



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**STUDIO DELL'EFFETTO DELLE CITOCHINE
E DELLA METFORMINA
SULL'ACETILAZIONE DELLE PROTEINE
IN ISOLE PANCREATICHE UMANE**

Relatore:

Prof. Gino Giannaccini
Prof. Antonio Lucacchini

Candidata:

Beatrice Fenili

Correlatore:

Dott.ssa Laura Giusti

Anno Accademico 2015/2016

CAPITOLO 1. – INTRODUZIONE	3
1.1 IL DIABETE MELLITO	3
1.1.1 Il pancreas.....	3
1.1.2 Il pancreas esocrino	4
1.1.3 Il pancreas endocrino	6
1.1.4 L’insulina nella regolazione dell’omeostasi glucidica.....	9
1.1.5 GSIS – Glucose-Stimulated Insuline Secretion	13
1.1.6 Le incretine	14
1.1.7 Classificazione del DM	15
1.1.8 Epidemiologia del DM	16
1.1.9 Diagnosi del DM.....	16
1.1.10 Patogenesi del DMT2	18
1.1.11 Sintomi e complicanze del DMT2	20
1.2 LA TERAPIA DEL DMT2	25
1.2.1 Terapia medica nutrizionale	25
1.2.2 Terapia farmacologica.....	26
1.2.3 Terapia insulinica	29
1.3 INFIAMMAZIONE E DIABETE	30
1.3.1 La sindrome metabolica	30
1.3.2 L’obesità.....	33
1.3.3 Il ruolo delle citochine nell’infiammazione legata ad obesità e DMT2	34
1.4 DMT2 E DANNO MITOCONDRIALE	44
1.4.1 Il diabete mitocondriale.....	44
1.4.2 Meccanismi di resistenza insulinica	45
1.4.3 Meccanismi di glucotossicità e lipotossicità	47
1.5.1 Proteomica	53
1.5.2 L’elettroforesi bidimensionale (2-DE).....	54
1.5.3 La spettrometria di massa (MS)	55
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI	57
CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI	58

3.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONI.....	58
3.2 IL CAMPIONE	58
3.2.1 Preparazione del campione	59
3.2.2 Dosaggio proteico RC-DC Biorad	60
3.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	63
3.3.1 Reidratazione delle strip.....	63
3.3.2 Prima dimensione – isoelettrofocalizzazione (IEF).....	63
3.3.3 Equilibratura delle strip.....	64
3.3.4 Preparazione dei gel.....	65
3.3.5 Seconda dimensione – SDS-PAGE	66
3.4 WESTERN BLOT (WB).....	66
3.4.1 Elettroblot su membrana di nitrocellulosa	66
3.4.2 Colorazione con rutenio	67
3.4.3 Fase di blocking.....	67
3.4.4 Anticorpi	68
3.4.5 Rivelazione enzimatica delle proteine di interesse.....	68
3.5 ACQUISIZIONE E ANALISI DELLE MEMBRANE DI NITROCELLULOSA.....	69
CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE	70
4.1 RISULTATI	70
4.1.1 Determinazione dell’acetilazione di isole pancreatiche umane tramite analisi bidimensionale e western blot.	70
4.1.2 Trattamento delle isole con citochine e protezione con metformina.	71
4.1.3 Analisi comparativa dei profili bidimensionali delle proteine acetilate prima e dopo trattamento e protezione.	72
4.2 DISCUSSIONE	74
BIBLIOGRAFIA	77

CAPITOLO 1. – INTRODUZIONE

1.1 IL DIABETE MELLITO

Il *diabete mellito* (DM) è una patologia che comprende un gruppo di disturbi metabolici che condividono il fenotipo dell'iperglicemia, dovuta a deficit nella secrezione insulinica, insulino-resistenza, o a entrambi. ⁽¹⁾

Alla base del DM non si riconosce una causa principale e specifica, ma l'insorgere della malattia deriva da una complessa interazione di fattori genetici, ambientali e comportamentali.

L'alterazione metabolica associata al DM causa modificazioni fisiopatologiche secondarie in molteplici apparati, che impongono un enorme peso sull'individuo affetto dalla patologia e sul sistema sanitario. ⁽²⁾

1.1.1 Il pancreas

Il pancreas [Figura 1] è una ghiandola voluminosa di colore rosa-grigiastro situata nella parte superiore dell'addome, in prossimità dell'ansa duodenale.

È strutturalmente costituito da due ghiandole compenstrate fra di loro, che presentano due funzioni distinte:

- *Funzione esocrina*: impegna circa l'80% del parenchima ed è finalizzata alla produzione del succo pancreatico, un secreto alcalino che contiene numerosi enzimi coinvolti nei processi digestivi.
- *Funzione endocrina*: impegna circa il 20% del parenchima e si occupa della produzione di ormoni, principalmente insulina e glucagone, deputati al controllo dell'omeostasi glicemica.

Il pancreas è situato davanti alla colonna vertebrale, all'altezza della I e della II vertebra lombare, e prende rapporto anteriormente con lo stomaco, a sinistra con la milza e a destra con il duodeno.

Nonostante la sua forma particolarmente irregolare, vi si distinguono abitualmente tre porzioni: una testa, un corpo ed una coda. La testa ed il corpo sono separate da una parte ristretta detta collo, o istmo.

La *testa* del pancreas corrisponde all'estremità destra dell'organo e si inserisce nella concavità dell'ansa duodenale, con la quale contrae intimi rapporti. La faccia anteriore della testa del pancreas è rivestita dal peritoneo e risulta incrociata dalla linea d'inserzione del mesocolon trasverso; su di essa transitano le vene provenienti dalla parte destra del colon trasverso e dalla fessura colica destra, che si uniscono alle vene pancreaticoduodenali e alla vena gastroepiploica destra, tributarie della vena mesenterica superiore.

La faccia posteriore della testa del pancreas è in rapporto con il coledoco e con un considerevole numero di vasi, che formano il piano vascolare retroviscerale. Questo comprende due organizzazioni vascolari: una superficiale, detta piano portale, ed una profonda, appartenente al sistema della vena cava inferiore.

Il *corpo* del pancreas ha una forma triangolare e si trova a ridosso della colonna vertebrale (I e II vertebra lombare).

La faccia anteriore del corpo del pancreas è rivestita dal peritoneo parietale posteriore, che forma la parete posteriore della borsa omentale, la quale media il rapporto con la parte posteriore dello stomaco.

La faccia posteriore è invece ricoperta dalla fascia di Treitz e contrae rapporto con numerosi vasi, fra cui i vasi lienali, la parte finale della vena mesenterica inferiore, l'aorta, i vasi mesenterici superiori e la vena renale sinistra. In più, questa porzione è in rapporto con il pilastro sinistro del diaframma, con il corpo surrenale sinistro e con il rene sinistro.

Infine la *coda*, variabile per forma ed estensione, rappresenta l'estremità sinistra del pancreas ed è addossata alla faccia interna della milza, talvolta in contatto diretto, talvolta separata da essa per mezzo di un intervallo che varia da 1 a 4 cm, rappresentato dal legamento pancreatico-lienale. ⁽³⁾

1.1.2 Il pancreas esocrino

Il volume maggiore del pancreas è rappresentato dalla porzione del *pancreas esocrino*, o *pancreas propriamente detto*.

Si tratta di una ghiandola tubulo-acinosa composta a secrezione sierosa, che ha la funzione di produrre un secreto, il succo pancreatico, necessario al corretto svolgimento di alcuni processi digestivi.

Il succo pancreatico presenta una componente fluida ed una componente proteica; si presenta infatti come una soluzione acquosa ricca di elettroliti e di numerosi enzimi digestivi.

Il pancreas esocrino è interamente rivestito da una capsula di natura connettivale che sprofonda nel parenchima sottostante e delimita i lobuli pancreatici. Nei setti che delimitano i lobuli transitano i vasi sanguigni e linfatici, ed i nervi.

Ciascun lobulo pancreatico è composto da centinaia raggruppamenti cellulari sferici detti acini pancreatici, che rappresentano le unità secernenti della ghiandola. Nel lobulo si individuano principalmente due tipi di cellule:

1. *Cellule acinose*: rappresentano circa l'80% della ghiandola ed hanno la funzione di sintetizzare la componente proteica del succo pancreatico;
2. *Cellule duttali*: rappresentano circa il 10% della ghiandola e sono deputate alla secrezione di soluzioni ricche di bicarbonati.

Gli *acini* sono composti da una sola fila di cellule, dette cellule acinose o zimogeniche, che poggiano su una lamina basale e sono responsabili della produzione della composizione proteica del succo gastrico. Esso infatti contiene un cocktail di numerosi proenzimi in forma inattiva, fondamentali per la digestione degli alimenti.

Fra gli enzimi, si ritrovano:

- *Lipasi*: necessarie alla digestione dei lipidi;
- *Amilasi*: necessarie alla digestione degli amidi;
- *Tripsina e chimotripsina*: proteasi necessarie alla digestione delle proteine; esse vengono prodotte dal pancreas come precursori inattivi, il tripsinogeno e chimotripsinogeno, che si attivano nel duodeno ad opera rispettivamente dell'enterochinasi batterica (enzima prodotto dalla mucosa intestinale) e dalla tripsina stessa;

- *Elastasi*: un altro tipo di proteasi;
- *Nucleasi, ribonucleasi, desossiribonucleasi*.

Le *cellule duttali* invece hanno la funzione di scernere soluzioni ricche di bicarbonati, che grazie al loro carattere nettamente alcalino concorrono alla neutralizzazione dell'acidità del succo gastrico.

Il succo pancreatico viene raccolto in piccoli canali, i dotti intercalari, che si continuano nei dotti intralobulari, i quali a loro volta confluiscono nei dotti interlobulari, per finire nei due grandi dotti pancreatici: il dotto pancreatico principale e il dotto pancreatico accessorio.

Il *dotto pancreatico principale* o di *Wirsung* percorre il pancreas dalla coda alla testa, decorrendo lungo l'asse maggiore dell'organo. Incontrata la porzione intrapancreatica del coledoco, si accolla al dotto per aprirsi con esso nella papilla duodenale maggiore presente nella seconda porzione del duodeno. Nella sua porzione terminale, il dotto pancreatico principale presenta uno sfintere che ha la funzione di rendere intermittente l'emissione del succo pancreatico e di impedire al contenuto dell'intestino di risalire nel pancreas.

Il *dotto pancreatico accessorio* o di *Santorini* è posto nella parte superiore della testa del pancreas ed origina dal dotto principale. Esso attraversa orizzontalmente la testa del pancreas e sbocca nel duodeno a livello della papilla duodenale minore, la quale si trova circa 2-3 cm al di sopra della papilla duodenale maggiore. ⁽⁴⁾

1.1.3 Il pancreas endocrino

La porzione endocrina del pancreas è costituita da circa 1-2 milioni di ammassi di cellule di forma rotondeggiante od ovale, che prendono il nome di *isole di Langerhans*.

Le isole di Langerhans sono disseminate in tutta la porzione esocrina del pancreas, ma sono particolarmente abbondanti a livello della coda. Sono separate dal tessuto acinoso circostante mediante un sottile strato connettivale.

Le cellule delle isole di Langerhans sono disposte in cordoni separati da un fitto intreccio di vasi capillari fenestrati, in cui riversano il loro secreto. Possiedono inoltre una ricca innervazione.

All'interno delle isole di Langerhans sono stati individuati diversi tipi di cellule, ciascuno dei quali è responsabile della sintesi e secrezione di un ormone peptidico:

- *Cellule α* : rappresentano circa il 20% delle cellule delle isole di Langerhans. Hanno la funzione di produrre e secernere il glucagone, un ormone polipeptidico che produce modificazioni fisiologiche nell'organismo volte ad elevare il livello di glicemia.
- *Cellule β* : sono le più numerose e rappresentano circa il 75-80% del totale. Contengono granuli di insulina variamente complessata con zinco. Tale ormone agisce in contrapposizione al glucagone, promuovendo l'utilizzazione del glucosio da parte dei tessuti periferici e portando dunque all'abbassamento dei livelli di glicemia.

Oltre a produrre insulina, è stato osservato che questo tipo di cellule è in grado di sintetizzare acido gamma-amminobutirrico (GABA), neurotrasmettitore a funzione inibitoria.

- *Cellule δ* : rappresentano circa il 5% delle cellule delle isole di Langerhans e producono somatostatina, un ormone a funzione paracrina ad azione inibitoria sugli altri due tipi cellulari.
- *Cellule F*: più rare, producono il polipeptide pancreatico (PP). Nel pancreas la secrezione di PP è controllata prevalentemente dal sistema parasimpatico ed inibita dalla somatostatina.

Le funzioni fisiologiche di questo ormone riguardano la modulazione del metabolismo energetico.

All'interno dell'isola di Langerhans, i diversi tipi cellulari hanno una disposizione particolare: le cellule β occupano il centro dell'isola e sono circondate da cellule α . Le cellule δ e le cellule F tendono a disporsi all'esterno dell'isola.

Le cellule β sono in stretto contatto tra di loro e con gli altri tipi di cellule tramite giunzioni comunicanti e giunzioni strette, per permettere un efficiente controllo di

tipo paracrino e la coordinazione delle differenti funzioni secretorie. Inoltre, tutte le cellule poggiano su una lamina basale a diretto contatto con i capillari.

Le isole di Langerhans presentano una vascolarizzazione a flusso centrifugo, che va dal centro alla periferia dell'isola. Questo fa sì che il sangue che entra all'interno di ogni isola raggiunga le cellule secondo un ordine ben preciso, che dipende anche dalla distribuzione reciproca dei diversi tipi cellulari. In particolare, il sangue passa, in ordine, dalle cellule β , quindi dalle cellule α , poi dalle cellule δ ed F. Ne deriva che alle cellule "non- β " arriva un'elevata quantità di insulina e GABA, importanti regolatori intransulari per quanto riguarda la produzione di glucagone e somatostatina.

Le isole di Langerhans sono diffusamente innervate da fibre ortosimpatiche, parasimpatiche e sensoriali.

Il sistema nervoso autonomo controlla in modo differente la stimolazione di insulina e glucagone.

La stimolazione da parte del sistema nervoso parasimpatico determina un aumento della secrezione sia di insulina sia di glucagone.

La stimolazione da parte del sistema nervoso simpatico invece porta ad un aumento della secrezione di glucagone e ad una diminuzione della secrezione di insulina. ⁽⁵⁾

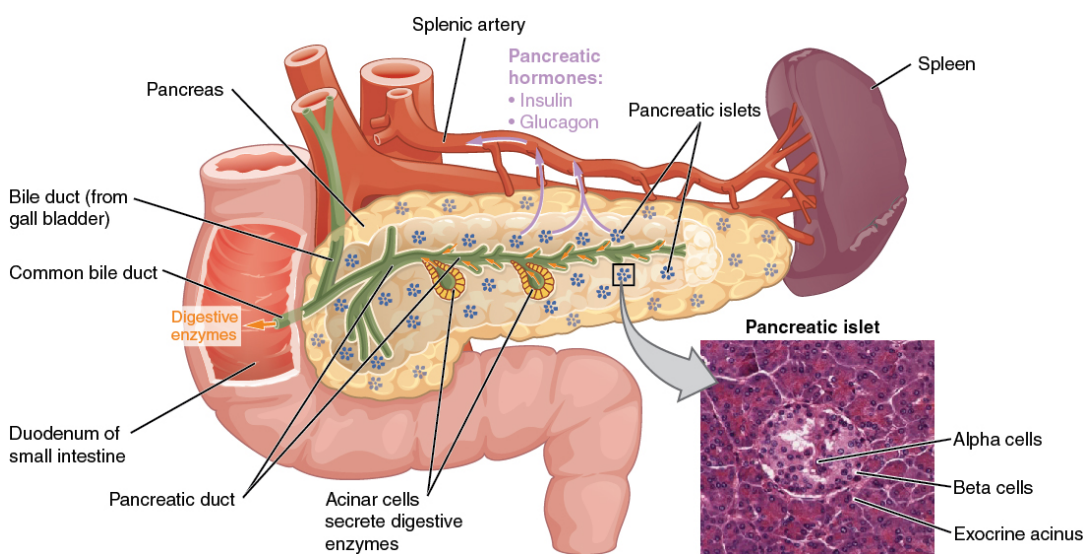


Figura 1

1.1.4 L'insulina nella regolazione dell'omeostasi glucidica

L'omeostasi glucidica riflette un equilibrio tra la produzione epatica di glucosio e la sua utilizzazione da parte dei tessuti periferici.

Insulina e glucagone sono i principali ormoni coinvolti nella regolazione di questo equilibrio metabolico. La loro azione, integrata con altri segnali ormonali e nervosi del tratto gastro-intestinale, delle ghiandole surrenaliche e del sistema nervoso centrale, ha come scopo finale il controllo dei livelli di glucosio nel sangue.

L'*insulina* è un ormone proteico codificato da un unico gene, che si trova a livello del braccio corto del cromosoma 11.

Essa ha un peso di 6 kDa ed è costituita da due subunità lineari: una catena A di 21 amminoacidi ed una catena B di 30 amminoacidi.

Il legame fra le due catene e la conformazione tridimensionale della proteina sono garantiti dalla presenza di tre ponti disolfuro: un ponte disolfuro unisce le cisteine A7-B7, il secondo unisce le cisteine A20-B19, mentre il terzo legame è interno alla catena A ed unisce le cisteine in posizione 6 e 11.

L'insulina viene biosintetizzata all'interno del reticolo endoplasmatico rugoso come pre-proforma a singola catena, per poi essere trasformata in insulina matura al momento del passaggio dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi e alle vescicole di secrezione.

La prima tappa della biosintesi dell'insulina matura a partire dalle molecole nascenti di pre-proinsulina è rappresentata dal taglio del peptide di segnale, che trasforma la molecola in proinsulina. La sequenza della proinsulina è costituita dalle catene A e B separate da una sequenza amminoacidica detta "peptide C", o di connessione.

Dopo il distacco del peptide di segnale, la molecola si ripiega su se stessa, in modo che le catene A e B si ritrovino vicine nello spazio e possano formare i ponti disolfuro. A questo punto, le molecole di proinsulina si ancorano a siti di legame sulla membrana del reticolo endoplasmatico e vengono trasportate nell'apparato del Golgi, insieme agli enzimi proteolitici. Qui, la proinsulina si raccoglie in zone specifiche della membrana, da cui originano le vescicole di secrezione.

Le vescicole che si staccano dall'apparato di Golgi, dette anche granuli secretori, vengono rivestite esternamente di clatrina, una proteina che consente l'interazione della vescicola con il sistema dei microtubuli; essa permette dunque il movimento del granulo dal citoplasma verso la membrana plasmatica, in una zona detta "pool a rilascio rapido", per un pronto rilascio per esocitosi.

Poiché la conversione della proinsulina in insulina matura avviene all'interno dei granuli, a questo livello sono presenti anche alcuni enzimi, appartenenti alla classe delle endo- ed eso-peptidasi, che hanno la funzione di tagliare il peptide C dalla proinsulina e formare l'ormone maturo.

Durante la permanenza dei granuli nel citoplasma, si ha l'acidificazione del loro contenuto mediante pompe idrogenioniche poste sulla membrana dello stesso; il pH acido mantiene l'insulina in soluzione, attiva le proteasi e fa sì che l'insulina precipiti in unità esameriche coordinate con due ioni zinco.

Durante il processo di esocitosi si avrà dunque la liberazione, oltre che di insulina matura, anche del peptide C, degli ioni zinco e di una piccola quota di proinsulina.

I principali modulatori della secrezione insulinica agiscono grazie all'interazione con specifici recettori presenti sulla membrana delle cellule β delle isole di Langerhans.

Inoltre, sono presenti strutture che agiscono da sensori e sono in grado di misurare i livelli circolanti di glucosio, di alcuni amminoacidi e di acidi grassi, e di controllare la secrezione ormonale.

Tra i principali stimolatori della secrezione insulinica ritroviamo:

- *Glucosio*: la quantità di glucosio presente in circolo a seguito di un pasto rappresenta il principale stimolo per la secrezione insulinica.
- *Amminoacidi*: hanno azione sinergica con il glucosio.
- *Acetilcolina*: agisce attraverso l'interazione con recettori muscarinici.
- *Catecolamine*: agiscono tramite l'attivazione di recettori β -adrenergici, accoppiati a proteine G stimolatorie.
- *Glucagone*: agisce tramite l'interazione con un recettore accoppiato a proteine G stimolatorie.

Tra i principali inibitori della secrezione insulinica si hanno:

- *Somatostatina*: agisce tramite l'interazione con recettori accoppiati a proteine G inibitorie.
- *Catecolamine*: agiscono tramite l'attivazione di recettori α_2 -adrenergici accoppiati a proteine G inibitorie.
- *Diminuzione della glicemia*: sia per azione diretta, sia per attivazione della secrezione di ormoni iperglicemizzanti.
- *Digiuno / esercizio fisico*: azione mediata dalla diminuzione della glicemia.

Il punto comunque di tutte le vie di trasduzione del segnale che stimolano o inibiscono la secrezione insulinica è, rispettivamente, l'aumento o la diminuzione della concentrazione di calcio intracellulare.

Elevati livelli di calcio intracellulare stimolano il movimento dei granuli secretori lungo i microtubuli, verso la membrana cellulare. A questo livello i granuli vanno a legarsi a proteine di ancoraggio che ne facilitano la fusione con la membrana plasmatica e permettono la liberazione del loro contenuto nel torrente circolatorio. Una volta liberate, le unità esameriche di insulina si dissociano rapidamente e determinano un aumento dell'insulinemia.

Una volta che l'insulina è stata secreta nel sistema venoso portale, circa il 50% è rimosso e degradato dal fegato. L'insulina rimanente entra nel circolo sistemico e per esercitare la sua azione deve necessariamente interagire con il proprio recettore, presente sulla membrana cellulare di tutti gli organi bersaglio.

Il *recettore dell'insulina* è una glicoproteina transmembranaria appartenente alla famiglia dei recettori ad attività chinasi.

Esso è costituito da quattro subunità legate fra loro da ponti disolfuro: due subunità α e due subunità β .

Le due subunità α sono extracellulari e contengono il sito di legame per l'ormone, mentre le due subunità β attraversano la membrana cellulare e presentano una porzione intracellulare dotata di una elevata densità di tirosine.

Il legame dell'insulina al recettore ne induce un cambiamento conformazionale che provoca lo smascheramento dei siti di legame per l'ATP sulle subunità β e la successiva autofosforilazione dei residui di tirosina presenti a questi livelli.

Questo evento innesca la trasduzione intracellulare del segnale che porta ai numerosi effetti metabolici e mitogenici propri dell'insulina.

Una delle vie di trasduzione del segnale implica l'attivazione della fosfatidilinositolo-3'-chinasi (PI-3 chinasi) che, mediante la fosforilazione della proteina chinasi Akt, stimola la traslocazione dei trasportatori del glucosio (come GLUT4) verso la superficie cellulare, un evento cruciale per l'utilizzo del glucosio da parte dei muscoli scheletrici e del tessuto adiposo.

L'attivazione di altre vie di trasduzione del segnale induce la glicogenosintesi, la sintesi proteica, la lipogenesi. ⁽⁶⁾

L'effetto fisiologico principale dell'insulina è quello di promuovere l'utilizzo di glucosio, amminoacidi ed acidi grassi. Ha dunque un potente effetto anabolizzante, facilitando sia l'ingresso dei nutrienti all'interno degli organi bersaglio, sia il loro deposito all'interno di essi.

L'insulina agisce principalmente su tre tessuti bersaglio, i quali risultano coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi glicemica.

Essi sono: il fegato, il muscolo e il tessuto adiposo.

- Il *fegato*: a livello epatico lo stimolo insulinico promuove il processo di glicogeno sintesi. Una volta che i depositi epatici di glicogeno sono ricostituiti, l'eccesso di glucosio viene utilizzato per la sintesi di trigliceridi. Parallelamente, l'elevato rapporto insulina/glucagone inibisce le vie della glicogenolisi e della gluconeogenesi, promuovendo un effetto anti-chetogenico, e inibisce la lipolisi.
- Il *muscolo scheletrico*: il muscolo scheletrico rappresenta il tessuto più sensibile all'insulina.

L'insulina stimola la captazione di glucosio da parte del muscolo scheletrico aumentando la traslocazione dei trasportatori GLUT4 preesistenti nelle membrane cellulari di questo tessuto. Il glucosio viene poi utilizzato per

ricostituire i depositi di glicogeno oppure avviato alla via glicolitica per la produzione di energia.

Parallelamente viene inibita la glicogenolisi.

Infine, l'insulina a livello muscolare promuove la sintesi proteica e ne inibisce il catabolismo.

- Il *tessuto adiposo*: l'effetto dell'insulina sul tessuto adiposo promuove il deposito degli acidi grassi liberi sotto forma di trigliceridi. Allo stesso tempo blocca la lipolisi dei trigliceridi esterificati. ⁽⁷⁾

1.1.5 GSIS – Glucose-Stimulated Insuline Secretion

Il glucosio rappresenta il principale stimolo alla secrezione insulinica; si parla infatti di Glucose-Stimulates Insuline Secretion (GSIS).

La stretta relazione fra i livelli glicemici e la risposta insulinica è resa possibile dalla presenza di meccanismi, all'interno delle cellule β , che accoppiano il metabolismo cellulare del glucosio all'apertura di canali voltaggio-dipendenti per il calcio. [vedi Figura 2]

Il glucosio in circolo entra nella cellula β per diffusione facilitata, ad opera di specifici trasportatori, in particolare GLUT1 e GLUT2, e dopo la sua conversione a glucosio-6-fosfato da parte della glucochinasi [1], viene avviato alla glicolisi. La glucochinasi serve dunque da "sensore del glucosio" all'interno delle cellule β .

L'ossidazione del glucosio e l'attivazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale [2] determinano un rapido aumento dei livelli di ATP intracellulari e incrementano il rapporto ADP/ATP; l'ATP va ad interagire con i canali del potassio ATP-dipendenti (K_{ATP}) e ne determina la chiusura [3].

Il blocco dell'uscita del potassio causa la depolarizzazione della cellula e ciò porta all'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti [4]; l'ingresso di calcio, oltre a depolarizzare ulteriormente la cellula, attiva il movimento dei granuli lungo i microtubuli e determina la secrezione insulinica [5].

Oltre al glucosio, anche gli amminoacidi e gli acidi grassi possono essere convertiti in intermedi della glicolisi e far aumentare i livelli di ATP intracellulari, dunque hanno anch'essi un ruolo nello stimolo della secrezione insulinica [6].

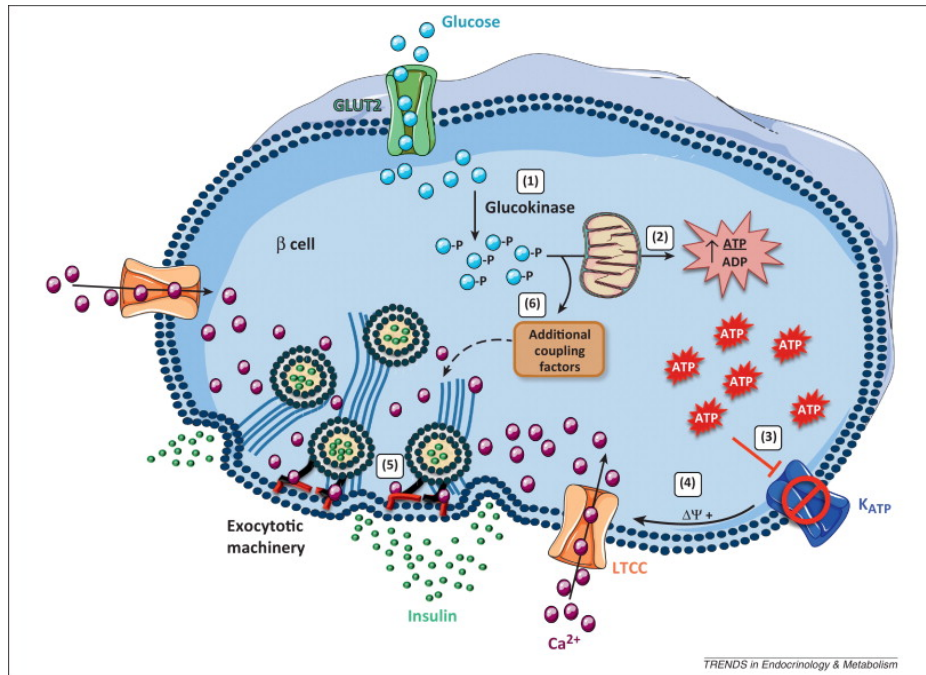


Figura 2

Recentemente è stato osservato che la secrezione bifasica di insulina dopo un pasto coinvolge anche un meccanismo di secrezione indipendente dalla chiusura dei canali K_{ATP}. Studi condotti su cellule β-pancreatiche trattate con diazossido (attivatore dei canali K_{ATP}) hanno dimostrato che il glucosio è in grado di esercitare un'azione diretta sulla secrezione insulinica, anche a basse concentrazioni, non necessariamente mediata dall'interazione con i canali K_{ATP}, ma comunque dipendente dall'aumento di Ca⁺⁺ intracellulare e dal metabolismo mitocondriale. Il meccanismo tuttavia non è ancora del tutto chiarito. (8) (9) (10) (11)

1.1.6 Le incretine

Fra gli ormoni che controllano la secrezione insulinica vi sono anche le *incretine*, rappresentate da due molecole principali: il peptide insulinotropico dipendente dal glucosio (*Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide* - GIP) ed il peptide 1 simile al glucagone (*Glucagon-Like Peptide 1* – GLP-1).

Si tratta di ormoni prodotti da cellule endocrine del tratto gastroenterico, in risposta alla presenza di glucidi o amminoacidi nel lume intestinale.

Una volta in circolo, GIP e GLP-1 mediano il cosiddetto “effetto incretinico”, ossia stimolano la secrezione insulinica ancor prima che i nutrienti siano completamente assorbiti e che i livelli glicemici si siano effettivamente innalzati.

In particolare, GLP-1 ha potenti effetti sulla GSIS, sull'espressione del gene dell'insulina, sulla crescita e differenziazione delle cellule β . È stato osservato che a seguito di infusione di glucosio GLP-1 stimola la secrezione insulinica e la responsività delle cellule β pancreatiche in modo dose-dipendente. ⁽¹²⁾⁽¹³⁾

1.1.7 Classificazione del DM

La classificazione più moderna del DM distingue i vari tipi di diabete in base ai processi patogenetici che ne stanno alla base, i quali differiscono ampiamente.

Le due principali categorie del DM sono:

- *Diabete mellito di tipo 1 (DMT1)*: origina dalla distruzione autoimmune delle cellule β delle isole di Langerhans, che conduce a deficit insulinico.
- *Diabete mellito di tipo 2 (DMT2)*: è descritto come un gruppo eterogeneo di disordini, solitamente caratterizzato da gradi variabili di insulino-resistenza, alterata secrezione insulinica e aumentata produzione di glucosio. ⁽¹⁴⁾

Esistono poi altre forme di diabete:

- *Diabete autoimmune a lenta evoluzione* (latent autoimmune diabetes of the adult – LADA): è una forma di diabete su base autoimmunitaria a lenta evoluzione verso l'insulino-dipendenza. Si tratta di un sottotipo di DMT1.
- *Diabete giovanile a insorgenza nell'età matura* (maturity onset diabetes of the young – MODY): è un sottotipo di DMT2 caratterizzato da ereditarietà autosomica dominante, insorgenza precoce dell'iperinsulinemia (di solito entro i 25 anni di età) e alterazione della secrezione insulinica. Sono state evidenziate mutazioni a livello di 6 loci, su differenti cromosomi; la forma più comune di diabete MODY si associa a mutazioni sul cromosoma 12, che prevede l'alterazione di un fattore di trascrizione nucleare epatico, il HNF-1 α . Una seconda forma di diabete MODY è dovuta a mutazioni a livello del gene della glucochinasi, localizzato sul cromosoma 7, che porta

ad una riduzione dei livelli di tale enzima. Infine, le forme meno comuni prevedono mutazioni a carico di altri fattori di trascrizione, quali HNF-4 α , HNF-1 β , insulin promoter factor IPF-1, e NeuroD1.

- *Diabete mellito gestazionale (DMG)*: è invece caratterizzato da una ridotta tolleranza glucidica che si può sviluppare durante la gravidanza. La resistenza insulinica correlata alle alterazioni metaboliche dell'ultimo periodo della gravidanza aumenta le richieste di insulina e può condurre a iperglicemia o alterata tolleranza glucidica. La maggior parte delle donne recupera la normale tolleranza glucidica dopo il parto, ma è conservata un rischio considerevole (30-60%) di sviluppare DM successivamente. ⁽¹⁵⁾

1.1.8 Epidemiologia del DM

La prevalenza del DM in tutto il mondo è aumentata drammaticamente negli ultimi decenni.

Si stima che il numero di soggetti affetti da DM continuerà ad aumentare anche nel futuro prossimo, considerando che siamo passati da circa 30 milioni di casi nel 1985 a 382 milioni nel 2013 (IDF Diabetes Atlas, the International Diabetes Federation, 2013).

Secondo la Federazione Internazionale del Diabete (IDF) i soggetti affetti da diabete nel 2015 sono in totale 415 milioni e saliranno a 642 milioni entro il 2040. È stato osservato inoltre che l'incidenza di DMT2 sta subendo un incremento molto più rapido rispetto agli altri tipi di diabete; ciò è dovuto all'aumento consistente dei casi di obesità, alla ridotta attività fisica, all'industrializzazione; inoltre l'incidenza di DMT2 aumenta con l'età: nel 2012, il tasso di persone affette da DM negli Stati Uniti era dello 0,2% per individui sotto i 20 anni di età, e del 12% per individui di più di 20 anni. Considerando la popolazione di età superiore ai 65 anni, il tasso saliva al 26,9%. ⁽¹⁶⁾

1.1.9 Diagnosi del DM

La tolleranza al glucosio può essere valutata in base alla glicemia plasmatica a digiuno (fasting plasma glucose – FPG), alla risposta al test di carico orale con glucosio (OGTT), o alla percentuale di emoglobina glicata (HbA1C).

L'International Expert Committee, con membri designati dell'American Diabetes Association, dalla European Association for the Study of Diabetes e dalla International Diabetes Federation, ha definito criteri diagnostici per il DM basato sulle seguenti premesse, ossia:

1. Il FPG, la risposta ad un carico orale di glucosio e l'HbA1c variano tra i soggetti;
2. Il DM è definito come il livello di glicemia al quale si hanno le manifestazioni cliniche della patologia, e non come l'innalzamento della glicemia rispetto ai valori medi riscontrati nella popolazione normale. ⁽¹⁷⁾

In base ai valori di FPG si può classificare la tolleranza glucidica:

- Una glicemia a digiuno <110 mg/dl è considerata normale;
- Una glicemia a digiuno \geq 110 mg/dl ma <126 mg/dl è definita come *alterata glicemia a digiuno* (impaired fasting glucose – IFG).
- Una glicemia a digiuno \geq 126 mg/dl conferma la diagnosi di DM.

I valori elevati di glucosio possono essere rivelati anche tramite OGTT.

Se dopo due ore da un carico orale di glucosio di 75g la glicemia assume valori superiori a 200 mg/dl si ha la conferma della diagnosi di DM.

Nel caso in cui tali valori siano compresi tra 140-200 mg/dl si parla invece di alterata tolleranza al glucosio (impaired glucose tolerance – IGT).

Nel 2010 l'American Diabetes Association ha introdotto il test dell'*emoglobina glicata* (emoglobina A1C, o HbA1c) per la diagnosi del DM in pazienti asintomatici, identificandolo come uno dei metodi diagnostici più validi.

L'emoglobina glicata viene prodotta da una reazione non enzimatica a seguito dell'esposizione dell'emoglobina normale al glucosio plasmatico; tale reazione è dunque strettamente correlata ai livelli glicemici.

Percentuali di HbA1c comprese fra 5,7-6,4% indicano un'omeostasi anomala del glucosio, mentre percentuali superiori al 6,5% sono sufficienti per la formulazione di diagnosi di DM2.

Dunque per la diagnosi di diabete mellito sono stati scelti i seguenti valori-soglia:

- Un FPG \geq 126 mg/dl;
- Una glicemia, misurata a due ore da un carico orale di glucosio, \geq 200 mg/dl;
- Un'HbA1c \geq 6,5%.

Allo stesso modo una glicemia, rilevata con misurazioni casuali, \geq 200 mg/dl è sufficiente per la diagnosi di DM.

Le condizioni di IFG, FGP e HbA1c compresa fra 5,7-6,4% sono indici di alterata omeostasi del glucosio e descrivono una condizione detta di “pre-diabete”, “incrementato rischio di diabete” (ADA) o “iperglicemia intermedia” (WHO).

Questi gruppi di persone presentano un rischio elevato di sviluppare progressivamente DMT2 ed hanno anche un aumentato rischio di patologia vascolare.

IFG e IGT sono strettamente associate all'obesità, in particolare quella addominale o viscerale, alla dislipidemia e all'ipertensione, oltre che al DMT2. Interventi sullo stile di vita volti ad aumentare la quantità di esercizio fisico giornaliera e alla riduzione del peso corporeo si sono dimostrati efficaci misure preventive per le patologie correlate. ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾

1.1.10 Patogenesi del DMT2

Il DMT2 è un evento patologico eterogeneo ad eziologia complessa e multifattoriale.

La patologia ha una forte componente genetica: individui che hanno un genitore affetto da DMT2 hanno un forte rischio di sviluppare la patologia; se entrambi i genitori sono affetti da DM, il rischio si aggira intorno al 40%.

Tuttavia, a modulare il fenotipo genetico sono numerosi fattori ambientali, comportamentali, sociali. ⁽²⁰⁾

Il DMT2 è caratterizzato da diverse anomalie fisiopatologiche, tra cui: alterata secrezione insulinica, insulino-resistenza periferica ed eccessiva produzione epatica di glucosio.

- La *resistenza insulinica*, sintomo caratteristico del diabete di tipo 2, è caratterizzata da una ridotta capacità dell'insulina di agire efficacemente sui tessuti bersaglio periferici dell'ormone, in particolare su muscolo e fegato. La resistenza all'azione dell'insulina altera l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti insulino-sensibili e aumenta la produzione epatica di glucosio: entrambi gli effetti contribuiscono all'iperglicemia del diabete.

Il preciso meccanismo molecolare che porta all'insulino-resistenza non è ancora stato chiarito del tutto. L'espressione del recettore insulinico e l'attività tirosinchinasica nel muscolo scheletrico appaiono ridotti, ma queste alterazioni sono più probabilmente secondarie all'insulino-resistenza.

Dunque sono stati ipotizzati difetti post-recettoriali, in particolare legati ad un difetto della via di segnale PI-3 chinasi, che determina una ridotta traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4 verso la membrana.

Altre anomalie riguardano l'accumulo di lipidi all'interno dei miociti del tessuto muscolare, che può portare ad alterazioni nel processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale e alla riduzione della produzione di ATP.

L'alterazione dell'ossidazione degli acidi grassi e dei lipidi all'interno delle cellule del muscolo scheletrico può inoltre generare delle ROS, le quali possono recare danno a livello mitocondriale e cellulare. ^{(21) (22) (23)}

- *L'alterata secrezione insulinica* è la conseguenza principale della resistenza insulinica. Nei primi stadi della malattia infatti, i livelli plasmatici di glucosio rimangono normali, perché le cellule β pancreatiche riescono a compensare il fenomeno dell'insulino-resistenza con un aumento della secrezione insulinica.

Col progredire dell'insulino-resistenza e del meccanismo compensatorio, le cellule β pancreatiche diventano incapaci di sostenere lo stato iperinsulinemico. Compare quindi intolleranza glucidica, caratterizzata dall'aumento dei livelli glicemici post-prandiali.

Il diabete conclamato, con iperglicemia anche a digiuno, si ha quando le isole di Langerhans riducono la secrezione di insulina e il fegato incrementa la biosintesi di glucosio.

Le cause del declino della capacità secretiva delle cellule β pancreatiche non sono ancora del tutto note. È stato osservato che il numero di β cellule si dimezza fino al 50% in pazienti affetti per lungo tempo da DMT2.

Inoltre, l'accumulo di polipeptide insulare amiloide, o amilina, co-secreto dalle cellule β , può portare all'accumulo di depositi amiloidi insulari; se questo evento sia primario o secondario non è noto.

Paradossalmente, la condizione di iperglicemia cronica può alterare la funzione delle isole pancreatiche e condurre ad alterazioni nella secrezione insulinica, secondo un meccanismo detto di glucotossicità.

Il concetto di glucotossicità è stato introdotto per la prima volta da Unger e colleghi nel 1985 ed indica il danno potenzialmente irreversibile a carico delle cellule β -pancreatiche causato dall'esposizione cronica a concentrazioni elevate di glucosio.

Allo stesso modo, l'innalzamento dei livelli di acidi grassi liberi (FFA) può determinare lipotossicità a carico delle cellule β pancreatiche. ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾

- *L'aumento della produzione epatica di glucosio* ha origine dal fenomeno della resistenza insulinica, a seguito della quale viene a mancare sul fegato l'azione fisiologica dell'insulina, che promuove l'accumulo di glucosio come glicogeno epatico e sopprime la gluconeogenesi. ⁽²⁶⁾

1.1.11 Sintomi e complicanze del DMT2

I sintomi più comuni del DMT2 sono:

- *Poliuria*: minzione frequente;
- *Polidipsia*: aumento del senso di sete;
- *Polifagia e perdita di peso*: aumento del senso di fame e dimagrimento a causa della mancata azione dell'insulina sui tessuti bersaglio, che provoca l'incapacità nell'utilizzazione dei nutrienti.

Altri sintomi associati ai principali sono:

- *Astenia cronica*;
- *Visione offuscata*;
- *Prurito*;
- *Neuropatia periferica*.⁽²⁷⁾

Le complicanze del DM2 sono notevoli e molto varie, e colpiscono principalmente il sistema cardiovascolare, il rene, il sistema nervoso e l'occhio. Si suddividono in complicanze acute e complicanze croniche.

Fra le *complicanze acute* del DM si riscontrano:

- *Chetoacidosi diabetica (CAD)*: la CAD è il risultato della combinazione di carenza insulinica, relativa o assoluta, ed eccesso di ormoni controregolatori (es. glucagone, catecolamine, cortisolo).

Può colpire sia i soggetti affetti da DM di tipo 1 che di tipo 2.

Il ridotto rapporto insulina/glucagone promuove la gluconeogenesi, la glicogenolisi e la formazione di corpi chetonici nel fegato, oltre ad incrementare il rilascio di nutrienti dal muscolo e dal tessuto adiposo verso il fegato.

La carenza di insulina o la mancanza della sua azione dovuta ad insulino-resistenza periferica spostano il metabolismo verso la produzione di glucosio portano a riduzione dei livelli del trasportatore del glucosio GLUT4, alterando l'utilizzazione del glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo.

La chetosi deriva da un massiccio incremento dei livelli di acidi grassi circolanti, che determina uno spostamento del metabolismo epatico verso la produzione di corpi chetonici.

A pH fisiologico i corpi chetonici sono presenti come chetoacidi e sono neutralizzati dai bicarbonati; quando i depositi di bicarbonati si esauriscono si instaura la condizione di acidosi metabolica.

La CAD è dunque caratterizzata da iperglicemia, chetosi e acidosi metabolica.

- *Stato iperosmolare iperglicemico (SII)*: colpisce prevalentemente i soggetti affetti da DM2.

Il deficit relativo di insulina e l'inadeguato apporto idrico sono le cause principali dello SII.

La carenza insulinica incrementa la produzione epatica di glucosio attraverso la glicogenolisi e la gluconeogenesi, e altera l'utilizzazione del glucosio a livello del muscolo scheletrico.

L'iperglicemia induce una diuresi osmotica che determina una marcata riduzione del volume intravascolare, peggiorata dall'inadeguato apporto di liquidi. ⁽²⁸⁾

Le *complicanze croniche* del DM2 colpiscono molti apparati e sono responsabili della maggior parte della morbilità e della mortalità associate alla patologia.

Il rischio di andare incontro a complicanze croniche aumenta parallelamente alla durata e all'entità dell'esposizione all'iperglicemia.

Il Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) ha provato definitivamente che la riduzione dell'iperglicemia cronica può avere un ruolo preventivo.

I meccanismi alla base delle complicanze di DM dovute all'esposizione cronica all'iperglicemia non sono ancora del tutto noti, ma sono state formulate varie ipotesi.

Un'ipotesi suggerisce che l'aumento dei livelli di glicemia determini l'interazione del glucosio con i gruppi amminici delle proteine, attraverso una reazione di glicosilazione non enzimatica. Questo fenomeno porta alla formazione di prodotti terminali di glicosilazione avanzata, detti AGE (advanced glycosilation end products), i quali sono in grado di formare legami crociati tra proteine. Alcuni AGE sono in grado di interagire con il recettore dei macrofagi e delle cellule endoteliali. I recettori per gli AGE (RAGE) delle cellule endoteliali inducono l'espressione di geni proinfiammatori.

Questo processo porta ad accelerazione dei fenomeni di aterosclerosi, disfunzione glomerulare, disfunzione endoteliale ed alterazione della composizione della matrice extracellulare.

La seconda ipotesi è basata sull'osservazione che l'iperglicemia aumenta il metabolismo glucidico attraverso la via del sorbitolo, ad opera della aldoso reductasi. L'incremento della concentrazione di sorbitolo provoca alterazione dei potenziali redox e produzione di ROS, che provocano stress ossidativo e conseguente danno cellulare.

Una terza ipotesi prende in considerazione il fatto che l'iperglicemia aumenta la formazione di diacilglicerolo (DAG), inducendo l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), la quale potrebbe andare ad alterare la trascrizione di alcuni geni responsabili della corretta funzione endoteliale.

Infine, secondo una quarta ipotesi l'iperglicemia incrementerebbe la via delle esosammine, che genera il fruttosio 6-fosfato. La via delle esosammine può alterare la funzione cellulare attraverso la glicosilazione di alcune proteine (ad es. la NO-sintasi endoteliale) oppure attraverso la modificazione dell'espressione genica di alcuni fattori di crescita, come il fattore β di crescita trasformante (TGF- β) o l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1).

Un possibile meccanismo unificante prende in considerazione la produzione di ROS nei mitocondri, che alterano le quattro vie descritte in precedenza.

Le complicanze croniche possono essere suddivise in complicanze vascolari e non vascolari.

Le complicanze vascolari sono ulteriormente suddivise in microvascolari e macrovascolari.

Le *complicanze microvascolari* comprendono:

- *Malattia oculare*: retinopatia ed edema oculare
- *Neuropatia sensoriale e motoria*
- *Nefropatia*

Le *complicanze macrovascolari* comprendono:

- *Coronaropatia*
- *Arteriopatia periferica*
- *Vasculopatia cerebrale*

Tra le *complicanze non vascolari* si hanno:

- *Complicanze gastrointestinali*: gastroparesi / diarrea
- *Complicanze genitourinarie*: uropatia / disfunzione sessuale
- *Complicanze dermatologiche*
- *Infezioni*
- *Cataratta*
- *Glaucoma*
- *Malattia periodontale*
- *Perdita di udito* ⁽²⁹⁾

1.2 LA TERAPIA DEL DMT2

La cura di un individuo affetto da DMT2 richiede un'equipe multidisciplinare, formata dal medico di base e/o l'endocrinologo o il diabetologo, un educatore specializzato e un nutrizionista. Inoltre, quando insorgono le complicanze del DM è essenziale l'intervento di medici specialisti.

Gli obiettivi della terapia del DM riguardano il controllo e l'eliminazione dei sintomi correlati all'iperglicemia, la riduzione delle complicanze micro- e macro-vascolari associate alla patologia e il raggiungimento di uno stile di vita sano.

1.2.1 Terapia medica nutrizionale

La terapia medica nutrizionale (TMN) rappresenta un momento essenziale nella cura e prevenzione del DM.

Numerosi studi, primo fra tutti il Diabetes Control and Complication Trial (DCCT), hanno dimostrato che, accanto alla terapia farmacologica, un adeguato regime alimentare assume il ruolo di vera e propria terapia e rappresenta uno strumento essenziale per ottenere e mantenere un compenso metabolico ottimale, ridurre il rischio cardiovascolare e prevenire le complicanze macro- e micro-vascolari associate alla patologia.

Il trattamento dell'obesità è di grande importanza in tutta la popolazione ed in particolare in soggetti diabetici, in quanto esiste una correlazione diretta fra l'IMC (Indice di Massa Corporea) e DMT2.

È stato osservato che anche una modesta perdita di peso può produrre un miglioramento dell'insulino-resistenza e una riduzione nell'uso di farmaci ipoglicemizzanti.

L'approccio principale per il calo ponderale consiste nella modificazione dello stile di vita, che include una riduzione dell'apporto calorico (500-1000 Kcal/die in meno) ed un incremento del dispendio energetico.

L'American Diabetes Association (ADA) afferma tuttavia che, mentre l'importanza della perdita di peso è ben documentata, non è altrettanto chiaro quale debba essere la composizione della dieta più efficace per raggiungere tale obiettivo.

La dieta mediterranea appare uno degli approcci più vantaggiosi, in grado di ridurre il tessuto adiposo viscerale sia negli uomini che nelle donne e di influenzare positivamente tutte le componenti della sindrome metabolica e rischi connessi.

Alcuni studi dimostrano che il consumo di alimenti a basso indice glicemico riduce le escursioni del glucosio post-prandiale e migliora il controllo glicemico.

Alla riduzione dell'apporto calorico deve essere associato l'incremento dell'attività fisica. L'esercizio fisico ha molteplici effetti positivi, comprendenti benefici cardiovascolari, riduzione della pressione arteriosa, mantenimento della massa muscolare, riduzione del grasso corporeo.

In particolare, nel soggetto diabetico l'attività fisica ha un ruolo determinante nella riduzione della glicemia e nell'aumento della sensibilità insulinica dei tessuti periferici. ⁽³⁰⁾

1.2.2 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica del DM di tipo 2 si avvale principalmente di farmaci ipoglicemizzanti e solo nei casi più gravi di DM, in cui la funzionalità delle cellule β pancreatiche risulta fortemente compromessa, si fa ricorso alla terapia insulinica.

I farmaci antidiabetici orali si distinguono in varie classi:

- *Biguanidi*: la metformina, maggior rappresentante di questa classe farmacologica, riduce la produzione epatica di glucosio mediante l'attivazione di proteinchinasi AMP dipendenti (AMPK).

Il farmaco è in grado inoltre di ridurre le concentrazioni di glucosio plasmatico a digiuno e ne migliora il suo utilizzo periferico; migliora il profilo lipidico e promuove una modesta perdita di peso.

Il meccanismo d'azione delle biguanidi non dipende dalla funzionalità residua delle cellule β pancreatiche.

Questi farmaci vengono definiti "euglicemizzanti" perché non portano a condizioni di ipoglicemia.

- *Sulfaniluree*: la principale azione delle sulfaniluree è quella di aumentare la secrezione insulinica da parte del pancreas interagendo con i canali K_{ATP} delle cellule β pancreatiche. Il legame del farmaco al canale K_{ATP} inibisce l'uscita dello ione K^+ dalla cellula. La depolarizzazione che ne consegue

porta all'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, determinando l'ingresso di Ca^{++} e la secrezione di insulina preformata.

Tali farmaci hanno effetto solo in presenza di una certa funzionalità residua del pancreas nella produzione insulinica, dunque vengono utilizzati con efficacia soprattutto nelle prime fasi della patologia.

È stato osservato inoltre che la somministrazione cronica di sulfaniluree nel DM di tipo 2 riduce i livelli ematici di glucagone e ciò contribuisce alla loro azione ipoglicemizzante. Il meccanismo alla base di tale effetto non è ancora del tutto chiarito, ma si ipotizza che sia dovuto all'effetto inibitorio paracrino esercitato dall'aumentata secrezione di insulina e somatostatina da parte delle isole di Langerhans.

Le sulfaniluree si distinguono in due classi:

1. Sulfaniluree di prima generazione: tolbutamide, clorpropamide e tolazamide;
 2. Sulfaniluree di seconda generazione: glibenclamide, glipizide, glimepiride.
- *Tiazolidindioni*: questa classe di farmaci, rappresentata principalmente da pioglitazone e rosiglitazone, riducono l'insulinoresistenza legandosi al recettore nucleare γ attivato dal proliferatore perossisomiale (PPAR- γ). I recettori PPAR- γ sono localizzati nel tessuto muscolare, adiposo ed epatico, ed hanno un'azione complessa di modulazione dell'espressione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, nella trasduzione del segnale insulinico e nella differenziazione degli adipociti.

Il maggior sito di azione di questi farmaci è il tessuto adiposo, nel quale promuovono la captazione di glucosio, l'utilizzazione e la modulazione della sintesi di ormoni lipidici, citochine ed altre proteine coinvolte nella modulazione del metabolismo energetico.

I tiazolidindioni promuovono la differenziazione degli adipociti, riducono l'accumulo di grasso epatico e riducono indirettamente la resistenza insulinica aumentando il deposito di acidi grassi e inducendo anche un aumento dei livelli di adiponectina.

Il loro utilizzo è limitato per l'insorgenza di alcuni effetti collaterali, quali aumento di peso, scompenso cardiaco congestizio, aumento del rischio di fratture nelle donne e, per rosiglitazone, un possibile aumento di rischio cardiovascolare (FDA – settembre 2010).

- *Inibitori dell' α -glucosidasi*: acarbosio e miglitolo sono inibitori competitivi delle α -glucosidasi intestinali e riducono l'iperglicemia post-prandiale ritardando la digestione e l'assorbimento di amido e disaccaridi; essi non modificano l'utilizzazione di glucosio né la secrezione insulinica.

Questi farmaci, assunti appena prima di ogni pasto, inibiscono l'enzima responsabile della degradazione degli oligosaccaridi in zuccheri semplici nel lume intestinale.

- *Agonisti del recettore del GLP-1*: nel DMT2 il rilascio di GLP-1 è diminuito dopo i pasti, con conseguente inadeguata soppressione del glucagone ed eccessivo rilascio di glucosio da parte del fegato.

Due analoghi sintetici del GLP-1, exenatide e liraglutide, sono approvati nella terapia del DM per ripristinare la sua attività.

Gli agonisti del recettore del GLP-1 aumentano la secrezione insulinica indotta da glucosio, sopprimono la secrezione di glucagone e rallentano lo svuotamento gastrico.

A causa della natura glucosio-dipendente della secrezione insulinica stimolata dalle incretine gli agenti di questa classe non provocano ipoglicemia. Inoltre, questi farmaci determinano un calo ponderale rilevante, risultando particolarmente utili in pazienti obesi.

- *Inibitori della dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-4)*: Sitagliptin, saxagliptin e linagliptin sono inibitori della DPP-4, l'enzima che degrada le incretine ed altre molecole GLP-1 simili.

Questi farmaci aumentano l'emivita del GLP-1 e del GIP secreti a livello endogeno, riducendo in questo modo le oscillazioni post-prandiali della glicemia, aumentando la secrezione insulinica mediata da glucosio e riducendo la concentrazione di glucagone.

1.2.3 Terapia insulinica

La terapia insulinica è necessaria per un numero significativo di soggetti affetti da DMT2 a causa della natura progressiva della malattia e la relativa carenza insulinica che si sviluppa nei pazienti con diabete di lunga durata.

Le insuline presenti in commercio sono disponibili in siringhe o pompe da infusione per l'iniezione sottocutanea e differiscono principalmente per la loro durata d'azione.

Si distinguono:

- *Insuline ad azione ultrarapida* – insulina lispro e aspart: hanno emivita molto breve, che non supera le 4-5 ore. Data la loro rapida insorgenza d'azione, esse vengono iniettate poco prima del pasto ed hanno un effetto sulla glicemia post-prandiale molto simile a quello fisiologico;
- *Insulina ad azione rapida*: è identica a quella umana in quanto ottenuta mediante la tecnica del DNA ricombinante e cristallizzata con zinco. L'effetto si manifesta entro 30 minuti e raggiunge il picco dopo 2-3 ore dall'iniezione; generalmente ha una durata che varia dalle 5 alle 8 ore.
- *Insuline ad azione intermedia* – insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn): ha insorgenza di azione ritardata (circa 2-5 ore) e una durata d'azione di 4-12 ore. La sua azione ritardata è dovuta al fatto che l'insulina è complessata con protamina, la quale viene degradata da enzimi proteolitici al momento dell'iniezione.
- *Insuline a lunga durata d'azione* – insulina glargina: possiede un plateau protratto di concentrazione plasmatica con azione molto protratta. Questo farmaco è stato relizzato per la riproduzione di convenienti livelli basali di insulina. L'aggiunta di due molecole di arginina alla catena B carbossi-terminale e la sostituzione di glicina con asparagine nella posizione A21 crea un analogo dell'insulina che risulta solubile in soluzioni acide, che però precipita al pH neutro fisiologico dopo somministrazione sottocutanea. Si viene a creare un deposito di insulina che si dissolve lentamente nell'arco di 11-24 ore, garantendo un livello basso e costante di insulina circolante.

La complicanza principale della terapia insulinica è rappresentata dalla crisi ipoglicemica, che si risolve mediante la somministrazione di glucosio. ⁽³¹⁾⁽³²⁾

1.3 INFIAMMAZIONE E DIABETE

Numerosi studi basati sulla popolazione hanno riconosciuto il processo infiammatorio come il punto di collegamento fra disturbi metabolici, obesità, aterosclerosi e DMT2.

L'accumulo di macrofagi nel tessuto adiposo, l'origine comune di macrofagi e adipociti, la prevalenza periferica di cellule mononucleate e la stessa apoptosi delle cellule β pancreatiche sono fonti di infiammazione presenti nell'eziologia del DMT2.

La condizione sempre più diffusa di "sindrome metabolica" sembra essere alla base di numerose patologie che riconoscono nell'infiammazione un connotato comune.
(33) (34)

1.3.1 La sindrome metabolica

Con il termine "sindrome metabolica" (SM) non si fa riferimento ad una singola malattia, ma ad un insieme di fattori di rischio che insieme aumentano la possibilità di sviluppare patologie cardiovascolari e l'insorgenza di DMT2. (35)

Nel 1988 Reaven ha osservato che le persone affette da patologia cardiovascolare (CVD – cardiovascular disease) presentavano fattori di rischio comuni, principalmente identificati in dislipidemia, ipertensione e iperglicemia, a cui egli ha dato il nome di Sindrome X.

Successivamente molti studi hanno osservato come l'insulinoresistenza sia alla base di molte forme di Sindrome X, per cui è stato coniato il termine "Sindrome dell'insulinoresistenza".

Nel 2001 infine l'Adult Treatment Panel III (ATPIII) del National Cholesterol Education Program ha scelto di riferirsi con il termine "Sindrome metabolica" a questo insieme di fattori di rischio. (36)

Sebbene l'ATPIII abbia identificato la CVD come esito primario della sindrome metabolica, la maggior parte delle persone in questa condizione sviluppa resistenza insulinica, che aumenta il rischio di sviluppare DMT2. Inoltre si osserva

come, in caso di diabete conclamato, il rischio di eventi cardiovascolari aumenti in modo consistente.

Oltre a CVD e DMT2, la sindrome metabolica è collegata a numerose altre patologie, quali ovaio policistico, fegato grasso, aterosclerosi, asma e alcune forme di tumore.⁽³⁷⁾

L'ATPIII ha identificato 6 maggiori componenti caratteristiche della sindrome metabolica:

1. *Obesità addominale*: è la forma di obesità più strettamente associata alla sindrome metabolica e si presenta clinicamente con un aumento della circonferenza della vita;
2. *Dislipidemia*: si manifesta nelle analisi di routine con un innalzamento dei livelli di trigliceridi ed un abbassamento dei livelli di colesterolo HDL;
3. *Ipertensione*: è prevalentemente associata all'obesità e alla condizione di insulino-resistenza;
4. *Resistenza insulinica e intolleranza al glucosio*: sono condizioni strettamente associate all'obesità che, in caso di diabete conclamato, portano ad elevati rischi sul sistema cardiovascolare;
5. *Stato pro-infiammatorio*: è riconosciuto clinicamente con un incremento della proteina C reattiva (PCR) ed è dovuto principalmente alla condizione di obesità, in cui l'eccesso di tessuto adiposo rilascia abbondanti citochine pro-infiammatorie;
6. *Stato pro-trombotico*: è evidenziato dall'innalzamento dei livelli plasmatici dell'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e del fibrinogeno. Il fibrinogeno, così come la CRP, vengono prodotti in risposta allo stato infiammatorio promosso dal rilascio di citochine dal tessuto adiposo.^{(38) (39)}

(40)

I criteri per la diagnosi di sindrome metabolica si basano su quelli identificati dal National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III (NCEP:ATPIII) e aggiornati dall'American Heart Association.

Si conferma la diagnosi quando il soggetto presenta tre o più delle seguenti caratteristiche:

- *Obesità centrale*: circonferenza vita > 102 cm per gli uomini e >88 cm per le donne;
- *Ipertrigliceridemia*: livelli sierici di trigliceridi > 150 mg/dl;
- *Ridotti livelli di colesterolo HDL*: < 40 mg/dl per gli uomini e < 50 mg/dl per le donne;
- *Iperensione*: pressione sanguigna \geq 130 mmHg (sistolica) e \geq 85 mmHg (diastolica).
- *Glicemia plasmatica a digiuno*: \geq 100 mg/dl.

Nel 2005 è intervenuta l'International Diabetes Federation (IDF) con una propria definizione, secondo cui la diagnosi di SM è confermata in caso di obesità viscerale, elemento essenziale, associata ad altri due criteri tra quelli definiti dall'ATPIII. ⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

La prevalenza della sindrome metabolica nelle diverse parti del mondo varia in parte sulla base di fattori quali l'età, l'etnicità, il sesso dei soggetti studiati.

Secondo i dati della National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) dal 2003-2004 al 2011-2012 la prevalenza dei casi di sindrome metabolica è aumentata dal 32,9% al 34,7%, con una netta maggioranza delle donne rispetto agli uomini (35,6% contro 30,3% rispettivamente).

L'incidenza della sindrome è legata anche all'età dei gruppi considerati: si passa da una prevalenza del 18,3% fra individui di 20-39 anni ad una del 46,7% negli over 60.

Dati recenti della NHANES hanno dimostrato che negli anni dal 2007 al 2012, la prevalenza nella popolazione USA si è mantenuta stabile, così come quella dell'obesità.

Si riconosce dunque un ruolo centrale dell'obesità in relazione alla sindrome metabolica, tanto che l'ATPIII la considera come il principale responsabile dell'elevata incidenza della SM. ⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾

1.3.2 L'obesità

L'obesità è una condizione medica caratterizzata da elevato accumulo di grasso corporeo, che può portare ad effetti negativi sulla salute e ad una riduzione dell'aspettativa di vita.⁽⁴⁵⁾

Nel 1997 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'ha riconosciuta ufficialmente come una epidemia globale.

Si tratta di una patologia tipica della società del benessere, infatti prima del XX secolo l'obesità era una condizione piuttosto rara.

Le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) indicano che nel 2008 il 10% degli uomini e il 14% delle donne erano obese, contro il 5% degli uomini e l'8% delle donne nel 1980.

Le stime OMS indicano che nel 2014 più di 1.9 miliardi di persone, maggiori di 18 anni, erano sovrappeso. Di queste, più di 600 milioni erano obese.

Inoltre, 41 milioni di bambini al di sotto dei 5 anni di età erano sovrappeso o obesi nel 2014.⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾

Secondo il criterio anatomico più utilizzato si possono distinguere, sul piano clinico, due forme di obesità: quella ginoide e quella androide.

Tale distinzione ha un notevole significato clinico, in quanto è stato osservato che l'obesità di tipo androide è la forma più strettamente associata alla sindrome metabolica e alle complicanze che da essa derivano.⁽⁴⁸⁾

Ciò è dovuto al fatto che il tessuto adiposo viscerale ha un'intensa attività metabolica ed endocrina. È stato osservato che all'aumentare della massa adiposa viscerale si ha un aumento notevole dei livelli di acidi grassi liberi (FFA) nel torrente circolatorio, i quali alterano il pathway di PI3K-Akt e inducono stress ossidativo, nonché un aumento della produzione di ormoni e citochine che svolgono un'attività biologica su molte funzioni dell'organismo.⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

La maggior parte dei pazienti diabetici è in sovrappeso o obesa.

Alcuni studi hanno dimostrato come nel DM2 la condizione di insulino-resistenza sia spesso associata ad obesità addominale e ipertrigliceridemia, portando a

riconoscere nell'obesità e più in generale nella sindrome metabolica le principali cause di sviluppo della patologia. ^{(52) (53) (54) (55)}

1.3.3 Il ruolo delle citochine nell'infiammazione legata ad obesità e DMT2

L'obesità è attualmente considerata come uno stato infiammatorio di basso grado indotto da numerosi mediatori, chiamati adipochine, prodotti e secreti dal tessuto adiposo bianco viscerale con funzioni endocrine, paracrine o autocrine. ⁽⁵⁶⁾
⁽⁵⁷⁾

Le adipochine comprendono una vastissima serie di composti, differenti per struttura e funzione, fra cui ormoni, citochine, chemochine, regolatori del metabolismo lipidico e glucidico, regolatori dell'omeostasi del glucosio, fattori di crescita, proteine del sistema del complemento, proteine coinvolte nell'angiogenesi, proteine a carattere pro-infiammatorio di fase acuta e componenti della matrice extra-cellulare.

Esse sono responsabili delle interazioni tra il tessuto adiposo, il tessuto muscolare, i surreni e il sistema nervoso centrale e simpatico; contribuiscono inoltre al controllo del bilancio energetico dell'organismo e della sensibilità all'insulina, alla regolazione della pressione arteriosa, alla risposta immunitaria e all'angiogenesi. Costituiscono quindi una rete di regolazione dell'infiammazione, dell'attività insulinica e del metabolismo glucidico a livello locale e sistemico, rappresentando un collegamento essenziale fra l'obesità e il DMT2. ⁽⁵⁸⁾

Le principali adipochine prodotte dal tessuto adiposo sono elencate in tabella n.1:

Adipochine	Ruolo (i) principale (i)	Sede di produzione
Adipochine ad attività ormonale		
Leptina	Stimola il senso di sazietà, la lipolisi, il metabolismo del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi, aumenta l'insulino-sensibilità	Adipocita
Adiponectina	Regola il metabolismo epatico del glucosio, aumenta l'insulino-sensibilità	Adipocita
Resistina	Induce insulino-resistenza (?)	Adipocita, macrofago
Adipsina	Stimola l'accumulo di trigliceridi, inibisce la lipolisi	Adipocita, macrofago
Apelina	Inibisce la secrezione insulinica	Adipocita, macrofago
Visfatina	Presenta attività insulino-simile, induce insulino-sensibilità, ha attività lipogenica	Adipocita
Vaspina	Aumenta l'insulino-resistenza	Adipocita
Omentina	Modula l'attività insulinica	Macrofago
Lipocalina 2	Induce insulino-sensibilità	Adipocita, macrofago
Proteina legante il retinolo 4	Induce insulino-resistenza	Adipocita
Chemerina	Stimola l'adipogenesi e l'insulino-resistenza	Adipocita
Adipochine ad attività citochinica/chemochinica, coinvolte nell'infiammazione		
IL-6	Citochina pro-infiammatoria, stimola la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi, contrasta l'azione dell'insulina e della leptina	Adipocita, macrofago, cellula endoteliale stromale
TNF- α	Citochina pro-infiammatoria, induce insulino-resistenza, aumenta la lipolisi	Adipocita, macrofago
sTNF-RII	Citochina pro-infiammatoria, induce insulino-resistenza, aumenta la lipolisi	Adipocita e macrofago
IL-1RA	Citochina anti-infiammatoria, diminuisce l'insulino-sensibilità	Macrofago
IL-10	Citochina anti-infiammatoria	Adipocita, macrofago
IL-8	Chemochina pro-infiammatoria	Cellule endoteliali stromali
MCP-1	Chemochina pro-infiammatoria, altera l'insulino-sensibilità, aumenta la lipolisi	Adipocita, macrofago
Adipochine ad attività coagulativa e vascolare		
PAI-1	Ha attività protrombotica, aumenta l'insulino-resistenza	Cellula endoteliale stromale
Adipochine ad attività di trasporto e metabolismo dei lipidi		
FABP-4	Trasporta acidi grassi	Adipocita
Adipochine ad attività enzimatica		
Catepsina S	Degrada l'elastina, inducendo sviluppo di lesioni aterosclerotiche	Adipocita, macrofago
GPX-3	Presenta attività anti-ossidante	Adipocita
ACE	Converte angiotensina I in angiotensina II	Cellula endoteliale stromale
Adipochine come proteine della fase acuta		
CRP	Stimola l'espressione di citochine e di molecole di adesione	Adipocita
SAA	Stimola la chemiotassi dei monociti e l'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali	Adipocita

Tabella n. 1: Le principali adipochine – R. Tozzoli, *Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica.*

In condizioni normali, gli adipociti bianchi accumulano lipidi e regolano l'omeostasi metabolica, mentre i macrofagi liberano arginasi (enzimi ad attività inibitoria sulla NO-sintasi) e citochine ad azione anti-infiammatoria.

In caso di obesità invece il tessuto adiposo viscerale si infiamma per azione combinata dei macrofagi e degli adipociti: i primi si infiltrano nel tessuto, aggregandosi in strutture simili a corone (crown-line structures), con rilascio di citochine pro-infiammatorie; i secondi crescono in numero (iperplasia) e in dimensioni (ipertrofia).⁽⁵⁹⁾

È stato osservato che l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo bianco è proporzionale all'adiposità, sia nei topi che negli umani, e che la perdita di peso porta a riduzione del numero di macrofagi infiltrati e ad un parallelo decremento dello stato pro-infiammatorio degli individui obesi.

Due diverse classi di macrofagi sono coinvolte nello sviluppo dello stato infiammatorio tipico dell'obesità:

1. *Macrofagi M1*: i macrofagi che si accumulano nel tessuto adiposo di topi obesi esprimono il gene associato agli M1 o macrofagi attivati per via classica. In uno studio è stato evidenziato che la stimolazione di macrofagi M1 porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie (tra cui TNF- α , IL-6 e IL-1 β), alla stimolazione dell'espressione dell'NO-sintasi inducibile e alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).
2. *Macrofagi M2*: i macrofagi che si accumulano nel tessuto adiposo di topi sani esprimono invece il gene associato agli M2, o macrofagi attivati per via alternativa. Questi stimolano la produzione di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e down-regolano la sintesi di citochine ad azione pro-infiammatoria.

I macrofagi M2 sono anche coinvolti nella riparazione di tessuti lesi o nella risoluzione dell'infiammazione.^{(60) (61) (62) (63)}

Lo stato infiammatorio legato all'obesità è confermato dalla presenza di elevati livelli ematici di proteina C-reattiva (PCR, marker dell'infiammazione) nei pazienti obesi.^{(64) (65)}

Inoltre, le cellule mononucleate presenti nel sangue dei soggetti obesi appaiono in uno stato infiammatorio, esprimendo quantità elevate di citochine pro-

infiammatorie e fattori correlati, con un aumento nella trascrizione dei geni pro-infiammatori regolati dal fattore nucleare kB (NF-kB), così come un incremento dell'espressione intranucleare della p65, il maggior componente del NF-kB. Queste cellule esprimono anche minori quantità dell'inibitore kB (IkB), che blocca l'attivazione del NF-kB. ⁽⁶⁶⁾

Le scoperte recenti riguardo all'alterazione della produzione di adipochine da parte del tessuto adiposo bianco hanno condotto all'osservazione che la disfunzione indotta dall'eccesso di grasso corporeo viscerale porta ad uno squilibrio nell'espressione di citochine pro- e anti-infiammatorie, che contribuisce allo sviluppo delle complicazioni legate all'obesità.

L'alterazione nella produzione di adipochine da parte del tessuto adiposo in individui obesi sembra essere alla base delle numerose complicanze derivate da tale patologia, fra cui il DMT2. ⁽⁶⁷⁾

Nell'ultimo decennio è stata confermata l'ipotesi che gli individui affetti da DMT2 presentano un basso grado di infiammazione che si mantiene per anni prima dell'esordio della malattia e ne è alla base dei processi patogenetici.

Il DMT2 appare quindi come il risultato finale del processo infiammatorio indotto dalle citochine, rilasciate in grandi quantità dal tessuto adiposo, dai macrofagi infiltrati all'interno di esso che sostengono l'infiammazione e dall'alterata funzione degli adipociti; esse non sono solamente marker rappresentativi delle alterazioni metaboliche legate alla patologia, ma possono contribuire direttamente e indirettamente allo sviluppo della resistenza insulinica e alla morte delle cellule β . ⁽⁶⁸⁾

Studi eseguiti su animali da esperimento e nell'uomo hanno evidenziato nell'obesità viscerale un incremento nella secrezione di alcune adipochine, quali resistina, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , che hanno uno spiccato effetto pro-infiammatorio e citotossico, e una riduzione nella produzione e/o azione biologica di adipochine aventi effetti metabolici positivi. ⁽⁶⁹⁾

Nella tabella n. 2 si evidenziano le alterazioni nella produzione di citochine associate alla condizione di obesità.

Adipochina	Sede di produzione prevalente	Variazione nell'obesità e nella sindrome metabolica	Indicatore
Leptina	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica, Dislipidemia
<i>Adiponectina</i>	Adipocita	Diminuzione	Resistenza insulinica
Adipsina	Macrofago	Aumento	Dislipidemia
Chemerina	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica, Dislipidemia
RBP-4	Adipocita	Aumento	Resistenza insulinica
<i>IL-6</i>	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
IL-8	Cellula endoteliale	Aumento	Flogosi
IL-10	Macrofago	Aumento	Flogosi
IL-1RA	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica
<i>TNF-α</i>	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
sTNF-RII	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
MCP-1	Macrofago	Aumento	Flogosi, Resistenza insulinica, Dislipidemia
VCAM-1	Cellula endoteliale	Aumento	Aterosclerosi
<i>PAI-1</i>	Cellula endoteliale	Aumento	Aterosclerosi, Resistenza insulinica
FABP-4	Adipocita	Aumento	Dislipidemia
Catepsina S	Macrofago	Aumento	Aterosclerosi
GPX-3	Adipocita	Diminuzione	Dislipidemia, Aterosclerosi
ACE	Cellula endoteliale	Aumento	Iperensione
CRP	Adipocita	Aumento	Flogosi
<i>SAA</i>	Adipocita	Aumento	Flogosi

Tabella n. 2: le alterazioni delle adipochine e sede di produzione - R. Tozzoli, *Il tessuto adiposo come organo endocrino: ruolo della diagnostica di laboratorio nell'obesità e nella sindrome metabolica*. RIMeL/IJlaM 2010; 6 (Suppl.)

Studi recenti hanno dimostrato che le stesse isole umane sono capaci di produrre una notevole varietà di citochine e chemochine, in risposta alla stimolazione fisiologica o patologica dei nutrienti.

Le citochine hanno un ruolo significativo nella regolazione delle funzioni delle isole di Langerhans.

Le citochine di derivazione insulare hanno infatti la funzione di stimolare l'adattamento e la riparazione del danno cellulare a breve termine; tuttavia, lo stress metabolico cronico può innescare un processo infiammatorio che sembra essere alla base del deficit di secrezione insulinica, nonché dell'apoptosi, delle cellule β -pancreatiche.

Si nota come in pazienti insulinoresistenti i livelli di citochine a carattere pro-infiammatorio aumentano, mentre decrescono i livelli di citochine protettive. Questo

cambiamento anomalo nella produzione di mediatori della risposta infiammatoria è alla base dell'insorgenza della disfunzione delle cellule β , della resistenza insulinica e dello sviluppo di DMT2.

È stato dimostrato che la riduzione dell'infiammazione delle isole di Langerhans è correlata con un miglioramento della funzione insulinica. ⁽⁷⁰⁾

In particolare, alterazioni rilevanti sono state riscontrate a carico di:

- *Leptina*: è un ormone prodotto prevalentemente dagli adipociti, di cruciale importanza per la regolazione del bilancio energetico. La sua secrezione è direttamente proporzionale all'entità dei depositi di grasso viscerale e dipende dallo stato nutrizionale.

Una volta secreta, essa esplica la sua azione principalmente a livello ipotalamico, dove inibisce il senso della fame, riduce l'introito calorico e aumenta il metabolismo energetico. ⁽⁷¹⁾

È stato osservato che ratti mancanti di leptina si dimostrano iperfagici, obesi e insulino-resistenti.

L'azione insulino-sensibilizzante della leptina dipende sia dall'azione di regolazione centrale dell'introito alimentare, sia dai suoi effetti biomolecolari intracellulari. La stimolazione del recettore della leptina è infatti associata all'attivazione di una serie di chinasi intracellulari rilevanti per l'omeostasi metabolica, quali PI3K/Akt, ERK, e soprattutto AMPK, con effetti di stimolo del metabolismo ossidativo degli acidi grassi e di inibizione dell'accumulo di trigliceridi nei tessuti periferici, come fegato, muscolo e cellule β -pancreatiche.

È da rimarcare che nell'obesità si riscontrano in genere livelli di leptina elevati anziché ridotti, cosicché l'alterazione dell'equilibrio energetico e l'aumento ponderale sarebbe imputabile ad una condizione di leptino-resistenza piuttosto che ad una carenza di tale ormone. A conferma di questa ipotesi è stato dimostrato che nel muscolo scheletrico di soggetti obesi, in vitro, la leptina ha azione ridotta sull'attivazione della β -ossidazione degli acidi grassi liberi (FFA). ^{(72) (73) (74) (75)}

- *Adiponectina*: è un ormone sintetizzato principalmente dagli adipociti. I livelli plasmatici di tale proteina si correlano con la sensibilità insulinica e sono inversamente proporzionali a vari indici di insulino-resistenza.

La secrezione di adiponectina appare ridotta nell'obesità e nel DM2, ed i suoi livelli circolanti sono inversamente correlati con la possibilità di sviluppo di DM.

La sua somministrazione ad animali da laboratorio migliora la resistenza insulinica e riduce i livelli ematici di glucosio, trigliceridi e FFA. La sua azione insulino-sensibilizzante, mediata dall'interazione con i propri recettori (R1, espresso prevalentemente nel muscolo scheletrico, e R2, prevalente nel tessuto adiposo), si esplica tramite l'attivazione dell'AMPK, enzima coinvolto nella β -ossidazione degli acidi grassi, con conseguente stimolo all'ossidazione dei FFA, riduzione dei livelli di FFA circolanti e riduzione del deposito di trigliceridi nei tessuti periferici.

Nell'obesità e nel DM, oltre alla riduzione dei livelli di tali ormoni, si verifica una down-regolazione recettoriale di R1 e R2, con ridotto effetto di stimolo dell'AMPK. ^{(76) (77) (78)}

- *Resistina*: è una citochina pro-infiammatoria prodotta da macrofagi e adipociti.

La sua espressione è soppressa da farmaci insulino-sensibilizzanti mentre risulta aumentata nel topo con obesità genetica e indotta dalla dieta. Tuttavia, nell'uomo la resistina viene secreta principalmente da macrofagi/monociti del sangue periferico e i suoi livelli circolanti non correlano in maniera significativa con l'insulinoreistenza e l'obesità. ⁽⁷⁹⁾

- *Visfatina*: è una proteina di recente identificazione, secreta soprattutto dal tessuto adiposo viscerale, ma non da quello sottocutaneo.

A livello dei tessuti periferici la visfatina condivide molte delle azioni dell'insulina, come dimostrato da studi sperimentali nei quali la somministrazione di alte dosi di tale ormone ha ridotto livelli di glucosio sia nei topi insulino-resistenti sia in quelli insulino-deficienti. Tali effetti della visfatina sono mediati dal recettore insulinico stesso, sui quali essa va ad agire legandosi in un sito allosterico alternativo; tuttavia, sebbene la sua

affinità di legame sia simile a quella dell'insulina, la sua concentrazione in circolo risulta nettamente inferiore, sollevando controversie sul suo possibile ruolo patogenetico nel DMT2. ^{(80) (81)}

- *TNF- α* : si tratta di una citochina prodotta da numerosi tipi di cellule. Tuttavia essa potrebbe essere coinvolta nella genesi dell'insulino-resistenza nell'obesità umana, essendo essa secreta in modo consistente dal tessuto adiposo viscerale.

È stato osservato che nel ratto, il trattamento cronico con un inibitore del *TNF- α* si accompagna ad un miglioramento della sensibilità insulinica.

In un altro studio, topi mancanti del *TNF- α* o del suo recettore apparivano protetti dall'insulinoresistenza indotta da obesità, mentre l'infusione di *TNF- α* ne causava insulinoresistenza in vivo. ⁽⁸²⁾

In vitro, tale citochina inibisce l'attività fosforilasi della subunità β del recettore insulinico e, nelle cellule adipose e muscolari, sembra in grado di modificare l'espressione dell'mRNA di GLUT4. Al contrario, la neutralizzazione di *TNF- α* determina un aumento dell'attività fosforilasi del recettore insulinico.

Nel tessuto adiposo, il *TNF- α* viene secreto per la maggior parte dai macrofagi, il cui numero è notevolmente aumentato nei soggetti con obesità viscerale. L'espressione della citochina nel tessuto adiposo correla con l'Indice di Massa Corporea, con la massa grassa e con i livelli di insulina circolante.

È stato osservato che il *TNF- α* attiva le serin/treonin-chinasi *IKK- β* , *PKC- ϵ* e *PKC- ζ* , le quali determinano la fosforilazione sia del recettore insulinico (IR), sia dei substrati proteici del IR (IRS), in particolare IRS-1; ciò dà luogo ad una ridotta attività di PI3K, che media la maggior parte delle azioni metaboliche dell'insulina. ⁽⁸³⁾

- *IL-6*: è secreta per il 60-70% dal tessuto adiposo ed è quella che è stata più strettamente correlata da studi in vivo all'insulino-resistenza e al DMT2. Mentre le altre citochine agiscono perlopiù con meccanismo paracrino, *IL-6*, data la sua elevata concentrazione plasmatica in condizioni di obesità, è in grado di esplicare la sua azione a distanza.

A livello epatico IL-6 induce resistenza insulinica aumentando la produzione epatica di glucosio, riducendo la glicogeno-sintetasi ed attivando la glicogeno-fosforilasi, con meccanismi ancora poco chiari. Si pensa che IL-6 riduca la fosforilazione di IRS-1 e l'attivazione di PI3K, con conseguente minore attivazione di Akt. ^{(84) (85)}

- *IL-1 β* : è considerato il maggior responsabile dell'induzione del danno e dell'apoptosi delle cellule β pancreatiche. Viene secreto principalmente dai macrofagi, ma è stato osservato che in alcune circostanze può essere prodotto anche dalle stesse cellule β .

La massiva risposta apoptotica delle cellule β pancreatiche tuttavia si ha per una combinazione di IL-1 β con altre citochine, quali TNF- α , secreto unicamente dai macrofagi, e l'interferone γ (INF- γ), secreto dalle cellule T-helper.

In uno studio prospettico è stato dimostrato che concentrazioni elevate di IL-6 e IL-1 β aumentano il rischio di sviluppare diabete di tre volte rispetto al gruppo di controllo; tuttavia con livelli di IL-6 aumentati e livelli non osservabili di IL-1 β l'aumento di rischio non è stato documentato.

L'effetto pro-apoptotico di IL-1 β si esplica attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB. L'attivazione di NF-kB gioca un ruolo centrale nella risposta infiammatoria e nell'innescò dell'apoptosi delle cellule β . NF-kB esiste nel citoplasma in forma inattiva, associato a proteine inibitorie chiamate I κ B. La fosforilazione di I κ B da parte di una chinasi provoca l'attivazione del fattore di trascrizione, che conduce all'espressione di geni pro-infiammatori o all'innescò dell'apoptosi per attivazione delle caspasi. ^{(86) (87) (88)}

- *INF- γ* : il tessuto adiposo infiammato, tipico del soggetto obeso, esprime livelli elevati di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, i quali producono INF- γ , una citochina coinvolta sia nella risposta immunitaria che nella risposta infiammatoria. È stato osservato che ratti obesi INF- γ -deficienti mostrano una significativa riduzione dell'espressione, da parte del tessuto adiposo, di mRNA codificanti per citochine a carattere pro-infiammatorio, come TNF-

α o alcune chemochine, nonché un decremento nell'infiltrazione di macrofagi a questo livello ed una migliore tolleranza al glucosio rispetto al gruppo di controllo. Questo indica un ruolo importante dell' INF- γ nella regolazione della risposta infiammatoria indotta dall'obesità.

Il trattamento di isole pancreatiche con elevate concentrazioni di INF- γ e TNF- α ha dimostrato un'azione sinergica fra le due citochine nella capacità di alterare la GSIS ed indurre l'apoptosi delle β -cellule. Infatti, il trattamento di isole umane con 200 U/ml di ciascuna citochina, da sola, non interferiva con la GSIS, mentre la co-incubazione alle stesse concentrazioni la inibiva marcatamente. Parallelamente, si osservava un progressivo deficit nella funzionalità delle cellule β -pancreatiche, fino alla vera e propria morte cellulare. Ciò ha confermato il ruolo diretto delle citochine nella distruzione delle isole di Langerhans. ⁽⁸⁹⁾ ⁽⁹⁰⁾

1.4 DMT2 E DANNO MITOCONDRIALE

Numerosi studi confermano il coinvolgimento dei mitocondri nei meccanismi che caratterizzano il DMT2.

Entrambe le condizioni di deficit della secrezione insulinica e insulino-resistenza sembrano essere causate da meccanismi di glucotossicità e lipotossicità tipici della condizione del diabetico e del soggetto obeso, rappresentando un possibile link fra le due patologie.

Di recente, alcuni studi hanno analizzato tali meccanismi di tossicità cellulare, ipotizzando che le condizioni di iperglicemia cronica e gli elevati livelli di FFA siano la causa primaria di danno a carico dei mitocondri.

1.4.1 Il diabete mitocondriale

Il mantenimento della normale omeostasi del glucosio coinvolge l'azione di un sensore del glucosio, nelle cellule β -pancreatiche, che accoppia l'aumento della glicemia con lo stimolo della secrezione insulinica. In tale processo un ruolo cruciale è svolto dal rapporto ADP/ATP, il quale viene mantenuto a livelli fisiologici dal processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale.

Questa osservazione ha permesso di ipotizzare che disfunzioni a carico dei mitocondri potessero essere alla base dei processi patogenetici che portano allo sviluppo di DMT2.

L'associazione fra diabete e malattia mitocondriale è definita per svariate mutazioni genetiche a livello del mtDNA, che potrebbero spiegare fino al 20% dei casi di diabete. Alla base del cosiddetto "diabete mitocondriale" si possono ritrovare però anche mutazioni del DNA nucleare a carico di geni che codificano per proteine necessarie alla replicazione e alla stabilità del mtDNA.

Le varie forme di diabete mitocondriale mostrano una marcata dipendenza dall'età per quanto riguarda il deterioramento delle funzioni pancreatiche e si manifestano quindi come malattie progressive; questo implica che nella patogenesi del diabete mitocondriale concorrano altri fattori, oltre a quello genetico.

Una delle mutazioni più fortemente associata a DMT2 è quella che coinvolge la sostituzione di una guanina con un'adenina (A →G) alla posizione 3243 della leucina del tRNA mitocondriale.

La presenza della mutazione A3243G porta ad una riduzione nel consumo di O₂ da parte della cellula, dovuto principalmente al calo della fosforilazione ossidativa. Questo porta a minor produzione di ATP e ad aumento nella produzione delle ROS, principali cause di stress ossidativo cellulare.

Il meccanismo molecolare con cui A3243G altera la secrezione insulinica può coinvolgere una diminuzione dei livelli citosolici di ADP/ATP, che porta ad un resetting del sensore del glucosio nelle cellule β-pancreatiche. Nelle cellule β insulari il rapporto ADP/ATP ha infatti un ruolo fondamentale nel determinare la secrezione insulinica stimolata da glucosio (GSIS).^{(91) (92) (93) (94)}

1.4.2 Meccanismi di resistenza insulinica

L'insulinoresistenza è un fenomeno precedente rispetto alla disfunzione delle cellule β pancreatiche ed è definita come il deterioramento nell'abilità dell'insulina di esercitare il suo effetto sul metabolismo del glucosio e dei lipidi nei tessuti bersaglio.

Sebbene il meccanismo alla base dell'insulinoresistenza non sia ancora del tutto chiaro, si ipotizza possa coinvolgere una disfunzione mitocondriale, dal momento che il DMT2 è stato correlato ad alterazioni del metabolismo ossidativo nei tessuti insulino-responsivi.

Il *muscolo scheletrico* è fortemente dipendente dalla fosforilazione ossidativa per la produzione di energia.

È il tessuto più sensibile all'azione dell'insulina e di conseguenza appare come il sito predominante di IR nel DMT2.

È stata dimostrata un'alterazione del metabolismo del glucosio e degli acidi grassi nel muscolo scheletrico dei soggetti affetti da DMT2. Le manifestazioni del metabolismo glucidico insulino-resistente includono: ridotto trasporto di glucosio, ridotta fosforilazione ossidativa e ridotta sintesi di glicogeno.

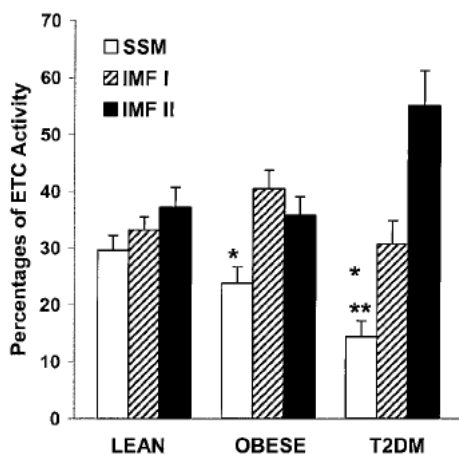
Tali eventi possono essere dovuti ad un'alterata capacità funzionale dei mitocondri nel compiere la fosforilazione ossidativa; infatti è stata osservata una riduzione dei marker enzimatici del cammino ossidativo nel muscolo scheletrico di pazienti obesi o affetti da DM2.

All'interno del muscolo scheletrico si distinguono due categorie principali di mitocondri: i mitocondri subsarcolemmatici (SSM), localizzati in prossimità del sarcolemma, e i mitocondri intermiofibrillari (IFM), inseriti tra le miofibrille.

Mentre i mitocondri IFM sono quelli deputati alla produzione di ATP necessaria alla contrazione muscolare, i mitocondri SSM generano ATP per le funzioni di membrana, compresi lo scambio di ioni, il trasporto di substrati, la sintesi di proteine e i meccanismi di trasduzione cellulare.

È stato osservato che difetti nei mitocondri SSM contribuiscono all'instaurarsi della condizione di resistenza insulinica nel tessuto muscolare. Uno studio ha dimostrato infatti una riduzione della funzionalità della NADH ossidoreduttasi, della citrato sintasi e della la β -idrossiacil-CoA deidrogenasi in mitocondri SSM di soggetti diabetici e obesi rispetto agli stessi in soggetti non diabetici normopeso.

I mitocondri SSM nei soggetti malati risultavano poi essere di dimensioni minori, con una capacità di fosforilazione ossidativa ridotta del 30%.^{(95) (96) (97) (98)}



La distribuzione dell'attività globale della succinato ossidasi (complesso II-IV) tra la frazione mitocondriale subsarcolemmale e intermiofibrillare (IFM), come % della totale attività della succinato ossidasi, è indicato per il muscolo scheletrico di soggetti magri, obesi e DM2.

* Soggetti magri vs obesi o DM2, $P < 0.01$;

** DM2 vs obesi, $P < 0.05$.

ETC, catena di trasporto degli elettroni;

SSM, mitocondri subsarcolemmali.

Il *tessuto adiposo* contribuisce per il 10-15% all'assorbimento del glucosio indotto dalla secrezione di insulina dopo i pasti, e svolge un ruolo fondamentale nell'immagazzinamento dei trigliceridi sotto lo stimolo insulinico.

In condizioni di digiuno i trigliceridi vengono idrolizzati ad acidi grassi, i quali vengono a loro volta ossidati a livello mitocondriale per produrre energia.

Evidenze sperimentali hanno provato che esiste una relazione fra disfunzioni mitocondriali indotte dai ROS e il DMT2 associato ad obesità.

1.4.3 Meccanismi di glucotossicità e lipotossicità

Numerose evidenze suggeriscono che lo stress ossidativo sia il meccanismo alla base della resistenza insulinica, del DMT2 e delle sue complicazioni.

È stato osservato che la quantità di ROS prodotte dai mitocondri in stati di iperglicemia prolungata ed elevati livelli di FFA contribuisce all'apoptosi e al mancato differenziamento delle cellule β -pancreatiche, con conseguente decremento della secrezione insulinica. ⁽⁹⁹⁾ ⁽¹⁰⁰⁾

Il danno radicalico causato dalle ROS sembra essere responsabile anche delle complicanze associate a DMT2, poiché conduce a glicazione non enzimatica delle proteine e a produzione di AGE.

La produzione di ROS dipende da molti fattori, come la presenza di un elevato potenziale di membrana, un'elevata quantità di NADH/FADH₂ in carenza di ADP, oppure elevati livelli di glucosio intracellulare combinati con elevati livelli di calcio. Queste condizioni sono tipiche dello stato di iperglicemia e sono alla base del fenomeno della *glucotossicità*.

È verosimile che molti degli effetti delle elevate concentrazioni di glucosio siano mediati dalla produzione di ROS, prodotte principalmente attraverso il metabolismo mitocondriale, in accordo con l'evidenza sperimentale secondo cui i mitocondri di cellule β pre-esposti al glucosio presentano evidenti alterazioni morfologiche.

Infatti l'incremento nella produzione delle ROS, associato ad elevato stress ossidativo, porta ad effetti dannosi sulla funzionalità mitocondriale, con riduzione e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, diminuzione della produzione

di ATP e del potenziale di membrana, e ciò causa deficit nella secrezione insulinica e ad apoptosi delle cellule β .

L'ipotesi secondo cui lo stress ossidativo stia alla base della glucotossicità trova conferma nell'osservazione che elevate concentrazioni di glucosio causano un aumento di perossidi all'interno delle isole di Langerhans. Le isole contengono livelli molto bassi di enzimi antiossidanti e questo le rende più suscettibili al danno radicalico rispetto ad altri tessuti corporei.

Alcuni studi confermano poi che il trattamento con antiossidanti, in vivo, protegge le isole pancreatiche dall'effetto tossico dell'iperglicemia.

Evidenze cliniche che supportano questa linea di pensiero includono molti casi di elevati livelli di marker dello stress ossidativo nel plasma e nelle urine di pazienti affetti da DMT2, così come diminuiti livelli di GSH nelle loro cellule sanguigne.

In vitro, le ROS e lo stress ossidativo conducono all'attivazione di una cascata di serine chinasi, che hanno come target il recettore insulinico (IR) e i substrati del recettore insulinico (IRS); la fosforilazione di IR e IRS porta ad attenuazione della risposta del segnale insulinico. ⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰³⁾

L'obesità e una dieta ricca di grassi sono associate ad elevati livelli di FFA nel sangue, condizione che predispone allo sviluppo di DMT2 e denominata lipotossicità.

È stato osservato che anche gli FFA possono contribuire allo stress ossidativo e all'alterazione dell'attività mitocondriale, perché capaci di incrementare la produzione di ROS per disaccoppiamento della β -ossidazione lipidica; infatti i mitocondri di soggetti affetti da DMT2 e obesità hanno un'alterata capacità di svolgere la β -ossidazione degli acidi grassi.

L'alterazione della funzione mitocondriale provoca accumulo di intermedi lipidici, come ad esempio le ceramidi, che raggiungono livelli elevati in soggetti obesi e diabetici, rispetto al gruppo di controllo sano.

L'accumulo di acilCoA a lunga catena, DAG, ceramidi o qualsiasi combinazione di questi intermedi lipidici influenza negativamente l'attivazione della cascata indotta dal segnale dell'insulina e sembra essere responsabile dell'innescamento della risposta infiammatoria.

L'esposizione delle isole umane per 48 ore a un'elevata concentrazione di FFA è risultata in grado di aumentare di varie volte il tasso di apoptosi cellulare. Tale effetto veniva completamente prevenuto mediante l'inibizione delle caspasi e parzialmente inibito se si bloccava la formazione di ceramide, un intermedio lipidico del metabolismo dei FFA.

In uno studio recente su cellule INS-1E è stato inoltre osservato come acidi grassi saturi e insaturi conducono a differenti livelli di stress del reticolo endoplasmatico da parte delle ROS.

Sarebbero gli FFA saturi a lunga catena, come l'acido palmitico, particolarmente abbondante nel sangue di soggetti obesi, ad indurre apoptosi delle cellule β in INS-1E attraverso un processo che coinvolge la generazione di ROS e lo stress ossidativo a livello del reticolo endoplasmatico (ER). Al contrario, FFA insaturi come l'acido oleico sembrerebbero avere un ruolo protettivo.

Lo stress dell'ER è stato ipotizzato essere uno dei link principali fra l'obesità indotta da una dieta ricca di grassi saturi ed il DMT2, nonché un possibile meccanismo che porta sia all'insulino-resistenza che all'apoptosi delle cellule β . ⁽¹⁰⁴⁾⁽¹⁰⁵⁾⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁷⁾

Le risposte allo stress innescate dall'iperglicemia e dall'elevazione dei livelli di FFA sono mediate dall'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kB (NF-kB), dalla Jun NH2-terminale/proteina chinasi attivata dallo stress (JNK/SAPK) e dalla proteina chinasi attivata dal mitogeno p38 (MAPK).

È stato dimostrato che NF-kB induce la sintesi di numerose citochine pro-infiammatorie, quali TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ed è in grado di stimolare l'espressione della NO sintasi inducibile (iNOS), che si accompagna alla produzione di elevati livelli di NO, che può reagire con altri radicali liberi e formare specie reattive dell'azoto (reactive nitrogen species – RNS), fortemente ossidanti. JNK/SAPK e p38 MAPK fanno entrambe parte della superfamiglia delle MAP serina/treonina proteine chinasi e sono coinvolte nell'innescare di fenomeni apoptotici. Sono attivate da vari stimoli, come ROS, stress ossidativo, iperglicemia, citochine pro-infiammatorie, proteine dello shock termico (HSP). ⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾

I fenomeni di glucotossicità e lipotossicità concomitanti in pazienti affetti da obesità e diabete sembrano stimolare l'azione pro-infiammatoria esercitata dalle citochine sulle isole di Langerhans, con un coinvolgimento delle strutture mitocondriali.

Il coinvolgimento dei mitocondri trova conferma nell'osservazione del fatto che il trattamento di isole umane con citochine induce una significativa down-regulation di differenti proteine coinvolte nella catena di trasporto degli elettroni (ATP-sintasi e NADH deidrogenasi), nel ciclo di Krebs (succinil-CoA ligasi), nel metabolismo degli alcoli (aldeide deidrogenasi mitocondriale) e nella degradazione dei gangliosidi (β -exosammidasi).

Si nota come la combinazione di livelli moderati di glucosio associati ad abbondanti livelli circolanti di FFA induce un incremento nella produzione di citochine molto più consistente rispetto alla sola azione dei FFA. Questo suggerisce che nella produzione locale di citochine sono coinvolti entrambi i meccanismi di glucotossicità e lipotossicità.

È stato osservato che la condizione di iperglicemia può contribuire all'induzione dell'apoptosi e all'espressione del recettore di morte Fas in maniera IL-1 β -dipendente. Infatti, l'incubazione di isole umane con elevate concentrazioni di glucosio (33.3 mM) per 20h induce significativamente la produzione di IL-1 β .

Al contrario, il trattamento di cavie con IL-1Ra (che neutralizza l'azione di IL-1 β) ha svariati effetti positivi, quali: un incremento nella capacità replicativa di cellule β , incremento della secrezione insulinica stimolata da glucosio, protezione dall'apoptosi, aumento della sensibilità insulinica e attenuazione dell'iperglicemia. L'esposizione cronica di cellule β -pancreatiche a IL-1 β , IFN- γ e TNF- α attiva l'espressione dell'NO-sintasi inducibile (iNOS) per stimolazione del pathway del NK-kB e porta all'eccessiva produzione di ossido nitrico (NO), che va ad interferire con la catena di trasporto degli elettroni, inibire l'ATP-sintasi mitocondriale ed indurre l'espressione genica di altre citochine a carattere pro-infiammatorio. Ciò conduce a diminuzione nella secrezione insulinica e induzione dell'apoptosi per attivazione delle caspasi. ^{(110) (111) (112) (113) (114) (115)}

Di recente, è stata dimostrata l'associazione del NF- κ B con gli enzimi istone acetiltransferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC).

Questi enzimi hanno la funzione fondamentale di regolare l'acetilazione degli istoni del DNA, modulando in questo modo il legame dei fattori di trascrizione e l'espressione genica. Essi sono però anche in grado di determinare l'acetilazione di molte proteine citoplasmatiche, essendo tale reazione una delle più comuni modificazioni post-traduzionali, inclusi enzimi metabolici e fattori di trascrizione. Così, l'impatto dell'acetilazione sulle modifiche post-traduzionali delle proteine è comparabile a quello della fosforilazione.

Si nota come l'istone H3 risulti essere iperacetilato nel promotore del TNF- α e dell'enzima associato COX2 in monociti isolati da pazienti affetti da DM, suggerendo una potenziale importanza dell'attività di HAT e HDAC nell'espressione di geni pro-infiammatori.

È stato visto che, in vitro, l'acetilazione degli istoni in monociti di pazienti diabetici sembra essere indotta da elevate concentrazioni di glucosio, così come dal trattamento con tricostatin A (inibitore HDAC), e che la produzione di citochine pro-infiammatorie IL-1 β e TNF- α era indotta da iperglicemia tramite l'attivazione di NF- κ B. Questo ha portato ad ipotizzare che l'iperacetilazione sia una conseguenza del DM piuttosto che una sua causa.

È stato osservato che l'acetilazione di NF- κ B porta ad un incremento del suo legame al DNA, promuovendo la trascrizione di geni pro-infiammatori e la sintesi di iNOS. Il blocco dell'azione di NF- κ B per inibizione di HDAC è in grado di inibire l'apoptosi innescata dal recettore di morte Fas e la soppressione del GSIS indotta dalle citochine in isole umane; inoltre viene ridotta l'espressione di iNOS, la conseguente formazione di NO e la morte delle cellule β pancreatiche. Ne risulta che il blocco di HDAC porta a protezione delle β -cellule dall'effetto tossico mediato dalle citochine. ^{(116) (117) (118)}

Un ruolo protettivo sull'azione infiammatoria mediata dalle citochine in isole pancreatiche è svolto anche dal GLP-1 e dalla metformina.

Sebbene il meccanismo sia ancora per buona parte oscuro, è stato dimostrato che la co-incubazione di citochine (IL-1 β e TNF- α) e GLP-1 porta ad una marcata azione

protettiva nei confronti dell'apoptosi indotta da citochine e dell'alterazione della GSIS. La secrezione di GLP-1 sembra inoltre stimolata dal trattamento cronico con metformina, uno dei principali farmaci antidiabetici. ^{(119) (120) (121)}

Studi recenti su cellule mononucleate di pazienti affetti da aterosclerosi della carotide inoltre hanno dimostrato che la metformina possiede una certa azione antiinfiammatoria: infatti il trattamento cronico con tale farmaco riduce le concentrazioni plasmatiche di PCR, IL-6 e TNF- α ; in più, si ha una riduzione significativa dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e TNF- α e del legame al DNA di NF-kB. In particolare, è stato osservato che la metformina non altera l'espressione di NF-kB, ma ne inibisce in modo marcato l'acetilazione. ^{(122) (123)}

1.5 LA PROTEOMICA

1.5.1 Proteomica

Con il termine *proteoma* si intende l'insieme completo delle proteine codificate dal genoma ed espresse in una cellula, in un tessuto o in un organismo in un dato istante. Mentre il genoma è costante per una data cellula e identico in tutte le cellule dell'organismo, il proteoma è altamente variabile nel tempo e può cambiare in risposta a svariati fattori esterni. ⁽¹²⁴⁾

Lo studio del proteoma è di competenza della *proteomica*, una branca della biologia molecolare che ha come obiettivo l'identificazione sistematica delle proteine espresse dal genoma umano in condizioni fisiologiche e il monitoraggio delle stesse in caso di alterazioni.

Esso prende in considerazione la diversità delle isoforme proteiche, le modifiche post-traduzionali che le proteine possono subire, le quali spesso risultano particolarmente importanti negli eventi di trasduzione del segnale, l'alterazione nella loro espressione in termini quantitativi e qualitativi, la loro funzione e attività e le eventuali interazioni molecolari. ⁽¹²⁵⁾ ⁽¹²⁶⁾

La proteomica è principalmente suddivisa in due rami: la proteomica classica e la proteomica funzionale:

- La *proteomica classica* si suddivide a sua volta in:
 1. *Proteomica sistematica*: ha come scopo l'identificazione e la caratterizzazione delle proteine.
 2. *Proteomica differenziale*: si propone lo scopo di differenziare e quantizzare le proteine differenzialmente espresse in determinate condizioni fisiologiche o patologiche, o in condizioni di trattamento farmacologico.
- La *proteomica funzionale* invece ha come scopo quello di definire la funzione biologica di proteine il cui ruolo è ancora sconosciuto, di identificare le interazioni proteina-proteina che si instaurano in vivo e di

descrivere a livello molecolare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolte.

Il proteoma viene analizzato attraverso due passaggi analitici consecutivi: la separazione delle proteine che costituiscono il proteoma, mediante la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale, e la loro identificazione strutturale mediante la tecnica della spettrometria di massa. ⁽¹²⁷⁾ ⁽¹²⁸⁾

1.5.2 L'elettroforesi bidimensionale (2-DE)

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica analitica che ha lo scopo di separare le proteine di un certo campione sulla base del loro punto isoelettrico e del loro peso molecolare.

Storicamente, essa deriva dall'accoppiamento di due tecniche elettroforetiche elaborate da U.K Laemmli, da M. Gronow e da G. Griffith, pertanto prevede due corse elettroforetiche, dette prima e seconda dimensione.

- La *prima dimensione* corrisponde alla isoelettrofocalizzazione (IEF), secondo cui le proteine si separano in base al loro punto isoelettrico.

Il punto isoelettrico di una proteina è definito come il valore di pH al quale la molecola non presenta alcuna carica netta.

Per eseguire questa tecnica è necessario un supporto in gel di poliacrilammide, su cui viene creato un gradiente di pH grazie a miscele di carrier anfolitici. Gli anfolti sono miscele di polimeri di amminoacidi dotati di cariche superficiali corrispondenti ai diversi range di pH e sono disponibili sotto forma di strip prefabbricate, contenenti gradienti immobilizzati di pH (IPG).

Dopo aver caricato il campione proteico sul gel, si collega l'elettrodo positivo (anodo) all'estremità acida del gradiente, e l'elettrodo negativo (catodo) all'estremità basica. Quando si sottopone la strip ad un campo elettrico si provoca il movimento delle proteine, in particolare quelle dotate di carica netta positiva migrano verso il catodo, mentre quelle dotate di carica netta negativa si spostano verso l'anodo.

Le proteine continuano la corsa finché non raggiungono la zona del gradiente di pH in cui la loro carica netta equivale a zero, che rappresenta il loro punto isoelettrico. Esse si focalizzano in una zona molto ristretta e ciò rende la IEF una tecnica ad alta risoluzione.

- La *seconda dimensione* è una classica SDS-PAGE; con questa tecnica, le bande proteiche focalizzate in prima dimensione vengono risolte in base al loro peso molecolare (PM).

Il campione viene dapprima trattato con sodio dodecilsolfato (SDS), che conferisce a tutte le proteine una carica netta negativa, mascherando la loro carica intrinseca.

Segue la corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide; dopo l'applicazione della corrente, le proteine cominciano a migrare in funzione della loro massa.

Le proteine più piccole si muovono più velocemente perché la loro corsa non viene impedita dalle maglie del gel, mentre quelle più grandi riescono a passare con difficoltà attraverso il reticolo. ^{(129) (130) (131)}

1.5.3 La spettrometria di massa (MS)

La spettrometria di massa è una tecnica che consente l'identificazione e l'analisi quantitativa di una molecola a partire dalla conoscenza della sua massa.

L'identificazione di una proteina mediante spettrometria di massa avviene attraverso l'analisi di peptidi generati utilizzando proteasi specifiche. Proteine con diversa sequenza amminoacidica, in seguito all'azione di una proteasi specifica, generano un insieme discreto di peptidi, definiti dalla loro massa, che è unico per quella proteina.

La banda proteica di un gel bidimensionale, colorata secondo una tecnica che non interferisce con l'analisi spettroscopica, viene direttamente trattata con proteasi e la miscela peptidica ottenuta viene analizzata con lo spettrometro di massa, che ne misura il peso molecolare.

Il PM rilevato dallo strumento viene confrontato con standard di molecole già riconosciute in laboratorio, per poter essere identificato.

Il principio su cui si basa la MS è la possibilità di separare una miscela di ioni secondo il loro rapporto massa/carica (m/z), generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti.

Per poter essere separati secondo questa tecnica, atomi e molecole devono essere volatilizzate e ionizzate, in modo da formare ioni con carica positiva o negativa che si possano muovere liberamente nel vuoto. La ionizzazione del campione avviene facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota generati da uno strumento chiamato sorgente, che può essere di diverso tipo.

Spesso per l'analisi in proteomica viene utilizzato come sistema di ionizzazione il MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), in cui si sfrutta un brevissimo ma intenso impulso di luce laser ultravioletta per indurre la produzione di ioni molecolari protonati degli analiti.

Di solito le sorgenti MALDI sono accoppiate ad analizzatori a tempo di volo (TOF – Time Of Flight), che misurano il rapporto m/z degli ioni generati nella sorgente, sulla base del tempo che questi impiegano per percorrere uno spazio definito.

Gli ioni provenienti dalla sorgente vengono accelerati da un forte campo elettrico, di 20 kV, all'uscita del quale hanno tutti la stessa energia cinetica, ma una differente velocità, a seconda della loro massa.

L'analizzatore TOF si basa su un principio molto semplice: poiché tutti gli ioni sono sottoposti ad uno stesso campo elettrico, gli ioni con rapporto m/z maggiore (più pesanti) raggiungono una velocità minore rispetto agli ioni con rapporto m/z minore.

Gli ioni, una volta separati dall'analizzatore sulla base del loro rapporto m/z , vengono raccolti da un rivelatore. Questo è costituito da una serie di elettrodi che ha lo scopo di amplificare il segnale, il quale è proporzionale al numero degli ioni presenti.

Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto m/z e li converte in uno spettro di massa. I picchi mostrati nello spettro di massa dovranno essere interpretati o confrontati con standard di laboratorio. ⁽¹³²⁾

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Questo studio nasce in collaborazione con l'Unità di Endocrinologia del Prof. Marchetti dell'Università di Pisa.

Lavori precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno avuto come scopo lo studio dell'effetto lipotossico del palmitato su mitocondri isolati da cellule INS-1E e dell'effetto protettivo del GLP-1, mediante le tecniche dell'elettroforesi bidimensionale e dello shotgun. Successivamente è stata studiata l'acetilazione delle proteine mitocondriali estratte da INS-1E; infine questi risultati sono stati trasferiti su cellule β pancreatiche umane. Tali esperimenti hanno evidenziato alterazioni nell'espressione di proteine mitocondriali e differenze significative nell'acetilazione associate al danno lipotossico, ed è stato confermato il ruolo protettivo del GLP-1 nei confronti dello stesso.

In particolare, il possibile ruolo dell'acetilazione proteica quale meccanismo patogenetico alla base del DMT2 ha portato ad interrogarsi, da un lato, sui possibili fattori che possano indurre tale modifica post-traduzionale, e dall'altro su quali siano le molecole che possano esercitare un effetto protettivo in questo senso.

Poiché di recente numerose evidenze sperimentali hanno fatto emergere il ruolo fondamentale delle citochine pro-infiammatorie nella patogenesi del DMT2, si è ipotizzata una possibile implicazione delle stesse nell'alterazione dell'acetilazione di proteine in cellule β pancreatiche. Inoltre, la conferma del ruolo protettivo del GLP-1 nei confronti dei danni indotti da citochine sulle cellule β del pancreas, e l'osservazione del fatto che la secrezione di tale ormone è stimolata dal trattamento cronico con metformina, hanno spinto ad investigare sul possibile ruolo del farmaco nei confronti dell'acetilazione mediata da citochine.

Lo scopo di questa tesi è stato dunque quello di analizzare la variazione dell'acetilazione proteica in isole umane a seguito di trattamento con un cocktail di citochine e di valutare il ruolo protettivo della metformina. L'analisi è stata condotta accoppiando la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale con il western blot, usando un anticorpo specifico diretto contro le lisine acetilate delle proteine.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONI

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip, pH 3-10, 18 cm, della GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

L'Apparecchio usato per l'isoelettrofocalizzazione è l'Ettan™ IPG-phor™ Isoelectric Focusin System (Amhersam Bioscience).

L'apparecchio usato per l'elettroforesi è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (American Bioscience).

L'apparecchio usato per il Western Blot è il Trans-Blot® Turbo™, Transfer System (Biorad).

Le membrane di nitrocellulosa utilizzate sono le: Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose con filtro 0,2 µm.

Le immagini sono state acquisite tramite lo strumento ImageQuant LAS 4010 della ditta GE Healthcare Bio – Sciences AB (Uppsala, Sweden).

3.2 IL CAMPIONE

Le cellule umane utilizzate in questo studio sono state fornite dal gruppo di ricerca del prof. Marchetti, della U.O di Malattie del Metabolismo e Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana.

Le isole umane di pancreas sono state ottenute da pancreas di donatori e sottoposte a un trattamento di digestione enzimatica con collagenasi e purificazione in gradiente di densità.

Al termine della procedura di isolamento, le cellule sono risospese in mezzo M199, contenente il 10% di siero e antibiotici (100 units/ml penicillina, 100 µg/ml

streptomicina, 50 µg/ml gentamicina e 0,25 µg/ml amfotericina B) e messe in coltura per 24h a 37 °C nell'incubatore.

In esperimenti paralleli le cellule sono incubate 24h in presenza di un cocktail di citochine (50 U/ml IL-1β plus 1000 U/ml IFN-γ), con o senza metformina (2,4 mg/ml metformin, concentrazione all'interno del range terapeutico).

3.2.1 Preparazione del campione

Per poter effettuare l'analisi proteica, è necessario rompere le cellule e solubilizzare le proteine.

Questo procedimento richiede una serie di accorgimenti, in quanto le proteine, una volta estratte dalle cellule, si trovano in condizioni non ottimali per la loro stabilità e funzionalità, quindi bisogna intervenire per ridurre le condizioni e/o gli agenti che possono denaturarle.

Il campione viene preparato seguendo questa serie di passaggi:

1. Trasferimento delle cellule dalla fiasca in una falcon da 50 ml, lavando bene la fiasca con 10 ml di PBS a 37°C, in modo da non perdere campione.
2. Centrifuga a 1200 rpm per 5 minuti ed eliminazione del sovrantante.
3. Risospensione del pellet in 10 ml di PBS a 37°C.
4. Centrifuga a 1200 rpm per 5 minuti ed eliminazione del sovrantante.
5. Risospensione del pellet in 200 µl di PBS e trasferimento del campione in un'ependorf.
6. Si procede al lavaggio della falcon con 200 µl di PBS e si ripete l'operazione con ulteriori 100 µl di PBS. Il volume finale nella eppendorf è di 500 µl.
7. Centrifuga a 500 g per 3 minuti ed eliminazione del sovrantante.
8. Risospensione del pellet in 100 µl di soluzione di sospensione (SS), composta da: soluzione di reidratazione (RS: Urea 7M, Tiourea 2M, Chaps 4 %, DTT 60 mM, Blu di Bromofenolo 0,002 %, H₂O mQ), NaF 50 mM, Na₃VO₄ 2 mM e nicotinammide 10 mM.

Il DTT (ditiotreitolo) ha la funzione di mantenere i gruppi sulfidrilici delle proteine in forma ridotta ed impedire la formazione di ponti disolfuro impropri.

Na_3VO_4 e NaF sono inibitori delle fosfatasi.

9. Aggiunta di 1 μl di tricostatina (1 μM) e 1 $\mu\text{l}/10^6$ cellule inibitori delle proteasi. Si agita bene per circa 5 minuti, a intervalli.

La tricostatina è un inibitore delle deacetilasi, mentre gli inibitori delle proteasi evitano la digestione proteica dovuta all'azione delle proteasi intracellulari.

10. Sonicazione: 5 volte per 4 secondi. Si agita bene e si lascia solubilizzare per circa 40 minuti.

La sonicazione ha lo scopo di rompere le membrane cellulari mediante l'utilizzo di ultrasuoni. È necessario prestare attenzione all'eccessivo sviluppo di calore.

11. Centrifuga a 17000 g per 5 minuti.

A questo punto si valuta la presenza o meno di pellet.

Se è presente un pellet consistente può rendersi necessaria l'aggiunta di altra SS e un ulteriore processo di sonicazione.

Se il pellet è piccolo si procede con l'esperimento.

12. Incubazione per circa 2 ore, agitando spesso. Questo periodo di incubazione ci assicura che vengano rotte sia le cellule che i mitocondri.

13. Centrifuga a 1700 g per 5 minuti.

Si utilizza il sovranatante per gli esperimenti successivi e si conserva in ogni caso il pellet eventualmente presente.

3.2.2 Dosaggio proteico RC-DC Biorad

L'RC-DC è un saggio colorimetrico per la determinazione quantitativa delle proteine, che si effettua in presenza di agenti riducenti e detergenti.

Mantiene tutte le caratteristiche del saggio DC originale, ma è stato modificato per essere compatibile ad alte concentrazioni di agenti riducenti (RC – reducing agent compatible) e di detergenti (DC – detergent compatible).

Il saggio si basa sullo stesso principio di funzionamento caratteristico del dosaggio DC, ovvero sul saggio di Lowry.

Quest'ultimo prevede due step per la comparsa della colorazione:

1. La reazione fra le proteine ed il tartrato di rame in mezzo alcalino;

2. La riduzione del reagente Folin ad opera delle stesse proteine.

La reazione avviene principalmente a carico degli amminoacidi tirosina e triptofano, e in maniera minore di cistina, cisteina e istidina. Le proteine attuano una riduzione del reagente Folin per perdita di 1,2 o 3 atomi di ossigeno, producendo così una o più specie ridotte che assumono la caratteristica colorazione blu, con un massimo di assorbanza a 750 nm ed un minimo a 405 nm.

L'assorbanza può essere misurata con sicurezza nell'intervallo 650-750 nm.

L'RC-DC si basa sul protocollo di Lowry, ma in più offre:

- Compatibilità fra agenti riducenti e detergenti;
- Compatibilità con miscele complesse di reagenti.

Il kit Biorad è composto da:

- Reagente A: soluzione alcalina di tartrato di rame.
- Reagente B: reagente Folin.
- Reagente S: soluzione surfactante.
- Reagente I: agente riducente.
- Reagente II: agente riducente.

La concentrazione proteica del campione incognito viene letta in relazione ad uno standard, rappresentato da albumina sierica bovina (BSA).

Tuttavia, la presenza di altre sostanze può cambiare la risposta della proteina ai reagenti del saggio, perciò è necessario che lo standard sia preparato nel solito tampone in cui si trova il campione proteico di interesse.

Nel nostro caso la BSA è risospesa nella soluzione di sospensione (SS).

Il dosaggio RC-DC viene effettuato in doppio, a temperatura ambiente, secondo i seguenti passaggi:

1. Preparazione di una retta di taratura utilizzando concentrazioni note e scalari di BSA, secondo la Tabella n.3. Le concentrazioni dello standard devono abbracciare l'intervallo di sensibilità del metodo.
2. Preparazione del campione, diluito 1:5, per avere un volume finale di 25 µl.

3. Aggiunta di 125 µl di Reagente I agli standard e al campione. Si agita, si incuba per 1 minuto.
4. Aggiunta di 125 µl di Reagente II agli standard e al campione. Si agita e si incuba per 1 minuto.
5. Centrifuga a 1200 g, per 5 minuti, a 20 °C. Poi si aspira il sovranatante.
6. Aggiunta di 125 µl di Reagente I agli standard e al campione. Si agita, si incuba per 1 minuto.
7. Aggiunta di 40 µl di Reagente II agli standard e al campione. Si agita e si incuba per 1 minuto.
8. Centrifuga a 1200 g, per 5 minuti, a 20 °C. Poi si aspira il sovrinatante.
9. Aggiunta di 127 µl di Soluzione A* (20 µl di Reagente S + 1000 µl di Reagente A). Si agita e si incuba per 5 minuti.
10. Aggiunta di 1 ml di Reagente B. Si agita e si incuba per 15 minuti.
11. Lettura a 750 nm allo spettrofotometro.

	RS	BSA	[BSA]µg/ml	µg BSA
Bianco	25 µl	/	0	0
1	21,7 µl	3,3 µl	0,2	5
2	18,3 µl	7,6 µl	0,4	10
3	11,7 µl	13,3 µl	0,8	20
4	/	25 µl	1,5	37,5

Tabella n. 3

I valori di assorbanza ottenuti per le concentrazioni note di proteina standard vengono utilizzati per costruire la retta di taratura. L'equazione della retta è: $y = mx$, dove y corrisponde al valore di assorbanza ed m alla pendenza della retta.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

Dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica del campione incognito.

3.3 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

3.3.1 Reidratazione delle strip

Le strip prefabbricate per la prima dimensione sono costituite da gel di immobiline che vengono venduti disidratati e congelati a -20 °C, per cui il primo passaggio da compiere, prima di eseguire l'isoelettrofocalizzazione, è la reidratazione delle strip.

Viene prelevato un volume di campione corrispondente a 150 µg di proteine, al quale si aggiunge Rehydration Solution fino ad un volume di 400 µl totali. Infine, si inserisce l'1,2% di anfoliti.

Si carica il campione nell'IPG Reswelling Tray, si appoggia sopra la strip e si copre con un'opportuna quantità di olio minerale, che minimizza l'evaporazione del campione e la cristallizzazione dell'urea.

Quindi si lascia ad idratare overnight.

3.3.2 Prima dimensione – isoelettrofocalizzazione (IEF)

Terminata la fase di reidratazione, le strip vengono trasferite sul supporto per la prima dimensione, il Manifold, fatto in ceramica d'ossido di alluminio.

Il Manifold viene prima riempito con 100 ml di olio minerale, poi vi si posizionano le strip, con il gel rivolto verso l'alto.

Alle estremità delle strip, su anodo e catodo, si posizionano gli electrode pads di carta per IEF, preventivamente imbevuti di 150 µl di acqua MilliQ. I pads servono ad assorbire l'eccesso di acqua e sali, preservando gli elettrodi dalla precipitazione degli ioni.

Sopra i pads vengono fissati gli elettrodi, in modo che aderiscano anche alle strip sottostanti.

Infine si avvia il programma preimpostato per l'IEF del campione.

Una volta raggiunti i 75.000 Vhrs, dopo circa 15h, la corsa si ferma.

3.3.3 Equilibratura delle strip

Terminata la prima dimensione si passa alla fase di equilibratura. Essa prevede due step consecutivi:

1. trattamento delle strip con 10 ml di SDS equilibration buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
2. trattamento delle strip con 10 ml di SDS equilibration buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente.

L'SDS equilibration buffer ha la seguente composizione:

- SDS (sodio dodecil-solfato) 2%: è l'agente denaturante che conferisce carica negativa alle proteine. L'SDS si lega alle proteine in quantità proporzionale alla loro massa; in questo modo la separazione delle proteine nella seconda dimensione avviene in base al loro PM.
- Tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,8: mantiene il range di pH adatto all'elettroforesi.
- Urea 6M e glicerolo 30%: queste sostanze si usano per ridurre il fenomeno dell'elettroendosmosi e migliorano il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione.

L'elettroendosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione.

- Blu di bromofenolo 0,002%: usato per la sua azione colorante, permette di seguire la corsa elettroforetica.

All'equilibration buffer si aggiungono, alternatamente:

- DTT (ditiotreitolo) 1%: agente riducente; preserva le proteine nella loro forma ridotta.
- IAA (iodoacetammide) 2,5%: agente alchilante nei confronti dei gruppi tiolici delle proteine, previene la riossidazione delle stesse durante l'elettroforesi.

3.3.4 Preparazione dei gel

La seconda dimensione prevede una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide.

La grandezza delle maglie del gel dipende dalla concentrazione di acrilammide; concentrazioni più basse danno un gel con maglie più larghe, che separa bene proteine ad alto PM, mentre concentrazioni maggiori danno un gel con maglie più strette, che separa meglio le proteine più piccole.

Nel nostro esperimento, i gel hanno una concentrazione del 12,5%.

I gel di poliacrilammide vengono preparati contemporaneamente, al fine di minimizzare la variabilità sperimentale ed aumentare la riproducibilità dell'esperimento.

Il gel si forma dalla reazione di polimerizzazione dell'acrilammide, un monomero solubile in acqua, in modo da formare un reticolo tridimensionale.

La polimerizzazione avviene per mezzo di una reazione radicalica innescata da due molecole che funzionano da catalizzatori: la N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TEMED) e l'ammonio persolfato (APS).

Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero, il quale reagisce con l'acrilammide e dà inizio alla reazione a catena.

La reazione di polimerizzazione viene inibita dall'ossigeno dell'aria, altamente reattivo verso i radicali liberi, per cui il gel viene colato nell'intercapedine ricavata due lastre di vetro e ricoperto da un piccolo strato di butanolo, che impedisce il contatto con l'O₂.

Ciascun gel ha la seguente composizione:

- Tris HCl pH 8,8 15 ml
- Acrilammide 30% 25 ml:
- H₂O mQ 19,4 ml
- APS 10% 0,6 ml.
- TEMED 24 µl.

3.3.5 Seconda dimensione – SDS-PAGE

Una volta preparati i gel, si posizionano le strip sul lato superiore di essi, in modo che aderiscano bene su tutta la lunghezza.

Le strip vengono sigillate con una soluzione di agarosio allo 0,1% in Running Buffer.

Si posizionano i gel nella camera elettroforetica, che viene riempita con Running Buffer 10X (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) diluito 1:10.

Si collega l'alimentatore e si fa partire la corsa, impostando un amperaggio iniziale di 40 mA per 15 minuti, poi di 40 mA fino alla fine della corsa.

La corsa finisce nel momento in cui il fronte, evidenziato dal blu di bromofenolo, esce dal fondo del gel.

3.4 WESTERN BLOT (WB)

Il Western Blot è una tecnica immunochimica che si basa sulla specificità della reazione antigene-anticorpo per l'identificazione di una proteina-target all'interno di una miscela più complessa.

Spesso vengono utilizzati due anticorpi, come nel nostro caso: l'anticorpo primario è diretto verso la proteina di interesse, mentre l'anticorpo secondario si lega al primario. L'anticorpo secondario porta legato nella sua struttura un enzima responsabile della reazione di chemiluminescenza, necessaria per la rivelazione del segnale.

Il WB è eseguito seguendo tre passaggi principali:

1. trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilammide ad una membrana di nitrocellulosa;
2. reazione immuno-mediata;
3. rivelazione enzimatica delle proteine di interesse.

3.4.1 Elettroblot su membrana di nitrocellulosa

Il primo step del WB consiste nel trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa, che rende fissa la posizione della proteina e la rende più accessibile all'anticorpo con cui verrà trattata.

Il trasferimento avviene grazie al passaggio di corrente e mantiene la separazione proteica avvenuta durante l'elettroforesi bidimensionale.

Terminata la seconda dimensione si tolgono i gel dai supporti e si procede alla creazione di un sandwich utilizzando il kit prefabbricato della Bio-Rad.

Il sandwich è formato, in ordine, da: carta imbevuta di soluzione di trasferimento, gel, membrana di nitrocellulosa, carta.

Prima di posizionare il secondo strato di carta è necessario eliminare con un rullo le bolle d'aria che si formano fra la nitrocellulosa e il gel.

Si inserisce il sandwich nella cassetta dell'apparecchio per il blot e si avvia il programma preimpostato, che prevede un amperaggio di 2,5 A per 15 minuti.

3.4.2 Colorazione con rutenio

Terminato il blotting si effettua la colorazione con rutenio, che prevede diversi passaggi:

- Trattamento della membrana di nitrocellulosa con una soluzione di fixing (AcOH al 7%, MeOH al 10%, H₂O fino a volume);
- 4 lavaggi da 5 minuti ciascuno con H₂O;
- Colorazione con una soluzione contenente rutenio (RuBP) 1 µM, acido fosforico 1% ed etanolo assoluto 30%. Le membrane di nitrocellulosa vengono messe in agitazione per 15 minuti a temperatura ambiente, coperte con un sacco nero perché il rutenio è fotosensibile.
- 7 lavaggi da 1 minuto con H₂O;
- Acquisizione dei risultati con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.4.3 Fase di blocking

Per le sue caratteristiche, tutta la membrana di nitrocellulosa è altamente ricettiva alle proteine ed è in grado di legarle anche per semplice contatto. Il blocking dei legami non specifici serve a prevenire l'interazione idrofobica dell'anticorpo con i siti liberi della nitrocellulosa e fa sì che l'anticorpo si leghi solo al proprio antigene.

Perciò, prima della reazione con gli anticorpi, si sottopone la membrana di nitrocellulosa al trattamento con una soluzione PBS-Milk, che ha la seguente composizione:

- Milk 3%
- Tween 0,2%
- PBS pH 7,5 fino a volume ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, NaCl 0,9%, H_2O per preparazioni biologiche fino a volume).

La miscela proteica si va a legare su tutte le zone della membrana di nitrocellulosa su cui non sono legate le proteine provenienti dal gel, saturando i siti aspecifici.

3.4.4 Anticorpi

Il trattamento con gli anticorpi viene effettuato secondo le seguenti fasi:

- Incubazione della membrana di nitrocellulosa per 2 ore con una miscela di PBS-BSA 5% - TWEEN 0,1% addizionata dell'*anticorpo primario*, l'anti-lisina acetilata in diluizione 1:1000.

L'anticorpo utilizzato in questo esperimento va a legarsi specificamente alle lisine acetilate delle proteine del campione.

- 4 lavaggi da 10 minuti con PBS-Milk-TWEEN. La nitrocellulosa viene lavata per rimuovere l'anticorpo non legato, oppure legato in modo aspecifico alla membrana di nitrocellulosa.
- Incubazione della nitrocellulosa per 1 ora con l'*anticorpo secondario*: anti-mouse (Perkin Elmer) in diluizione 1:10.000 in PBS-Milk-TWEEN. L'anticorpo secondario porta legato l'HRP (Horseradish Peroxidase).
- 4 lavaggi da 10 minuti con PBS-Milk-TWEEN;
- 2 lavaggi da 5 minuti con PBS;
- 1 lavaggio da 1 minuto con H_2O .

3.4.5 Rivelazione enzimatica delle proteine di interesse

Le proteine acetilate vengono rivelate tramite chemiluminescenza, mediante l'uso di Luminolo (ECL Kit, Perkin Elmer), che esibisce la sua luminescenza se trattato con un agente ossidante.

La membrana di nitrocellulosa viene dunque incubata per 1 minuto con luminolo e ossidante, al buio.

Al termine dell'incubazione si trasferisce la nitrocellulosa su un piatto di sviluppo e si acquisisce l'immagine tramite ImageQuant LAS 4000.

3.5 ACQUISIZIONE E ANALISI DELLE MEMBRANE DI NITROCELLULOSA

Le immagini delle nitrocellulose sono acquisite con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare), che acquisisce le immagini in fluorescenza, e analizzate con il programma ProgenesiSame Spot (Total Lab).

Tramite questo software è possibile selezionare gli spot di interesse, sovrapporli agli spot ottenuti dagli altri campioni, definirne il numero e l'area.

Si individuano quattro classi:

1. controllo;
2. metformina;
3. citochine;
4. citochine + metformina;

Il programma permette di confrontare le varie classi, evidenziando differenze per quanto riguarda la presenza/assenza di determinate proteine o una loro variazione quantitativa.

È possibile in questo modo confrontare le differenze negli spot acetilati nei vari campioni.

CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 RISULTATI

4.1.1 Determinazione dell'acetilazione di isole pancreatiche umane tramite analisi bidimensionale e western blot.

Al fine di caratterizzare il pattern delle proteine acetilate nelle isole pancreatiche umane, abbiamo effettuato l'elettroforesi bidimensionale accoppiata al western blot, utilizzando un anticorpo specifico per le lisine acetilate delle proteine. Le isole umane sono state ottenute da 3 donatori sani, non diabetici. Approssimativamente, abbiamo ottenuto 350 μg di proteine da ogni estrazione. Data la forte variabilità tra soggetti diversi, i campioni non sono stati uniti per formare dei pool ma sono stati analizzati individualmente. Dall'esame del profilo elettroforetico globale è possibile individuare una media di circa 1.000 spots. Un'immagine rappresentativa del profilo proteico ottenuto su gel con l'elettroforesi bidimensionale è riportata in figura 3.

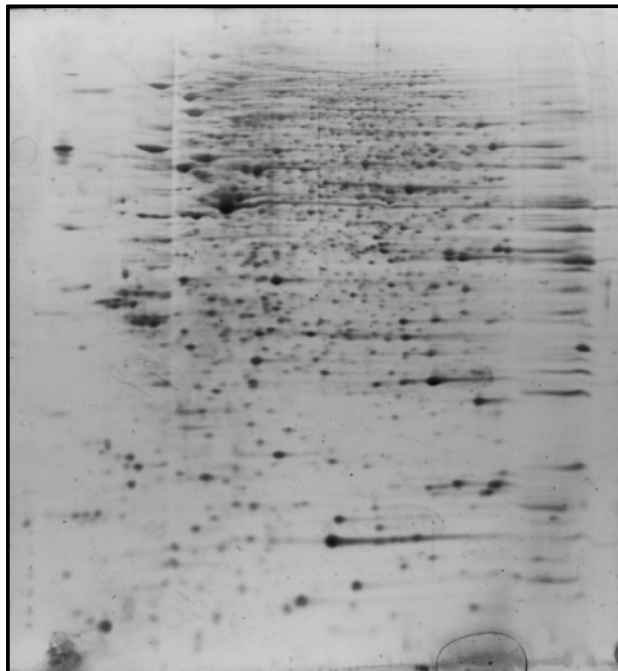


Figura 3 - Gel di acrilamide col pattern proteico rappresentativo delle isole umane ottenuto con elettroforesi bidimensionale.

La figura 4 raffigura invece la membrana di nitrocellulosa dopo il trasferimento del pattern proteico bidimensionale e colorata al rutenio (fig. 4A) e la stessa membrana dopo la rilevazione degli immunocomplessi (fig. 4B).

Gli spots acetilati sono risultati essere 149.

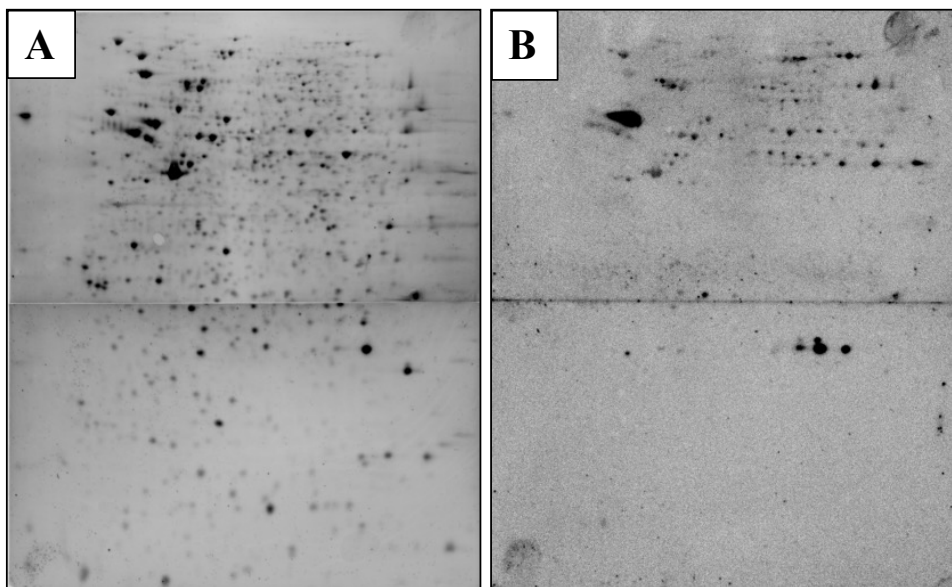


Fig. 4 - Membrana di nitrocellulosa dopo il trasferimento del pattern proteico bidimensionale e colorata al rutenio (A) e la stessa membrana dopo la rilevazione degli immunocomplessi (B).

La colorazione al rutenio della nitrocellulosa, subito dopo il trasferimento delle proteine, ci ha consentito di confrontarla perfettamente con l'immagine della stessa membrana ottenuta dopo la rilevazione delle proteine acetilate. In questo modo le 149 proteine acetilate possono essere ritrovate nel pattern globale e quindi è stato possibile ritrovarle anche nel gel da cui gli spot selezionati per l'identificazione possono essere tagliati per la spettrometria di massa.

4.1.2 Trattamento delle isole con citochine e protezione con metformina.

Per studiare gli effetti del trattamento con citochine sull'espressione delle proteine pancreatiche, è stato condotto un trattamento delle isole con citochine (50 U/ml IL-1 β , 1000 U/ml IFN- γ) per 24 ore. Contemporaneamente, è stato eseguito un esperimento in cui una concentrazione 2,4 mg/ml di metformina veniva aggiunta alle cellule (con o senza citochine) al fine di valutare gli effetti di protezione del

farmaco. Pertanto, per ogni esperimento, avevamo 4 condizioni: controllo, citochine, metformina, citochine+metformina.

4.1.3 Analisi comparativa dei profili bidimensionali delle proteine acetilate prima e dopo trattamento e protezione.

L'analisi bidimensionale è stata condotta su estratti cellulari ottenuti da isole pancreatiche umane nelle diverse condizioni di trattamento. L'analisi comparativa è stata condotta utilizzando il programma Progenesis Same Spots (TotalLab) ed i risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 4, 5, 6 e fig. 5 e 6. Il volume di ogni spot acetilato, ottenuto dopo il rilevamento degli immunocomplessi, è stato normalizzato con il contenuto proteico globale ottenuto dalla colorazione al rutenio delle membrane corrispondenti. Infatti, nel valutare le intensità degli spot acetilati, è indispensabile che venga effettuata una normalizzazione sul contenuto proteico effettivamente presente sulla membrana. Questo serve ad evitare variazioni di intensità del segnale dovute a variazioni nella quantità effettiva di proteine caricate nell'esperimento piuttosto che a reali variazioni nell'acetilazione.

La significatività delle differenze tra i volumi normalizzati per ogni spot acetilato è stata calcolata con il t-test di Student accoppiato. Quindi le proteine di interesse sono state tagliate dal gel e inviate al laboratorio di Proteomica e Metabonomica della Fondazione Santa Lucia (Roma; Prof. Urbani) per l'identificazione tramite Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS).

Al momento siamo in attesa dei risultati.

Tabella 4: Controllo vs citochine.				
M, media; DS, deviazione standard				
<i>n</i>^o	CTRL M±DS	Citochine M±DS	Fold cito/ctrl	p-value
797	0,071±0,042	0,024±0,002	0,3	0,05
927	0,039±0,004	0,020±0,002	0,5	0,02
992	0,035±0,010	0,013±0,003	0,4	0,05
4279	0,045±0,019	0,020±0,004	0,4	0,05
4323	0,242±0,040	0,287±0,036	1,2	0,05
4337	0,134±0,015	0,212±0,028	1,6	0,05
4349	0,065±0,008	0,044±0,016	0,7	0,04
4363	0,033±0,008	0,010±0,001	0,3	0,05

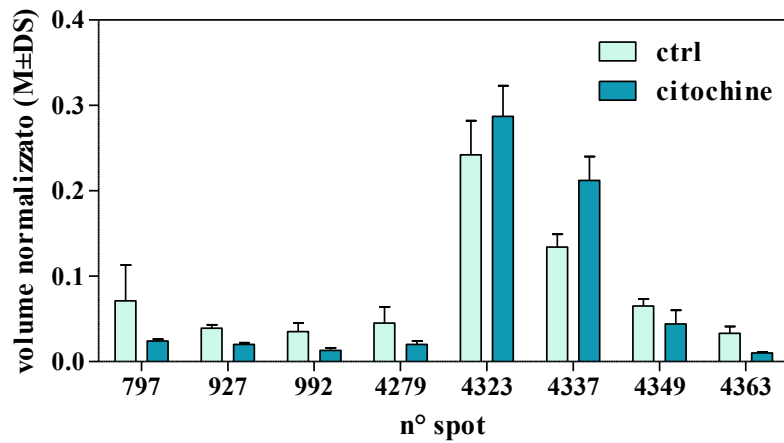


Fig. 5 - Istogramma relativo al volume normalizzato degli spots differenzialmente espressi con variazione significativa ($p\text{-value} \leq 0,05$) nel confronto controllo vs trattamento con citochine.

Tabella 5: Controllo vs metformina.
M, media; DS, deviazione standard

n°	CTRL M±DS	metformina M±DS	Fold cito/ctrl	p-value
992	0,035±0,010	0,065±0,003	1,9	0,04

Tabella 6: Controllo vs metformina+citochine.
M, media; DS, deviazione standard

n°	CTRL M±DS	Metf+cito M±DS	Fold Metf+cito/ctrl	p-value
927	0,039±0,004	0,071±0,003	1,8	0,04
2225	0,122±0,019	0,238±0,005	2,0	0,01
4337	0,134±0,015	0,390±0,039	2,9	0,01
4349	0,065±0,008	0,090±0,010	1,4	0,01
4323	0,242±0,040	0,509±0,064	2,1	0,02

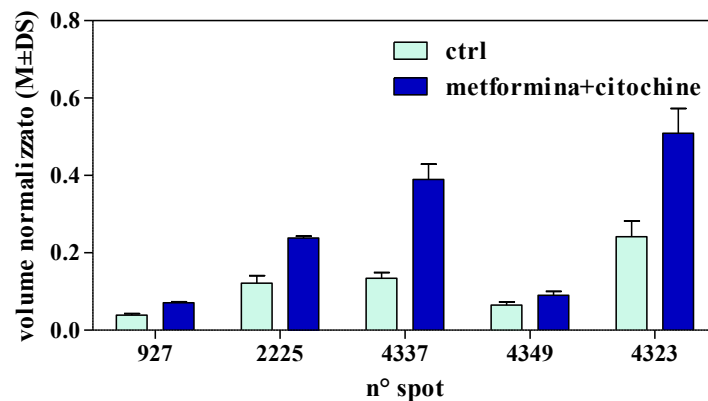


Fig. 6 - Istogramma relativo al volume normalizzato degli spots differenzialmente espressi con variazione significativa ($p\text{-value} \leq 0,05$) nel confronto controllo vs trattamento con metformina+citochine.

4.2 DISCUSSIONE

La disfunzione e l'apoptosi delle cellule beta pancreatiche sono gli eventi decisivi nella progressione del DMT2, ma i meccanismi che stanno alla base di tali eventi non sono ancora ben conosciuti. È noto come il rischio di insorgenza di DMT2 sia influenzato da fattori ambientali, quali una dieta ricca di grassi saturi e uno stile di vita sedentario, in particolare se combinati ad una predisposizione genetica.

Negli ultimi anni, oltre al noto coinvolgimento del processo infiammatorio nella patogenesi del DMT1, è emersa l'importanza delle citochine pro-infiammatorie (come IL-1 β , IFN- γ e TNF- α) anche nel DMT2 ⁽¹³³⁾ ⁽¹³⁴⁾. A seconda del loro ruolo nella regolazione della funzione delle cellule pancreatiche, alcune citochine sono protettive, mentre altre possono essere dannose. Nello stato di insulino-resistenza, i livelli di citochine dannose nelle cellule beta delle isole aumentano, mentre i livelli di citochine protettive diminuiscono. Questo anomalo sbilanciamento nelle citochine, locali e circolanti, svolge un ruolo importante nello scatenare la disfunzione delle cellule beta ed il DMT2. Infatti, l'esposizione cronica di isole ad alcune citochine come IL-1 β , IFN- γ , e TNF- α inibisce la secrezione di insulina e induce apoptosi delle cellule beta ⁽¹³⁵⁾. Inoltre, l'effetto dannoso di queste citochine sulla funzione e sulla sopravvivenza delle cellule beta sembra essere mediato da una complessa rete di geni sensibili alle citochine ⁽¹³⁶⁾. Il meccanismo molecolare che è alla base di quest'alterazione non è però noto.

Studi recenti condotti nei nostri laboratori su cellule INS-1E di ratto e su isole pancreatiche umane, hanno evidenziato alterazioni nell'acetilazione di proteine in

seguito a trattamento con palmitato. Abbiamo quindi voluto esaminare un'eventuale implicazione anche delle citochine nell'alterazione dell'acetilazione sulle proteine estratte da cellule beta pancreatiche. Inoltre, abbiamo investigato se il trattamento con metformina potesse essere mediato anch'esso da una regolazione dell'acetilazione. Se l'esposizione delle isole alla sola metformina non induce cambiamenti significativi (tranne per lo spot 992), dal confronto del controllo con le isole trattate con citochine è emersa invece in queste ultime una generale down-regolazione dell'acetilazione, come è evidente nella fig. 7.

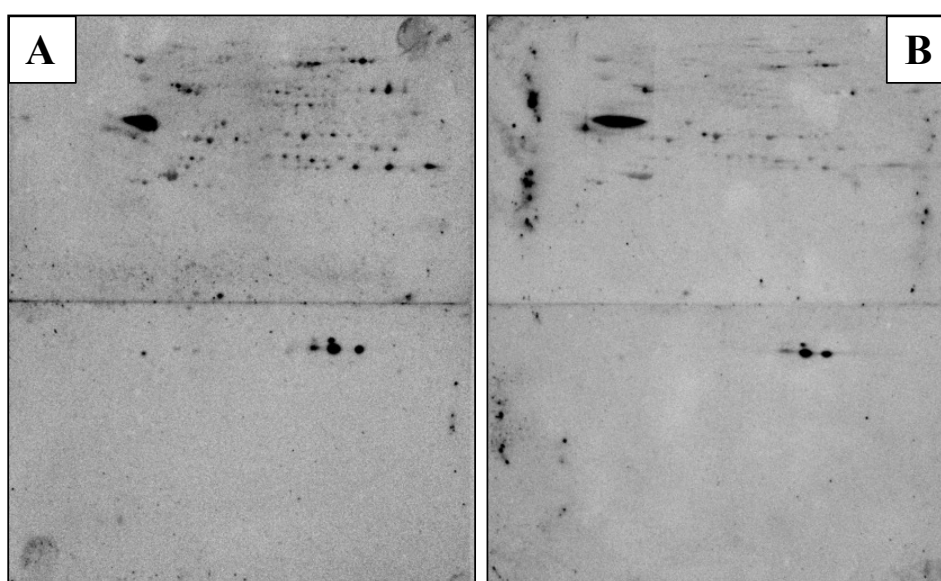


Fig.7: In figura A è riportato il pattern rappresentativo dell'acetilazione nelle isole umane di controllo; in figura B, è rappresentato quello delle isole trattate con citochine.

Dei 149 spots acetilati totali, 8 mostravano inoltre una variazione statisticamente significativa ($p \leq 0,05$; tabella 4, figura 5). Dal confronto delle attuali mappe bidimensionali con quelle ottenute dallo studio precedente sul palmitato, abbiamo potuto risalire all'identità di due di questi spots (n° 4323, 4337) che corrispondono alla superossido dismutasi, e sono gli unici spots la cui acetilazione aumenta a seguito del trattamento. Questo enzima è importante per la distruzione dei radicali anionici, e la sua attività viene fortemente inibita dall'acetilazione, con un conseguente aumento di specie reattive dell'ossigeno che posso indurre apoptosi delle cellule beta ⁽¹³⁷⁾. Pertanto questo potrebbe suggerire che l'effetto negativo delle citochine sia mediato dall'acetilazione, e quindi inibizione, di enzimi utili come antiossidanti.

Inoltre, possiamo vedere come, per gli spots down-regolati in maniera significativa in presenza di citochine (n° 992, 797, 927, 4279 e 4349), il trattamento con metformina favorisca un ritorno dell'acetilazione a livelli basali (fig. 8).

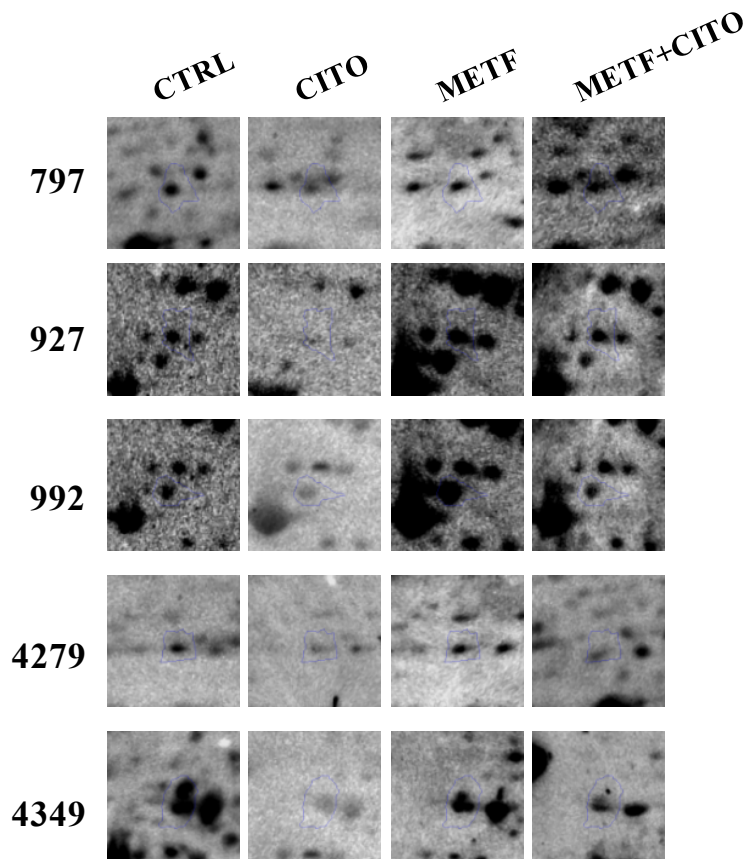


Fig. 8: Immagini rappresentative di alcuni spots differenzialmente espressi tra i diversi trattamenti.

L'identificazione successiva degli spots proteici tramite spettrometria di massa ci permetterà di individuare le altre proteine che rispondono allo stress infiammatorio e che risultano inoltre sensibili a protezione con metformina. Questo potrà aiutare nella comprensione del ruolo delle modificazioni post-traduzionali nella progressiva alterazione della funzionalità delle cellule beta in risposta al processo infiammatorio e nella risposta a farmaci utilizzati nel trattamento del diabete.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Harrison, Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo – *Principi di medicina interna*. Casa Editrice Ambrosiana, Edizione XVIII 2012.
- (2) American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, suppl. American Diabetes Association: Clinical Practice. 29.1 (Jan 2006): S43-8.
- (3) M. Gesi, M. Ferrucci, I. Ghelarducci – *Anatomia del corpo umano*. Editore CDL Libri.
- (4) S. standring – *Anatomia del Gray. Le basi anatomiche per la pratica clinica*. Elsevier Editore 2009.
- (5) Martini Fredric H., Timmons Michael J., Tallitsch Robert B. – *Anatomia Umana*. Edises Editore, Edizione V, 2012.
- (6) Berne, Levy, Koeppen, Stanton, Mazoni – *Principi di fisiologia di Berne e Levy*. Editore Elvisier – Masson, Edizione IV 2007. Capitolo 43
- (7) Cindy L. Stanfield – *Fisiologia*, Edises Editore, Edizione IV, 2012.
- (8) J C Henquin. *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose*. *Diabetes* 2000 Nov; 49(11): 1751-1760.
- (9) Berne, Levy, Koeppen, Stanton, Mazoni – *Principi di fisiologia di Berne e Levy*. Editore Elvisier – Masson, Edizione IV 2007. Capitolo 43
- (10) Maechler P, Kennedy ED, Pozzan T, *et al.* – *Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic β -cells*. *EMBO J* 1997; **16**: 3833–3841.
- (11) Mitsushisa Komatsu, Masahiro Takei, Hiroaki Ishi, Yoshihiko Sato – *Glucose-stimulated insulin secretion: A new perspective*. *JDI Issue 6* November 2013 pages 511-516.
- (12) Lise L. Kjemis, Jens J. Holst, Aage Vølund, Sten Madsbad. *The Influence of GLP-1 on Glucose-Stimulated Insulin Secretion*. *Diabetes* Feb 2003, 52 (2) 380-386; DOI: 10.2337/diabetes.52.2.380
- (13) Casella C., Taglietti V. – *Principi di fisiologia vol I e II*. La Goliardica Pavese Editore.

- (14) American Diabetes Association – *Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care 2004 Jan; 27 (suppl. 1): S5-S10.
- (15) Alberti K.G., Zimmet P.Z. (1998). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med. 15, 539–553
- (16) www.diabetesatlas.org
- (17) American Diabetes Association – *2 Classification and Diagnosis of Diabetes*. Diabetes Care 2016 Jan; 39 (suppl.1) S13-S22.
- (18) Edelman D, Olsen MK, Dudley TK, Harris AC, Oddone EZ : *Utility of hemoglobin A1c in predicting diabetes risk*. J Gen Intern Med 2004; 19: 1175– 1180
- (19) Sato KK, Hayashi T, Harita N, Yoneda T, Nakamura Y, Endo G, Kambe H – *Combined measurement of fasting plasma glucose and A1C is effective for the prediction of type 2 diabetes: the Kansai Healthcare Study*. Diabetes Care 2009; 32: 644– 646
- (20) K.G.G.M. Alberti, P.Z. Zimmet – *Definition Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. Diabetic Medicine Volume 15 Issue 7 July 1998 pages 539-553.
- (21) Felig et al., *Metabolismo dei substrati energetici, Endocrinologia e metabolismo*, Mc Graw Hill, II ed.
- (22) Saltier AL et al., *Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature; 414: 799-806, 2001
- (23) Pessin et al., *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J Clin Invest; 106: 165-69 2000
- (24) Polonsky KS, Sturis J, Bell JI: *Non-insulin dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance*. N Engl J Med 334 :777 –783,1996
- (25) Weyer C, Bogardus C, Mott D, Prateley R: *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Invest 104 :787 –794,1999
- (26) Saltier AL et al., *Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid*

metabolism. Nature; 414: 799-806, 2001

- (27) Harrison, Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo – *Principi di medicina interna*. Casa Editrice Ambrosiana, Edizione XVIII 2012.
- (28) J.P. Assal, L. Groop – Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. WHO 1999
- (29) Ilias Migdalis, David Leslie, Anastasia Mavrogiannaki, Nikolaos Papanas, Paul Valensi, and Helen Vlassara. *Diabetes Mellitus 2014*. International Journal of Endocrinology, vol. 2015, Article ID 845759, 4 pages, 2015. doi:10.1155/2015/845759
- (30) Harrison, Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo – *Principi di medicina interna*. Casa Editrice Ambrosiana, Edizione XVIII 2012.
- (31) Bertram G. Katzung. *Farmacologia generale e clinica*. Piccin-Nuova Editore, IX edizione.
- (32) E. Rossi, V. Cuomo, C. Riccardi. *Farmacologia. Principi di base e applicazioni terapeutiche*. Edizioni Minerva Medica, Torino 2005.
- (33) K. Alexandraky, C. Piperi, C. Kalofoutis, J. Singh, A. Alveras, A. Kalofoutis – *Inflammatory Process in Type Two Diabetes. The Role of Citokynes*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1048: 89-117 (2006) New York Academy of Sciences.
- (34) Grundy S.M. (2007). *Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor*. J Clin Endocrinol Metab. 92, 399–404
- (35) Huang, Paul L. *A Comprehensive Definition for Metabolic Syndrome*. Disease Models & Mechanisms 2.5-6 (2009): 231–237. PMC. Web. 16 Sept. 2016.
- (36) Scott M. Grundy, H. Bryan Brewer, James I. Cleeman, Sidney C. Smith, Claude Lenfant. – *Definition of Metabolic Syndrome*. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition.
- (37) Park, Yong-Woo et al. “*The Metabolic Syndrome: Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third*

National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.” *Archives of internal medicine* 163.4 (2003): 427–436. Print.

- (38) National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106, 3143–3421
- (39) Kotronen, A., Seppala-Lindroos, A., Bergholm, R., and Yki-Jarvinen, H. (2008). *Tissue specificity of insulin-resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome.* *Diabetologia* 51, (130-138)
- (40) Scott M. Grundy, H. Bryan Brewer, James I. Cleeman, Sidney C. Smith, Claude Lenfant. – *Definition of Metabolic Syndrome.* Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition.
- (41) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.
- (42) www.idf.org
- (43) JAMA - Journal of the American Medical Association. *High prevalence of metabolic syndrome found in U.S.* ScienceDaily. ScienceDaily, 19 May 2015.
- (44) Mozumdar A, Liguori G. *Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among US adults: NHANES III to NHANES 1999-2006.* *Diabetes Care.* 2011;34(1):216-219.
- (45) Haslam DW e James WP, *Obesity*, in *Lancet*, vol. 366, n° 9492, 2005, pp. 1197–209.
- (46) www.who.int/
- (47) Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. *Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012.* *JAMA.* 2014;311(8):806-814.

- (48) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. *Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity*. Nat Med. 1996 Jul; 2(7):800-3.
- (49) J.P. Desprès and I. Lemieux – *Abdominal Obesity and Metabolic Syndrome*. Nature 444, 881-887 (14 December 2006).
- (50) Jean-Pierre Desprès – *Is visceral obesity the cause of metabolic syndrome?* Annals Of Medicine, vol. 38, Iss. 1, 2006.
- (51) P. Magni, M. Ruscica, R. Verna, M.M. Corsi – *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Medical Systems.
- (52) *The relationship of obesity to the metabolic syndrome*. Lebovitz HE. Int J Clin Pract Suppl. 2003 Mar; (134):18-27.
- (53) E. Bonora, C. Brangani, I. Pichiri – *Obesità addominale e diabete*. AIM Publishing srl, 2008.
- (54) Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarin L, DeFronzo R, Cusi K. *A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes*. Diabetes. 2003 Oct; 52(10):2461-74).
- (55) www.istat.it/it/archivio/71090
- (56) K. Alexandraki, C. Piperi, C. Kalofoutis, J. Singh, A. Alveras, A. Kalofoutis – *Inflammatory Process in Type Two Diabetes. The Role of Cytokines*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1048: 89-117 (2006) New York Academy of Sciences.
- (57) Susan E. Wozniak, Laura L. Gee, Mitchell S. Wachtel, Eldo E. Frezza – *Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article*. Dig Dis Sci (2009) 54:1847
- (58) Ouchi, Noriyuki et al. *Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease*. Nature reviews. Immunology 11.2 (2011): 85–97. PMC. Web. 16 Sept. 2016.
- (59) Weisberg, S. P. et al. 2003. *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J. Clin. Invest. 112: 1796-1808

- (60) Hotamisligil GS – *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*. 2006 Dec 14; 444(7121):860-7.
- (61) Berg AH, Scherer PE - *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. *Circ Res*. 2005 May 13; 96(9):939-49
- (62) Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B - *Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr; 90(4):2282-9.
- (63) Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N - *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Sep; 28(9):1654-9.
- (64) Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM - *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. *JAMA*. 2001 Jul 18; 286(3):327-34.
- (65) Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB - *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults*. *JAMA*. 1999 Dec 8; 282(22):2131-5.
- (66) Ouchi, Noriyuki et al. *Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease*. *Nature reviews. Immunology* 11.2 (2011): 85–97. *PMC*. Web. 16 Sept. 2016.
- (67) Steven E. Kahn, Rebecca L. Hull and Kristina M. Utzschneider. *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. *Nature* 444, 840-846 (14 December 2006)
- (68) Enzo Bonora, Corinna Brangani, Isabella Pichiri. *Obesità addominale e diabete*. © 2008 AIM Publishing Srl.
- (69) Ouchi N1, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85-97. doi: 10.1038/nri2921. Epub 2011 Jan 21.
- (70) M. Y. Donath, M. Böni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, P. A. Halban, J. A. Eshes. *Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin,*

regulation and function. Trends in Endocrinology and Metabolism. Vol. 21 No.5

- (71) K. Alexandraki, C. Piperi, C. Kalafoutis, J. Singh, A. Alveras, A. Kalafoutis. *Inflammatory Process in Type 2 Diabetes. The Role of Cytokines*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1084: 89-117 (2006)
- (72) C. Wang, Y. Guan, J. Yang. *Cytokines in the Progression of Pancreatic β -cell Dysfunction*. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Endocrinology. Volume 2010, Article ID 515136. Doi: 10.1155/2010/515136.
- (73) S.D Covey, R. D. Wideman, C. MacDonald et al. *The pancreatic β -cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose omeostasis*. Cell Metabolism, vol. 4 No. 4, pp. 291-302, 2006.
- (74) J. Harvey, F. McKenna, P.S. Herson, D. Spanswick and M. L. J. Ashford. *Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1*. Journal of Phisiology, vol 504, no. 3, pp. 527-535, 1997.
- (75) A. Z. Zhao, K. E. Bornfeldt and J. A. Beavo. *Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B*. *The Journal of Clinical Investigation*, vol 102, no. 5, pp- 869-873, 1998.
- (76) P. R. Huypens. *Leptin and adiponectin regulate compensatory beta-cell growth in accordance to overweight*. Medical Hypothesis, vol 68, no. 5, pp. 1134-1137, 2007.
- (77) T. Kadowaki and T. Yamauchi. *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocrine Reviews, vol. 26, no. 3, pp. 439-451, 2005.
- (78) C. Wang, Y. Guan, J. Yang. *Cytokines in the Progression of Pancreatic β -cell Dysfunction*. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Endocrinology. Volume 2010, Article ID 515136. Doi: 10.1155/2010/515136.
- (79) M. Nakata, T. Okada, K. Ozawa and T. Yada. *Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release*. Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 353, no. 4, pp. 1045-1051, 2007.

- (80) J. E. P. Brown, D. J. Onyago, M. Ramanjaneya et al. *Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic β -cell*. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 44, no. 3, pp. 171-178, 2010.
- (81) K. Alexandraki, C. Piperi, C. Kalafoutis, J. Singh, A. Alveras, A. Kalafoutis. *Inflammatory Process in Type 2 Diabetes. The Role of Cytokines*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1084: 89-117 (2006)
- (82) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. *Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*. 1993; 259:87-91.
- (83) Hotamisligil, G. S. et al. 1996. *IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosin kinase activity in TNF- α and obesity induced insulin resistance*. *Science* 271: 665-668.
- (84) Campbell, I. L. et al. 1989. *Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta-cell*. *J. Immunol.* 13: 43-53.
- (85) Carey, A. L. & M.A. Febbraio. 2004. *Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe?* *Diabetologia* 47: 1135-1142.
- (86) K. Maedler, P. Sergeev, F. Ris et al. *Glucose-induced β -cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 6, pp. 851-860, 2002.
- (87) N. Welsh, M. Cnop, I. Kharroubi et al. *Is there a role for locally produced Interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets?*. *Diabetes*, vol. 54, no. 11, pp. 3238-3244, 2005.
- (88) O. Osborn, S. E. Brownell, M. Sanchez-Alvarez, D. Salomon, H. Gram, and T. Bartfai. *Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity*. *Cytokine*, vol. 44, no. 1, pp. 141-148, 2008.
- (89) Viviane Zorzanelli Rocha, Eduardo J. Folco, Galina Sukhova, Koichi Shimizu, Israel Gotsman, Ashley H Vernon and Peter Libby. *Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation*. *Circulation Research*. 2008; 103: 467-476, published online before print August 28, 2008.

- (90) I. L. Campbell, A. Iscaro and L. C. Harrison. *IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans*. The Journal of Immunology October 1, 1988 vol. 141 no. 7 2325-2329.
- (91) Pravenec, Michal et al. *Direct Linkage of Mitochondrial Genome Variation to Risk Factors for Type 2 Diabetes in Conplastic Strains*. Genome Research 17.9 (2007): 1319–1326. PMC. Web. 20 Sept. 2016.
- (92) Maassen, J. Antonie et al. *Mitochondrial Diabetes*. Diabetes 53. suppl 1 (2004): S103-S109. Web.20 Sept2016.
- (93) van Den Ouweland JM, Lemkes HH, Trembath RC, Ross R, Velho G, Cohen D, Froguel P, Maassen JA: *Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene*. Diabetes 43 :746 – 751, 1994.
- (94) Saker PJ, Hattersley AT, Barrow B, Hammersley MS, Horton V, Gillmer MD, Turner RC: *UKPDS 21: low prevalence of the mitochondrial transfer RNA gene (tRNA(Leu(UUR)) mutation at position 3243bp in UK Caucasian type 2 diabetic patients*. Diabet Med 14 :42 –45,1997
- (95) Petersen K.F. et al., *Impaired mitochondrial activity in insulin resistance offspring of patients with type 2 diabetes*. N. Engl. J. Med. 350 (7): 664-71, 2004
- (96) Kelley D.E. et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 51: 2944-50, 2002
- (97) Morino K. et al., *Molecular mechanism of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes 55 (SUPPL 2): S9-S15 41, 2006
- (98) Klaus-Dieter Gerbitz, Klaus Gempel and Dieter Brdiczka. *Mitochondria and Diabetes: Genetic, Biochemical, and Clinical Implications of the Cellular Energy Circuit*. Diabetes 1996 Feb; 45(2): 113-126
- (100) Murphy, Michael P.. *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochemical Journal 417.1 (2009): 1-13. Web.20 Sept 2016.

- (101) Robertson, R. Paul et al. *Glucose Toxicity in β -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection*. *Diabetes* 52.3 (2003): 581-587. Web.20 Sept2016.
- (102) Robertson RP, HJ, Tanaka Y, Sacchi G, Tran POT, Gleason C, Poitout V: *Glucose toxicity of the β -cell: cellular and molecular mechanisms*. In *Diabetes Mellitus*. LeRoith D, Olefsky JM, Taylor S, Eds. New York, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.125 –132.
- (103) Maechler P, Jornot L, Wollheim CB: *Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells*. *J Biol Chem* 274 :27905 –27913,1999
- (104) Adams 2nd JM. et al., *Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin resistant humans*. *Diabetes* 53: 25-31, 2004 Griffin ME, et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade*. *Diabetes*, 48: 1270-74, 39 1999.
- (105) Itani SI et al., *Lipid induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol protein kinase C, and I-B-*. *Diabetes* 51: 2005-11, 2002
- (106) Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. *A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes*. *Diabetes*. 2003 Oct;52(10):2461-74).
- (107) Ciregia F, Giusti L, Ronci M, Bugliani M, Piga I, Pieroni L, Rossi C, Marchetti P, Urbani A, Lucacchini A. *Glucagon-like peptide 1 protects INS-1E mitochondria against palmitate-mediated beta-cell dysfunction: a proteomic study*. *Mol Biosyst*. 2015 May 19;11(6):1696-707.
- (108) Shoelson, S. E. et al. (2003). *Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity and diet-induced insulin resistance*. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 (Suppl. 3), S49-S52.
- (109) Floodstrom, M. et al. (1996) *Cytokines activate the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) and induce nitric oxide production in human pancreatic*

islets. FEBS, Lett. 385, 4-6.

- (110) M. Y. Donath, M. Böni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, P. A. Halban, J. A. Eshes. *Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function*. Trends in Endocrinology and Metabolism. Vol. 21 No.5
- (111) Donath, M. Y. Et al. (2008) *Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy*. Diabetes Care 31 (suppl. 2), S108-S113.
- (112) Robertson R. P. et al. (2004) *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes 53 (Suppl. 1), S119-S124.
- (113) Maedler, K et al. (2001) *Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets*. Diabetes 50, 1683-1690.
- (114) Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochem J256 :205 –212,1988.
- (115) Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC: *Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress*. J Biol Chem276 :31099 –31104, 2001.
- (116) L. Larsen, M. Tonnesen, S. G. Ronn, J. Størling, S. Jørgensen, P. Mascagni, C. A. Dinarello, N. Billestrup, T. Mandrup-Poulsen. *Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells*. Diabetologia (2007) 50:779–789 DOI 10.1007/s00125-006-0562-3.
- (117) A. Iyer, D. P. Fairlie, L. Brown. *Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease*. Immunology and Cell Biology 90, 39-46 (January 2012).
- (118) Dan P Christensen, Mattias Dahllöf, Morten Lundh, Daniel N Rasmussen, Mette D Nielsen, Nils Billestrup, Lars G Grunnet, and Thomas Mandrup-Poulsen . *Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition as a Novel Treatment for Diabetes Mellitus*. MOL MED 17(5-6)378-390, MAY-JUNE 2011.
- (119) D. Rondas, M. BUgliani, W. D’Hertog, K. Lage, M. Masini, E. Waelkens, P. Marchetti, C. Mathieu, L. Overbergh. *Glucagon-Like Peptide-1 Protects*

Human Islets against Cytokine-Mediated β -Cell Dysfunction and Death: A Proteomic Study of the Pathways Involved. J. Proteome Res. 2013, 12, 4193-4206.

- (120) L. Farilla, A. Bulotta, B. Hirshberg, S. Li Calzi, N. Khoury, H. Noushmehr, C. Bertolotto, U. Di Mario, D. M. Harlan, R. Perfetti. *Glucagon-Like Peptide-1 Inhibits Cell Apoptosis and Improves Glucose Responsiveness of Freshly Isolated Human Islets.* Endocrinology, Vol. 144, Issue 12.
- (121) Nauck, M.A., Vardarli, I., Deacon, C.F. et al. *Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down?.* Diabetologia (2011) 54: 10. doi:10.1007/s00125-010-1896-4.
- (122) Cameron, Amy R. et al. *Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status.* Circulation Research 119.5 (2016): 652–665. PMC. Web. 20 Sept. 2016.
- (123) Kappe, C., Patrone, C., Holst, J.J. et al. *Metformin protects against lipoapoptosis and enhances GLP-1 secretion from GLP-1-producing cells.* J Gastroenterol (2013) 48: 322. doi:10.1007/s00535-012-0637-5
- (124) Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley aa, Appel RD, Humhery-Smith I, Hochstrasser DF and Williams KL. *Progress with proteome projects: why all proteins espresse by a genome should be identified and how to do it.* Biotechnol. Genet. Eng. Rev 1995; 13: (19-50)
- (125) Hoog CL, Mann M. *Proteomics.* Annu Rev Genomics Hum Genet 2004;5(267-293)
- (126) Pandey A, Mann M. *Proteomics to study genes and genomes.* Nature 2000: (837-846)
- (127) Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, Brianza F. *Functional proteomics of signal trasduction by membrane receptors.* Electrophoresis 1999; 20 (4-5): 952-961
- (128) Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Field S. *Protein analysis on a protomic scale.* Nature 2003: (208-215)
- (129) Anderson NG, Anderson NL. *Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future.* Electrophoresis. 1996;17(443-444)

- (130) Herbert BR et al. *What place for polyacrylamide in proteomics?* Trend Biotechnol 2001:19.
- (131) T. Rabilloud, C. Lelong. *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial.* Journal of Proteomics, 74 (2011), pp. 1829-1841 (2011)
- (132) Adriana Calderaro, Maria-Cristina Arcangeletti, Isabella Rodighiero, Mirko Buttrini, Chiara Gorrini, Federica Motta, Diego Germini, Maria-Cristina Medici, Carlo Chezzi & Flora De Conto. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification.* Scientific Reports 4, Article number: 6803 (2014) doi:10.1038/srep06803
- (133) Alexandraki, K.; Piperi, C.; Kalofoutis, C.; Singh, J.; Alaveras, A.; Kalofoutis, A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006, 1084, 89–117.
- (134) Wang, C.; Guan, Y.; Yang, J. Cytokines in the progression of pancreatic beta-cell dysfunction. Int J Endocrinol 2010, 2010, 515136.
- (135) Wang, C.; Guan, Y.; Yang, J. Cytokines in the progression of pancreatic beta-cell dysfunction. Int J Endocrinol 2010, 2010, 515136.
- (136) Eizirik, D. L.; Sammeth, M.; Bouckenooghe, T.; Bottu, G.; Sisino, G.; Igoillo-Esteve, M.; Ortis, F.; Santin, I.; Colli, M. L.; Barthson, J.; Bouwens, L.; Hughes, L.; Gregory, L.; Lunter, G.; Marselli, L.; Marchetti, P.; McCarthy, M. I.; Cnop, M. The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. PLoS Genet. 2012, 8 (3), e1002552.
- (137) Fu Y, Kinter M, Hudson J, Humphries KM, Lane RS, White JR, Hakim M, Pan Y, Verdin E, Griffin TM. Aging Promotes Sirtuin 3-Dependent Cartilage Superoxide Dismutase 2 Acetylation and Osteoarthritis. Arthritis Rheumatol. 2016 Aug;68(8):1887-98.