hanno, quindi, una maggiore capacità nell'assorbire il glucosio, a causa dell'aumentata espressione del trasportatore e dei cambiamenti strutturali della membrana dell'orletto a spazzola¹⁴⁹. Ratti sia con diabete spontaneo che indotto farmacologicamente, sono caratterizzati da un aumento dell'espressione di SGLT2 e GLUT2 nei reni. Quest'aumentata espressione dei trasportatori del glucosio è dovuta a un meccanismo di regolazione che cerca di evitare la perdita di glucosio. Tuttavia, si traduce anche in una maggiore concentrazione di glucosio dal tubulo prossimale nell'interstizio, favorendo lo sviluppo di glomerulosclerosi e nefropatia, nel diabete non controllato^{150,151}. È importante sottolineare che, le alterazioni nell'espressione di SGLT nel diabete, coinvolgono meccanismi di regolazione a livello trascrizionale, come recentemente dimostrato da studi utilizzando ratti diabetici alloxana-indotti. In questi animali, il diabete aumenta sia l'espressione di mRNA di SGLT2 che HNF-1 α e c'è una correlazione tra l'espressione di SGLT2 e HNF-1 α legato al promotore di SGLT2 nella corteccia renale, come dimostrano da saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)¹⁵².

¹⁴⁸ Hirsch Jochen R., Donald DF Loo and Ernest M. Wright. "Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes." *Journal of Biological Chemistry* 271.25 (1996): 14740-14746.

¹⁴⁹ Dyer J. et al. "Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282.2 (2002): G241-G248.

¹⁵⁰ Nath Karl A. "Tubulo interstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage." *American Journal of Kidney Diseases* 20.1 (1992): 1-17.

¹⁵¹ D'Agord Schaan B. et al. "Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes." *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme* 33.11 (2001): 664-669.

¹⁵² Freitas H. S. et al. "Na⁺-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity." *Endocrinology* 149.2 (2008): 717-724.

1.8.1. Florizina

L'inibizione dei sodio-glucosio cotrasportatori è da molto tempo considerato un possibile approccio per il trattamento dell'iperglicemia nel diabete di tipo 2.

Per anni ha svolto un ruolo importante nel diabete e nella fisiologia del rene la Florizina. Si tratta di un glucoside naturale presente in varie piante come nella corteccia della radice del melo. È stato isolato nel 1835 da un chimico francese e in seguito utilizzato per il trattamento della febbre e malattie infettive, in particolare della malaria. Dopo l'osservazione che induce glicosuria, è stato utile nello studio della funzione renale negli esseri umani¹⁵³. Studi dal 1950 hanno dimostrato che, la Florizina, blocca il trasporto di glucosio in diversi tessuti, tra cui l'intestino tenue e il rene, inibendo le proteine SGLT¹⁵⁴. Il trattamento di ratti diabetici parzialmente pancreatectomizzati con la Florizina induce glicosuria, abbassa il livello di glucosio nel sangue e migliora la resistenza all'insulina in questi animali¹⁵⁵. Emerge quindi che i pazienti diabetici possono trarre beneficio da un trattamento con la Florizina. Nonostante la Florizina inibisce l'aumento del livello di glucosio nel sangue in topi trattati con una soluzione di glucosio, non è stato ulteriormente sviluppato come terapeutico per il diabete di tipo 2 per vari motivi, che includono: la bassa selettività per SGLT2 rispetto SGLT1, la presenza di un metabolita attivo, e la sua bassa biodisponibilità orale dovuta allo scarso assorbimento intestinale¹⁵³. L'inibizione di SGLT1 può anche provocare effetti a livello gastrointestinale come diarrea grave, disidratazione, e malassorbimento¹⁵⁶. La floretina, metabolita attivo della Florizina, può anche produrre effetti negativi inibendo GLUT1 e GLUT2¹⁵⁷. La scarsa biodisponibilità della Florizina ha

¹⁵³ Ehrenkranz Joel RL et al. "Phlorizin: a review." *Diabetes/metabolism research and reviews* 21.1 (2005): 31-38.

¹⁵⁴ Panayotova-Heiermann Mariana, Donald DF Loo and Ernest M. Wright. "Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter." *Journal of Biological Chemistry* 270.45 (1995): 27099-27105.

¹⁵⁵ Rossetti Luciano et al. "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats." *Journal of Clinical Investigation* 79.5 (1987): 1510.

¹⁵⁶ Wright Ernest M., Donald DF Loo and Bruce A. Hirayama. "Biology of human sodium glucose transporters." *Physiological reviews* 91.2 (2011): 733-794.

¹⁵⁷ Thorens Bernard and Mike Mueckler. "Glucose transporters in the 21st Century." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298.2 (2010): E141-E145.

portato allo sviluppo di T-1095, un analogo, che è somministrato per via orale, assorbito nell'intestino, convertito nella sua forma attiva nel fegato, e poi filtrato dal rene dove impedisce il riassorbimento di glucosio, bloccando SGLT2 e SGLT1^{158,159}. Da studi su modelli di topo e di ratto con diabete tipo 1 e 2, è emerso che il trattamento acuto con T-1095 aumenta l'escrezione urinaria di glucosio e ne riduce i livelli nel sangue. Il trattamento cronico con T-1095 diminuisce i livelli di glucosio e glicemoglobina, di insulina e trigliceridi, normalizza il contenuto di GLUT4 nel muscolo e diminuisce la produzione epatica di glucosio¹⁶⁰. A livello del rene ritarda lo sviluppo della microalbuminuria e normalizza i livelli renali di GLUT2¹⁶¹. Tuttavia sono stati sviluppati composti con maggiore biodisponibilità orale e selettività per SGLT2 come possibili opzioni per il trattamento del diabete in futuro. Attualmente, ci sono due inibitori per SGLT2, dapagliflozin e canagliflozin, approvati a livello globale¹⁶². Il dapagliflozin (BMS-512148), un composto con un'emivita più lunga rispetto a quella della Florizina¹⁶³, è 1220 volte più selettivo per SGLT2, rispetto a SGLT1 mentre la Florizina è soltanto 10 volte più selettivo. Studi in vitro hanno indicato una potenza inibitoria comparabile per SGLT2 di ratto o umana. La somministrazione del dapagliflozin a ratti diabetici ha comportato una riduzione del 55% del glucosio nel sangue 5 h dopo una singola dose¹⁶⁴. Oltre a questi, altri inibitori di SGLT2 sono attualmente in fase di sviluppo o di sperimentazione clinica.

¹⁵⁸ Oku Akira et al. "Correction of hyperglycemia and insulin sensitivity by T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, in streptozotocin-induced diabetic rats." *The Japanese Journal of Pharmacology* 84.3 (2000): 351-354.

¹⁵⁹ Arakawa Kenji et al. "Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095." *British journal of pharmacology* 132.2 (2001): 578-586.

¹⁶⁰ Oku Akira et al. "T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes." *Diabetes* 48.9 (1999): 1794-1800.

¹⁶¹ Adachi Tetsuya et al. "T-1095, a renal Na⁺-glucose transporter inhibitor, improves hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats." *Metabolism* 49.8 (2000): 990-995.

¹⁶² Jung Chang Hee, Jung Eun Jang and Joong-Yeol Park. "A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor." *Diabetes & metabolism journal* 38.4 (2014): 261-273.

¹⁶³ Han Songping et al. "Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats." *Diabetes* 57.6 (2008): 1723-1729.

¹⁶⁴ Meng Wei et al. "Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes." *Journal of medicinal chemistry* 51.5 (2008): 1145-1149.

Emerge da studi recenti nell'uomo che gli inibitori di SGLT2 rappresentano una strategia efficace e innovativa per controllare la concentrazione di glucosio plasmatico nei pazienti con diabete di tipo 2; infatti, questi inibitori impediscono il riassorbimento del glucosio da tubuli renali, promuovono l'escrezione del glucosio urinario e ne diminuiscono i livelli nel plasma.

Il rene contribuisce all'omeostasi del glucosio attraverso diversi meccanismi, che includono gluconeogenesi, l'utilizzo del glucosio e il suo riassorbimento dal filtrato glomerulare¹⁶⁵. Durante il riassorbimento del glucosio, per esempio, sono filtrati 180 L di plasma al giorno nei reni, che corrispondono a circa 180 g di glucosio, se si considera una concentrazione plasmatica di glucosio di 100 mg/dl¹⁶⁶. In condizioni fisiologiche il glucosio è completamente riassorbito dalle cellule epiteliali del tubulo renale, infatti, non è presente nell'urina¹⁶⁷. A occuparsi del riassorbimento del glucosio sono i cotrasportatori sodio-glucosio localizzati a livello della membrana apicale, che utilizzando l'ATP, trasportano il glucosio contro il suo gradiente di concentrazione, mentre il sodio è trasportato secondo il suo gradiente elettrochimico che è generato e mantenuto dalla pompa sodio-potassio presente sulla membrana basolaterale. La maggior parte del glucosio filtrato è riassorbito da SGLT2 localizzato principalmente a livello del segmento S1 del tubulo renale prossimale; mentre SGLT1, situato a livello dei segmenti S2 e S3, si occupa del riassorbimento del glucosio rimasto. Il glucosio è accumulato nella cellula e poi attraverso un processo passivo trasportato nell'interstizio, secondo il suo gradiente. Questa funzione è svolta da GLUT1 e GLUT2, presenti sulla membrana basolaterale, che trasportano il glucosio per diffusione facilitata¹⁶⁸.

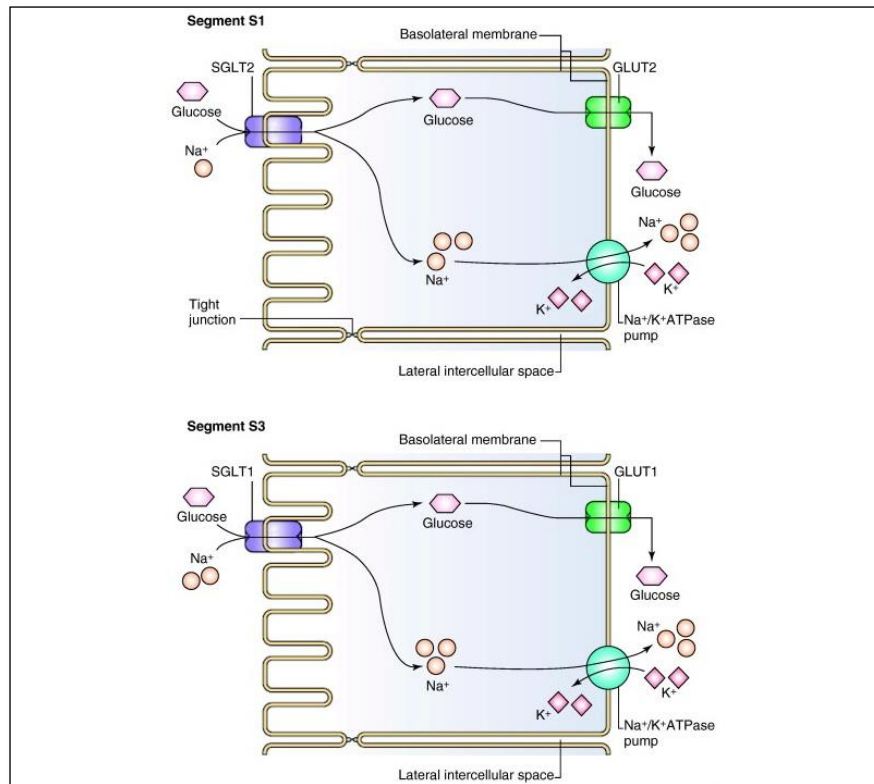
¹⁶⁵ Mather Amanda and Carol Pollock. "Glucose handling by the kidney." *Kidney international* 79 (2011): S1-S6.

¹⁶⁶ Gerich J. E. "Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications." *Diabetic Medicine* 27.2 (2010): 136-142.

¹⁶⁷ Abdul-Ghani, Muhammad A., Luke Norton and Ralph A. DeFronzo. "Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes." *Endocrine reviews* 32.4 (2011): 515-531.

¹⁶⁸ Jung Chang Hee, Jung Eun Jang and Joong-Yeol Park. "A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor." *Diabetes & metabolism journal* 38.4 (2014): 261-273.

Figura 10. Meccanismo di riassorbimento del glucosio nel tubolo renale mediante SGLT2 e SGLT1.



Fonte: www.spiro.ir

Nel corso degli anni è cambiato il modo di vedere il rene, da organo “vittima” nel diabete (nefropatia) a potenziale bersaglio per ridurre l’iperglicemia. Per raggiungere questo scopo, infatti, sono stati sviluppati farmaci che riducono il riassorbimento renale. Il carico di glucosio filtrato dipende della concentrazione di glucosio nel plasma e dalla velocità di filtrazione glomerulare (GFR); infatti, quando aumenta la concentrazione plasmatica di glucosio, aumenta in modo lineare anche il carico di glucosio filtrato^{169,167}. Quando la capacità di riassorbimento del tubulo prossimale è superata, come avviene durante l’iperglicemia, si ha glicosuria. Studi su pazienti e modelli animali di diabete hanno, infatti, costantemente evidenziato un aumento del tasso di riassorbimento

¹⁶⁹ Chao Edward C. and Robert R. Henry. "SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment." *Nature Reviews Drug Discovery* 9.7 (2010): 551-559.

di glucosio nel tubulo prossimale. Uno dei meccanismi molecolari responsabili è un aumento dell'espressione genica di SGLT2 durante l'iperglicemia^{168,170}. Il rene diabetico, aumentando la quantità di glucosio riassorbita, riduce la glicosuria ma aumenta la gravità dell'iperglicemia.

¹⁷⁰ Rahmoune Hassan et al. "Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes* 54.12 (2005): 3427-3434.

Capitolo 2. Scopo della tesi

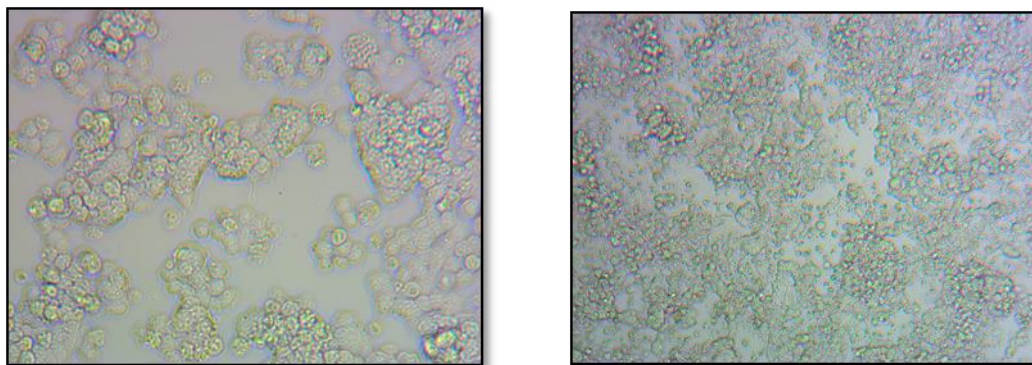
Studi recenti sembrerebbero coinvolgere sempre più, a livello delle cellule intestinali, il sodio-glucosio cotrasportatore nella modulazione della secrezione di GLP-1. Alla luce di quanto discusso prima, e poiché in letteratura sono assenti le informazioni riguardo a questi cotrasportatori a livello del tessuto endocrino pancreatico, lo scopo della mia tesi è stato quello di verificare la presenza e il ruolo di SGLT1 e SGLT2 in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche murine, il potenziale ruolo nella sintesi e secrezione di GLP-1 e glucagone, e di valutare i cambiamenti della loro espressione genica e proteica in presenza di perturbazioni metaboliche quali iperglicemia e ipernefemia, e in presenza o meno dell'inibitore specifico Florizina.

Capitolo 3. Materiali e metodi

3.1. Linea cellulare alfa TC1 clone 6

Alfa TC1 clone 6 (α -TC1/6) è una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche murine. Essa è stata clonata dalla linea cellulare alfa TC1, che deriva da un adenoma creato in topi transgenici in cui, l'espressione dell'oncogene che codifica per l'antigene T grande del virus SV40, è sotto il controllo del promotore di ratto per il pre-proglucagone. La linea cellulare parentale alfa TC1 è meno differenziata e produce glucagone e quantità considerevoli di insulina e pre-proinsulina. Alfa TC1 clone 6 presenta invece un fenotipo molto più differenziato che produce, infatti, solo glucagone^{171,172,173}.

Figura 11. Cellule pancreatiche murine della linea cellulare α -TC1clone 6 fotografate con ingrandimento 20X (A) e 10X (B).



A

B

¹⁷¹ Piro Salvatore et al. "Chronic Exposure to GLP-1 Increases GLP-1 Synthesis and Release in a Pancreatic Alpha Cell Line (α -TC1): Evidence of a Direct Effect of GLP-1 on Pancreatic Alpha Cells." PloS one 9.2 (2014): e90093.

¹⁷² Chen Xiaoping et al. "Isosteviol has beneficial effects on palmitate-induced α -cell dysfunction and gene expression." PloS one 7.3 (2012): e34361.

¹⁷³ Shen Xiao-xia et al. "Glucotoxicity and α Cell Dysfunction: Involvement of the PI3K/Akt Pathway in Glucose-Induced Insulin Resistance in Rat Islets and Clonal α TC1-6 Cells." Endocrine research 37.1 (2012): 12-24.

3.2. Coltura cellulare

La linea cellulare alfa TC1 clone 6 è stata acquistata dalla ditta American Type Culture Collection (ATCC, ATCC[®] CRL-2934[™]) e spedita in ghiaccio secco. Appena arrivate in laboratorio, le cellule sono state immediatamente criopreservate in azoto liquido.

3.2.1. Recupero di cellule crioconservate

Il vial, contenente 1.5×10^7 cellule in 1 ml di terreno di congelamento (Freezing Medium), è stato prelevato dall'azoto liquido, scongelato per circa 2 minuti in un bagnetto impostato alla temperatura di 37°C, rimosso e decontaminato con etanolo. Sotto cappa a flusso laminare il contenuto del vial è stato trasferito in una fiasca da 75 cm², contenente 15 ml di terreno di crescita completo: il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l.

Metodica di preparazione del terreno di crescita completo.

In un beaker sterile sono stati versati 800 ml di acqua milli Q ed è stato aggiunto il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) in polvere, contenente 1 g/l di glucosio. Sono stati aggiunti 1.5 g/l di bicarbonato di sodio (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e la soluzione è stata portata al volume di 1L. Avvenuta la solubilizzazione del DMEM, la soluzione è stata filtrata, al fine di renderla sterile, con filtri da 0.22 µm (Filtropur V100 1000ml 0.2µm, *Starstedt, Nümbrecht, Germany*). Per preparare il terreno di crescita completa, il DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l, sono stati aggiunti al DMEM (1 g/l di glucosio e 1,5 g/l di bicarbonato di sodio) i seguenti elementi: 10% di FBS, 15 mM di Hepes (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), 0,1 mM di amminoacidi non essenziali (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), 0.02% di BSA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), 100 unità/ml di penicillina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), 100 µg/ml di streptomomicina (*Sigma-Aldrich, St.*

Louis, MO, USA) ed è stato aggiunto infine il glucosio per arrivare ad una concentrazione finale di 2 g/l. Il terreno di crescita è stato successivamente filtrato con filtri da 0.22 µm.

La fiasca è stata posta in un incubatore a 37°C e al 5% di CO₂, controllata il giorno successivo al fine di valutare l'adesione e la vitalità cellulare, e sostituito il terreno di coltura ogni 48 h. Dopo un periodo di incubazione di sette giorni, raggiunto almeno il 75% di confluenza, le cellule sono state staccate con tripsina e suddivise in 5 fiasche, come raccomandato dalla ditta. Dopo ulteriori sette giorni di coltura, una parte delle cellule è stata congelata in azoto liquido mentre le altre sono state divise in nuove subcolture.

3.2.2. Crioconservazione delle cellule

La linea cellulare alfa TC1 clone 6, come la maggior parte delle linee cellulari, può essere conservata a temperature inferiori a -130°C. La procedura di crioconservazione consiste nel congelare le cellule lentamente fino a raggiungere una temperatura inferiore a -70°C e nel trasferire successivamente i vials in azoto liquido, dove verranno mantenute ad una temperatura inferiore a -130°C. Un lento congelamento, di -1°C al minuto, è importante affinché l'acqua, presente all'interno delle cellule, possa uscire per osmosi richiamata dall'aumento della concentrazione di soluti nella sospensione cellulare; in questo modo non si formeranno cristalli di ghiaccio nell'ambiente intracellulare e le cellule non saranno danneggiate. Per evitare che perdano la loro vitalità, a causa di un'eccessiva fuoriuscita di acqua che provoca una consistente riduzione del volume cellulare, è aggiunto nel mezzo di congelamento un agente crioprotettivo.

Procedura della crioconservazione

- È stato preparato il Freezing Medium aggiungendo al terreno di crescita completo: FBS al 20% per aumentare la sopravvivenza delle cellule al momento del recupero di queste dalla crioconservazione, e il DMSO al 10% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

- Le cellule sono state tripsinizzate e centrifugate a 488 ×g per 5 minuti a temperatura ambiente.
- È stato eliminato il surnatante e il pellet è stato risospeso in 1 ml di Freezing Medium.
- La sospensione cellulare è stata trasferita in tubi sterili da 2 ml con tappo a vite, precedentemente etichettati con il nome della linea cellulare e la data.
- I tubi sono stati posti in una camera di congelamento, pre-raffreddata a 4°C, che ha una velocità di raffreddamento controllata e permette di ridurre la temperatura di -1°C al minuto (Mr. Frosty™ Freezing Container. *Nalgene, UK*).
- La camera di congelamento è stata posta in un congelatore a -70°C per almeno 24 ore, e successivamente i tubi sono stati trasferiti in azoto liquido a -130°C.

3.2.3. *Subcultura cellulare*

Per garantire la vitalità, la stabilità genetica e quella fenotipica, la linea cellulare α -TC1/6 è stata mantenuta in una fase di crescita esponenziale. Per permettere che ciò avvenga, le cellule sono state divise regolarmente prima che entrino nella fase stazionaria e che il monostrato diventi confluento al 100%. Raggiunto almeno il 75% della confluenza, sono state staccate con l'ausilio dell'enzima proteolitico tripsina, che si occupa della digestione delle proteine di legame, disperse in un'unica sospensione cellulare e suddivise in nuove fiasche, con un numero di cellule/fiasca di circa 10×10^6 , affinché possano aderire e dividersi.

Procedura della subcoltura

- Dopo aver rimosso il mezzo di coltura presente nella fiasca, le cellule sono state lavate con 10 ml di PBS 1X (Phosphate buffer saline, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), per due volte.
- Per staccare le cellule dalla loro superficie di adesione è stato aggiunto 1 ml di soluzione di tripsina/EDTA allo 0.25% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*),

in modo da ricoprire completamente il monostrato cellulare. La fiasca è stata posta nell'incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 5 minuti.

- Trascorso il periodo di incubazione, le cellule sono state osservate al microscopio per verificare se hanno assunto un aspetto arrotondato e rifrangente, indice del loro distacco.
- Sono stati aggiunti 15 ml di DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l alla sospensione cellulare per inattivare la tripsina.
- Le cellule sono state accuratamente risospese e dopo aver controllato che la maggior parte (più del 95%) di esse sia in forma di singole cellule (e non ci siano aggregati), sono state divise in tre nuove fiasche da 75 cm² e diluite con 12 ml di DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l.
- Le fiasche sono state poste nell'incubatore; la coltura è stata controllata il giorno seguente per assicurarsi che le cellule si siano riattaccate e siano in attiva crescita e ogni due giorni è stato cambiato il mezzo di coltura.

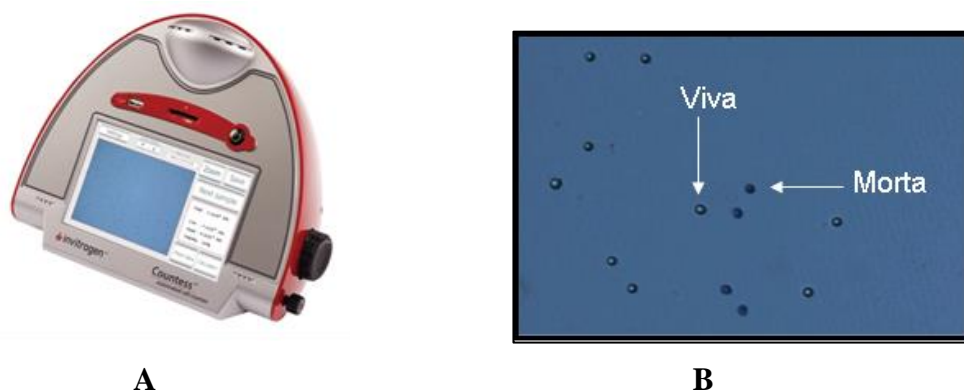
3.2.4. Tripsinizzazione per studi sperimentali

Una volta che le cellule hanno riacquisito il loro fenotipo, che possono aver perso a causa dello stress del processo di crioconservazione, e sono entrate nella fase di crescita esponenziale, sono state poi utilizzate per gli studi sperimentali. Raggiunta la confluenza, è stato rimosso il mezzo di coltura dalla fiasca e le cellule sono state lavate per due volte con 10 ml di PBS 1X. È stata ricoperta la superficie di adesione cellulare con 1 ml di tripsina/EDTA allo 0.25% e, dopo un'incubazione di 5 minuti a 37°C e al 5% di CO₂, le cellule sono state osservate al microscopio per verificare che effettivamente si siano staccate. Sono stati aggiunti 9 ml di DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l, le cellule sono state risospese, trasferite in un tubo Falcon da 15 ml e centrifugate a 488 ×g per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 1 ml di DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l e trasferito in un tubo Falcon da 50 ml, dove sono stati aggiunti 19 ml di terreno di crescita completo per la conta e la coltura cellulare.

3.2.5. Conta cellulare

Dalla sospensione cellulare sono stati prelevati 10 μ l e aggiunti 10 μ l di Trypan Blue 0.4% (rapporto 1:1) per valutare il numero delle cellule contenute. La conta cellulare è stata eseguita con il contatore automatizzato CountessTM (Life Technologies, Grand Islands, USA). Lo strumento permette una conta delle cellule totali, delle cellule vive e di quelle morte e dà una stima della vitalità cellulare. Sono stati caricati 10 μ l su un vetrino da camera che è stato inserito nello strumento per il conteggio delle cellule: la fotocamera acquisisce l'immagine delle cellule dal campione e il software la analizza automaticamente. Il principio della valutazione si fonda sul concetto dell'integrità della membrana cellulare: le cellule che non hanno una membrana intatta permetteranno il passaggio del Trypan Blue che conferirà a esse una colorazione blu e saranno riconosciute come cellule morte; mentre quelle vive, appariranno solo circondate dall'alone blu poiché il colorante non è riuscito a entrare all'interno della cellula (**Figura 12B**). In base al numero di cellule vive, è stato calcolato il volume da prelevare dalla sospensione cellulare iniziale per piastrare un numero di cellule ottimali per ogni punto sperimentale.

Figura 12. Contatore automatizzato Countess[®].



Immagini ottenute da ProductWiki Inc. © 2013 e CountessTM-manual InvitrogenTM.

3.2.6. Disegno sperimentale

Le cellule sono state mantenute in DMEM al 10% di FBS e glucosio 11.1 mmol/l per le prime 24 h di incubazione a 37°C e al 5% di CO₂, affinché avvenga l'adesione cellulare e quindi la formazione di legami intracellulari e intercellulari. Successivamente il mezzo di coltura è stato sostituito con DMEM privo di siero e contenente glucosio 5.5 mmol/l e le cellule sono state mantenute in coltura per ulteriori 24 h a 37°C e al 5% di CO₂. Questa fase ha la funzione di normalizzare il metabolismo cellulare. Al termine di questa fase le cellule sono state coltivate per 16 h in presenza di glucosio 5.5 mmol/l, glucosio 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta di acidi grassi liberi 0.5 mmol/l (oleico e palmitico in rapporto 2:1, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), con o senza l'aggiunta di Florizina 50 µmol/l^{174,175,176} (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), inibitore del sodio-glucosio cotrasportatore.

3.3. Valutazione dell'attività metabolica cellulare

Per valutare l'attività metabolica è stato utilizzato un saggio colorimetrico con MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. L'MTT (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), disciolto in una soluzione salina bilanciata senza rosso fenolo, è di colore giallo. Questo saggio si basa sul concetto che solo le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali sono in grado di tagliare l'anello tetrazolico del MTT, portando alla formazione di cristalli violacei di formazano, che sono insolubili in soluzione acquosa, ma possono essere solubilizzati in isopropanolo acidificato. La soluzione di color viola che si ottiene è misurabile allo spettrofotometro. La quantità di formazano che viene prodotta è

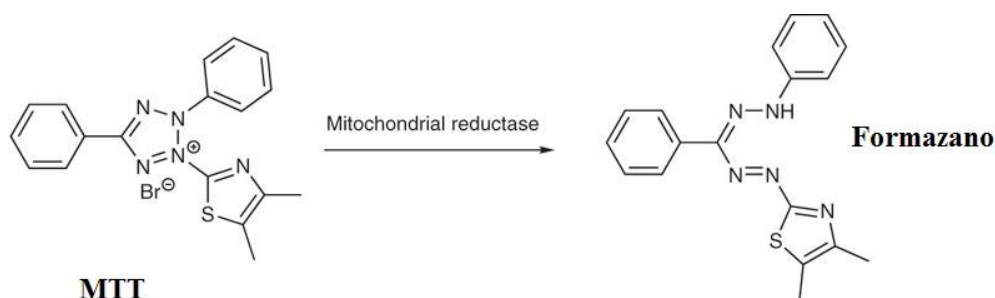
¹⁷⁴ Yamaguchi Koji et al. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effect of an sodium-glucose cotransporter inhibitor, phlorizin, on renal glucose transport in rats." *Drug Metabolism and Disposition* 39.10 (2011): 1801-1807.

¹⁷⁵ Blodgett Amy B. et al. "A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells." *Diabetes technology & therapeutics* 13.7 (2011): 743-751.

¹⁷⁶ Hirose Masamichi et al. "Phlorizin Prevents Electrically-Induced Ventricular Tachyarrhythmia during Ischemia in Langendorff-Perfused Guinea-Pig Hearts." *Biological & pharmaceutical bulletin* 37.7 (2014): 1168-1176.

direttamente proporzionale al numero di mitocondri attivi, e quindi, al numero di cellule vitali^{177,178}.

Figura 13. Reazione di conversione del MTT in Formazano.



Fonte: www.nature.com

Procedura di valutazione dell'attività metabolica cellulare

- Sono state utilizzate piastre multiwell da 96 pozzetti e sono state piastrate 5×10^4 cellule per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 10 μ l di MTT (5 mg/ml in PBS) in 100 μ l di terreno di coltura (diluizione 1:10) e la piastra è stata posta in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 2h^{177,179}, evitando l'esposizione alla luce.
- È stato aspirato il surnatante e sono stati aggiunti 100 μ l di una soluzione di isopropanolo con il 10% di dimetilsolfossido (DMSO) per la solubilizzazione dei cristalli di formazano.
- È stata fatta un'incubazione di 30 minuti al buio.

¹⁷⁷ Liu Yuanbin and David Schubert. "Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis." *Journal of neurochemistry* 69.6 (1997): 2285-2293.

¹⁷⁸ Liu Yuanbin et al. "Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *Journal of neurochemistry* 69.2 (1997): 581-593.

¹⁷⁹ Berridge Michael V. and An S. Tan. "Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Archives of biochemistry and biophysics* 303.2 (1993): 474-482.

- Infine è stata fatta una lettura allo spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 540 nm per la lettura dei campioni e 620 nm per il background (che è stato sottratto alla prima lettura).

3.4. Valutazione dell'apoptosi e della necrosi cellulare

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata, basata su meccanismi genetici e caratterizzata da cambiamenti morfologici e biochimici¹⁸⁰. Tra i cambiamenti cellulari che sono coinvolti nelle fasi precoci di questo processo, è inclusa la perdita dell'asimmetria dei fosfolipidi a livello della membrana plasmatica. Infatti, in una cellula "vitale", i fosfolipidi sono distribuiti asimmetricamente tra i due foglietti della membrana plasmatica e la fosfatidilserina è trasportata sul lato interno del doppio strato fosfolipidico da un enzima Mg^{2+} -ATP dipendente, l'amminofosfolipidi traslocasi^{181,182}. In una cellula "apoptotica" la fosfatidilserina è traslocata invece sulla porzione esterna della membrana, in seguito all'inibizione di flippasi o all'attivazione di scramblasi¹⁸¹. Diventa quindi disponibile per il legame con le annessine, un gruppo di proteine omologhe che legano i fosfolipidi in presenza di calcio^{183,184}. Per misurare il tasso di apoptosi e di necrosi è stato utilizzato l'Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*) che comprende la sonda fluorescente, Annessina V-fluoresceina isotiocianato (AnnexinV-FITC) e lo Ioduro di Propidio

¹⁸⁰ Majno Guido and Isabelle Joris. "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *The American journal of pathology* 146.1 (1995): 3.

¹⁸¹ Matsura Tatsuya. "Oxidized Phosphatidylserine: Production and Bioactivities." *Yonago Acta medica* 57.4 (2014): 119-127.

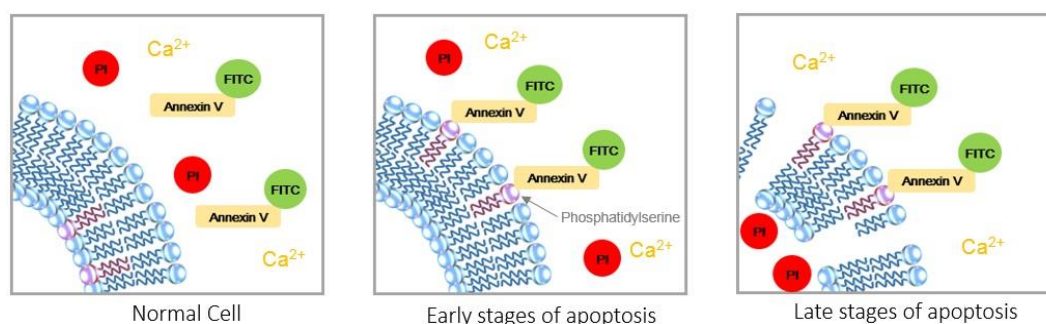
¹⁸² Kuypers Frans A. et al. "Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V." *Blood* 87.3 (1996): 1179-1187.

¹⁸³ Pigault Claire et al. "Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes." *Journal of molecular biology* 236.1 (1994): 199-208.

¹⁸⁴ Trotter Patrick J., Margaret A. Orchard and John H. Walker. " Ca^{2+} concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes." *Biochem. J* 308 (1995): 591-598.

(PI)¹⁸⁵. L'annexina V è coniugata con il fluoroforo fluoresceina isotiocianato (FITC) ed emette nel verde quando, in presenza di calcio, si lega alla fosfatidilserina esposta dalle cellule che stanno iniziando il processo apoptotico. Lo ioduro di propidio invece si lega al DNA delle cellule necrotiche la cui membrana è totalmente compromessa, emettendo nel rosso. L'utilizzo di una combinazione di due fluorofori diversi permette quindi di differenziare le cellule in apoptosi precoce che saranno annexina V positive e PI negative, le cellule necrotiche annexina V positive e PI positive ed infine le cellule vive annexina V negative e PI negative.

Figura 14. Meccanismo di funzionamento del kit di apoptosi e necrosi.



Fonte: www.dojindo.eu.com

Procedura di valutazione dell'apoptosi e della necrosi cellulare

Per valutare l'apoptosi e necrosi cellulare sono state utilizzate piastre multiwell da 96 pozzetti, contenenti ciascuno 5×10^4 cellule in 100 μ l di terreno.

- È stato preparato il Binding Buffer 1X, diluendo 550 μ l di Binding Buffer 10X in 4.95 ml di acqua sterile.
- La piastra è stata centrifugata a 400 \times g per 5 minuti a temperatura ambiente.

¹⁸⁵ Chowdhury Avik Acharya et al. "Synergistic apoptosis of CML cells by buthionine sulfoximine and hydroxychavicol correlates with activation of AIF and GSH-ROS-JNK-ERK-iNOS pathway." PloS one 8.9 (2013): e73672.

- È stato aspirato delicatamente il terreno di incubazione e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di Binding Buffer 1X. La piastra è stata centrifugata a 400 ×g per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Terminata la centrifuga, è stato aspirato il surnatante e sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione contenente Binding Buffer 1X, Annessina V-FITC e Propidium Iodide Solution. Per 500 µl di Binding Buffer 1X sono stati aggiunti 5 µl di Annessina V-FITC (50 µg/ml) e 10 µl PI (100 µg/ml).
- La piastra è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente, evitando l'esposizione alla luce.
- Terminata l'incubazione, è stata centrifugata a 400 ×g per 5 minuti a temperatura ambiente.
- È stato aspirato delicatamente il surnatante e sono stati aggiunti 100 µl di Binding Buffer 1X.
- La lettura della piastra è stata fatta allo spettrofluorimetro, impostando le seguenti lunghezze d'onda: 485 nm (eccitazione) e 535 nm (emissione) per l'annessina V-FITC e 560 nm (eccitazione) e 595 nm (emissione) per il PI.

3.5. Valutazione dello stress ossidativo cellulare

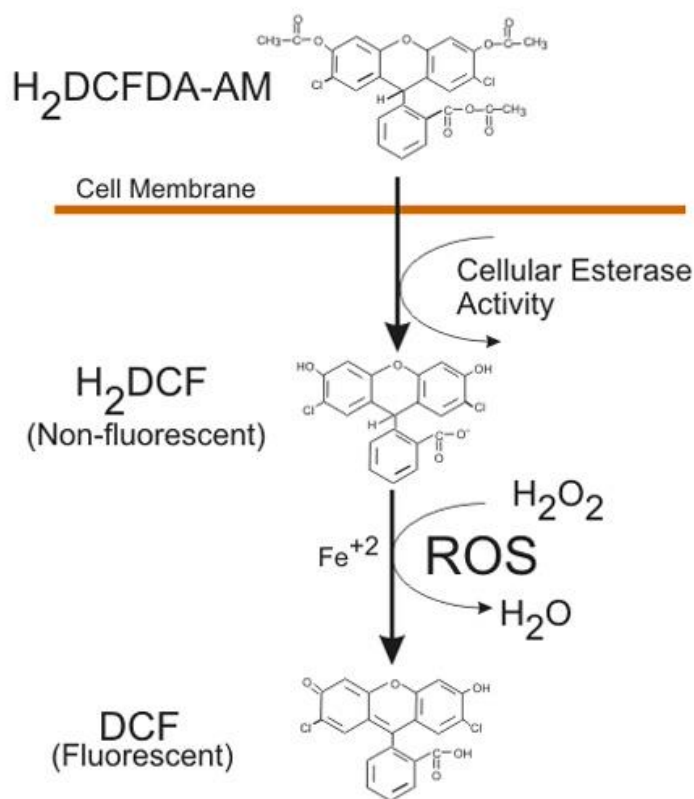
Nelle cellule di mammifero, la maggior parte (più del 90%) delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è prodotta come conseguenza del trasporto di elettroni a livello della catena mitocondriale. In condizioni fisiologiche esistono differenti sistemi enzimatici e non, che proteggono la cellula dagli effetti dannosi degli ossidanti. Enzimi scavenger includono catalasi, superossido dismutasi (SOD) e glutazione perossidasi. La maggior parte dei sistemi non enzimatici comprende la vitamina E, la vitamina C (acido ascorbico) e il glutatione. Lo stress ossidativo si verifica quando la produzione di ossidanti non è controbilanciata dall'azione dei sistemi antiossidanti delle cellule e vengono quindi attivati

specifiche vie di segnalazione redox-sensibili¹⁸⁶. Per la valutazione dello stress ossidativo cellulare è stato utilizzato un indicatore delle specie reattive dell'ossigeno nelle cellule: il 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodidrossifluoresceina diacetato (CM-H₂DCFDA; Molecular Probes). CM-H₂DCFDA deriva da H₂DCFDA al quale sono stati aggiunti gruppi clorometilici, per permettere una maggiore ritenzione all'interno della cellula e ridurre la perdita per diffusione passiva. Questa sonda è in grado di attraversare passivamente la membrana plasmatica, e una volta dentro la cellula, è convertita in un composto non fluorescente (CM-H₂DCF) grazie all'azione delle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetato; mentre i gruppi clorometilici essendo tiolo-reattivi reagiscono con il glutathione e altri tioli intracellulari. Il composto formato, è in seguito ossidato da specie reattive dell'ossigeno ed è convertito in un addotto fluorescente (CM-DCF) che rimane intrappolato all'interno della cellula, facilitando così anche studi a lungo termine. I livelli di ROS che producono CM-DCF possono essere determinati misurando il tasso di formazione degli addotti fluorescenti¹⁸⁷. La sonda CM-H₂DCFDA riconosce diverse specie reattive dell'ossigeno: perossido di idrogeno (H₂O₂), radicale idrossilico (HO·), anione ipoclorito (OCl⁻), ossido nitrico (NO), radicale perossile (ROO·), perossinitrito (ONOO⁻), ossigeno singoletto (¹O₂) e anione superossido (·O₂⁻).

¹⁸⁶ Koopman Werner JH et al. "Simultaneous quantification of oxidative stress and cell spreading using 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorofluorescein." *Cytometry Part A* 69.12 (2006): 1184-1192.

¹⁸⁷ Forkink Marleen et al. "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797.6 (2010): 1034-1044.

Figura 15. Formazione del composto fluorescente DCF mediante ROS.



Fonte: seallab.wordpress.com

Procedura per la valutazione dello stress ossidativo cellulare

Per la valutazione dello stress ossidativo cellulare sono state utilizzate piastre multiwell da 96 pozzetti, contenenti 5×10^4 cellule per pozzetto.

- 50 μ g di sonda CM-H₂DCFDA (*Life Technologies, Grand Island, NY, USA*) sono stati disciolti in 86 μ l di DMSO, per ottenere una concentrazione finale di 1mM (1 mmol/l); tutti i passaggi sono stati eseguiti in assenza di luce.
- È stata preparata una soluzione composta da Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (KRB, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 5.5 mmol/l glucosio e dall'1% di sonda, affinché questa abbia una concentrazione di 10 μ M.
- È stato rimosso il mezzo di coltura e sono stati aggiunti 100 μ l della soluzione KRB+sonda in ogni pozzetto contenente le cellule.
- Si è proseguito con un'incubazione di 1 h a 37°C e al 5% di CO₂.

- Trascorso il periodo di incubazione, è stato aspirato il surnatante e le cellule sono state trattate in base alle condizioni sperimentali e incubate per 16 h a 37°C e al 5% di CO₂.
- Si è proceduto con la lettura allo spettrofluorimetro impostando le seguenti lunghezze d'onda: 495 nm (eccitazione) e 527 nm (emissione).

3.6. Estrazione dell'RNA totale

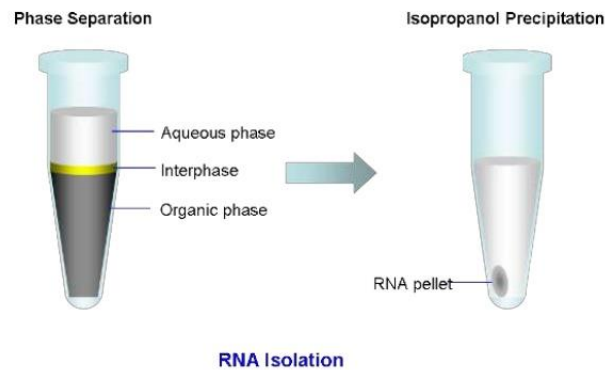
Per isolare un RNA totale di alta qualità dalle cellule è stato utilizzato il Trizol[®] Reagent (*Life Technologies, Grand Island, NY, USA*), una soluzione che facilita l'estrazione di una varietà di tipi di RNA con diverso peso molecolare. Questo reagente mantiene l'integrità dell'RNA grazie ad un'effettiva inibizione dell'attività dell'RNasi, durante la fase di omogeneizzazione dei campioni in cui vengono lisate le cellule e disciolte le componenti cellulari. Dopo l'omogeneizzazione del campione con Trizol, è aggiunto il cloroformio in modo da ottenere tre fasi: uno strato acquoso chiaro, che contiene l'RNA, uno strato intermedio e più in basso uno strato organico di colore rosso/rosa che contiene DNA e proteine. L'RNA precipita nella soluzione acquosa in cui si trova in seguito l'aggiunta di isopropanolo. Per rimuovere le impurità, l'RNA precipitato è lavato e infine risospeso per essere utilizzato nella RT-PCR^{188,189,190}.

¹⁸⁸ Chomczynski Piotr. "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* 15.3 (1993): 532-4.

¹⁸⁹ Chomczynski Piotr and Nicoletta Sacchi. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical biochemistry* 162.1 (1987): 156-159.

¹⁹⁰ Hummon Amanda B. et al. "Isolation and solubilization of proteins after TRIzol[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage." *Biotechniques* 42.4 (2007): 467.

Figura 16. Precipitazione dell'RNA nella soluzione acquosa in seguito l'aggiunta di isopropanolo.



Fonte: www.slideshare.net

Procedura per l'estrazione dell'RNA totale

Il protocollo per l'estrazione dell'RNA totale prevede una prima fase in cui vengono preparati i campioni e una seconda fase di isolamento dell'RNA. La prima fase è caratterizzata dall'omogeneizzazione dei campioni e dalla separazione in fasi della miscela; mentre la seconda parte del protocollo prevede la precipitazione, i lavaggi e la solubilizzazione dell'RNA.

- Sono state utilizzate piastre con diametro di 60 mm, in ognuna delle quali sono state piastrate 2×10^6 cellule.
- Per prima cosa è stato rimosso il mezzo di coltura dalle piastre ed è stato aggiunto 1 ml di PBS 1X (a freddo) per lavare le cellule.
- Dopo aver rimosso il PBS 1X, è stato aggiunto 1 ml di Trizol Reagent direttamente sul monostrato cellulare e, pipettando dall'alto verso il basso per diverse volte, è stato possibile lisare le cellule ottenendo l'omogeneizzazione del campione. Il contenuto della piastra è stato trasferito in una provetta eppendorf da 1.5 ml.

- Per permettere la completa dissociazione del complesso di nucleoproteine, il campione omogenizzato è stato incubato a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio per 1 ml di Trizol usato per l'omogeneizzazione dei campioni, e ogni eppendorf è stata agitata vigorosamente per 1 minuto con la mano.
- I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 5 minuti e poi centrifugati a 12000 ×g per 15 minuti a 4°C. Con il processo di centrifugazione sono state ottenute tre fasi: una fase rosso fenolo-cloroformio in basso, un'interfase, e una fase acquosa incolore in alto. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa, che costituisce il 50% del volume totale.
- La fase acquosa è stata rimossa e trasferita in una nuova provetta eppendorf.
- Per far precipitare l'RNA sono stati aggiunti alla fase acquosa 500 µl di isopropanolo al 100% e ogni eppendorf è stata agitata con la mano per 1 minuto.
- I campioni sono stati incubati per circa 30 minuti a 4°C, e poi centrifugati a 12000 ×g per 15 minuti a 4°C.
- È stato aspirato il surnatante e il pellet di RNA è stato lavato con 1 ml di etanolo al 75%; i campioni sono stati brevemente passati al vortex e poi centrifugati a 10000 ×g per 5 minuti a 4°C.
- Dopo aver rimosso il surnatante si è lasciato asciugare il pellet dell'RNA per circa 30 minuti.
- Il pellet è stato infine reidratato in 30 µl di acqua DEPC (RNase-free water, *Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*) e incubato a 60°C per 10 minuti. È stato conservato a -70°C e in seguito utilizzato per la retrotrascrizione e la RT-PCR.

3.7. Misurazione dell'RNA tramite spettrofotometro

Le basi puriniche e pirimidiniche degli acidi nucleici sono caratterizzate dalla capacità di assorbire le radiazioni ultraviolette con un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm. Grazie a questa proprietà è possibile eseguire delle misurazioni di assorbanza con uno specifico strumento, lo

spettrofotometro, per poi risalire alla concentrazione dell'acido nucleico. L'assorbanza, infatti, è in relazione lineare con la concentrazione di un campione secondo la legge di Lambert-Beer. Gli spettrofotometri di recente innovazione, calcolano automaticamente la concentrazione del campione in esame esprimendola in $\mu\text{g/ml}$. Due ulteriori letture a 280 nm e 230 nm permettono di determinare la purezza dell'acido nucleico. Il rapporto A_{260}/A_{280} è usato per stimare la purezza della preparazione degli acidi nucleici ed è un indice della contaminazione da proteine, poiché queste assorbono a 280 nm. Il valore ottimale di questo rapporto per l'RNA è maggiore di 1.8. Invece il rapporto A_{260}/A_{230} riflette una contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici e il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.20.

Metodo. Per eseguire la quantificazione spettrofotometrica, che permette di valutare la concentrazione dell'RNA, è stata rilevata l'assorbanza di 2 μl di RNA, diluiti in 998 μl di H_2O deionizzata, posti in una cuvetta di quarzo. Si è proceduto prima alla lettura del bianco trasferendo 1 ml di acqua deionizzata nella cuvetta, e successivamente è stata fatta la lettura dei campioni nelle diverse condizioni sperimentali. Lo strumento ci ha fornito i seguenti valori: i due rapporti A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} e la concentrazione dei campioni in $\mu\text{g/ml}$, della quale ci siamo serviti per calcolare i μl di RNA da utilizzare per retrotrascrivere 1 μg di cDNA.

3.8. Retrotrascrizione dell'RNA totale

La retrotrascrizione è il processo attraverso il quale è possibile ottenere una molecola di DNA complementare a partire dall'mRNA. L'enzima responsabile di questa reazione è la trascrittasi inversa chiamata anche "DNA polimerasi RNA-dipendente". Per la retrotrascrizione, di rilevante importanza è la coda di circa 200 residui di adenina (coda poli-A) che solitamente gli RNA eucariotici presentano alla loro estremità 3'-OH, in seguito al processo di maturazione. L'innesco, o primer della reazione è l'oligo dT, una catena di circa venti residui di timina che si

appaia alla coda di poli-A. L'appaiamento tra due filamenti singoli di acido nucleico in generale è definito annealing. Il primer fornisce un 3'-OH necessario alla trascrittasi inversa per allungare la catena usando come stampo il trascritto. Incubando l'RNA totale (quindi contenente anche RNA ribosomiale) estratto dalle cellule, con l'enzima trascrittasi inversa, precursori deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), soluzione tampone e ioni bivalenti Mg^{2+} è possibile, in presenza della sequenza complementare oligo (dT), dare il via alla formazione di un filamento di cDNA (DNA copia o complementare). Questa seconda fase detta di allungamento avviene alla temperatura di circa 50°C in 1 ora. Sintetizzato il primo filamento, prima di procedere con l'amplificazione del cDNA, viene aggiunto alla reazione l'enzima RNasi (solitamente derivata dal batterio *Escherichia coli*) che degrada il filamento di RNA originale che è stato usato come stampo dalla trascrittasi inversa. Per la retrotrascrizione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit: iScript™ cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad, Laboratories Inc. Hercules, CA, USA*). Le soluzioni presenti nel kit sono: la 5x iScript Reaction Mix, la Nuclease-free water, e l'iScript Reverse Transcriptase.

Procedura di retrotrascrizione dell'RNA totale

Per un volume finale di reazione di 20 µl, sono stati aggiunti:

- 4 µl di 5x iScript Reaction Mix;
- 1 µl di iScript Reverse Transcriptase;
- x µl di RNA per avere 1 µg di cDNA (la quantità in µl si calcola a partire dalla concentrazione di RNA, valutata con metodica spettrofotometrica, come descritto in precedenza);
- x µl di Nuclease-free water per portare il tutto al volume finale.

La soluzione è stata poi posta in un termociclatore (GeneAmp PCR System 2700, *Applied Biosystems, CA, USA*), utilizzando il seguente ciclo termico:

- 5 minuti a 25°C
- 30 minuti a 42°C
- 5 minuti a 85°C
- 4°C STOP

L'elevata temperatura è necessaria per inibire l'attività dell'enzima e per separare le catene di cDNA di nuova sintesi dall'RNA. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per effettuare la PCR Real-Time o conservato a -20°C¹⁹¹.

3.9. PCR Real-Time

Cenni sulla Real-Time

La Polymerase Chain Reaction (PCR, reazione a catena della polimerasi), è una metodica di laboratorio che è stata sviluppata nel 1980 da Kary Mullis^{192,193}; essa consente l'amplificazione di un frammento di DNA di estremità note, ma non permette di quantificarlo. La Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), invece, permette un'analisi quantitativa delle molecole di DNA. È una tecnica basata sulla PCR, la cui caratteristica fondamentale è che il prodotto amplificato è rilevato durante la progressione della reazione: in "tempo reale". La RT-PCR è combinata con il metodo di trascrizione inversa per quantificare l'mRNA, che viene spesso utilizzato per dedurre l'espressione genica. Le reazioni della RT-PCR sono eseguite da un termociclatore che utilizza una tecnologia basata sulla fluorescenza^{194,195}. I due segnali fluorescenti più utilizzati sono Sybr Green e TaqMan.

Il principio su cui si basa la Sybr Green è l'utilizzo di una molecola fluorescente che si lega al solco minore del DNA a doppia elica (dsDNA), emettendo un segnale mille volte superiore rispetto alle molecole che rimangono libere in soluzione. A una crescente quantità di acido deossiribonucleico a doppio filamento, presente in un tubo da reazione, corrisponderà una maggiore quantità di molecola fluorescente legata e, quindi, un segnale più elevato. Questo metodo ha

¹⁹¹ Wojewoda Christina M. et al. "Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 (CAP/CTM v2. 0) with other real-time PCR assays in HIV-1 monitoring and follow-up of low-level viral loads." *Journal of virological methods* 187.1 (2013): 1-5.

¹⁹² Mullis Kary B. "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Scientific American* 262.4 (1990): 56-61.

¹⁹³ Tajadini Mohamadhasan, Mojtaba Panjehpour and Shaghayegh Haghjooy Javanmard. "Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes." *Advanced biomedical research* 3 (2014).

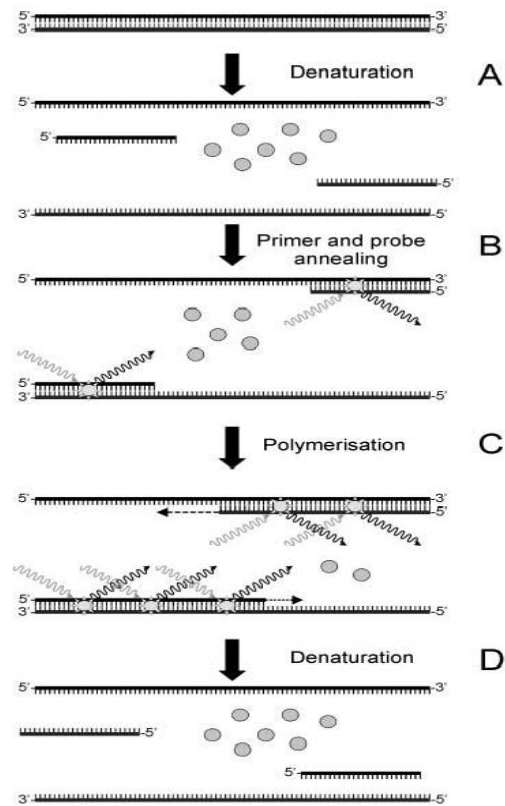
¹⁹⁴ Jensen Ellen C. "Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA: Use, Limitations, and Presentation of Results." *The Anatomical Record* 295.1 (2012): 1-3.

il vantaggio di essere relativamente poco costoso e di facile utilizzo, ma meno preciso poiché si basa su una molecola fluorescente, non specifica per il legame al DNA a doppio filamento che, legandosi in maniera random a tutte le doppie eliche, provoca una sovrastima della concentrazione del gene target¹⁹⁵. Per avere un'indicazione della purezza dei prodotti di reazione, e sull'eventuale presenza di dimeri di primers, si analizza la curva di melting: quando la reazione di PCR termina, la temperatura da 65°C (fluorescenza massima, tutto il DNA è a doppio filamento) aumenta gradualmente fino a 90°C (fluorescenza minima, il DNA è a singolo filamento) e nel momento in cui la fluorescenza cala rapidamente, provoca un flesso nella curva corrispondente alla temperatura di melting del prodotto di reazione, cioè il 50% del materiale amplificato è in forma di single strand DNA (ssDNA). Nel caso in cui sia visibile più di un flesso, il rischio è di aver amplificato target aspecifici. Per comodità i flessi della curva di fluorescenza sono trasformati in picchi facendone la derivata prima.

Come riportato in **figura 17**: durante la fase di denaturazione, le molecole di Sybr Green non sono in grado di legarsi al DNA, quindi rimangono libere in soluzione ed emettono poca fluorescenza. Alla temperatura di annealing solo poche molecole si appaieranno al primer, o target, a doppio filamento, mentre nella fase di polimerizzazione sempre più molecole fluorescenti si legheranno al DNA di nuova sintesi, aumentando il segnale fluorescente che può essere monitorato in tempo reale. Infine il segnale ritorna al background durante la denaturazione quando le molecole saranno rilasciate¹⁹⁵.

¹⁹⁵ Bustin Stephen A. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *Journal of molecular endocrinology* 25.2 (2000): 169-193.

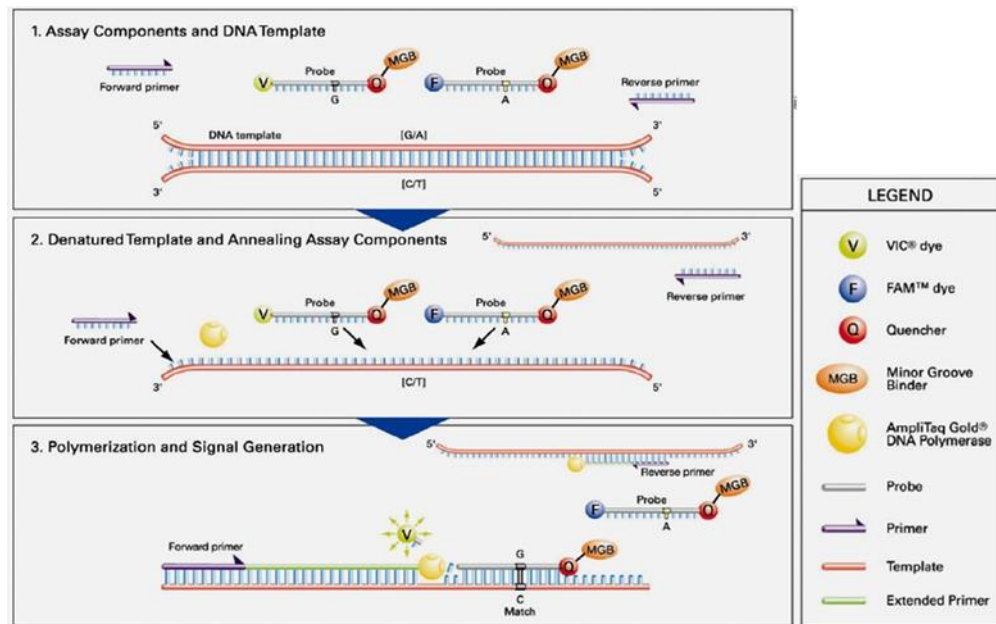
Figura 17. Meccanismo d'azione della reazione della RT-PCR con sonda Sybr Green.



Fonte: www.endocrinology.org

La TaqMan, invece, è una sonda doppiamente marcata; si tratta, infatti, di un oligonucleotide che presenta all'estremità 5' un fluoroforo definito "reporter" mentre quello legato all'estremità 3' è detto "quencher". Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del reporter è spenta dalla vicinanza del quencher che ne assorbe il segnale durante l'amplificazione. In seguito all'attività 5' nucleasica della DNA polimerasi, l'oligonucleotide è rotto: questo permette la separazione tra il reporter e il quencher e l'emissione del segnale fluorescente da parte del reporter. L'utilizzo di sonde TaqMan è caratterizzato da una più alta specificità poiché è misurata solo l'amplificazione di sequenze specifiche¹⁹³.

Figura 18. Meccanismo d'azione della reazione di RT-PCR con sonda TaqMan.



Fonte: bioservices.capitalbio.com

La Real Time PCR si concentra sulla fase esponenziale della reazione della PCR, poiché essa fornisce dati più accurati e precisi per essere poi quantificati. All'interno della fase esponenziale sono calcolati due valori: "threshold line" e "cycle threshold". La threshold line, ovvero la linea soglia, è il livello in cui la reazione raggiunge un'intensità di fluorescenza superiore al background. Esso è scelto in maniera arbitraria dall'operatore in base ai valori dei bianchi. Il ciclo di PCR in cui il campione interseca la threshold line è chiamato "ciclo soglia" (Ct, cycle threshold) ed è inversamente proporzionale alla quantità di campione iniziale. Più campione c'è all'inizio della reazione e minore sarà il numero di cicli necessari per raggiungere il punto in cui il segnale fluorescente è registrato come statisticamente significativo sul background¹⁹⁴.

Questo metodo si basa su due assunzioni: la reazione avviene con un'efficienza del 100% ed è una delle ragioni per usare un basso numero di cicli quando la reazione è ancora in fase esponenziale; un controllo endogeno (gene di riferimento) deve essere incluso per normalizzare il gene target.

I valori Ct generati dalla reazione della PCR sono messi in un foglio di calcolo. Il valore Ct per il gene di riferimento è sottratto dal valore Ct del gene target, che dà il Δ CT. È importante notare che i due geni devono essere amplificati con un'efficienza comparabile affinché questo calcolo sia preciso. Il Δ CT del campione di controllo, che è generalmente un valore medio, è sottratto al Δ CT di ciascun campione trattato, si ottiene così il $\Delta\Delta$ CT. Il valore negativo di questa sottrazione ($-\Delta\Delta$ CT) è usato come esponente al 2 nell'equazione ($2^{-\Delta\Delta$ CT}) e rappresenta la variazione del gene target del campione trattato rispetto a quello di controllo. Il valore finale $2^{-\Delta\Delta$ CT può essere utilizzato per rappresentare graficamente i dati¹⁹⁴.

Valutazione dell'espressione genica di SGLT1, SGLT2, PC1/3 e PC2

Tramite Real-Time RT-PCR è stata valutata l'espressione genica di: Sodio-Glucosio Cotrasportatore 1 (SGLT1), Sodio-Glucosio Cotrasportatore 2 (SGLT2), Pro-ormone Convertasi 1/3 (PC1/3) e Pro-ormone Convertasi 2 (PC2).

Metodica. Sono state utilizzate piastre multiwell da 96. Per ogni punto sperimentale è stata preparata una miscela di reazione con un volume finale di 20 μ l.

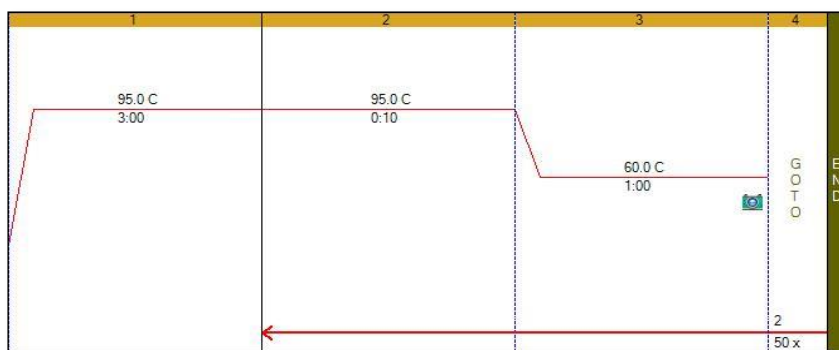
SGLT1 e SGLT2:

Per ogni pozzetto sono stati aggiunti:

- 10 μ l di TaqMan (SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix, *Bio-Rad, Laboratories Inc. Hercules, CA, USA*);
- 1 μ l di housekeeping (18S);
- 1 μ l di sonda (SGLT1 o SGLT2);
- x μ l di cDNA (140 ng per SGLT1 e SGLT2);
- x μ l di H₂O RNasefree;

La piastra è stata posta nel termociclatore (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System, *Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA*) ed è stato impostato il seguente protocollo.

Figura 19. Protocollo utilizzato per la valutazione dell'espressione genica di SGLT1 e SGLT2.



Nella **Tabella 1** sono riportate le caratteristiche delle sonde utilizzate.

Gene Symbol	Gene Name	Code	Transcripts	Amplicon Length	Assay Design
Slc5a1	Sodium/glucose cotransporter 1	Mm00451203_m1	1 RefSeq (NM)	109	Probe spans exons
Slc5a2	Sodium/glucose cotransporter 2	Mm00453835_m1	1 RefSeq (NM)	83	Probe spans exons

Come housekeeping è stato utilizzato la 18S (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, VIC®/MGB probe, primer limited).

Le sonde riportate in tabella e la 18S sono state acquistate da: *Life Technologies, Grand Island, NY, USA*.

PC1/3 e PC2

Per ogni pozzetto sono stati aggiunti

- 10 µl di Sybr Green (iQTM Universal SYBR[®] Green Supermix, *Life Technologies, Grand Island, NY, USA*) contenente desossiribonucleotidi trifosfato, Taq DNA polimerasi e molecola Sybr Green I;
- 1 µl (0.0001 µmol/µl) per ciascun primer specifico (*Primm srl, MI, Italy*);
- x µl di cDNA (60 ng per PC1/3 e 20 ng per PC2);
- x µl di H₂O RNasefree;

La piastra è stata posta nel termociclatore (CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System, *Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA*) ed è stato impostato il seguente protocollo.

Figura 20. Protocollo utilizzato per la valutazione dell'espressione genica di PC1/3.

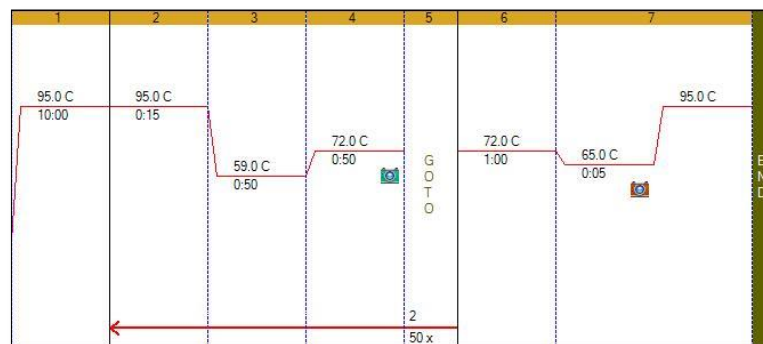


Figura 21. Esempio curva di melting per PC1/3.

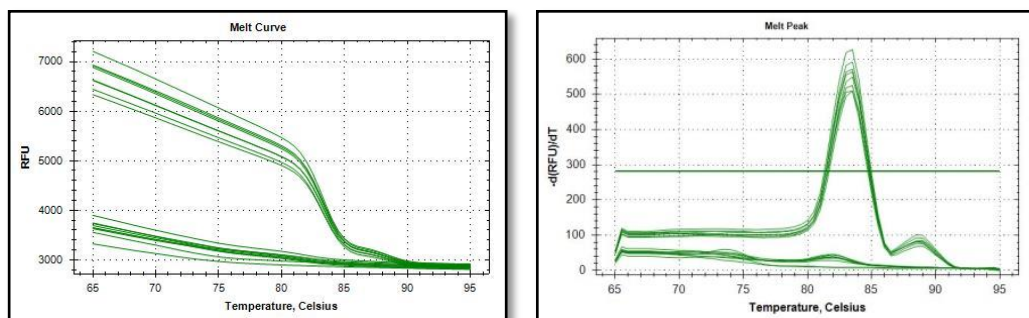


Figura 22. Protocollo utilizzato per la valutazione dell'espressione genica di PC2.

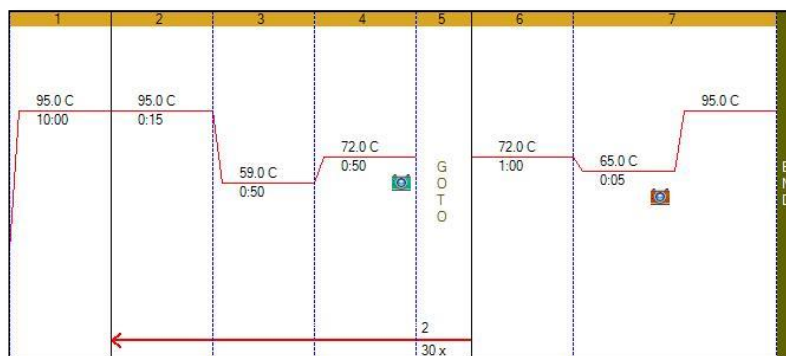
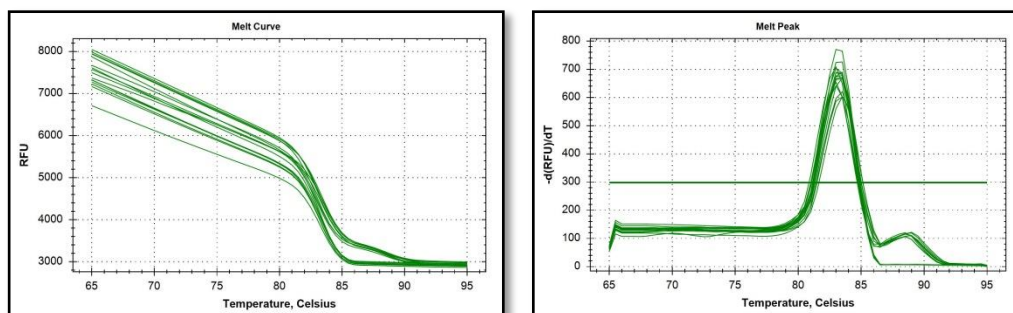


Figura 23. Esempio curva di melting per PC2.



La sequenza dei primers è riportata in **Tabella 2**:

NOME	SEQUENZA
mPC1/3s	ACATGGGGAGAGAATCCTGTAGGCA
mPC1/3r	CATGGCCTTTGAAGGAGTTCCTTGT
mPC2s	TTGATGCAGGTGCCATGGTGAA
mPC2r	ACTTGTCAAAGCCCACCTTGGAGT
mBeta-Actin S	AGCTGCCTGACGGCCAGGTC
mBeta-Actin R	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGC

Le sonde sono state acquistate dalla *Primm srl, Milano, Italy*.

Per confrontare l'espressione di un gene target in condizioni differenti, è necessario normalizzare i valori ottenuti con quelli di un gene avente espressione costante. La valutazione dei dati è stata eseguita con il metodo $\Delta\Delta Ct$ ¹⁹⁶, sono state fatte le medie dei cicli soglia (Ct) del gene target e del gene housekeeping sia dei campioni sperimentali che del campione di controllo (glucosio 5.5 mmol/l). Successivamente è stata sottratta la media del gene housekeeping da quella ottenuta per il gene target, sia per i campioni sperimentali (ΔCt campione sperimentale), che per il campione di controllo (ΔCt controllo):

$$\Delta Ct_{c.sperimentale} = \text{media Ct Target}_{c.sperimentale} - \text{media Ct Housekeeping}_{c.sperimentale}$$

$$\Delta Ct_{c.controllo} = \text{media Ct Target}_{c.controllo} - \text{media Ct Housekeeping}_{c.controllo}$$

E' stato sottratto il valore di ΔCt del campione di controllo, dal valore di ΔCt di ogni campione sperimentale e il risultato ($\Delta\Delta Ct$) è stato posto come esponente negativo di 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ottenendo il numero di volte che quel gene target è stato espresso in ogni condizione sperimentale.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{c.sperimentale} - \Delta Ct_{c.controllo}$$

3.10. Estrazione delle proteine

Per l'estrazione delle proteine cellulari è stato utilizzato il CellLytic™ M mammalian cell lysis/extraction reagent (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), che permette una rapida ed efficiente lisi delle cellule e la solubilizzazione delle proteine sia di cellule aderenti che in sospensione. Le proteine estratte sono state poi destinate al Western Blot.

Sono state utilizzate piastre da 60 mm contenenti 4×10^6 cellule. È stata preparata una soluzione contenente 990 μ l di CellLytic M reagent e 10 μ l di Protease Inhibitor Cocktail (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), un inibitore delle proteasi che serve per inibire la denaturazione delle proteine.

¹⁹⁶ Livak Kenneth J. and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.

Per prima cosa è stato rimosso il terreno di incubazione dalle piastre e le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS 1X. Sono poi stati aggiunti 200 µl della soluzione di CelLytic M reagent + Protease Inhibitor Cocktail, in modo da ricoprire tutta la superficie di adesione delle cellule e le piastre sono state poste su un agitatore per 15 minuti a 4°C. Per ottenere una maggiore quantità di proteine totali, con l'aiuto di uno scraper sono state rimosse le cellule lisate dalla piastra e sono state trasferite in provette eppendorf e centrifugate per 15 minuti a 13000 ×g a 4°C. Il surnatante contenente le proteine è stato prelevato e messo in una nuova provetta eppendorf, dalla quale sono stati prelevati 20 µl per il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford. Il lisato è stato poi conservato a -20°C.

3.11. Dosaggio proteico con metodo Bradford

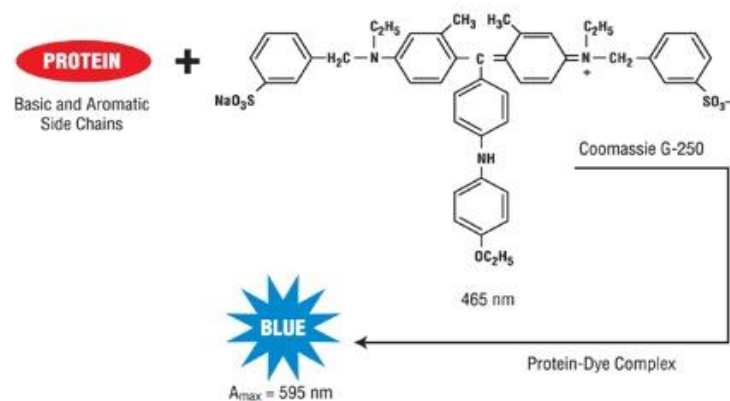
Per determinare la concentrazione di proteine del lisato cellulare è stato utilizzato il metodo di Bradford. Esso si basa sulla formazione di un complesso tra il reagente di Bradford e le proteine presenti in soluzione. Il reagente di Bradford è il Brilliant Blue G¹⁹⁷ (in acido fosforico e metanolo), un colorante organico che si lega principalmente a residui amminoacidici basici ed aromatici, in modo particolare all'arginina, sulla superficie delle proteine portando alla formazione di precipitati¹⁹⁸. Il Brilliant Blue G in condizioni acide ha un colore rosso e presenta massima assorbanza a 495 nm. In seguito al legame con le proteine cambia colore diventando blu, e sposta il suo massimo assorbimento alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il legame del colorante alle proteine è un processo molto rapido che avviene in circa 2 minuti e il complesso proteine-colorante rimane disperso in soluzione per un tempo relativamente lungo di circa 1 h. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteine, per cui l'intensità del blu e l'assorbimento saranno proporzionali alla concentrazione proteica del campione in esame. La presenza di cationi, quali sodio e potassio, o di carboidrati come il

¹⁹⁷ Bradford Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1 (1976): 248-254.

¹⁹⁸ Lucarini A.C. and B. V. Kilikian. "Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances." *Biotechnology techniques* 13.2 (1999): 149-154.

saccarosio causa poca o nessuna interferenza, mentre agenti tamponanti fortemente alcalini possono essere responsabili dello sviluppo di piccole quantità di colore. A provocare grande interferenza nel valore di assorbanza sono sostanze come SDS, Triton X-100, detergenti commerciali, idrossido di sodio e Tris (>2M)^{197,198}.

Figura 24. Reazione del reagente di Bradford in presenza di proteine.



Fonte: www.qcbio.com

Procedura del dosaggio proteico

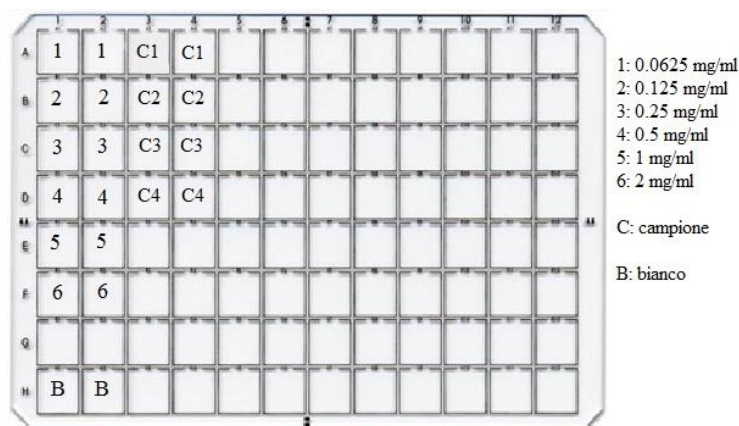
Questo saggio è stato eseguito in piastre multiwell da 96 pozzetti ed è stato utilizzato il Bradford Reagent (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Come proteina standard è stata utilizzata la BSA (Bovine Serum Albumin) e preparata una curva di taratura diluendo lo standard a differenti concentrazioni (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml).

In una piastra multiwell da 96 pozzetti sono stati aggiunti, in doppio, 5 µl di ciascun punto dello standard partendo dal punto con la più bassa concentrazione (pozzetti A1,A2- F1,F2).

Nei pozzetti H1 e H2 sono stati aggiunti 5 µl in doppio di acqua deionizzata (o buffer di lisi); questi rappresentano il bianco (o background) poiché non contengono proteine.

Nei pozzetti A3,A4-D3,D4 sono stati caricati, in doppio, 5 µl di ogni campione (lisato cellulare) da dosare nelle diverse condizioni sperimentali.

Figura 25. Esempio piastra per la metodica del dosaggio proteico.



Sono stati aggiunti, infine, 250 µl di reagente di Bradford in ogni pozzetto e la piastra è stata posta su un agitatore a temperatura ambiente per 5 minuti: questo periodo è sufficiente affinché avvenga la reazione di sviluppo del colore.

L'assorbanza è stata valutata alla lunghezza d'onda di 595 nm, costruita la curva di taratura e dall'equazione della retta è stata ricavata la concentrazione di proteine presenti in ogni campione di interesse, alle diverse condizioni sperimentali, in base ai valori di assorbanza ottenuti.

3.12. Western Blot

Per valutare la presenza nelle alfa cellule pancreatiche delle proteine: SGLT1, SGLT2, PC1/3 e PC2 è stata utilizzata la metodica Western Blot, che permette di identificare specifiche proteine partendo da una miscela proteica estratta dalle cellule. Questa metodologia è caratterizzata da tre principali fasi^{199,200}:

¹⁹⁹ Mahmood Tahrin and Ping-Chang Yang. "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." North American journal of medical sciences 4.9 (2012): 429

²⁰⁰ Electrophoresis, B. "western blotting-a beginner's guide."

1. separazione delle proteine in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi su gel;
2. trasferimento su un supporto solido, ovvero una membrana;
3. incubazione della membrana con un anticorpo primario specifico per la proteina di interesse e un anticorpo secondario; e successivo sviluppo fotografico con apposite pellicole.

Il campione proteico è stato diluito con un tampone di caricamento, il loading buffer 4X, in rapporto 3:1. Il buffer di carica contiene il glicerolo al 20% che ha la funzione di aumentare la densità del campione proteico per mantenerlo sul fondo del pozzetto del gel; il bromofenolo (concentrazione finale 0,02%) che permette di visualizzare la migrazione delle proteine. Questo è possibile poiché si tratta di un colorante anionico di piccole dimensioni che migrerà più velocemente di qualsiasi altra componente della miscela proteica da separare. Altro elemento del loading buffer 4X è il sodio dodecil solfato (SDS: Sodium Dodecyl Sulphate, concentrazione finale 8%), un tensioattivo anionico che ha la funzione di denaturare le proteine attraverso la rottura di legami non-covalenti (interazioni idrofobiche e legami idrogeno). Il legame della componente anionica dell'SDS alla catena peptidica, in un rapporto costante di 1.4 g di SDS ogni grammo di proteina, conferisce una carica negativa alla proteina proporzionale alla sua massa; carica negativa che è significativamente maggiore della carica elettrica originale. La repulsione elettrostatica che si viene a creare in seguito al legame dell'SDS, causa la denaturazione della proteina ad una struttura filiforme e siccome il rapporto massa-carica per ogni proteina rimane costante, la separazione avviene quindi per differenza fra pesi molecolari. Il processo di denaturazione delle proteine è importante non solo per permettere la corsa elettroforetica su un gel di poliacrilammide, ma anche per facilitare il successivo legame dell'anticorpo, che tipicamente riconosce una piccola porzione, denominata epitopo, della proteina di interesse la quale potrebbe essere difficilmente accessibile nel caso in cui si trovasse all'interno della proteina ripiegata. Al buffer di carica è stato aggiunto il β -mercaptoetanolo al 5% (50 μ l per 1 ml) per la riduzione dei ponti disolfuro.

Metodica

Per preparare il campione di carica sono stati trasferiti in una provetta eppendorf 150 µl di lisato cellulare, e aggiunti 50 µl di loading buffer 4X, in modo tale che tre parti siano rappresentate dal campione proteico e una parte dal tampone.

Dopo aver passato al vortex la provetta eppendorf, il campione di carica è stato incubato a 95°C per 5 minuti, per completare il processo di denaturazione. Al termine, i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 5 minuti e agitati su vortex prima di essere caricati su gel.

Per la corsa elettroforetica sono stati utilizzati gel precasting di poliacrilammide (4-20%) (Mini-PROTEAN[®] Precast Gels, *Bio-rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA*), contenenti composti trialici che reagiscono con i residui di triptofano presenti nelle proteine e producono fluorescenza in una reazione indotta dai raggi UV (**Figura 26B**). I gels sono stati inseriti nella cella per la corsa elettroforetica (Mini-PROTEAN[®] vertical electrophoresis cells, *Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK*), ed è stato aggiunto il Buffer di Corsa 1X (450 ml di acqua deionizzata + 50 ml TGS running buffer 10X).

Il primo pozzetto del gel è stato caricato con 5 µl di un marcatore di peso molecolare (Precision Plus Protein[™] Standards Dual Color, *Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK*) che permetterà la determinazione della dimensione delle proteine e consentirà di monitorare lo stato di avanzamento della corsa elettroforetica.

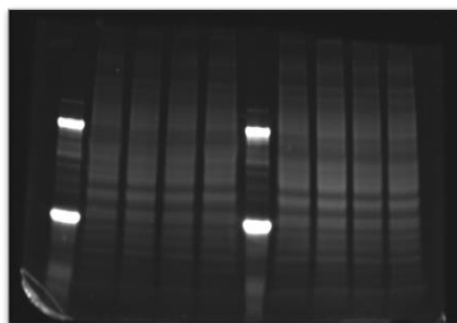
Per caricare la stessa quantità di proteine in ciascun pozzetto, ovvero 50 µg, sono stati calcolati i µl dei campioni di carica partendo dalle concentrazioni ottenute dal dosaggio delle proteine con il metodo Bradford.

Dopo aver caricato i campioni è stata applicata una differenza di potenziale di 100 V, in modo da far partire la corsa elettroforetica (SDS-PAGE) che è durata 90 minuti e ha permesso lo spostamento delle proteine verso l'elettrodo positivo, essendo cariche negativamente.

Figura 26. Cella elettroforetica (A) ed esempio di corsa elettroforetica (B)



A

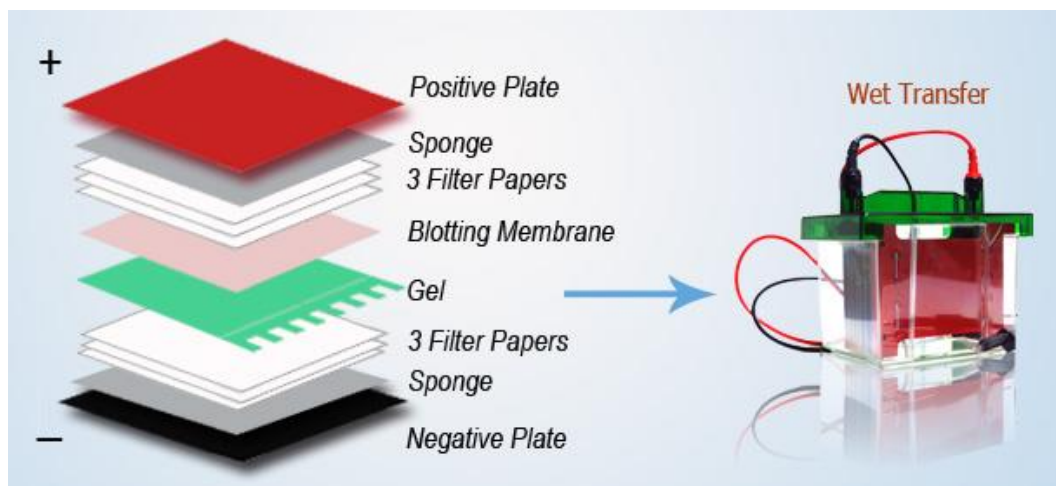


B

Fonte (figura 26-A): vivalascuola.studenti.it

La seconda fase del Western Blot prevede il trasferimento su membrana. Sono state preparate delle vaschette nelle quali è stato versato il Buffer di Trasferimento 1X (per 1L di Transfer Buffer 1X sono stati diluiti 100 ml di Tris/glycine premixed buffer 10X in 700 ml di acqua deionizzata e sono stati poi aggiunti 200 ml di metanolo). Nel Buffer di Trasferimento sono state immerse per 30 minuti: 2 spugne, 4 carte da filtro, la membrana di nitrocellulosa 0.20 μm (*Bio-Rad, Laboratories Inc. Hercules, CA, USA*) e il gel, dopo che è stata completata la corsa elettroforetica. Tutti questi elementi sono necessari per preparare il sandwich. Per assemblarlo si è partiti dalla parte nera della camera di supporto (polo negativo) e su questa sono stati posizionati i vari componenti con il seguente ordine: spugna, 2 carte da filtro, gel, membrana di nitrocellulosa, 2 carte da filtro, spugna; il sandwich è stato completato con la parte bianca della camera di supporto (polo positivo) ed è stato inserito in una vasca con ghiaccio e il Buffer di Trasferimento; il tutto è stato posto a sua volta in un contenitore più grande raffreddato. Siccome il trasferimento avviene mediante un campo elettrico orientato perpendicolarmente alla superficie del gel, è importante collocare la membrana tra il gel e l'elettrodo positivo, in modo tale che le proteine con carica negativa possono migrare dal gel alla membrana. È stato impostato lo strumento (Power Supply) sui 100 Volt per 60 minuti in modo da ottenere il completo trasferimento elettroforetico.

Figura 27. Trasferimento su membrana di nitrocellulosa



Fonte: www.western-blot.us

Al termine del periodo di trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata posta in una piccola vaschetta, aggiunto TBS-T per ricoprirla e fatti due lavaggi, di 5 minuti ciascuno, in agitazione continua. Dopo aver rimosso la soluzione di lavaggio è stato aggiunto l'anticorpo primario preparato in TBS-T al 5% di BSA e diluito in base alle indicazioni della ditta; la vaschetta ricoperta con il parafilm per evitare l'evaporazione della soluzione e posta in agitazione overnight a 4°C.

In **tabella 3** sono riportate le caratteristiche degli anticorpi primari utilizzati.

ANTICORPI PRIMARI				
Nome	Codice	Tipo anticorpo	Diluizione	Ditta
SGLT1 (H-85)	sc-98974	policonale di coniglio	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
SGLT2 (H-45)	sc-98975	policonale di coniglio	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
PC1/3	ab55543	monoclonale di topo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
PC2 (C-19)	sc-22893	policonale di coniglio	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
ACTIN (C-11)	sc-1615	policonale di capra	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Il giorno seguente, è stata preparata, per i lavaggi della membrana, una soluzione di 200 ml di TBS-T, diluendo 20 ml di PBS 10X in 180 ml di H₂O milli Q e aggiungendo poi 200 µl di Tween20. Di questi 200 ml, metà sono stati utilizzati per preparare il TBS-T milk al 5%, sciogliendo 5 g di latte in polvere in 100 ml di soluzione.

Terminata l'incubazione overnight con l'anticorpo primario, la membrana è stata messa in agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo aver rimosso l'anticorpo primario, è stata ricoperta con TBS-T milk al 5%, e fatti due lavaggi, di 5 minuti ciascuno, a temperatura ambiente e in agitazione continua. I lavaggi servono per rimuovere l'anticorpo che non si è legato, in modo da lasciare solo quello legato alla proteina di interesse. Al termine dei lavaggi è stato aggiunto l'anticorpo secondario, preparato in una soluzione di TBS-T milk al 5% e diluito in base alle indicazioni della ditta, e la membrana incubata per 60 minuti a temperatura ambiente e in agitazione continua. Il secondario è coniugato con la perossidasi di rafano (HRP), che in presenza del substrato produrrà un segnale in corrispondenza del punto in cui si trova la proteina bersaglio.

In **tabella 4** sono riportate le caratteristiche degli anticorpi secondari utilizzati.

ANTICORPI SECONDARI				
Ab I	Nome	Codice	Diluizione	Ditta
SGLT1 e SGLT2	goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
ACTIN	donkey anti-goat IgG-HRP	sc-2020	1:5000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
PC1/3	goat anti-mouse IgG-HRP	sc-2005	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
PC2	goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Al termine del periodo d'incubazione, sono stati fatti 3 lavaggi in TBS-T milk al 5%, di 5 minuti ciascuno a temperatura ambiente e in agitazione continua, seguiti da 3 lavaggi veloci con TBS-T e infine altri 3 lavaggi questa volta di 5 minuti ciascuno, in agitazione e a temperatura ambiente.

Completati i lavaggi, la membrana è stata posta su carta assorbente per farla asciugare, messa in una vaschetta e aggiunto ECL (Enhanced Chemiluminescence, Euroclone, Pero, Milan, Italy), substrato della perossidasi per sviluppare la reazione di chemiluminescenza, in rapporto 1:1 con detection reagent 1-Luminol Enhancer Solution e detection reagent 2-Peroxide Solution, e incubata per 5 minuti a temperatura ambiente. Al termine, la membrana è stata asciugata e posta nella cassetta di esposizione (BioMax Cassette, Carestream, NY, USA) per il tempo necessario allo sviluppo delle bande.

Il peso molecolare delle proteine è riportato in **tabella 5**:

PROTEINA	PESO MOLECOLARE
SGLT1	75 kDa
SGLT2	70-77 kDa
PC1/3 e PC2	70-80 kDa
ACTINA	43 kDa

Per normalizzare l'espressione delle proteine utilizzando l'housekeeping, la membrana è stata recuperata, lavata 3 volte in TBS-T in agitazione per 5 minuti a temperatura ambiente, aggiunto l'anticorpo primario contro l'actina diluito in TBS-T al 5% di BSA e incubata overnight a 4°C in agitazione continua. Il giorno seguente è stato rimosso l'anticorpo primario, sono stati fatti i lavaggi con TBS-T milk al 5% e la membrana incubata con lo specifico anticorpo secondario diluito 1:5000 per 60 minuti a temperatura ambiente e in agitazione continua. Al termine, la banda è stata sviluppata utilizzando l'ECL.

Le pellicole sono state scannerizzate utilizzando il programma Image-J per misurare la densità delle bande e normalizzarle con il valore ottenuto per l'Actina.

3.13. Valutazione della secrezione di GLP-1 totale e del glucagone con metodo ELISA

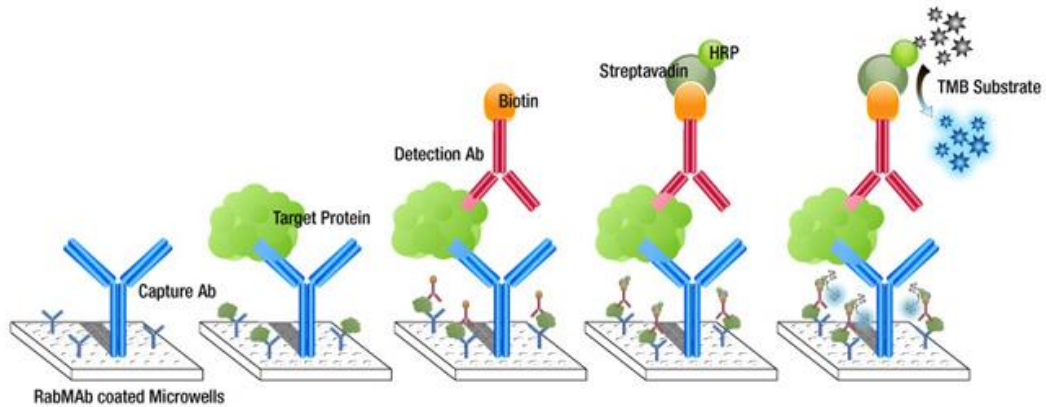
3.13.1. Principio generale della metodica ELISA

L'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) è un metodo di analisi immunologica che si basa sul legame di un antigene con il suo anticorpo specifico, consentendo di rilevare quantità molto ridotte di proteine, peptidi, ormoni o anticorpi. Il sistema utilizza, per rilevare le molecole biologiche, antigeni o anticorpi marcati con un enzima e quelli più comunemente utilizzati sono la fosfatasi alcalina, la glucosio ossidasi e la perossidasi. I saggi ELISA si suddividono in immunologici competitivi (metodo diretto o indiretto) e non-competitivi. Quelli competitivi si utilizzano per misurare peptidi a basso peso molecolare, la cui struttura non permette il legame di due anticorpi contemporaneamente; invece, i saggi non competitivi (o a sandwich) possono essere applicati per la determinazione di composti a elevato peso molecolare.

Per il saggio vengono utilizzate, generalmente, delle micropiastre da 96 pozzetti, la cui superficie è rivestita da quantità note di anticorpo per catturare l'antigene desiderato. Dopo aver bloccato i siti di legame non specifici, utilizzando albumina o siero, viene prima aggiunto il campione contenente l'antigene e, successivamente, l'anticorpo specifico per formare il complesso a "sandwich". Un anticorpo coniugato con una perossidasi (metodo colorimetrico) è aggiunto in seguito e si andrà a legare al primario: in presenza di un substrato cromogenico, l'enzima produrrà una reazione colorimetrica, un cambiamento di colore visibile indicando la presenza dell'antigene²⁰¹.

²⁰¹ Gan Stephanie D. and Kruti R. Patel. "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay." *Journal of Investigative Dermatology* 133.9 (2013): e12.

Figura 28. Saggio ELISA con metodica sandwich.



Fonte: www.epitomics.com

3.13.2. Valutazione della secrezione di GLP-1 totale

Il saggio è stato svolto utilizzando una micropiastra con pozzetti rivestiti da una quantità pre-titolata di anticorpo policlonale anti-GLP-1. Il kit utilizzato è il GLP-1 total ELISA Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

- Aggiungere in ogni pozzetto 300 μ l di tampone di lavaggio 1X (Tris-Buffered Saline e Tween-20).
- Decantare il surnatante rovesciando la piastra e asciugarla velocemente. Ripetere il passaggio 2 volte.
- Aggiungere in duplicato 50 μ l di matrix solution (soluzione contenente siero che mima il background del surnatante) nei pozzetti destinati ai controlli di qualità, ai bianchi e agli standard.
- Aggiungere in duplicato 50 μ l di tampone ai pozzetti dei campioni e dei bianchi.
- Aggiungere in duplicato 50 μ l di ogni standard del GLP-1, in ordine di concentrazione crescente, nei rispettivi pozzetti e 50 μ l di campione sperimentale (surnatante) nei pozzetti stabiliti.

- Incubare la piastra a temperatura ambiente per 90 minuti su un agitatore circolare per micropiastre a velocità moderata (400-500 rpm).
- Decantare e rimuovere la soluzione rimanente invertendo la piastra, quindi asciugare velocemente.
- Lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando dopo ogni passaggio per eliminare i materiali non legati.
- Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di Detection Antibody Solution (soluzione pre-titolata di anticorpo anti-GLP-1 monoclonale biotinilato; l'anticorpo secondario si legherà al GLP-1 catturato dall'anticorpo che riveste la superficie del pozzetto) e incubare la piastra per 60 minuti a temperatura ambiente su un agitatore circolare a 400-500 rpm.
- Decantare e asciugare la piastra; lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando dopo ogni passaggio per allontanare il materiale non legato.
- Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione contenente l'enzima (streptavidina-perossidasi di rafano pre-titolata in tampone) e incubare la piastra a temperatura ambiente su un agitatore a velocità moderata, per 30 minuti.
- Decantare e asciugare la piastra; lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µl di tampone di lavaggio, decantando e asciugando la piastra dopo ogni passaggio affinché venga eliminato l'eccesso di enzima non legato.
- Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione contenente il TMB, substrato della perossidasi, e porre la micropiastra in agitazione per 20 minuti circa: apparirà una colorazione blu, ben visibile nei pozzetti contenenti gli standard, di intensità proporzionale alla concentrazione di GLP-1.
- Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto (HCl 0.3 M) ed agitare la piastra a mano: il colore virerà dal blu al giallo (acidificazione).
- Leggere l'assorbanza a 450 nm e 590 nm e correggere per differenza ($A_{450} - A_{590}$). L'aumento dell'assorbimento è direttamente proporzionale alla quantità di GLP-1 catturato. Il GLP-1 presente nel campione sperimentale è stato ricavato interpolando l'assorbanza con la curva di riferimento generata, nello stesso saggio, con standard di GLP-1 a concentrazioni note.

3.13.3. Valutazione della secrezione di glucagone

Per la valutazione della secrezione del glucagone²⁰² sono state utilizzate micropiastre con pozzetti rivestiti da anticorpo monoclonale, specifico per il riconoscimento e il legame con il glucagone. Utilizzando degli standard contenenti concentrazioni note di glucagone, è stato possibile allestire la curva standard, all'interno del medesimo saggio. Il kit utilizzato per questo saggio è il Glucagon quantikine ELISA Kit (*R&D Systems, Abingdon, UK*).

- Lavare e aspirare ogni pozzetto con 300 µl di soluzione di lavaggio (tensioattivo in tampone), per almeno 2 volte, e dopo l'ultimo lavaggio rimuovere ogni residuo per aspirazione, poi invertire la piastra e asciugarla.
- Aggiungere 150 µl di Diluente RD1-110 (soluzione proteica) in ogni pozzetto.
- Aggiungere 50 µl di Standard nei pozzetti stabiliti, in ordine di concentrazione crescente, e 50 µl di campione nei rispettivi pozzetti.
- Coprire la piastra con l'adesivo dato in dotazione ed incubare per 3 ore a temperatura ambiente.
- Aspirare ogni pozzetto e aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio.
- Per eliminare i materiali in eccesso ripetere questo passaggio per un totale di 4 lavaggi.
- Aggiungere 200 µl per pozzetto di anticorpo monoclonale diretto contro il glucagone immobilizzato, coniugato con perossidasi di rafano e incubare la piastra per 60 minuti a 2-8°C.
- Lavare ogni pozzetto 3 volte per eliminare l'anticorpo in eccesso, aggiungere 200 µl di substrato (perossido di idrogeno e tetrametilbenzidina in rapporto 1:1) e incubare la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere per ogni pozzetto 50 µl di soluzione bloccante (acido solforico): che permette il viraggio dal blu al giallo.
- Leggere la piastra entro 30 minuti, alla lunghezza d'onda di 450 nm.

²⁰² Heller R. Scott and Gregory W. Aponte. "Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 269.6 (1995): G852-G860.

3.14. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con il modello test T di Student per campioni indipendenti (controllo/trattamento), e l'ANOVA con Correzione del Bonferroni.

Il test T permette di verificare se due variabili hanno medie, varianze o distribuzioni uguali, e si può ricorrere ad esso per verificare se la differenza presente fra la media di una medesima misura, rilevata in due popolazioni diverse, sia dovuta o meno al caso. Per ogni campione è stata misurata una variabile numerica, è stata calcolata la media e valutato se la differenza della media relativa al campione di controllo rispetto a quella relativa al campione trattato, è significativa, cioè se è presente una reale diversità tra i due campioni sperimentali non imputabile al caso.

Il test ANOVA, invece, è utilizzato per confrontare due o più gruppi di dati, comparando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi. Si ricorre a questo test quando si vuole verificare se, la variabilità delle medie dei valori riscontrati in una popolazione sottoposta a diversi trattamenti, sia imputabile o meno al caso. Il livello di significatività impostato è quello del 5%, quindi per $p < 0.05$, la probabilità che la differenza riscontrata tra i campioni in esame sia casuale, è inferiore al 5%, quindi il test è considerato statisticamente significativo e le medie sono valutate come significativamente diverse. Infine, la Correzione del Bonferroni afferma, che se uno sperimentatore sta analizzando n ipotesi (dipendenti o indipendenti) su una serie di dati, il livello di significatività statistica che dovrebbe essere utilizzato per ogni ipotesi è $1/n$ volte quello che sarebbe loro attribuito se anche solo un'ipotesi fosse empiricamente testata.

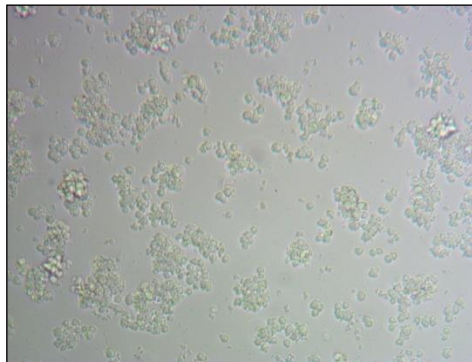
Tutti i dati sono espressi come valore medio \pm errore standard della media (ES). I valori sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al controllo.

Capitolo 4. Risultati

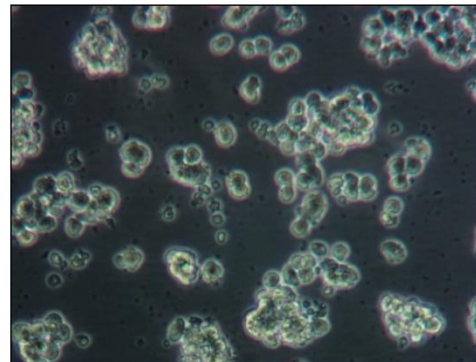
4.1. Caratteristiche della linea cellulare studiata

La linea cellulare studiata alfa TC1 clone 6 (α -TC1/6) è costituita da alfa cellule pancreatiche murine. Essa è stata clonata dalla linea cellulare alfa TC1, che deriva da un adenoma indotto in topi transgenici in cui, l'espressione dell'oncogene che codifica per l'antigene T grande del virus SV40 è sotto il controllo del promotore di ratto per il pre-proglucagone. La linea cellulare parentale alfa TC1 è meno differenziata e produce sia il glucagone che l'insulina, mentre la linea che dà origine alle alfa cellule TC1 clone 6 è più differenziata e produce solo glucagone^{171,172,173}.

Figura 29 A-B. Cellule pancreatiche murine della linea cellulare α -TC1 clone 6 fotografate con ingrandimento 10X (A) e 40X (B).



A



B

4.2. Studio della presenza di SGLT1 e SGLT2 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte ad alto glucosio e FFA.

4.2.1. Studi di espressione genica

Espressione genica per SGLT1 e SGLT2

Come riportato in **Figura 30A**, l'incubazione delle alfa cellule per 16 h in presenza di glucosio 16.7 mmol/l ha determinato un'alterazione dell'espressione genica sia di SGLT1 che di SGLT2. In particolare, come riportato in **Figura 30A**, il messaggero per SGLT1 aumenta significativamente ($+131\pm 49\%$) ($p=0.010$, Test-t di Student), mentre SGLT2 si riduce significativamente ($-52\pm 9\%$) ($p=0.000$, Test-t di Student) rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l. (**SGLT1 $n=9$; SGLT2 $n=7$**)

La presenza di FFA nel terreno di coltura non sembra indurre variazioni significative sia di SGLT1 che di SGLT2, rispetto al controllo (glucosio 5.5 mmol/l) (**Figura 30 B-C**). In particolare, l'effetto selettivo del glucosio sull'espressione genica del trasportatore è messo in evidenza dal fatto che, la contemporanea presenza di alto glucosio e acidi grassi, non sembra indurre variazioni significative nella trascrizione genica rispetto alla presenza di glucosio da solo (16.7 mmol/l) (**Figura 30 B-C**). (**SGLT1 $n=5$; SGLT2 $n=5$**)

(A)

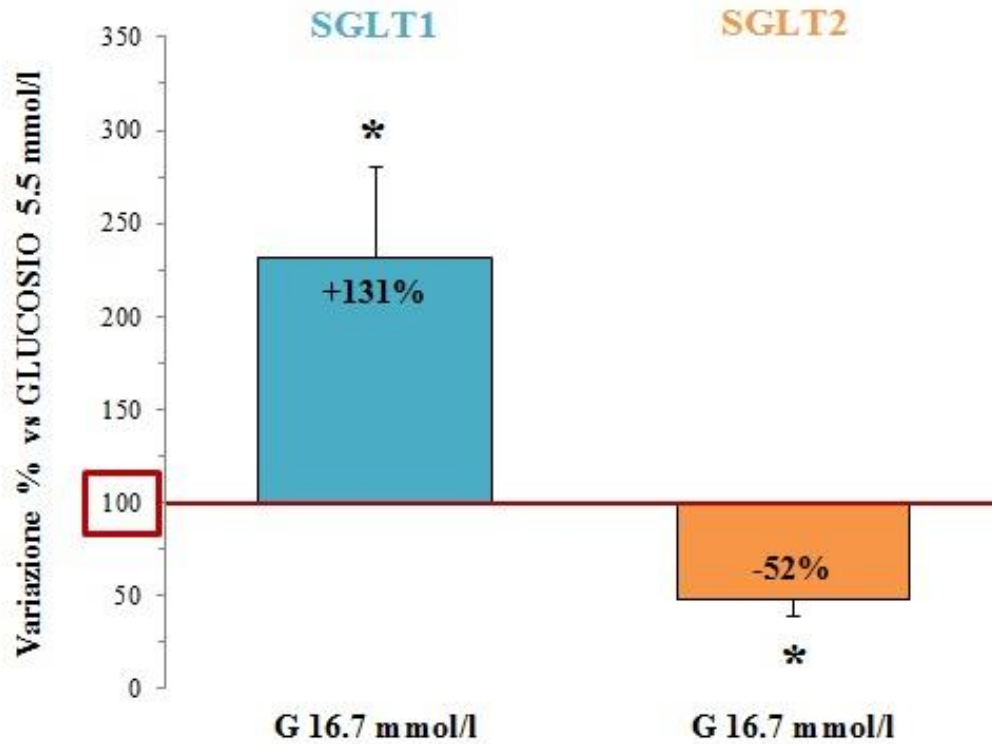
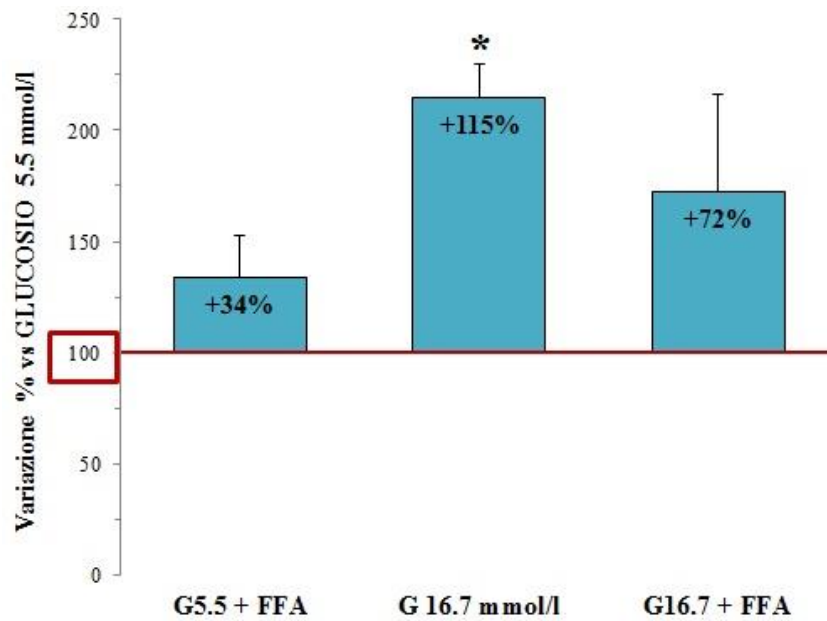


Figura 30 A. Espressione genica per SGLT1 e SGLT2 in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l. Alte concentrazioni di glucosio sembrano modulare l'espressione di entrambi i sodio-glucosio cotrasportatori, inducendo un significativo aumento di SGLT1 e una riduzione significativa di SGLT2 rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, T-test di Student).

(B)



(C)

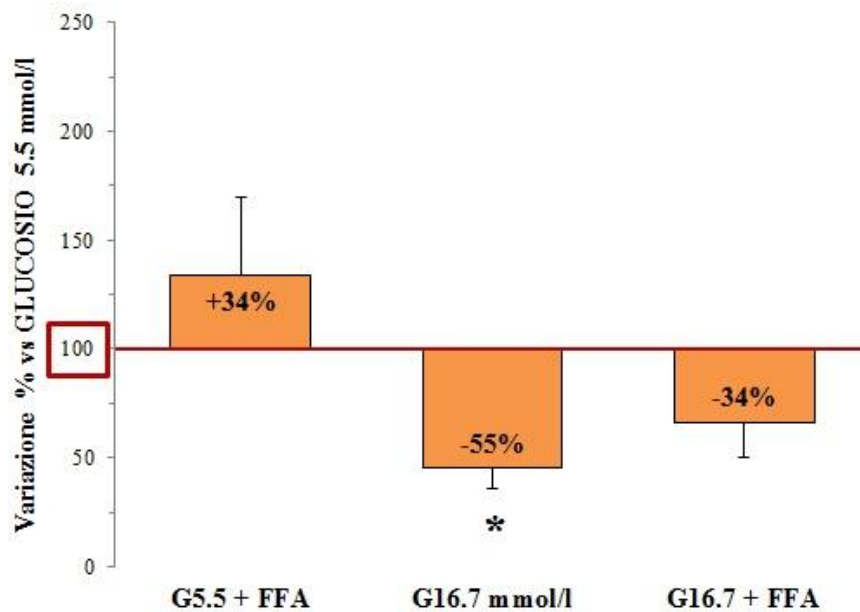


Figura 30 (B-C). Espressione genica per SGLT1 (panello B) e SGLT2 (pannello C) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l. La presenza degli acidi grassi non sembra modificare significativamente l'espressione genica di entrambi i sodio-glucosio cotrasportatori rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l.

4.2.2. Studi di espressione proteica

Espressione proteica per SGLT1 e SGLT2

Il dato dell'espressione genica per SGLT1 e SGLT2, in presenza di alte concentrazioni di glucosio (16.7 mmol/l) per 16 h, non sembra essere confermato dallo studio della proteina. Infatti, come riportato in **Figura 31A**, l'espressione proteica di SGLT1 sembra ridursi ($-34\pm 11\%$) ($p=0.008$, Test-t di Student) significativamente rispetto al suo controllo ($100\pm 0\%$), mentre non si osservano differenze significative per SGLT2 ($+19\pm 21\%$) rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l (**Figura 31A**).

In **Figura 31B 31C**, sono riportati degli esempi di corsa elettroforetica per la separazione delle proteine SGLT1 (**Figura 31B**) e SGLT2 (**Figura 31C**) con metodologia Western-Blot. (**SGLT1 $n=5$; SGLT2 $n=5$**)

Contrariamente, il dato dell'espressione genica dei sodio-glucosio cotrasportatori in presenza di FFA nel terreno di coltura, sembra essere confermato dalla valutazione dell'espressione proteica che, sia per SGLT1 e SGLT2, non cambia rispetto al controllo (**Figura 31 D-E**).

In **Figura 31F 31G**, sono riportati degli esempi di corsa elettroforetica per la separazione delle proteine SGLT1 (**Figura 31F**) e SGLT2 (**Figura 31G**), in presenza di una miscela di acidi grassi liberi, con metodologia Western-Blot. (**SGLT1 $n=5$; SGLT2 $n=4$**)

(A)

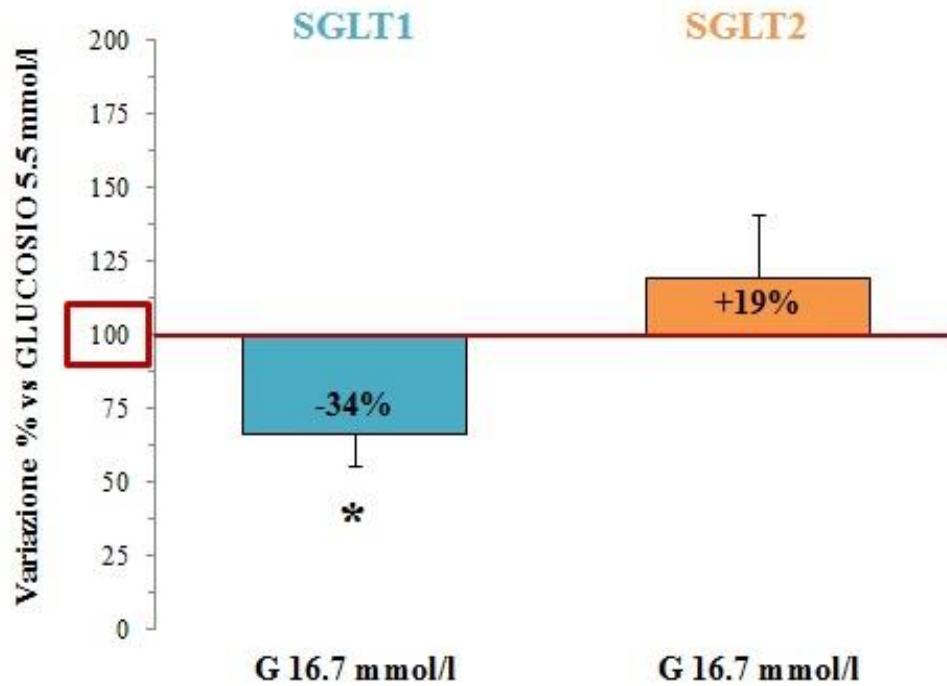


Figura 31A. Espressione proteica per SGLT1 e SGLT2 in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l. La presenza di alte concentrazioni di glucosio sembra ridurre significativamente l'espressione proteica di SGLT1 rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test-t di Student), ma non si osservano variazioni significative per SGLT2.

(B)

SGLT1



(C)

SGLT2

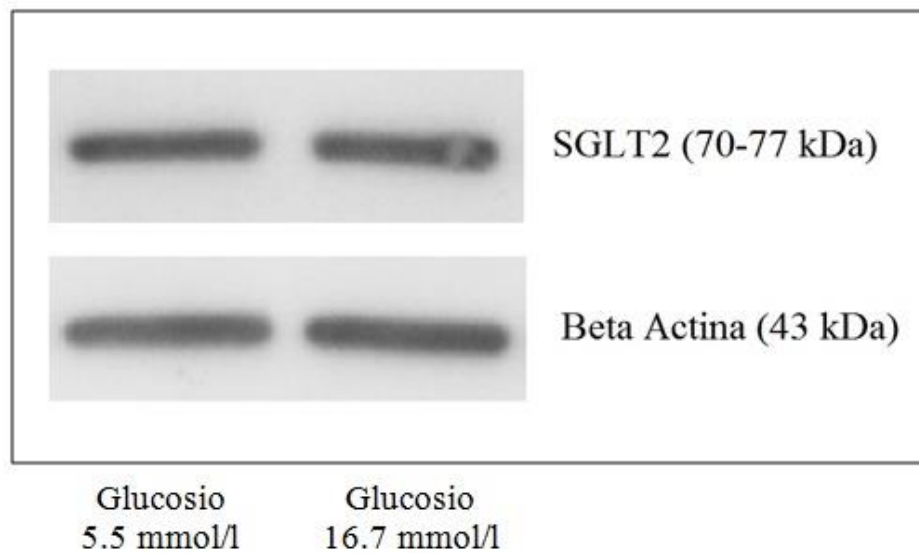
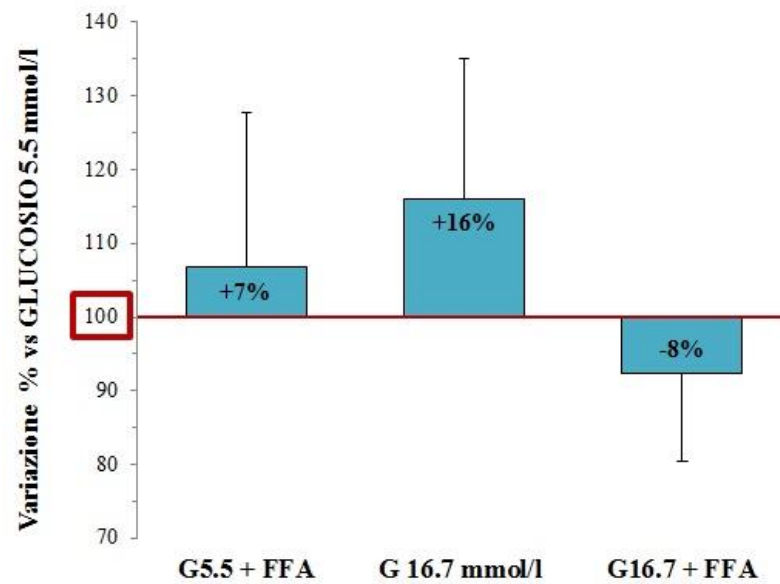


Figura 31 (B-C). Esempio studi di espressione proteica per SGLT1 (pannello **B**) e SGLT2 (pannello **C**) con metodologia Western Blot su cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l.

(D)



(E)

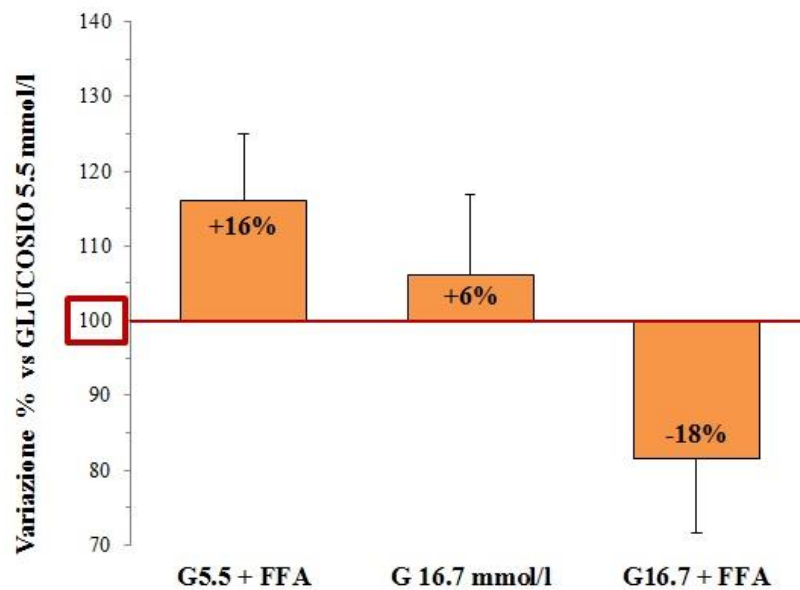
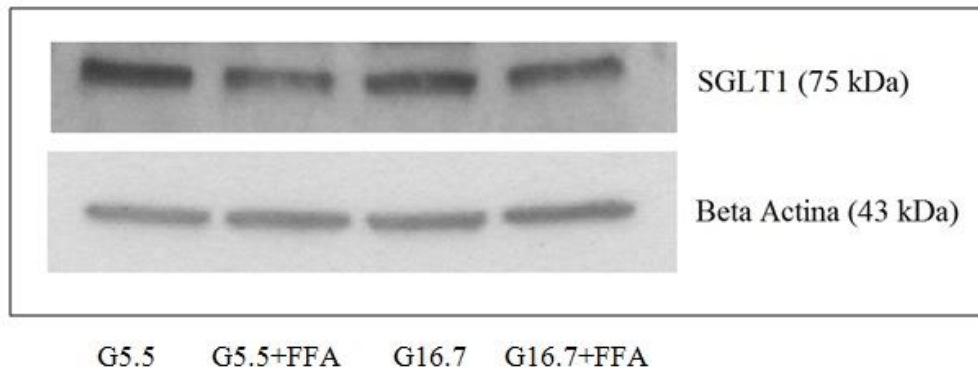


Figura 31 (D-E). Espressione proteica per SGLT1 (panello **D**) e SGLT2 (pannello **E**) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1) 0.5 mmol/l. La presenza di FFA non induce variazioni significative rispetto al controllo (glucosio 5.5 mmol/l).

(F)

SGLT1



(G)

SGLT2

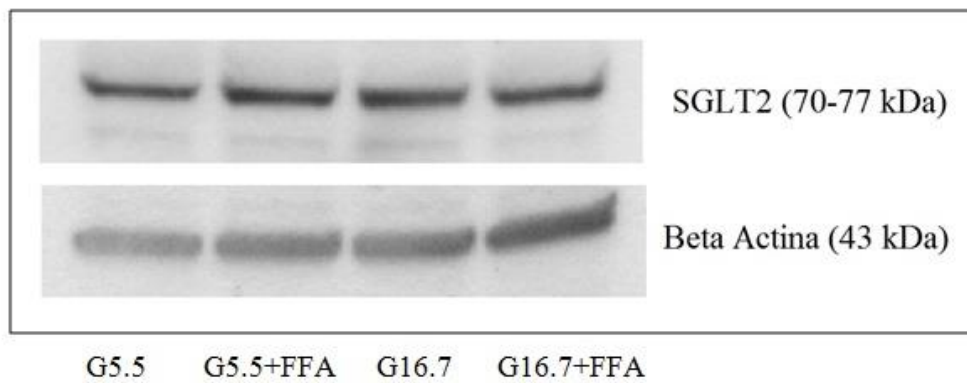


Figura 31 (F-G). Esempio studi di espressione proteica per SGLT1 (pannello **F**) e SGLT2 (pannello **G**) con metodologia Western Blot su cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura di una miscela di acidi grassi liberi (FFA, oleico:palmitico, 2:1), 0.5 mmol/l.

4.3. Studio della presenza di SGLT1 e SGLT2 in alfa-cellule pancreatiche murine (alfa-TC1 clone 6) esposte ad alto glucosio con e senza Florizina.

Nella prima parte dello studio è stata evidenziata la presenza delle due isoforme del sodio-glucosio cotrasportatore sulle alfa cellule pancreatiche murine alfa-TC1/6, e l'effetto selettivo di un'elevata concentrazione di glucosio sulla modulazione dell'espressione genica e proteica. Poiché la presenza di FFA nel terreno di coltura non sembra determinare degli effetti importanti sul cotrasportatore, nella seconda parte dello studio le cellule sono state esposte solamente a glucosio 16.7 mmol/l.

4.3.1. Studi di espressione genica e proteica

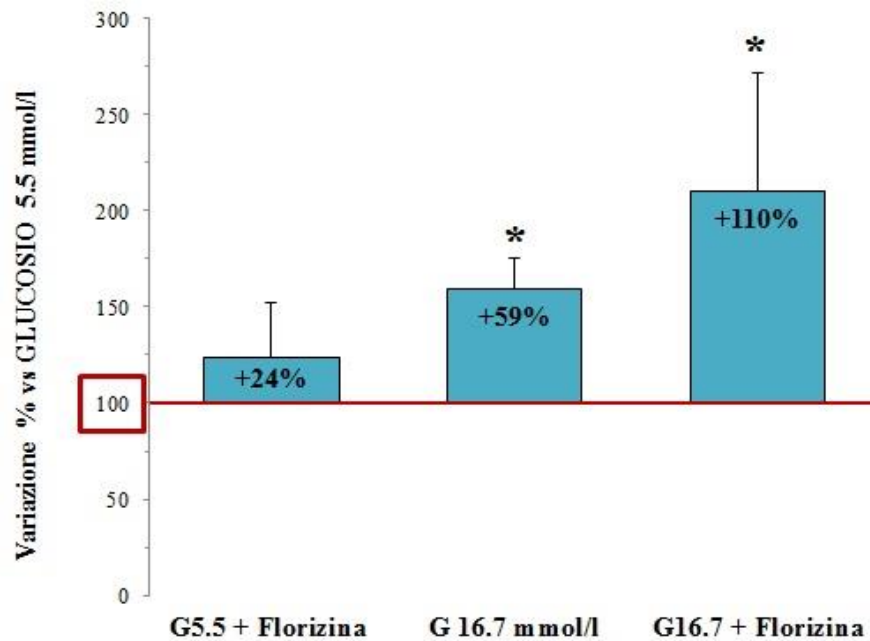
Espressione genica e proteica per SGLT1 e SGLT2 con o senza Florizina

Come riportato in **Figura 32 A-B**, l'incubazione delle alfa cellule per 16 h in presenza di Florizina 50 μM ^{174,175,176}, inibitore delle due isoforme di SGLT, ha determinato un'alterazione dell'espressione genica sia di SGLT1 che di SGLT2. L'espressione genica dell'isoforma 1 del cotrasportatore sodio-glucosio, aumenta significativamente sia in condizioni di iperglicemia (+59 \pm 16%) che in presenza dell'inibitore e di alte concentrazioni di glucosio (+110 \pm 62%), (p<0.05 vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni) (**Figura 32 A**). In particolare, come riportato in **Figura 32 B**, la riduzione dell'espressione genica di SGLT2 in condizioni di iperglicemia (-61 \pm 12%) (p<0.05 vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni), tende a ritornare simile al controllo (-9 \pm 20%) in presenza della Florizina e di alte concentrazioni di glucosio (p<0.05 vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni). (**SGLT1 n=7; SGLT2 n=5**)

L'inibitore non sembra esercitare un effetto sulla traduzione proteica. Infatti, nelle alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 16.7 mmol/l e Florizina 50 μM l'espressione proteica di SGLT1 e SGLT2 rimane simile al controllo, in presenza o meno dell'inibitore (**Figura 32 C-D**). (**SGLT1 n=4; SGLT2 n=6**).

In **Figura 32E e 32F**, sono riportati degli esempi di corsa elettroforetica per la separazione delle proteine SGLT1 (**Figura 32E**) e SGLT2 (**Figura 32F**), in presenza di Florizina, con metodologia Western-Blot.

(A)



(B)

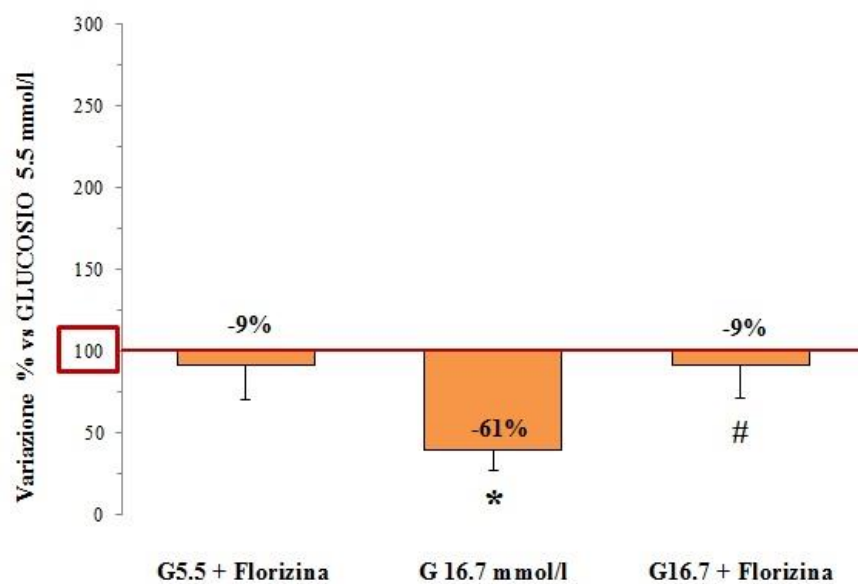
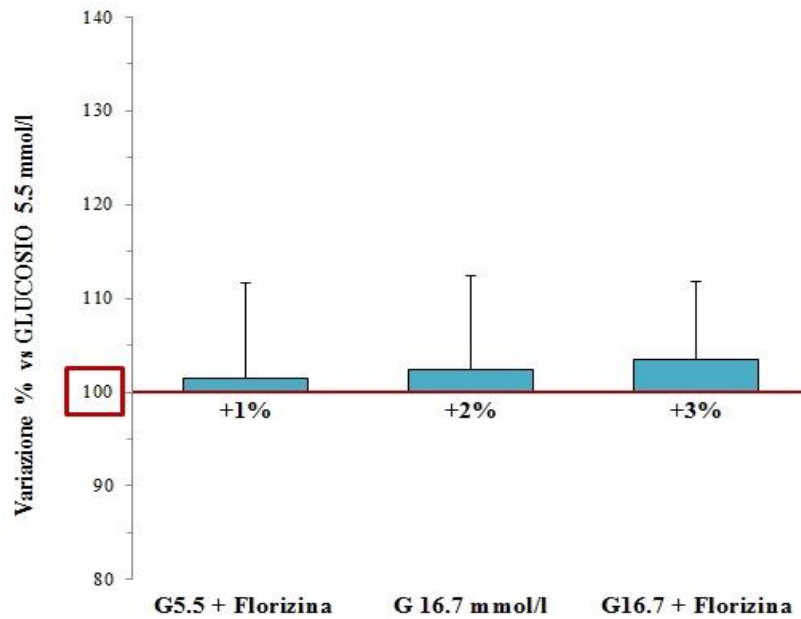


Figura 32 (A-B). Espressione genica per SGLT1 (panello **A**) e SGLT2 (pannello **B**) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, in presenza o meno della Florizina (50 μ M). In condizioni di iperglicemia (glucosio 16.7 mmol/l) aumenta significativamente l'espressione genica di SGLT1 e si riduce quella di SGLT2 (*= p <0.05 vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni). La combinazione di alte concentrazioni di glucosio e Florizina induce un aumento significativo del messaggero di SGLT2 rispetto al solo alto glucosio (16.7 mmol/l), (#= p <0.05 vs glucosio 16.7 mmol/l. Test di Bonferroni).

(C)



(D)

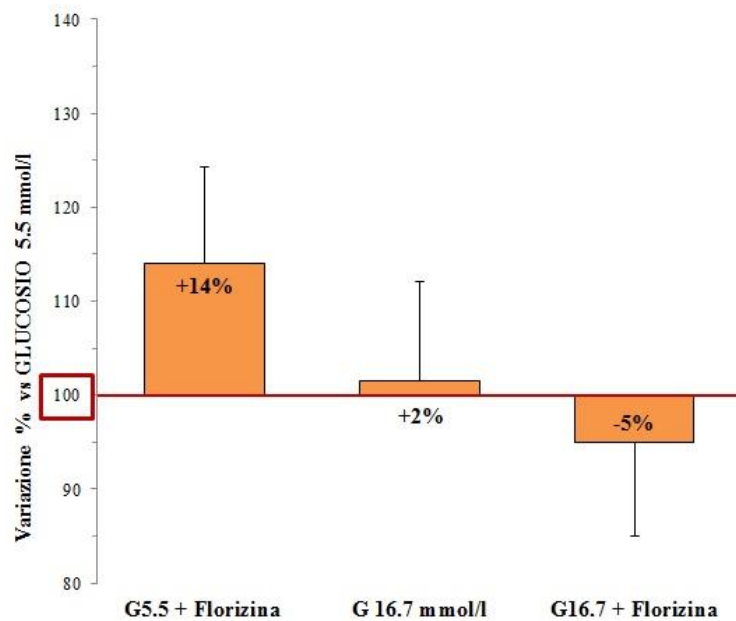
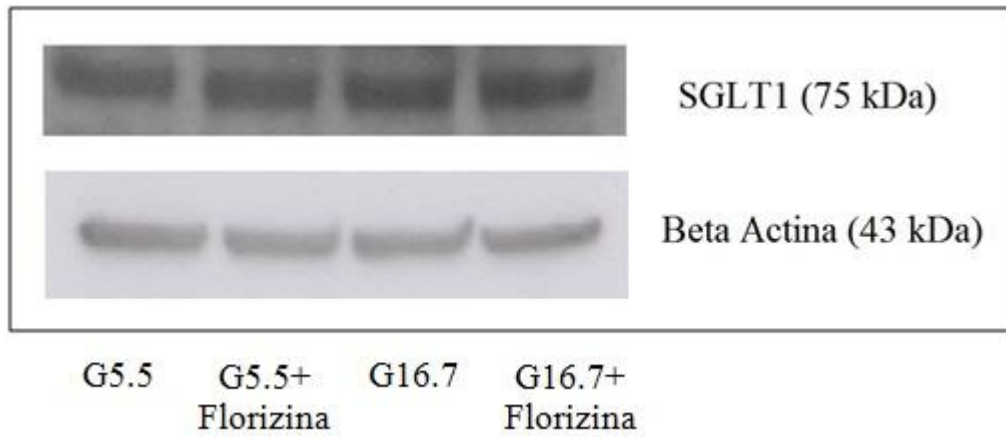


Figura 32 (C-D). Espressione proteica per SGLT1 (panello C) e SGLT2 (panello D) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina (50 μ M). Non si osservano variazioni significative dell'espressione proteica dei due sodio-glucosio cotrasportatori, nelle varie condizioni sperimentali, rispetto al controllo (glucosio 5.5 mmol/l).

(E)

SGLT1



(F)

SGLT2

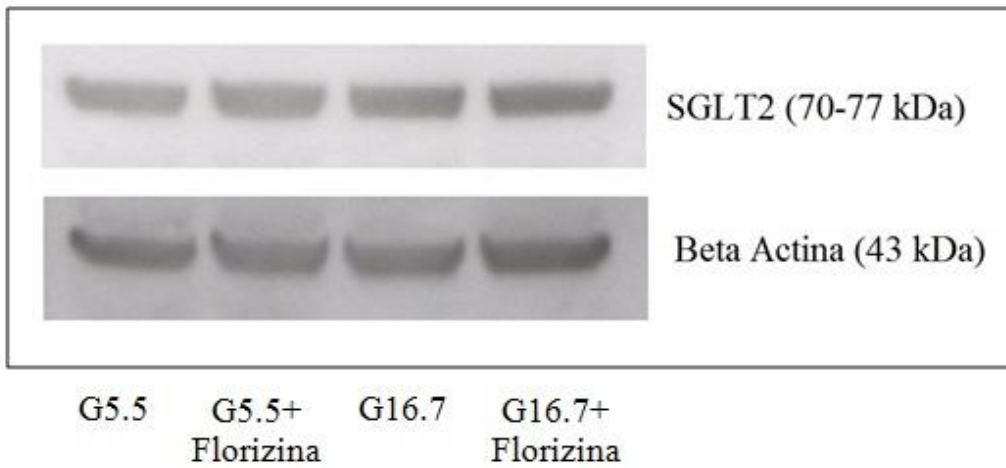


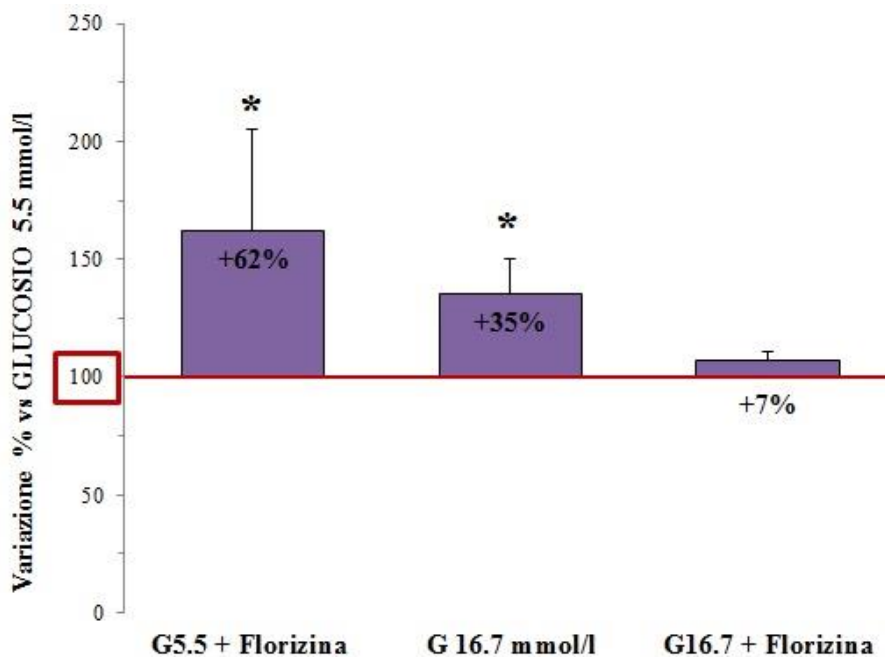
Figura 32 (E-F). Esempio studi di espressione proteica per SGLT1 (pannello E) e SGLT2 (pannello F) con metodologia Western Blot su cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina (50 μ M).

Espressione genica e proteica per PC1/3 e PC2 con o senza Florizina

Come riportato in **Figura 33 A-B**, l'incubazione delle alfa cellule per 16 h in presenza di alto glucosio ha determinato un'alterazione dell'espressione sia di PC1/3 che di PC2. In particolare, come riportato in **Figura 33A**, il messaggero per PC1/3 aumenta significativamente ($+35\pm 15\%$) nelle cellule esposte a glucosio 16.7 mmol/l, rispetto a quelle esposte a glucosio 5.5 mmol/l ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). Parallelamente, abbiamo osservato una riduzione significativa ($-49\pm 7\%$) dell'espressione genica di PC2 in presenza di glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al controllo ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni) (**Figura 33B**).

Alle nostre condizioni sperimentali, l'aggiunta dell'inibitore delle isoforme del cotrasportatore sodio-glucosio SGLT sembra normalizzare l'espressione genica di PC1-3 ($+7\pm 4\%$) rispetto a glucosio 5.5 mmol/l, mentre quella di PC2 aumenta significativamente ($+19\pm 10\%$) in presenza di alto glucosio e Florizina rispetto al solo alto glucosio (16.7 mmol/l), ($p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni) (**Figure 33 A-B**). (PC1/3 $n=5$; PC2 $n=6$)

(A)



(B)

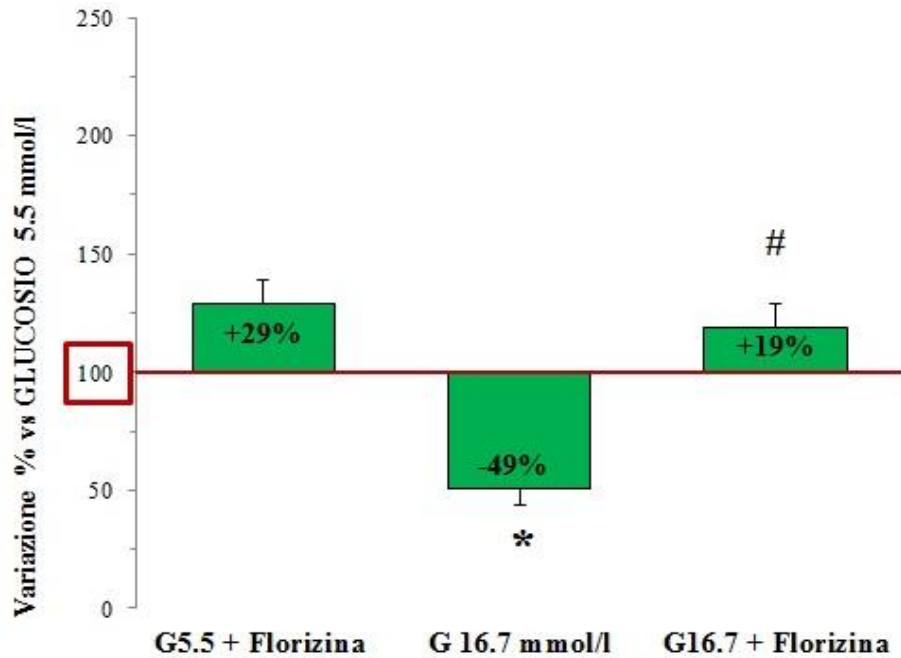


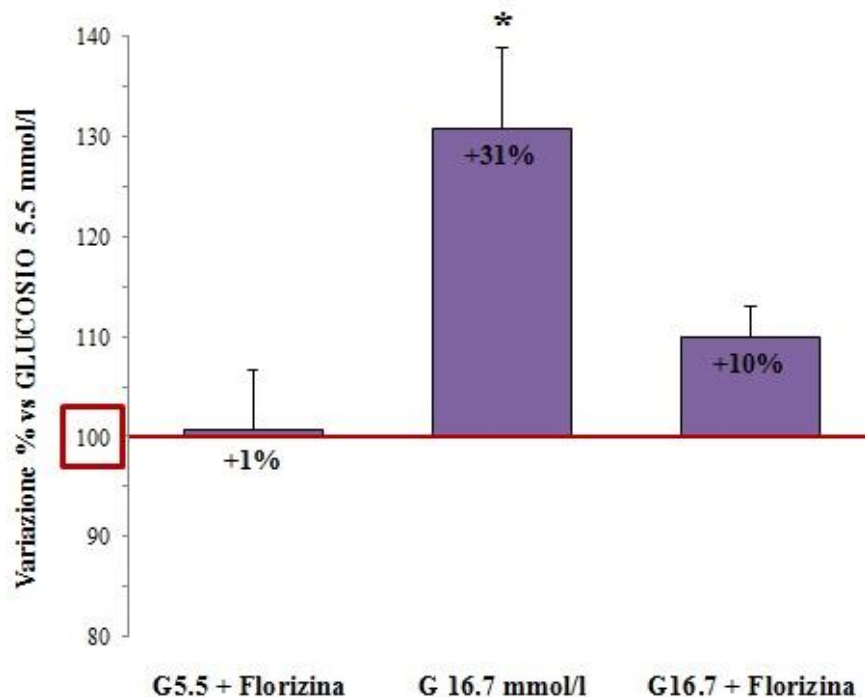
Figura 33 (A-B). Espressione genica per PC1/3 (panello A) e PC2 (pannello B) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina. Alte concentrazioni di glucosio (16.7 mmol/l) inducono un aumento e una riduzione significativa dell'espressione genica rispettivamente di PC1/3 e PC2 (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). La presenza dell'inibitore determina un aumento significativo del messaggero di PC2 in presenza di alto glucosio e Florizina rispetto alla condizione di iperglicemia. (#= $p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni).

Interessante, il dato dell'espressione genica per PC1/3 e PC2, viene solo parzialmente riconfermato dallo studio dell'espressione proteica. Infatti, come riportato in **Figura 33 C**, la proteina PC1/3 sembra essere modificata solo dalla presenza di un'elevata concentrazione di glucosio (+31±8%), rispetto alla condizione di controllo (p<0.05, vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni) (**Figura 33 C**).

Per quanto riguarda PC2 (**Figura 33 D**), come atteso, l'espressione della proteina si riduce significativamente (-14±1%) nelle cellule esposte per 16 h a glucosio 16.7 mmol/l (p<0.05, vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). La presenza della Florizina aumenta significativamente (+21±4%) l'espressione di PC2 in condizione di glucosio 5.5 mmol/l, rispetto al controllo senza inibitore (p<0.05, vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). (**PC1/3 n=4; PC2 n=4**).

In **Figura 33 E-F**, sono riportati degli esempi di corsa elettroforetica per la separazione delle proteine PC1/3 (pannello **E**) e PC2 (pannello **F**) con metodologia Western-Blot in presenza della Florizina.

(C)



(D)

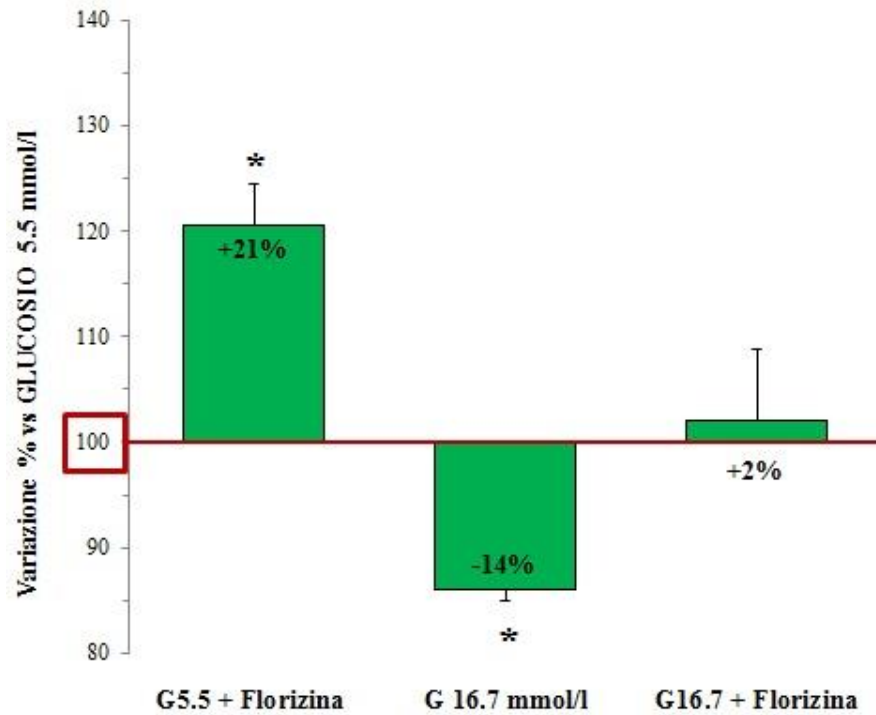
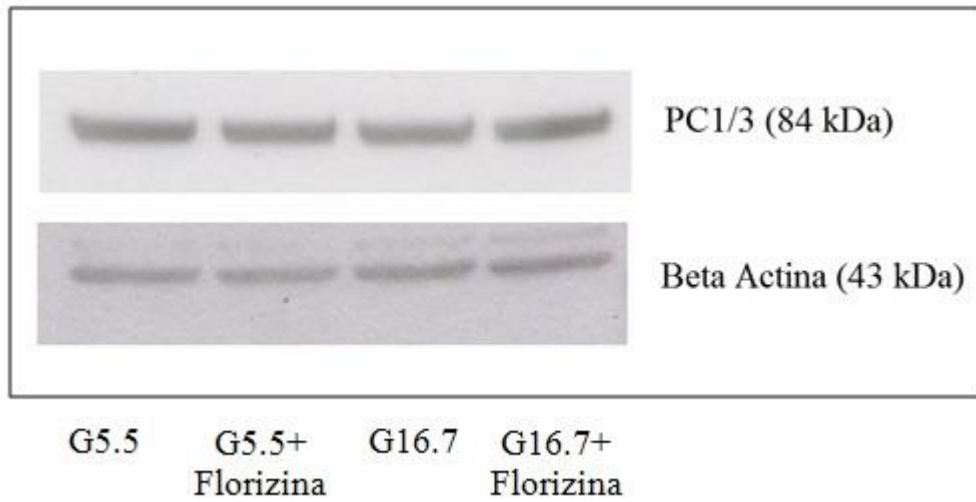


Figura 33 (C-D). Espressione proteica per PC1/3 (panello C) e PC2 (panello D) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina. In presenza di iperglicemia (16.7 mmol/l) si osserva un aumento significativo dell'espressione proteica di PC1/3 e una significativa riduzione di PC2 rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni). PC2 aumenta significativamente in presenza di basso glucosio e Florizina (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni).

(E)

PC1/3



(F)

PC2

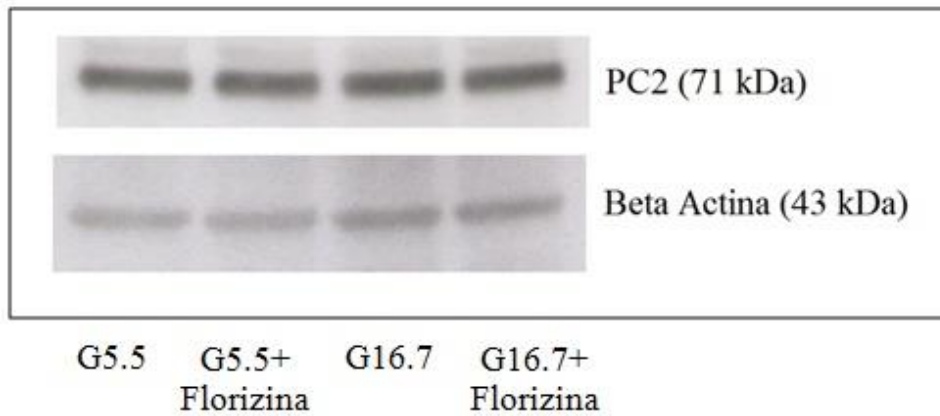


Figura 33 (E-F). Esempio studi di espressione proteica per PC1/3 (pannello E) e PC2 (pannello F) con metodologia Western Blot su cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina (50 μ M).

4.3.2. Studi funzionali

Secrezione di GLP-1 totale

Nel nostro studio abbiamo osservato un andamento della secrezione del GLP-1 parallelo ai dati di espressione genica e proteica per PC1/3. Infatti, come riportato in **Figura 34** e come atteso, 16 h di coltura delle alfa cellule in presenza di glucosio 16.7 mmol/l hanno determinato un incremento significativo del rilascio di GLP-1 ($+25\pm 3\%$) rispetto al controllo a basso glucosio ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). Dato interessante, l'esposizione delle alfa-cellule a Florizina ha causato una normalizzazione dell'espressione genica e proteica del PC1/3 e, parallelamente, anche una riduzione significativa della secrezione del GLP-1, sia rispetto sia a glucosio 16.7 mmol/l da solo ($-55\pm 3\%$) ($p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni) che rispetto al controllo a basso glucosio ($-30\pm 3\%$) ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni). (**Figura 34**) ($n=4$)

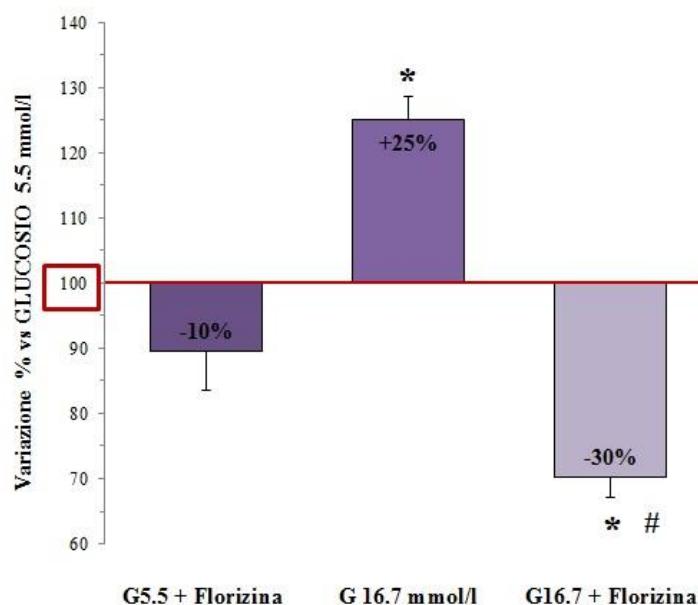


Figura 34. L'incubazione delle alfa cellule per 16 h in presenza di glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta della Florizina (50 μ M) ha determinato un aumento significativo della secrezione del GLP-1 in condizione di alto glucosio rispetto al controllo ($*=p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni). La presenza di alto glucosio e Florizina ne induce una riduzione significativa rispetto al basso e alto glucosio ($*=p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l e $\#=p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l. Test di Bonferroni).

Secrezione del glucagone

Per quanto riguarda la secrezione del glucagone, alle nostre condizioni sperimentali si è osservata una riduzione significativa ($-16\pm 5\%$) nel rilascio dell'ormone nel terreno di coltura di alfa cellule esposte, per 16h, a glucosio 16.7 mmol/l, rispetto al controllo ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni), **Figura 35**. La presenza della Florizina normalizza ($0\pm 5\%$, $p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni) il rilascio del glucagone parallelamente alla modulazione dell'espressione genica e proteica di PC2 (**Figura 35**). ($n=4$)

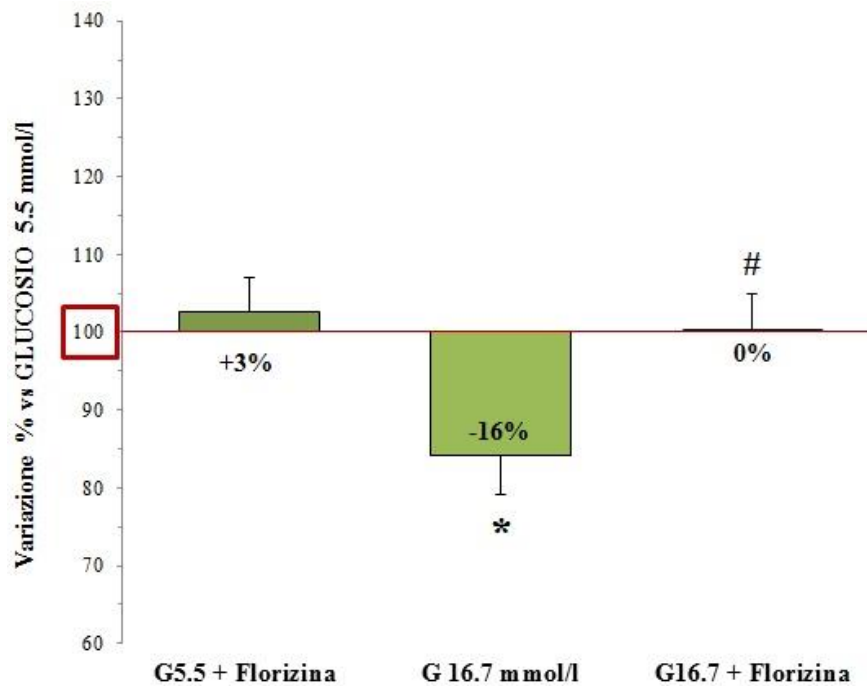


Figura 35. Secrezione di glucagone nel terreno di coltura di alfa cellule esposte a Florizina (50 μ M). Dopo 16 h, si osserva una riduzione significativa della secrezione del glucagone ad alte concentrazioni di glucosio ($*=p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni).

4.3.3. Attività metabolica cellulare

Come riportato in **Figura 36**, la presenza di un'elevata concentrazione di glucosio nel terreno di coltura ha determinato un aumento significativo dell'attività metabolica cellulare ($+14\pm 2\%$), rispetto al controllo ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni), valutata attraverso il test con MTT. Nel metabolismo delle cellule pancreatiche alfa-TC1/6 sembra giocare un ruolo importante il cotrasportatore sodio-glucosio: infatti, come riportato in Figure 36, l'aggiunta della Florizina ha determinato una diminuzione significativa dell'attività metabolica, sia rispetto a glucosio 16.7 da solo ($-25\pm 3\%$) ($p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l, Test di Bonferroni), che a glucosio 5.5 mmol/l ($-11\pm 3\%$) ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni). La combinazione di basso glucosio e Florizina sembrerebbe aumentarne ($+13\pm 2\%$) l'attività metabolica rispetto al controllo ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni) ($n=6$).

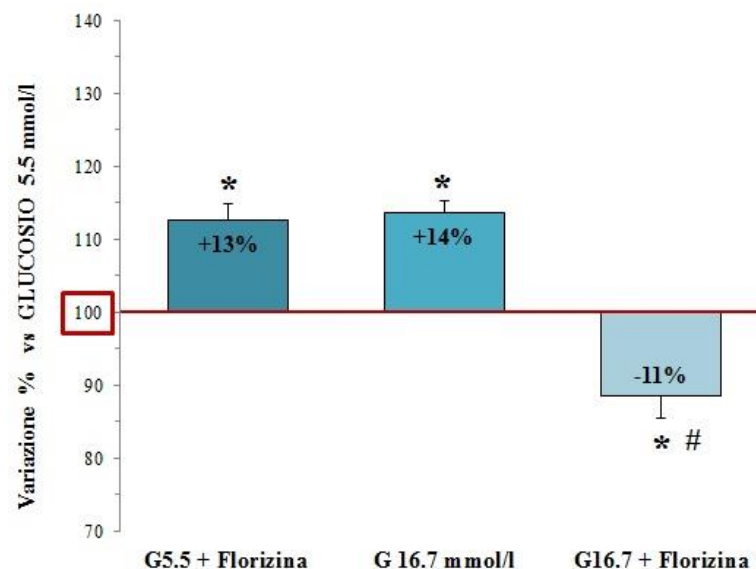
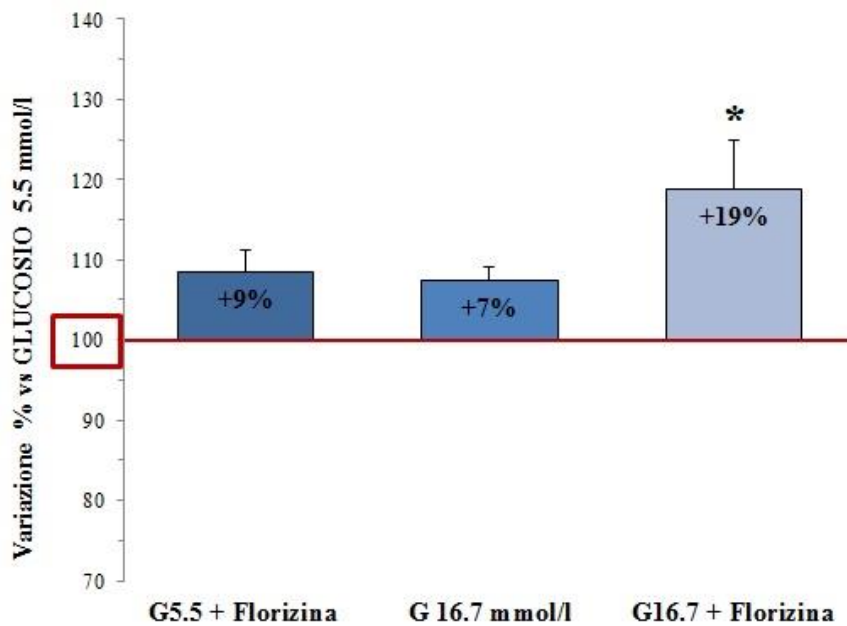


Figura 36. Test di attività metabolica cellulare con MTT su alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina. La presenza di alto glucosio e inibitore induce una riduzione significativa dell'attività metabolica rispetto al basso (5.5 mmol/l) e alto glucosio (16.7 mmol/l). (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l e #= $p < 0.05$ vs glucosio 16.7 mmol/l. Test di Bonferroni).

4.3.4. Valutazione del tasso di apoptosi e necrosi cellulare

Come riportato in **Figura 37**, alle nostre condizioni sperimentali, la presenza della Florizina 50 $\mu\text{mol/l}$, in combinazione con alte concentrazioni di glucosio, sembra essere deleteria per le alfa-TC1/6, poiché induce un aumento significativo sia dell'apoptosi ($+19\pm 6\%$) che della necrosi ($+15\pm 3\%$), rispetto al controllo ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l, Test di Bonferroni), **Figura 37 A-B**. ($n=7$)

(A)



(B)

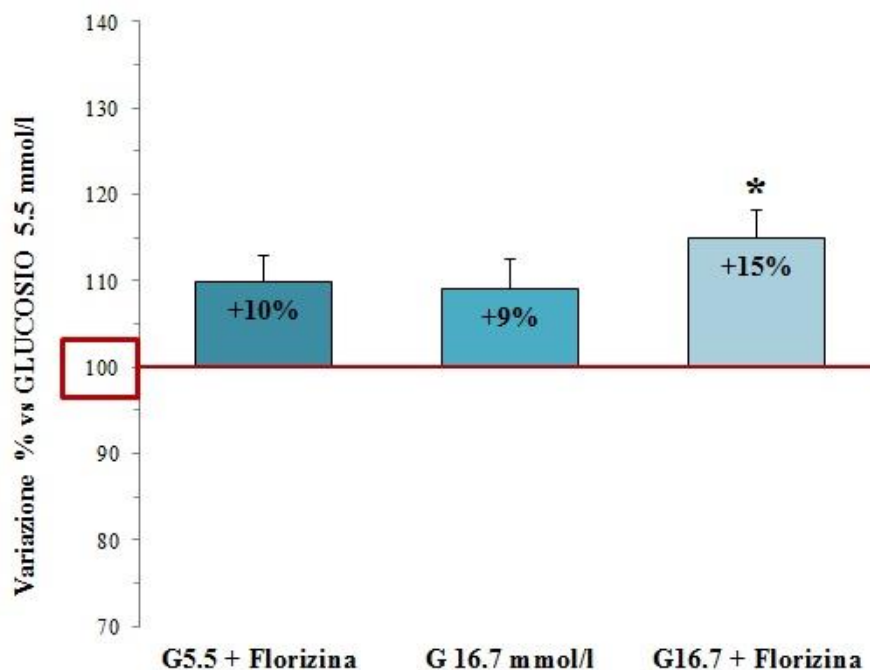


Figura 37 (A-B). Valutazione del tasso di apoptosi (pannello A) e di necrosi (pannello B) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina (50 μ M). La presenza della Florizina in combinazione con alte concentrazioni di glucosio determina un aumento significativo del tasso di apoptosi e di necrosi rispetto al controllo (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni).

4.3.5. Valutazione dello stress ossidativo

Lo stress ossidativo è stato misurato valutando la presenza di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta della Florizina. Come riportato in **Figura 38**, l'iperglicemia induce un incremento significativo (+19 \pm 2%) della concentrazione di ROS ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni), rispetto alle cellule esposte a glucosio 5.5 mmol/l. La presenza dell'inibitore e di alto glucosio nel terreno di coltura non induce cambiamenti significativi nell'espressione dei

radicali liberi rispetto a cellule esposte al solo alto glucosio. La concentrazione di ROS, tuttavia, si riduce ($-20\pm 5\%$) in quelle coltivate in presenza di Florizina e glucosio 5.5 mmol/l ($p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni) rispetto al controllo (**Figura 38**). ($n=7$)

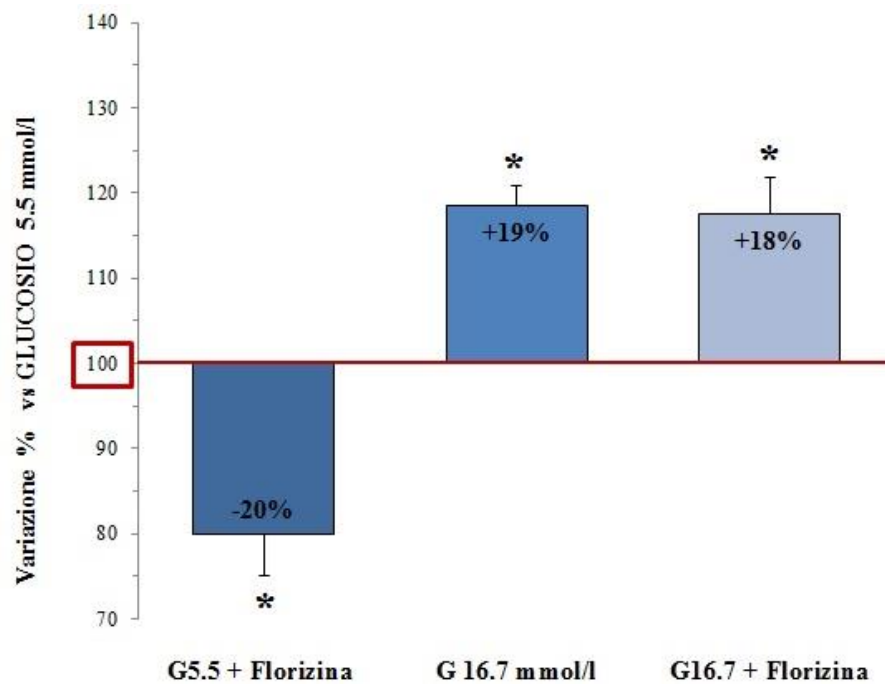


Figura 38. Valutazione della concentrazione di ROS in alfa cellule esposte per 16 h a glucosio 5.5 e 16.7 mmol/l, con o senza l'aggiunta nel terreno di coltura della Florizina (50 μ M). L'alto glucosio induce un aumento significativo dei ROS rispetto al controllo, mentre la presenza dell'inibitore determina in combinazione con il basso glucosio una diminuzione dei radicali liberi e, in presenza di alto glucosio, un aumento rispetto al controllo 5.5 mmol/l. (*= $p < 0.05$ vs glucosio 5.5 mmol/l. Test di Bonferroni).

Capitolo 5. Discussione dei risultati

È noto come il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) colpisca milioni di persone in tutto il mondo²⁰³, e sia caratterizzato da una ridotta sensibilità all'insulina a livello dei tessuti periferici, un'inadeguata secrezione dell'ormone da parte delle cellule beta del pancreas e un alterato rilascio di glucagone da parte delle alfa cellule pancreatiche²⁰⁴. Negli ultimi anni, per il trattamento del T2DM è stata introdotta una nuova classe di farmaci che si basa sulla capacità del Glucagone-Like Peptide-1 (GLP-1), un ormone prodotto dalle cellule L intestinali, di ridurre i livelli di glucosio nel plasma. Il GLP-1 agisce a più livelli, ma come ampiamente dimostrato, colpisce soprattutto le cellule beta e alfa del pancreas²⁰⁵. Il GLP-1 potenzia il rilascio di insulina glucosio-indotta e sembra normalizzare l'alterata produzione di glucagone osservata nei pazienti diabetici²⁰⁶. Poiché il GLP-1 è rapidamente degradato dall'enzima DiPeptidil Peptidase Type IV (DPP-4) e, quindi, ha una breve emivita plasmatica, in clinica sono attualmente utilizzati gli analoghi di questa incretina che sono più resistenti alla degradazione della DPP-4²⁰⁷.

Il GLP-1 è un peptide che deriva dal clivaggio del pro-glucagone: nelle alfa cellule del pancreas, la presenza dell'enzima pro-ormone convertasi 2 (PC2) porta alla produzione di glucagone, mentre nelle cellule L-intestinali il pro-ormone convertasi 1/3 (PC1/3) catalizza la scissione in GLP-1 e GLP-2. Fino a pochi anni fa, l'evidenza suggeriva che la sintesi tessuto-specifica fosse dovuta alla differente espressione enzimatica fra le alfa-cellule pancreatiche e quelle L-intestinali²⁰⁸.

²⁰³ Ashcroft Frances M. and Patrik Rorsman. "Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years." Cell 148.6 (2012): 1160-1171.

²⁰⁴ Unger Roger H and Lelio Orci. "The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus." The Lancet 305.7897 (1975): 14-16.

²⁰⁵ Drucker Daniel J. et al. "Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits." Diabetes care 33.2 (2010): 428-433.

²⁰⁶ Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology 132.6 (2007): 2131-2157.

²⁰⁷ Ahrén Bo. "GLP-1-based therapy of type 2 diabetes: GLP-1 mimetics and DPP-IV inhibitors." Current diabetes reports 7.5 (2007): 340-347.

²⁰⁸ Tucker J. Devin, Savita Dhanvantari and Patricia L. Brubaker. "Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines." Regulatory peptides 62.1 (1996): 29-35.

Sulla base di queste premesse, il GLP-1 viene prodotto principalmente dalle cellule L-intestinali: tuttavia, mentre in vivo solo piccole quantità del peptide raggiungono il pancreas in forma bioattiva per l'azione rapida della DPP-4, giustificando solo in parte gli effetti importanti osservati sulle isole pancreatiche, alcune osservazioni degli ultimi anni indicano che il GLP-1 può essere prodotto anche nelle cellule alfa-pancreatiche. In particolare, in uno studio condotto nel nostro laboratorio, è stato dimostrato, attraverso studi morfologici, funzionali e molecolari, la presenza e le varie funzioni di un sistema locale di produzione di GLP-1 nelle cellule delle isole pancreatiche umane, incluse quelle ottenute da pazienti diabetici tipo 2²⁰⁹. Inoltre, sempre nel nostro laboratorio, studi preliminari hanno evidenziato la presenza di un sistema di produzione delle incretine in una linea murina di alfa cellule pancreatiche, un effetto anti-apoptotico e un ruolo protettivo del GLP-1 in presenza di perturbazioni metaboliche come iperglicemia e l'ipernefemia evidenziando anche, per la prima volta, come l'IL-6 sia in grado di mediare l'interazione fra tessuti insulino-sensibili e la produzione di GLP-1, suggerendo un ruolo di questa interleuchina nella regolazione della secrezione di insulina.

La glucotossicità, danno indotto da elevate concentrazioni di glucosio, insieme alla lipotossicità, danno dovuto ad alte concentrazioni di acidi grassi, rappresenta, tra i vari fattori acquisiti, quelli che maggiormente sono stati studiati nel diabete^{210,211}. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato che entrambe queste condizioni inducono alterazioni della secrezione insulinica, aumentano l'apoptosi, modificano la trascrizione di geni importanti per la cellula beta, interferendo con i processi rigenerativi beta-cellulari. Come discusso ampiamente, il glucosio rappresenta lo stimolo per il rilascio del GLP-1: studi recenti hanno evidenziato che, a livello dell'intestino superiore, il rilascio di GLP-1 e GIP avviene grazie all'assorbimento del glucosio mediato da un particolare cotrasportatore sodio-glucosio, l'SGLT1. Piccole correnti associate a questo trasportatore

²⁰⁹ Marchetti P. et al. "A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets." *Diabetologia* 55.12 (2012): 3262-3272.

²¹⁰ Kaiser N., Gil Leibowitz, and Rafael Neshet. "Glucotoxicity and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus." *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 16.1 (2003): 5-22.

²¹¹ Poitout Vincent and R. Paul Robertson. "Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* 143.2 (2002): 339-342.

sembrerebbero sufficienti a depolarizzazione la membrana, attivare l'ingresso di calcio voltaggio-dipendente e rilasciare il peptide²¹². Questa ipotesi sembrerebbe supportata dalla dimostrazione che la secrezione di GLP-1 glucosio-dipendente in vitro sia bloccata dall'esposizione delle cellule a inibitori farmacologici di SGLT1²¹³, e che topi knockout per SGLT1 presentino una concentrazione basale ridotta di GLP-1 e GIP²¹⁴. Per contro, la concentrazione plasmatica di GLP-1, dopo un carico orale di glucosio, è risultata notevolmente più elevata del normale in questi topi mancanti di SGLT1, suggerendo che il ridotto assorbimento del glucosio a livello dell'intestino superiore possa essere compensato nell'intestino distale, dove non risulterebbero presenti questi recettori²¹⁵. Un'ipotesi è che, un aumento del carico di glucosio distale, possa facilitare la fermentazione microbica e la produzione di acidi grassi a catena corta, che a loro volta attivano il rilascio di GLP-1 dalle cellule L attraverso vie alternative²¹⁶.

Poiché gli studi più recenti sembrerebbero coinvolgere sempre più il cotrasportatore del glucosio SGLT nella modulazione della sintesi e secrezione di GLP-1 a livello delle cellule intestinali, fornendo anche potenziali approfondimenti meccanicistici e identificando le isoforme di questo trasportatore come possibili bersagli nella terapia anti-diabetica, nella mia tesi ho voluto valutare la presenza di SGLT1 e SGLT2 sulle cellule alfa pancreatiche murine, e il loro potenziale ruolo nella secrezione di GLP-1 a livello del pancreas.

I risultati ottenuti nella prima parte del mio studio hanno confermato un incremento significativo della trascrizione di PC1/3 nella linea cellulare alfa TC1-6, parallelamente a un aumento della secrezione di GLP-1 nel terreno di coltura dopo esposizione a un'elevata concentrazione di glucosio: la presenza dell'incretina ha determinato un effetto protettivo sulle cellule pancreatiche stesse,

²¹² Gribble Fiona M. et al. "A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line." *Diabetes* 52.5 (2003): 1147-1154.

²¹³ Parker H. E. et al. "Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion." *Diabetologia* 55.9 (2012): 2445-2455.

²¹⁴ Gorboulev Valentin et al. "Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion." *Diabetes* 61.1 (2012): 187-196.

²¹⁵ Powell David R. et al. "LX4211 Increases Serum Glucagon-Like Peptide 1 and Peptide YY Levels by Reducing Sodium/Glucose Cotransporter 1 (SGLT1)-Mediated Absorption of Intestinal Glucose." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 345.2 (2013): 250-259.

²¹⁶ Powell David R. et al. "Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304.2 (2013): E117-E130.

evidenziato da un miglioramento dell'attività metabolica e da una riduzione dell'apoptosi e della necrosi.

In questa tesi, per la prima volta è stata evidenziata la presenza di SGLT1 e SGLT2 sulle cellule alfa pancreatiche murine, attraverso studi di espressione genica e proteica. Il dato interessante è rappresentato dalla differente modulazione di queste isoforme in presenza di un'elevata concentrazione di glucosio. Infatti, abbiamo osservato un incremento significativo dell'espressione genica per SGLT1, mentre SGLT2 diminuisce significativamente rispetto al basale. Questo potrebbe essere spiegato attraverso la dissimile sensibilità al glucosio: studi condotti in ovociti di *Xenopus*, hanno dimostrato che la V_{max} per SGLT1 è sostanzialmente inferiore a quella di SGLT2. La differenza di V_{max} potrebbe anche essere associata a un diverso turnover dei due trasportatori²¹⁷. Questo potrebbe spiegare quello che abbiamo osservato sulla nostra linea cellulare, e la necessità di una valutazione di SGLT2 nel tempo e a più elevate concentrazioni di glucosio. Inoltre, questa caratteristica delle due isoforme potrebbe indicare anche un ruolo differente o, ancora meglio, sinergico nella regolazione dell'assorbimento glucidico a livello pancreatico. A differenza di quanto supposto nello studio di Powell e colleghi²¹⁶, alle nostre condizioni sperimentali, non abbiamo osservato variazioni significative del sodio-glucosio cotrasportatore nelle alfa cellule esposte ad una miscela di acidi grassi liberi.

Una volta dimostrata la presenza di SGLT1 e SGLT2 nella linea cellulare pancreatica murina alfa TC1-6, abbiamo voluto capire come questo recettore potesse incidere nella modulazione della secrezione di GLP-1 e nella vitalità cellulare, esponendo le nostre cellule alla presenza o meno di un inibitore specifico per il trasportatore competitivo per il glucosio, la Florizina²¹⁸.

In presenza di questo inibitore, abbiamo osservato un aumento dell'espressione genica di SGLT1 e una normalizzazione del messaggero per SGLT2, senza significativi cambiamenti per quanto riguarda la proteina. Il fatto che non si osservino variazioni dei recettori a basso glucosio potrebbe indicare il

²¹⁷ Ikeda Tyson S. et al. "Characterization of a Na^+ /glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine." *The Journal of membrane biology* 110.1 (1989): 87-95.

²¹⁸ Rossetti Luciano et al. "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats." *Journal of Clinical Investigation* 79.5 (1987): 1510.

ruolo accessorio del sodio-glucosio cotrasportatore e la sua "entrata in gioco" solamente in presenza di un eccessivo livello di glucosio in circolo.

La presenza della Florizina ha determinato una modulazione dell'espressione genica e proteica di PC1/3 e PC2, i cui valori sono ritornati simili ai controlli: questo effetto è stato, parallelamente, associato a una riduzione della secrezione di GLP-1 e una normalizzazione del glucagone nel terreno di coltura di cellule esposte per 16 h ad una concentrazione di glucosio elevata. Il dato interessante è stato una riduzione significativa dell'attività metabolica e un aumento del tasso di apoptosi e necrosi nelle cellule coltivate in presenza di Florizina. Come abbiamo visto negli studi precedenti, e confermato in questa tesi, una maggior presenza dell'incetina nel terreno di coltura causa un miglioramento dell'attività metabolica e una riduzione del tasso di apoptosi e necrosi nelle cellule pancreatiche: bloccando l'azione di SGLT1 e SGLT2 abbiamo osservato una riduzione significativa della concentrazione di GLP-1 che, indirettamente, potrebbe aver causato il peggioramento della vitalità cellulare. Questo potrebbe confermare il ruolo protettivo dell'incetina. Per quanto riguarda lo stress ossidativo, non si sono osservati cambiamenti significativi in presenza o meno della Florizina.

Gli studi preliminari presentati in questa tesi hanno dimostrato, per la prima volta, la presenza delle isoforme 1 e 2 del cotrasportatore sodio-glucosio nelle alfa cellule pancreatiche murine, suggerendo che una loro inibizione o alterazione potrebbe essere coinvolta nel danno cellulare indotto da iperglicemia. Questo effetto sembra essere mediato da una diminuita presenza dell'incetina nel terreno di coltura e, pertanto, da una riduzione delle sue riconosciute proprietà anti-apoptotiche.

La dimostrazione della presenza e del ruolo di questi sodio-glucosio cotrasportatori sulle alfa cellule pancreatiche potrebbe, se confermata da ulteriori e più specifici studi, aprire ad approcci terapeutici innovativi destinati a migliorare la vitalità delle isole pancreatiche proteggendo la funzione delle cellule alfa e, probabilmente, beta in presenza delle perturbazioni metaboliche tipiche del diabete mellito di tipo 2. Questi due cotrasportatori sodio-glucosio sono considerati dei nuovi bersagli terapeutici per ridurre l'iperglicemia nei pazienti con

diabete mellito: inibitori con diverse specificità per SGLT1 e SGLT2, come dapagliflozin, canagliflozin ed empagliflozin, possono rallentare il tasso di assorbimento intestinale del glucosio e aumentare l'eliminazione renale degli zuccheri nelle urine, come dimostrato da studi clinici randomizzati sulla loro efficacia ipoglicemizzante nel diabete di tipo 2. Dimostrare la presenza di questi recettori anche sulle alfa cellule pancreatiche umane potrebbe portare a nuovi farmaci specifici e utili nella cura del diabete mellito tipo 2.

Bibliografia

1. Brunton Stephen. "Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder." *Postgraduate medicine* 121.5 (2009): 68-81.
2. Lau David CW. "Metabolic syndrome: perception or reality?" *Current atherosclerosis reports* 11.4 (2009): 264-271.
3. Goldberg Elad, and Ilan Krause. "Infection and type 1 diabetes mellitus-A two edged sword?" *Autoimmunity reviews* 8.8 (2009): 682-686.
4. Concannon Patrick, Stephen S. Rich and Gerald T. Nepom. "Genetics of type 1A diabetes." *New England Journal of Medicine* 360.16 (2009): 1646-1654.
5. Bode Bruce W. "Defining the importance of daily glycemic control and implications for type 2 diabetes management." *Postgrad Med* 121.5 (2009): 82-93.
6. Janssen P. et al. "Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 37.1 (2013): 18-36.
7. Donnelly Dan. "The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands." *British journal of pharmacology* 166.1 (2012): 27-41.
8. Holst Jens Juul. "The physiology of glucagon-like peptide 1." *Physiological reviews* 87.4 (2007): 1409-1439.
9. Yu Bao-Sheng and An-Ru Wang. "Glucagon-like peptide 1 based therapy for type 2 diabetes." *World Journal of Pediatrics* 4.1 (2008): 8-13.
10. Avogaro A. "Cardioprotective effects of glucagon-like peptide-1: preclinical and clinical data." *Giornale italiano di cardiologia* (2006) 12.12 Suppl 2 (2011): 17-24.
11. Marchetti P. et al. "A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets." *Diabetologia* 55.12 (2012): 3262-3272.
12. American Diabetes Association. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes Care* 37.Supplement 1 (2014): S81-S90.
13. International Diabetes Federation. "Global Diabetes Plan 2011–2021." (2012).
14. Consoli Agostino. "Italian barometer diabetes report 2013. L'impatto del diabete in Europa e in Italia."
15. Fonte: diabete.net e diabete Italia
16. Zimmet Paul, K.G. Alberti and Jonathan Shaw. "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* 414.6865 (2001): 782-787.

17. Bottazzo GianFranco, Alejo Florin-Christensen and Deborah Doniach. "Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies." *The Lancet* 304.7892 (1974): 1279-1283.
18. Christie Michael R. et al. "Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM: studies with identical twins." *Diabetes* 41.7 (1992): 782-787.
19. Fu Zhuo, Elizabeth R. Gilbert and Dongmin Liu. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." *Current diabetes reviews* 9.1 (2013): 25.
20. Pugliese Alberto. "Genetics of type 1 diabetes." *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 33.1 (2004).
21. Lupi R. et al. "Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger." *Diabetes & metabolism* 33.5 (2007): 340-345.
22. Kahn Steven E. "The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *The American journal of medicine* 108.6 (2000): 2-8.
23. Marchetti Piero et al. "Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89.11 (2004): 5535-5541.
24. Atkinson Mark A. and Noel K. Maclaren. "The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." *New England Journal of Medicine* 331.21 (1994): 1428-1436.
25. Polonsky Kenneth S., Jeppe Sturis, and Graeme I. Bell. "Non-insulin-dependent diabetes mellitus—a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance." *New England Journal of Medicine* 334.12 (1996): 777-783.
26. Del Guerra Silvia et al. "Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes." *Diabetes* 54.3 (2005): 727-735.
27. Zimmet Paul, K.G. Alberti and Jonathan Shaw. "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* 414.6865 (2001): 782-787.
28. Prentki Marc and Christopher J. Nolan. "Islet β cell failure in type 2 diabetes." *Journal of Clinical Investigation* 116.7 (2006): 1802.
29. Marchetti Piero. "La β -cellula nel diabete mellito di tipo 2." *Grandangolo in Diabetologia La secrezione insulinica* 2 (2002).
30. Pan Fong Cheng and Chris Wright. "Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland." *Developmental Dynamics* 240.3 (2011): 530-565.
31. Cabrera Over et al. "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.7 (2006): 2334-2339.

32. Gromada Jesper, Isobel Franklin and Claes B. Wollheim. " α -Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains." *Endocrine reviews* 28.1 (2007): 84-116.
33. Chang T.W. and Alfred L. Goldberg. "The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle." *Journal of Biological Chemistry* 253.10 (1978): 3685-3693.
34. Fu Zhuo, Elizabeth R. Gilbert and Dongmin Liu. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." *Current diabetes reviews* 9.1 (2013): 25.
35. Zhao Feng-Qi and Aileen F. Keating. "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Current genomics* 8.2 (2007): 113.
36. Gromada Jesper et al. "CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells." *The Journal of physiology* 518.3 (1999): 745-759.
37. Henquin J-C. "The interplay between cyclic AMP and ions in the stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells." *Archives Of Physiology And Biochemistry* 93.1 (1985): 37-48.
38. Charles M. Arthur et al. "Adenosine 3', 5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release." *Science* 179.4073 (1973): 569-571.
39. Gonzalo Susana and Maurine E. Linder. "SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway." *Molecular biology of the cell* 9.3 (1998): 585-597.
40. Drucker Daniel J. "Minireview: the glucagon-like peptides." *Endocrinology* 142.2 (2001): 521-527.
41. Meier Juris J. et al. "Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited." *Regulatory peptides* 107.1 (2002): 1-13.
42. Jones Peter M. and Shanta J. Persaud. "Protein Kinases, protein Phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic β -Cells." *Endocrine Reviews* 19.4 (1998): 429-461.
43. Oh Yoon Sin. "Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids." *Anatomy & cell biology* 48.1 (2015): 16-24.
44. Ohneda Akira et al. "Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 46.3 (1978): 504-510.
45. Poitout Vincent and R. Paul Robertson. "Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* 143.2 (2002): 339-342.
46. Robertson R. Paul et al. " β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes." *Diabetes* 53.suppl 1 (2004): S119-S124.
47. Deguil Julie et al. "Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape." *Traffic* 12.3 (2011): 349-362.

48. Prentki Marc et al. "Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipototoxicity Role in β -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes." *Diabetes* 51.suppl 3 (2002): S405-S413.
49. Yaney G.C. and B.E. Corkey. "Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells." *Diabetologia* 46.10 (2003): 1297-1312.
50. Gremlich Sandrine et al. "Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels." *Journal of Biological Chemistry* 272.48 (1997): 30261-30269.
51. Ritz-Laser Beate et al. "Glucose-Induced Preproinsulin Gene Expression Is Inhibited by the Free Fatty Acid Palmitate 1." *Endocrinology* 140.9 (1999): 4005-4014.
52. Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.
53. Drews Gisela, Peter Krippeit-Drews and Martina Düfer. "Electrophysiology of islet cells." *The Islets of Langerhans*. Springer Netherlands, 2010. 115-163.
54. Exton John H. et al. "Gluconeogenesis in the perfused liver: The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosine 3', 5'-monophosphate and insulin." *The American journal of medicine* 40.5 (1966): 709-715.
55. Unger R.H. "The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus." *Annual review of medicine* 28.1 (1977): 119-130.
56. Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.
57. Hahn H-J., M. Ziegler and E. Mohr. "Inhibition of glucagon secretion by glucose and glyceraldehyde on isolated islets of Wistar rats." *FEBS letters* 49.1 (1974): 100-102.
58. Marliss Errol B. et al. "Insulin and glucagon release from monolayer cell cultures of pancreas from newborn rats." *European journal of clinical investigation* 3.1 (1973): 16-26.
59. Heimberg Harry et al. "Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic α -and β -cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization." *Journal of Biological Chemistry* 270.15 (1995): 8971-8975.
60. Tu Jian, Bernard E. Tuch and Zhaoyi Si. "Expression and Regulation of Glucokinase in Rat Islet β -and α -Cells during Development 1." *Endocrinology* 140.8 (1999): 3762-3766.
61. Edwards J.C. and K. W. Taylor. "Fatty acids and the release of glucagon from isolated guinea-pig islets of Langerhans incubated in vitro." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 215.2 (1970): 310-315.

62. Gross R. and P. Mialhe. "Free fatty acids and pancreatic function in the duck." *Acta endocrinologica* 112.1 (1986): 100-104.
63. Bollheimer L. Cornelius et al. "Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations." *Metabolism* 53.11 (2004): 1443-1448.
64. Hong Jing et al. "The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro." *Metabolism* 54.10 (2005): 1329-1336.
65. Olofsson Charlotta S. et al. "Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic α -cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium." *Diabetes* 53.11 (2004): 2836-2843.
66. Hong Jing et al. "Stevioside counteracts the α -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290.3 (2006): E416-E422.
67. Gromada Jesper, Isobel Franklin and Claes B. Wollheim. " α -Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains." *Endocrine reviews* 28.1 (2007): 84-116.
68. Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.
69. Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.
70. Rizza Robert A. "Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy." *Diabetes* 59.11 (2010): 2697-2707.
71. Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.
72. Hare Kristine J. et al. "Inappropriate glucagon response after oral compared with isoglycemic intravenous glucose administration in patients with type 1 diabetes." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298.4 (2010): E832-E837.
73. Holst Jens Juul et al. "Regulation of glucagon secretion by incretins." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13.s1 (2011): 89-94.
74. Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.
75. Baron Alain D. et al. "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics." *Diabetes* 36.3 (1987): 274-283.
76. Nielsen Michael F. et al. "Assessment of hepatic sensitivity to glucagon in NIDDM: use as a tool to estimate the contribution of the indirect pathway to nocturnal glycogen synthesis." *Diabetes* 46.12 (1997): 2007-2016.

77. Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.
78. Bansal Pritpal and Qinghua Wang. "Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295.4 (2008): E751-E761.
79. Müller Walter A. et al. "Abnormal alpha-cell function in diabetes: response to carbohydrate and protein ingestion." *New England Journal of Medicine* 283.3 (1970): 109-115.
80. Burcelin Rémy, Claude Knauf and Patrice D. Cani. "Pancreatic α -cell dysfunction in diabetes." *Diabetes & metabolism* 34 (2008): S49-S55.
81. Gastaldelli Amalia et al. "Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study." *Diabetes* 49.8 (2000): 1367-1373.
82. Consoli Agostino et al. "Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM." *Diabetes* 38.5 (1989): 550-557.
83. Basu Rita, W. Frederick Schwenk and Robert A. Rizza. "Both fasting glucose production and disappearance are abnormal in people with "mild" and "severe" type 2 diabetes." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287.1 (2004): E55-E62.
84. Baron Alain D. et al. "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics." *Diabetes* 36.3 (1987): 274-283.
85. Knop F.K. et al. "Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic iv glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus." *Diabetologia* 50.4 (2007): 797-805.
86. Meier J.J. et al. "Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects." *Diabetologia* 50.4 (2007): 806-813.
87. Lund Asger et al. "Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell." *Current diabetes reports* 14.12 (2014): 1-7.
88. Brown J.C. et al. "Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide." *Recent progress in hormone research* 31 (1974): 487-532.
89. Brubaker PL. "The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis." *Ann N Y Acad Sci* 1070 (2006):10-26.
90. Roberge J.N. and P.L. Brubaker. "Secretion of Proglucagon-Derived Peptides in Response to Intestinal Luminal Nutrients." *Endocrinology* 128.6 (1991): 3169-3174.
91. Mortensen Kristine et al. "GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine." *Regulatory peptides* 114.2 (2003): 189-196.

92. Theodorakis Michael J. et al. "Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 290.3 (2006): E550-E559.
93. Reimann Frank and Fiona M. Gribble. "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells." *Diabetes* 51.9 (2002): 2757-2763.
94. Gribble Fiona M. et al. "A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line." *Diabetes* 52.5 (2003): 1147-1154.
95. Orskov Cathrine et al. "Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans." *Diabetes* 43.4 (1994): 535-539.
96. Fehmann Hans C. and Joel F. Habener. "Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7–37) on a somatostatin secreting cell line." *FEBS letters* 279.2 (1991): 335-340.
97. Heller R. Scott, Timothy J. Kieffer and Joel F. Habener. "Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing α -cells of the rat endocrine pancreas." *Diabetes* 46.5 (1997): 785-791.
98. Nauck M. A. et al. "Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7–36 amide]) in patients with NIDDM." *Diabetologia* 39.12 (1996): 1546-1553.
99. McIntosh Christopher HS, Scott Widenmaier and Su-Jin Kim. "2 Pleiotropic Actions of the Incretin Hormones." *Vitamins and hormones* 84 (2010): 21.
100. Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2131-2157.
101. Vilsbøll Tina et al. "Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients." *Diabetes* 50.3 (2001): 609-613.
102. Kreymann B. et al. "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." *The Lancet* 330.8571 (1987): 1300-1304.
103. Ørskov C., J.J. Holst and O. V. Nielsen. "Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78–107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach." *Endocrinology* 123.4 (1988): 2009-2013.
104. Vilsbøll Tina et al. "Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects." *Regulatory peptides* 114.2 (2003): 115-121.
105. Gedulin Bronislava R., Timothy J. Rink and Andrew A. Young. "Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats." *Metabolism* 46.1 (1997): 67-70.
106. Unger R. H. "Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances." *Diabetologia* 28.8 (1985): 574-578.

107. Raju Bharathi and Philip E. Cryer. "Loss of the Decrement in Intraileal Insulin Plausibly Explains Loss of the Glucagon Response to Hypoglycemia in Insulin-Deficient Diabetes Documentation of the Intraileal Insulin Hypothesis in Humans." *Diabetes* 54.3 (2005): 757-764.
108. De Heer, J. et al. "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas." *Diabetologia* 51.12 (2008): 2263-2270.
109. Eissele R. et al. "Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man." *European journal of clinical investigation* 22.4 (1992): 283-291.
110. Elliott R.M. et al. "Glucagon-like peptide-1 (7–36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns." *Journal of Endocrinology* 138.1 (1993): 159-166.
111. Jacobsen Siv Hesse et al. "Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects." *Obesity surgery* 22.7 (2012): 1084-1096.
112. Reimann Frank and Fiona M. Gribble. "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells." *Diabetes* 51.9 (2002): 2757-2763.
113. Rorsman P. "The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint." *Diabetologia* 40.5 (1997): 487-495.
114. Schuit Frans C. et al. "Glucose sensing in pancreatic β -cells a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus." *Diabetes* 50.1 (2001): 1-11.
115. Sidhu S.S. et al. "Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca^{2+} in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUTag." *The Journal of physiology* 528.1 (2000): 165-176.
116. Rayner C.K. et al. "Effects of intraduodenal glucose and fructose on antropyloric motility and appetite in healthy humans." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278.2 (2000): R360-R366.
117. Sugiyama K. et al. "Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption." *Digestion* 55.1 (1994): 24-28.
118. Shima Kenji et al. "Relationship between molecular structures of sugars and their ability to stimulate the release of glucagon-like peptide-1 from canine ileal loops." *Acta endocrinologica* 123.4 (1990): 464-470.
119. Ritzel U. et al. "Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum." *Acta diabetologica* 34.1 (1997): 18-21.

120. Christensen Mikkel et al. "The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 369-381.
121. Deacon Carolyn F. and Bo Ahrén. "Physiology of incretins in health and disease." *The review of diabetic studies: RDS* 8.3 (2011): 293.
122. Garber Alan J. "Incretin therapy--present and future." *Rev Diabet Stud* 8.3 (2011): 307-322.
123. Holst Jens Juul. "The physiology of glucagon-like peptide 1." *Physiological reviews* 87.4 (2007): 1409-1439.
124. Moon Jun Sung and Kyu Chang Won. "Pancreatic α -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." *Diabetes & metabolism journal* 39.1 (2015): 1-9.
125. Creutzfeldt Werner OC et al. "Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7–36) amide in type I diabetic patients." *Diabetes care* 19.6 (1996): 580-586.
126. De Heer J. et al. "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas." *Diabetologia* 51.12 (2008): 2263-2270.
127. Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2131-2157.
128. DeFronzo Ralph A. et al. "Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study." *Current Medical Research and Opinion®* 24.10 (2008): 2943-2952.
129. Ahrén B. O. et al. "Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89.5 (2004): 2078-2084.
130. DeFronzo Ralph A. et al. "The efficacy and safety of saxagliptin when added to metformin therapy in patients with inadequately controlled type 2 diabetes with metformin alone." *Diabetes care* 32.9 (2009): 1649-1655.
131. Balas Bogdan et al. "The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92.4 (2007): 1249-1255.
132. Herman Gary A. et al. "Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91.11 (2006): 4612-4619.
133. Chacra A. R. et al. "Saxagliptin added to a submaximal dose of sulphonylurea improves glycaemic control compared with uptitration of sulphonylurea in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial." *International journal of clinical practice* 63.9 (2009): 1395-1406.

134. Ahrén Bo et al. "Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94.4 (2009): 1236-1243.
135. Bell Graeme I. et al. "Molecular biology of mammalian glucose transporters." *Diabetes care* 13.3 (1990): 198-208.
136. Sabino-Silva R. et al. "The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43.11 (2010): 1019-1026.
137. Zhao Feng-Qi and Aileen F. Keating. "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Current genomics* 8.2 (2007): 113.
138. Hediger Matthias A. and David B. Rhoads. "Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters." *Physiological Reviews* 74.4 (1994): 993-1026.
139. Wright Ernest M. and Eric Turk. "The sodium/glucose cotransport family SLC5." *Pflügers Archiv* 447.5 (2004): 510-518.
140. Wright, E. M., B. A. Hirayama and D. F. Loo. "Active sugar transport in health and disease." *Journal of internal medicine* 261.1 (2007): 32-43.
141. Sabino-Silva R. et al. "Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow." *Journal of Membrane Biology* 228.2 (2009): 63-69.
142. Zhou Lubing et al. "Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1)." *Journal of cellular biochemistry* 90.2 (2003): 339-346.
143. Hediger Matthias A. and David B. Rhoads. "Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters." *Physiological Reviews* 74.4 (1994): 993-1026.
144. Wright Ernest M. et al. "Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5." *Physiology* 19.6 (2004): 370-376.
145. Wells Rebecca G. et al. "Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 263.3 (1992): F459-F465.
146. Wright Ernest M. et al. "Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5." *Physiology* 19.6 (2004): 370-376.
147. Ishikawa Yasuko, Takafumi Eguchi and Hajime Ishida. "Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine: Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1357.3 (1997): 306-318.
148. Hirsch Jochen R., Donald DF Loo and Ernest M. Wright. "Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes." *Journal of Biological Chemistry* 271.25 (1996): 14740-14746.

149. Dyer J. et al. "Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282.2 (2002): G241-G248.
150. Nath Karl A. "Tubulo interstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage." *American Journal of Kidney Diseases* 20.1 (1992): 1-17.
151. D'Agord Schaan B. et al. "Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes." *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et metabolisme* 33.11 (2001): 664-669.
152. Freitas H. S. et al. "Na⁺-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity." *Endocrinology* 149.2 (2008): 717-724.
153. Ehrenkranz Joel RL et al. "Phlorizin: a review." *Diabetes/metabolism research and reviews* 21.1 (2005): 31-38.
154. Panayotova-Heiermann Mariana, Donald DF Loo and Ernest M. Wright. "Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter." *Journal of Biological Chemistry* 270.45 (1995): 27099-27105.
155. Rossetti Luciano et al. "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats." *Journal of Clinical Investigation* 79.5 (1987): 1510.
156. Wright Ernest M., Donald DF Loo and Bruce A. Hirayama. "Biology of human sodium glucose transporters." *Physiological reviews* 91.2 (2011): 733-794.
157. Thorens Bernard and Mike Mueckler. "Glucose transporters in the 21st Century." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298.2 (2010): E141-E145.
158. Oku Akira et al. "Correction of hyperglycemia and insulin sensitivity by T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, in streptozotocin-induced diabetic rats." *The Japanese Journal of Pharmacology* 84.3 (2000): 351-354.
159. Arakawa Kenji et al. "Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095." *British journal of pharmacology* 132.2 (2001): 578-586.
160. Oku Akira et al. "T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes." *Diabetes* 48.9 (1999): 1794-1800.
161. Adachi Tetsuya et al. "T-1095, a renal Na⁺-glucose transporter inhibitor, improves hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats." *Metabolism* 49.8 (2000): 990-995.

162. Jung Chang Hee, Jung Eun Jang and Joong-Yeol Park. "A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor." *Diabetes & metabolism journal* 38.4 (2014): 261-273.
163. Han Songping et al. "Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats." *Diabetes* 57.6 (2008): 1723-1729.
164. Meng Wei et al. "Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes." *Journal of medicinal chemistry* 51.5 (2008): 1145-1149.
165. Mather Amanda and Carol Pollock. "Glucose handling by the kidney." *Kidney international* 79 (2011): S1-S6.
166. Gerich J.E. "Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications." *Diabetic Medicine* 27.2 (2010): 136-142.
167. Abdul-Ghani, Muhammad A., Luke Norton and Ralph A. DeFronzo. "Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes." *Endocrine reviews* 32.4 (2011): 515-531.
168. Jung Chang Hee, Jung Eun Jang and Joong-Yeol Park. "A novel therapeutic agent for type 2 diabetes mellitus: SGLT2 inhibitor." *Diabetes & metabolism journal* 38.4 (2014): 261-273.
169. Chao Edward C. and Robert R. Henry. "SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment." *Nature Reviews Drug Discovery* 9.7 (2010): 551-559.
170. Rahmoune Hassan et al. "Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes* 54.12 (2005): 3427-3434.
171. Piro Salvatore et al. "Chronic Exposure to GLP-1 Increases GLP-1 Synthesis and Release in a Pancreatic Alpha Cell Line (α -TC1): Evidence of a Direct Effect of GLP-1 on Pancreatic Alpha Cells." *PloS one* 9.2 (2014): e90093.
172. Chen Xiaoping et al. "Isosteviol has beneficial effects on palmitate-induced α -cell dysfunction and gene expression." *PloS one* 7.3 (2012): e34361.
173. Shen Xiao-xia et al. "Glucotoxicity and α Cell Dysfunction: Involvement of the PI3K/Akt Pathway in Glucose-Induced Insulin Resistance in Rat Islets and Clonal α TC1-6 Cells." *Endocrine research* 37.1 (2012): 12-24.
174. Yamaguchi Koji et al. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effect of a sodium-glucose cotransporter inhibitor, phlorizin, on renal glucose transport in rats." *Drug Metabolism and Disposition* 39.10 (2011): 1801-1807.
175. Blodgett Amy B. et al. "A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells." *Diabetes technology & therapeutics* 13.7 (2011): 743-751.

176. Hirose Masamichi et al. "Phlorizin Prevents Electrically-Induced Ventricular Tachyarrhythmia during Ischemia in Langendorff-Perfused Guinea-Pig Hearts." *Biological & pharmaceutical bulletin* 37.7 (2014): 1168-1176.
177. Liu Yuanbin and David Schubert. "Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis." *Journal of neurochemistry* 69.6 (1997): 2285-2293.
178. Liu Yuanbin et al. "Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *Journal of neurochemistry* 69.2 (1997): 581-593.
179. Berridge Michael V. and An S. Tan. "Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Archives of biochemistry and biophysics* 303.2 (1993): 474-482.
180. Majno Guido and Isabelle Joris. "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *The American journal of pathology* 146.1 (1995): 3.
181. Matura, Tatsuya. "Oxidized Phosphatidylserine: Production and Bioactivities." *Yonago Acta medica* 57.4 (2014): 119-127.
182. Kuypers Frans A. et al. "Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V." *Blood* 87.3 (1996): 1179-1187.
183. Pigault Claire et al. "Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes." *Journal of molecular biology* 236.1 (1994): 199-208.
184. Trotter Patrick J., Margaret A. Orchard and John H. Walker. "Ca²⁺ concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes." *Biochem. J* 308 (1995): 591-598.
185. Chowdhury Avik Acharya et al. "Synergistic apoptosis of CML cells by buthionine sulfoximine and hydroxychavicol correlates with activation of AIF and GSH-ROS-JNK-ERK-iNOS pathway." *PloS one* 8.9 (2013): e73672.
186. Koopman Werner JH et al. "Simultaneous quantification of oxidative stress and cell spreading using 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorofluorescein." *Cytometry Part A* 69.12 (2006): 1184-1192.
187. Forkink Marleen et al. "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797.6 (2010): 1034-1044.
188. Chomczynski Piotr. "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* 15.3 (1993): 532-4.

189. Chomeczynski Piotr and Nicoletta Sacchi. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Analytical biochemistry* 162.1 (1987): 156-159.
190. Hummon Amanda B. et al. "Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage." *Biotechniques* 42.4 (2007): 467.
191. Wojewoda Christina M. et al. "Comparison of Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 (CAP/CTM v2. 0) with other real-time PCR assays in HIV-1 monitoring and follow-up of low-level viral loads." *Journal of virological methods* 187.1 (2013): 1-5.
192. Mullis Kary B. "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Scientific American* 262.4 (1990): 56-61.
193. Tajadini, Mohamadhasan, Mojtaba Panjehpour and Shaghayegh Haghjooy Javanmard. "Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes." *Advanced biomedical research* 3 (2014).
194. Jensen Ellen C. "Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA: Use, Limitations, and Presentation of Results." *The Anatomical Record* 295.1 (2012): 1-3.
195. Bustin Stephen A. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *Journal of molecular endocrinology* 25.2 (2000): 169-193.
196. Livak Kenneth J. and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.
197. Bradford Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1 (1976): 248-254.
198. Lucarini A.C. and B.V. Kilikian. "Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances." *Biotechnology techniques* 13.2 (1999): 149-154.
199. Mahmood Tahrin and Ping-Chang Yang. "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." *North American journal of medical sciences* 4.9 (2012): 429
200. Electrophoresis, B. "western blotting-a beginner's guide."
201. Gan Stephanie D. and Kruti R. Patel. "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay." *Journal of Investigative Dermatology* 133.9 (2013): e12.
202. Heller R. Scott and Gregory W. Aponte. "Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 269.6 (1995): G852-G860.

203. Ashcroft Frances M. and Patrik Rorsman. "Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years." *Cell* 148.6 (2012): 1160-1171.
204. Unger RogerH and Lelio Orci. "The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus." *The Lancet* 305.7897 (1975): 14-16.
205. Drucker Daniel J. et al. "Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits." *Diabetes care* 33.2 (2010): 428-433.
206. Baggio Laurie L. and Daniel J. Drucker. "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132.6 (2007): 2131-2157.
207. Ahrén Bo. "GLP-1-based therapy of type 2 diabetes: GLP-1 mimetics and DPP-IV inhibitors." *Current diabetes reports* 7.5 (2007): 340-347.
208. Tucker J. Devin, Savita Dhanvantari and Patricia L. Brubaker. "Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines." *Regulatory peptides* 62.1 (1996): 29-35.
209. Marchetti P. et al. "A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets." *Diabetologia* 55.12 (2012): 3262-3272.
210. Kaiser N., Gil Leibowitz and Rafael Nesher. "Glucotoxicity and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus." *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 16.1 (2003): 5-22.
211. Poitout Vincent and R. Paul Robertson. "Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* 143.2 (2002): 339-342.
212. Gribble Fiona M. et al. "A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line." *Diabetes* 52.5 (2003): 1147-1154.
213. Parker H.E. et al. "Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion." *Diabetologia* 55.9 (2012): 2445-2455.
214. Gorboulev Valentin et al. " Na^+ -D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion." *Diabetes* 61.1 (2012): 187-196.
215. Powell David R. et al. "LX4211 Increases Serum Glucagon-Like Peptide 1 and Peptide YY Levels by Reducing Sodium/Glucose Cotransporter 1 (SGLT1)-Mediated Absorption of Intestinal Glucose." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 345.2 (2013): 250-259.
216. Powell David R. et al. "Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 304.2 (2013): E117-E130.
217. Ikeda Tyson S. et al. "Characterization of a Na^{+} /glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine." *The Journal of membrane biology* 110.1 (1989): 87-95.

- 218.** Rossetti Luciano et al. "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats." *Journal of Clinical Investigation* 79.5 (1987): 1510.