



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

**EFFETTO DI ESTRATTI DI SEMI DI DATTERO E
LACTOBACILLUS PARACASEI F-19 SULLA
MODULAZIONE DI MARKERS MOLECOLARI IN
UN MODELLO IN VITRO DI DIABETE DI TIPO 2**

Relatore

Prof. Lorenzo CORSI

*Tesi sperimentale
di Laurea Magistrale in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche di
Sergio LEVAGNINI*

Anno Accademico

2024/2025

INDICE

ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Diabete di tipo 2: aspetti generali.....	6
1.1.1 Definizione di diabete di tipo 2.....	6
1.1.2 Epidemiologia e incidenza globale.....	7
1.1.3 Fisiopatologia diabetica.....	8
1.1.4 Diagnosi e prevenzione.....	10
1.2 Markers molecolari e funzionali del diabete di tipo 2.....	11
1.2.1 Insulina.....	11
1.2.2 Ruolo della Sintaxina-4 nella patogenesi del diabete.....	12
1.2.3 Ruolo del GRP94 nella patogenesi del diabete.....	13
1.2.4 Ruolo del GLP-1R nella patogenesi del diabete.....	14
1.2.5 Ruolo del GLUT2 nella patogenesi del diabete.....	16
1.3 Terapie farmacologiche.....	18
1.4 Approcci nutraceutici e probiotici nel diabete di tipo 2.....	21
1.4.1 Semi di dattero.....	21
1.4.2 Microbiota intestinale e probiotici.....	22
1.4.3 <i>Lactobacillus paracasei</i> F19 come probiotico antidiabetico.....	24
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	26
3. MATERIALI E METODI.....	28
3.1 Modelli cellulari in vitro per lo studio del diabete di tipo 2.....	28

3.1.1	La linea cellulare 1.1B4: modello umano di cellule β -pancreatiche.....	28
3.1.2	Effetti dell'iperglicemia sulla funzionalità β -cellulare.....	29
3.1.3	Linea cellulare 1.1B4 utilizzata nello studio.....	30
3.1.4	Medium di coltura.....	31
3.1.5	Tripsina-EDTA.....	31
3.2	Semi di dattero.....	32
3.2.1	Procedure estrattive dei semi di <i>Phoenix dactylifera</i>	32
3.3	<i>Lactobacillus paracasei</i> F19.....	33
3.3.1	Procedura di ottenimento del filtrato metabolico.....	33
3.3.2	Liofilizzazione del filtrato metabolico.....	34
3.4	Mantenimento, splitting, conta e semina cellulare.....	35
3.5	Test tossicologici: citotossicità con CCK.....	37
3.6	Estrazione e quantificazione proteica.....	38
3.6.1	Trattamenti per Western blot ed ELISA.....	38
3.6.2	Estrazione proteica dalle cellule della linea 1.1B.....	38
3.6.3	Quantificazione proteica.....	39
3.7	Western blot.....	41
3.7.1	Preparazione dei campioni e caricamento su gel.....	41
3.7.2	Corsa elettroforetica.....	42
3.7.3	Trasferimento gel-membrana.....	43
3.7.4	Legame tra proteine e anticorpi.....	43
3.7.5	Sviluppo.....	45
3.7.6	Stripping.....	45

3.8	ELISA.....	46
3.9	Immunofluorescenza.....	47
3.10	Analisi statistica.....	47
4.	RISULTATI.....	48
4.1	Test di citotossicità diretta sulle 1.1B4.....	48
4.1.1	Effetto del Glucosio 25mM.....	48
4.1.2	Effetto degli estratti acquosi dei semi di <i>Phoenix dactylifera</i>	49
4.1.3	Effetto del filtrato metabolico di <i>Lactobacillus paracasei</i> F19...51	
4.1.4	Effetto dell'associazione tra Macerato Acquoso di semi di <i>Phoenix dactylifera</i> e filtrato metabolico di <i>Lactobacillus paracasei</i> F19.....	52
4.2	Analisi immunochimica di Sintaxina-4, GRP94 e GLP-1R.....	55
4.3	Analisi immunochimica di GLUT2.....	58
4.4	Analisi in immunofluorescenza dei contenuti insulinici.....	61
5.	DISCUSSIONE.....	63
6.	CONCLUSIONI.....	68
7.	BIBLIOGRAFIA.....	69
8.	RINGRAZIAMENTI.....	72

ABSTRACT

Il diabete di tipo 2 rappresenta una patologia metabolica cronica caratterizzata da iperglicemia persistente e progressiva disfunzione delle cellule β -pancreatiche. Negli ultimi anni, l'attenzione della ricerca scientifica è stata rivolta allo studio di composti bioattivi di origine naturale e all'utilizzo di ceppi probiotici opportunamente selezionati, in grado, potenzialmente, di modulare vie di segnalazione cellulare coinvolte nella regolazione del metabolismo glucidico e nella funzionalità delle cellule β .

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto di estratti derivati da semi di *Phoenix dactylifera* e di metaboliti prodotti dal probiotico *Lactobacillus paracasei* F-19 sulla modulazione di specifici markers molecolari in un modello cellulare in vitro di diabete di tipo 2.

Le cellule della linea β -pancreatica umana 1.1B4 sono state trattate a diversi tempi (48 e 72 ore) con estratti acquosi, ottenuti mediante macerazione, di farina di semi di *Phoenix dactylifera* e con un estratto filtrato contenente i prodotti del metabolismo di *Lactobacillus paracasei* F-19. I trattamenti sono stati effettuati sia singolarmente che in combinazione, a diverse concentrazioni, in presenza di condizioni di iperglicemia indotta da Glucosio 25mM. L'espressione di markers di diabete di tipo 2 quali GRP94, Sintaxina-4, GLP-1R e GLUT2 sono stati valutati con tecniche immunochimiche quali Western blot, ELISA ed immunofluorescenza.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con Glucosio 25mM determina una riduzione dell'espressione di tutte le proteine testate. Al contrario, il trattamento con il macerato acquoso di semi di dattero e con il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19, sia singolarmente sia in associazione, ha mostrato un aumento dell'espressione di tali proteine rispetto alla condizione iperglicemica.

Nel complesso, i risultati di questo studio indicano che gli estratti di semi di dattero e i metaboliti derivati da *Lactobacillus paracasei* F-19 possono modulare l'espressione di specifici markers molecolari associati alla funzionalità delle cellule β in condizioni di stress iperglicemico. Tali evidenze suggeriscono un potenziale ruolo di composti nutraceutici e probiotici come strategie complementari nella modulazione dei processi cellulari coinvolti nella fisiopatologia del diabete di tipo 2. Tuttavia, ulteriori studi saranno necessari per chiarire i meccanismi molecolari alla base degli effetti osservati e per valutarne la rilevanza in modelli biologici più complessi.

1 INTRODUZIONE

1.1 Diabete di tipo 2: aspetti generali

1.1.1 Definizione di diabete di tipo 2

Il diabete rappresenta un gruppo di patologie metaboliche croniche caratterizzate da iperglicemia persistente causata, in generale, da un difetto della secrezione insulinica, della sua azione o di entrambe. Tale condizione, se non adeguatamente controllata, può determinare nel tempo complicanze a carico di diversi organi e sistemi, rendendola una delle principali sfide per la salute pubblica a livello globale.

Tra le diverse forme, il diabete di tipo 1 è caratterizzato da un'etiologia di tipo autoimmune in cui il sistema immunitario attacca e distrugge le cellule β -pancreatiche responsabili della produzione di insulina. Questo comporta una carenza assoluta dell'ormone e la necessità di una terapia insulinica sostitutiva per tutta la vita. Il diabete di tipo 1 insorge prevalentemente in età pediatrica o adolescenziale, sebbene possa manifestarsi anche in età adulta.

Nonostante l'importanza clinica del diabete di tipo 1, la presente tesi si concentra principalmente sul diabete di tipo 2, analizzandone caratteristiche, complicanze e strategie di gestione.

Il diabete di tipo 2 è una malattia metabolica caratterizzata da iperglicemia cronica, diminuito catabolismo del glucosio ed aumentato catabolismo di grassi e proteine. Si verifica a causa di una progressiva distruzione non autoimmune delle cellule β -pancreatiche alla quale consegue una inadeguata secrezione insulinica accompagnata, solitamente, da insulino-resistenza (Lu et al., 2024).

L'iperglicemia cronica causata dal diabete mellito determina complicanze tradizionali suddivisibili in due tipologie:

- Complicanze microvascolari: neuropatia diabetica (causa principale di amputazioni non traumatiche), retinopatia diabetica (può comportare cataratta e cecità) e nefropatia diabetica (insufficienza renale cronica che richiede la dialisi)
- Complicanze macrovascolari: aterosclerosi, scompenso cardiaco, infarto e ictus (le probabilità di morte cardio-vascolare e cerebro-vascolare sono elevate)

Oltre a queste, vi sono una serie di complicanze emergenti dovute all'aumento dell'aspettativa di vita e al conseguente prolungamento della cronicità della malattia.

Quindi se inizialmente il diabete di tipo 2 comportava principalmente complicanze di tipo vascolare oggi invece determina l'insorgenza di uno spettro molto più ampio di patologie sistemiche associate tra le quali: tumori, infezioni, epatiti, disabilità funzionali, cognitive ed affettive.

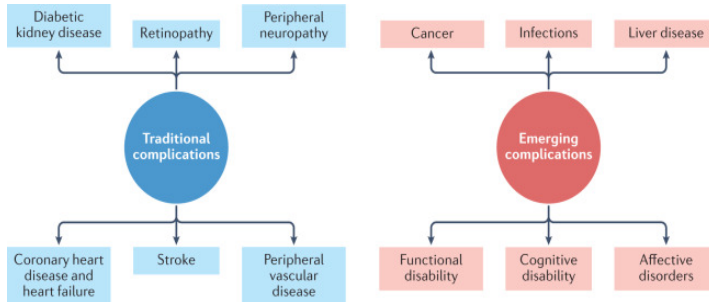


Figura 1. Cambiamento del tipo di complicanze associate al diabete di tipo 2. Le attuali terapie farmacologiche del diabete di tipo 2 determinano un aumento dell'aspettativa di vita dei soggetti diabetici ma al contempo anche l'insorgenza di nuove patologie emergenti associate alla cronicizzazione della malattia (Tomic et al., 2022).

1.1.2 Epidemiologia e incidenza globale

Il diabete di tipo 2 rappresenta il 96% di tutti i casi di diabete ed è diventato un onere sanitario mondiale a causa della sua elevata incidenza, disabilità e mortalità. Si stima che la spesa sanitaria globale annuale per questa malattia tra le persone che ne sono soggette di età compresa tra i 20 e i 79 anni sia stata di 966 miliardi di dollari nel 2021 e si stima che possa raggiungere i 1054 miliardi di dollari entro il 2045 (Lu et al., 2024). Nel 2022 si è stimato che 828 milioni di adulti fossero affetti da questa patologia con un aumento di 630 milioni rispetto al 1990 ed i maggiori aumenti sono stati riscontrati nei paesi a basso e medio reddito (NCD Risk Factor Collaboration, 2024).

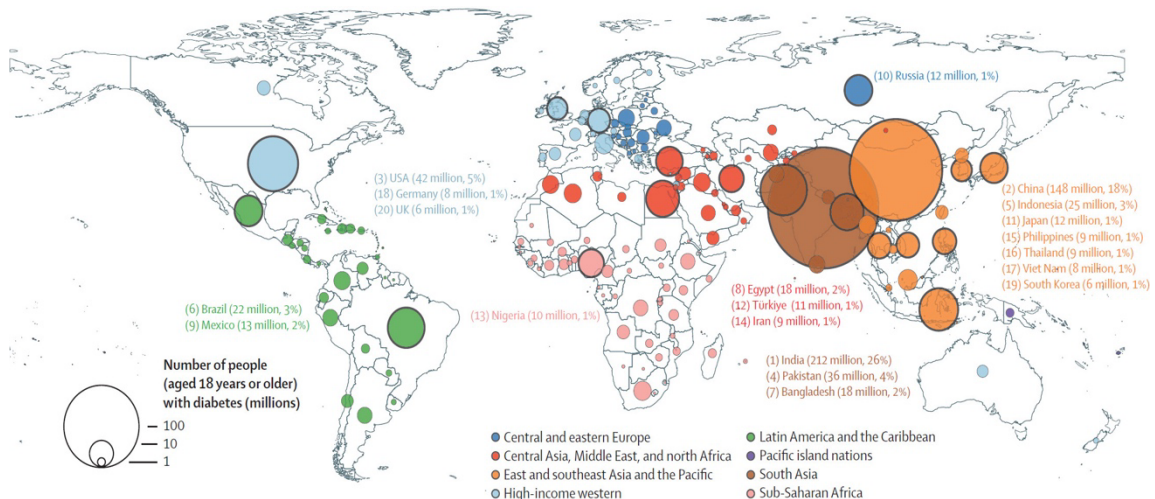


Figura 2. Diffusione del diabete mellito nel mondo. Il grafico mostra come sia cambiata nel tempo la prevalenza del diabete mellito negli adulti a livello globale evidenziando un aumento progressivo e continuo tra il 1990 e il 2022 con un andamento generalizzato ma più marcato nei paesi a basso e medio reddito, mentre nei paesi ad alto reddito la crescita è più lenta e questo significa che il diabete di tipo 2 è un'epidemia globale in espansione il cui peso si sta sempre più spostando verso i paesi meno sviluppati (NCD Risk Factor Collaboration, 2024).

1.1.3 Fisiopatologia diabetica

È possibile distinguere due principali difetti metabolici che caratterizzano il diabete mellito:

- **Insulino-resistenza:** si tratta dell'incapacità dei tessuti bersaglio, in particolare fegato, muscolo e tessuto adiposo, di rispondere adeguatamente alle fisiologiche modulazioni determinate dall'insulina, ne consegue un minor assorbimento del glucosio nel muscolo, una ridotta azione inibitoria della gluconeogenesi, una riduzione della glicolisi ed un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi a livello degli epatociti. La progressiva incapacità degli epatociti di captare l'insulina costituisce il fattore patogenico principale dell'insulino-resistenza.
- **Disfunzione delle cellule β -pancreatiche:** è caratterizzata da una progressiva riduzione della capacità di produrre e secernere l'insulina da parte delle cellule β -pancreatiche. Inizialmente esse tendono a compensare l'insulino-resistenza aumentando la secrezione insulinica, ma tale condizione protratta nel tempo si deteriora comportando l'insorgenza dell'iperglicemia diabetica e di tutte le conseguenze ad essa correlate.

L'iperglicemia è il fattore scatenante di entrambe gli stati patologici che si influenzano a vicenda e presumibilmente esacerbano sinergicamente il diabete. La disfunzione delle cellule β è più grave della resistenza all'insulina in quanto, nella prima condizione, la secrezione di insulina è compromessa, mentre nella seconda può ancora essere secreta, ma è l'insensibilità all'insulina nei tessuti bersaglio a creare il maggior danno funzionale. Man mano che la disfunzione delle cellule β e l'insulino-resistenza si aggravano, l'iperglicemia si amplifica portando alla progressione verso il diabete di tipo 2 (Cerf, 2013).

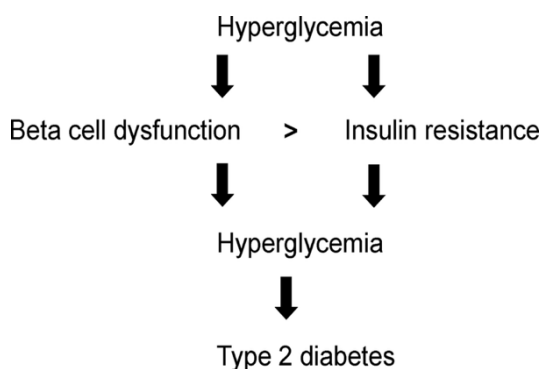


Figura 3. Disfunzione delle cellule β indotta da iperglicemia e insulino-resistenza. Lo schema evidenzia che la disfunzione delle cellule β è considerata il determinante critico di questa patologia metabolica, mentre l'iperglicemia si configura come un elemento chiave in un circolo vizioso patogenetico in quanto essa contribuisce all'instaurarsi e al peggioramento dell'insulino-resistenza e della disfunzione delle cellule β -pancreatiche (glucotossicità), e al contempo rappresenta il principale fattore responsabile delle manifestazioni cliniche e delle complicanze croniche della patologia (Cerf, 2013).

Quindi, l'insulino-resistenza e la disfunzione delle cellule β -pancreatiche rappresentano i due principali meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo del diabete di tipo 2.

Il processo degenerativo determinato dall'azione combinata di questi due processi conduce alla perdita dell'omeostasi glicemica. Inizialmente, la ridotta sensibilità dei tessuti periferici all'insulina, viene compensata da un aumento della secrezione insulinica da parte delle cellule β , tuttavia, questa capacità adattativa non è illimitata. In particolare, si genera un circolo vizioso in cui entrambe gli stati patogenetici inducono sia iperglicemia che aumento della richiesta insulinica (Cerf, 2013).

L'insulino-resistenza deriva da una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali quali obesità, sedentarietà e invecchiamento; uno dei meccanismi principali è rappresentato dalla lipotossicità, caratterizzata dall'accumulo ectopico di lipidi in tessuti quali fegato e muscolo scheletrico, che interferisce con la segnalazione insulinica intracellulare (Lee et al., 2022). Un ulteriore contributo rilevante è dato dallo stato infiammatorio cronico associato all'accumulo eccessivo di tessuto adiposo viscerale; è stato infatti dimostrato che questa condizione porta ad un aumento della quantità dei macrofagi che producono e rilasciano citochine pro-infiammatorie in risposta all'eccessivo accumulo di acidi grassi (Ogden et al., 2007). Le citochine pro-infiammatorie agiscono sia a livello locale che sistemico, inducendo stress ossidativo nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri, con conseguente compromissione della trasduzione del segnale insulinico (Lee et al., 2022).

Parallelamente all'insulino-resistenza, si sviluppa una progressiva disfunzione delle cellule β -pancreatiche. L'iperglicemia cronica esercita un effetto tossico diretto su queste cellule, fenomeno noto come glucotossicità che, amplificato dalla lipotossicità di cui si è accennato in precedenza, produce il danno cellulare determinando una riduzione della sintesi e del rilascio di insulina (Ogden et al., 2007).

Analogamente a quanto accade nell'insulino resistenza, anche nel caso della disfunzione delle cellule β -pancreatiche, i processi infiammatori giocano un ruolo cruciale. Le cellule β , infatti, sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo, poiché dotate di una limitata capacità antiossidante. Questo contribuisce alla loro perdita funzionale e strutturale, per cui le citochine pro-infiammatorie possono indurre l'apoptosi attraverso meccanismi legati allo stress mitocondriale (Ogden et al., 2007).

Oltre ai fattori ambientali e metabolici, anche la predisposizione genetica riveste un ruolo significativo. Numerosi studi hanno evidenziato che varianti genetiche associate al diabete tipo 2 influenzano direttamente la funzione β -cellulare, con conseguente compromissione della secrezione insulinica e progressivo esaurimento funzionale di tali cellule (Ogden et al., 2007).

1.1.4 Diagnosi e prevenzione

Il diabete mellito viene diagnosticato tramite analisi del sangue quando il glucosio plasmatico a digiuno è maggiore o uguale a 126 mg/dl, l'emoglobina (HbA1c) è maggiore o uguale al 6,5% o il glucosio monitorato per 2 ore durante il test di tolleranza dopo somministrazione orale di 75 g è maggiore o uguale a 200 mg/dl (Kalyani et al., 2025).

A livello preventivo la dieta mediterranea e le diete a base vegetale permettono un migliore controllo glicemico ed un abbassamento dell'emoglobina HbA1c rispetto a diete con basso contenuto di carboidrati che mostrano un'efficacia solo a breve termine; le diete ad alto contenuto proteico invece mostrano risultati contrastanti, con alcuni benefici per i profili lipidici ma effetti incoerenti sul controllo glicemico. Rispetto alle diverse tipologie di diete possibili, l'allenamento di tipo aerobico migliora significativamente il controllo glicemico, la sensibilità insulinica e i fattori di rischio cardiovascolare. La combinazione tra modifica della dieta e attività fisica sembra essere la strategia più efficace per la prevenzione e la gestione del diabete di tipo 2 (Tecce et al., 2025).

L'attività fisica può ridurre l'emoglobina HbA1c dallo 0,4% all'1,0% e migliorare i fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione e dislipidemia). Studi clinici randomizzati hanno riportato una diminuzione delle malattie associate al diabete come retinopatia e nefropatia (3,5%), infarto miocardico (3,3% - 6,2%) e mortalità (2,7% - 4,9%) utilizzando strategie intensive di riduzione del glucosio (emoglobina HbA1c <7%) rispetto al trattamento convenzionale due decenni dopo il completamento dello studio (Kalyani et al., 2025).

1.2 Markers molecolari e funzionali del diabete di tipo 2

1.2.1 Insulina

L'insulina è un ormone peptidico essenziale per il mantenimento della glicemia in quanto favorisce l'assorbimento di glucosio nel muscolo scheletrico e nei tessuti adiposi e regola il metabolismo cellulare attraverso una serie di fosforilazioni proteiche a cascata.

La via di segnalazione generalmente considerata come principale mediatore delle azioni metaboliche dell'insulina è quella che prevede l'attivazione della proteina Akt (chinasi). L'innesco della cascata di reazioni inizia con il legame dell'insulina al suo recettore presente sulla superficie di membrana con conseguente attivazione del dominio tirosin-chinasico che determina l'autofosforilazione del recettore stesso. In seguito, i residui di tirosina fosforilati reclutano le proteine del substrato del recettore dell'insulina (IRS1 e IRS2), che a loro volta attivano la chinasi lipidica PI3K. A livello della membrana plasmatica la PI3K attivata catalizza la fosforilazione di PIP2 in PIP3 il quale funge da ligando attivatore delle proteine PDK1 e mTORC2 di cui, PDK1 e mTORC2 vanno direttamente a fosforilare l'Akt (nelle posizioni T308 e S473) determinandone l'attivazione completa. La proteina Akt attivata può attivare a sua volta tre vie di segnalazione differenti:

- Fosforilando TBC1D4 porta alla traslocazione delle vescicole contenenti GLUT4 sulla membrana plasmatica determinando l'ingresso intracellulare di glucosio;
- Fosforilando GSK3 α e GSK3 β promuove la sintesi del glicogeno e inibisce la glicogenolisi;
- Fosforilando PRAS40 e TSC2 favorisce la sintesi proteica tramite l'inibizione di mTORC1 ed inoltre, sempre attraverso questa via, promuove la lipogenesi ed inibisce la lipolisi.

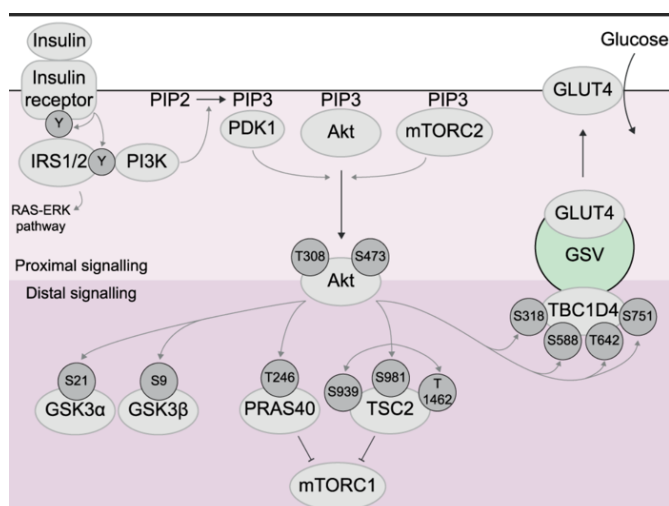


Figura 5. Panorama della segnalazione insulinica. Lo schema descrive la cascata di fosforilazione che partono dall'attivazione recettoriale insulinica per andare a modulare diversi meccanismi cellulari effettori (Van Gerwen et al., 2023).

1.2.2 Ruolo della Syntaxina-4 nella patogenesi del diabete

Nelle cellule β -pancreatiche la secrezione insulinica avviene attraverso la fusione delle vescicole contenenti l'insulina con la membrana plasmatica (esocitosi) ed è regolata principalmente da due classi di proteine: le proteine SNARE (recettori proteici di attacco sensibili al fattore N-etilmaleimmide) e le proteine SM (simili a Sec1/Munc18).

In particolare, attraverso le SNARE, l'esocitosi avviene grazie all'interazione tra le proteine SNARE vescicolari (v-SNARE), localizzate sui granuli secretori, e le proteine SNARE della membrana bersaglio (t-SNARE), presenti sulla membrana plasmatica, di cui fanno parte le syntaxine.

Queste proteine si assemblano formando il complesso SNARE che consente l'avvicinamento e la successiva fusione tra la membrana del granulo e la membrana plasmatica. Le proteine SM svolgono invece un ruolo regolatorio essenziale, stabilizzando le syntaxine nella conformazione attiva e favorendo così la formazione del complesso.

La secrezione di insulina stimolata dal glucosio è caratterizzata da una prima fase rapida dovuta al rilascio dei granuli già ancorati alla membrana plasmatica e da una seconda fase più lenta e prolungata dipendente dal reclutamento di nuovi granuli intracellulari. Questi granuli di nuova mobilitazione contribuiscono non solo alla seconda fase, ma anche, in parte, alla prima.

Le diverse isoforme di syntaxina svolgono ruoli specifici nel controllo dell'esocitosi:

- la Syntaxina-1A è coinvolta principalmente nella fusione dei granuli già ancorati; la sua assenza comporterebbe una riduzione della prima fase rapida ma senza influenzare la seconda fase lenta;
- la Syntaxina-3 regola il reclutamento e la fusione dei granuli intracellulari; la sua assenza comporterebbe una riduzione della seconda fase lenta e, in minor misura, anche della prima fase rapida senza però influenzare il rilascio mediato dai granuli già ancorati;
- la Syntaxina-4, diversamente dalle precedenti isoforme, favorisce sia la fusione dei granuli già ancorati alla membrana plasmatica che il reclutamento e la fusione dei granuli di nuova mobilitazione, quindi svolge un duplice ruolo partecipando ad entrambe le fasi della secrezione insulinica; la sua assenza comporterebbe una significativa riduzione della secrezione insulinica.

Studi condotti sulle isole pancreatiche umane in cui è stata indotta la riduzione dell'espressione della Sintaxina-4, hanno evidenziato una marcata diminuzione della secrezione insulinica in entrambe le fasi unitamente alla riduzione della quantità di granuli già ancorati alla membrana plasmatica in parallelo ad un'alterata mobilitazione dei granuli intracellulari (Xie et al., 2015). Di conseguenza, la Sintaxina-4 rappresenta un mediatore centrale dell'esocitosi insulinica, controllando sia la fusione dei granuli già ancorati sia quella dei granuli reclutati successivamente. Il suo ruolo risulta in parte sovrapponibile a quello della Sintaxina-1A e della Sintaxina-3, ma i suoi effetti sul rilascio insulinico risultano essere più marcati.

In studio si è evidenziato come una riduzione della disponibilità o dell'attività della Sintaxina-4 comprometta l'efficienza del meccanismo di rilascio insulinico da parte delle cellule β -pancreatiche. Gli autori affermano infatti che la Sintaxina-4 è un componente critico del meccanismo di esocitosi dei granuli di insulina e la sua ridotta disponibilità contribuisce alla compromissione della secrezione insulinica caratteristica del diabete di tipo 2. Inoltre, si è osservato che il potenziamento dell'attività di questa proteina migliora la secrezione insulinica stimolata dal glucosio (Xie et al., 2015). Questo dato suggerisce che l'aumento dell'attività o dell'espressione di Sintaxina-4 può, almeno parzialmente, compensare il difetto secretorio insulinico tipico del diabete di tipo 2, rafforzando l'ipotesi di un suo possibile utilizzo come target terapeutico.

1.2.3 Ruolo del GRP94 nella patogenesi del diabete

I chaperoni molecolari sono proteine fondamentali per la regolazione delle funzioni cellulari in quanto garantiscono la corretta maturazione e ripiegamento di specifiche proteine. Tra questi, la proteina GRP94 (Glucose Regulated Protein 94) rappresenta il chaperone più abbondante nel lume del reticolo endoplasmatico (compartimento cellulare deputato alla sintesi e al corretto ripiegamento delle proteine), le sue proteine bersaglio principali sono: immunoglobuline, i fattori di crescita insulino-simili 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), le integrine, i Toll-like receptor (TLR) e alcune glicoproteine specifiche (GRAP).

Nelle cellule β -pancreatiche GRP94 è altamente espresso e a questo livello risulta essere fondamentale per il corretto ripiegamento della proinsulina (precursore dell'insulina) e del recettore tirosin-chinasico IGF-1R (recettore del fattore di crescita insulino-simile 1), suggerendo un ruolo cruciale nella sopravvivenza delle cellule β e nella patogenesi del diabete di tipo 2.

Studi sperimentali su modelli murini diabetici hanno mostrato che l'espressione di GRP94 nelle cellule β -pancreatiche cambia con l'età. Nei primi stadi della malattia (4 settimane) i livelli di GRP94 aumentano rispetto ai controlli come possibile risposta adattativa allo stress del reticolo endoplasmatico. Con la progressione della malattia (8-13 settimane), invece, si osserva una riduzione di GRP94, mentre GRP78, un altro chaperone, rimane elevato, suggerendo un meccanismo di compensazione cellulare. Esperimenti di knockdown e knockout nelle cellule β mostrano che la riduzione di GRP94 aumenta i segnali pro-apoptotici e la suscettibilità delle cellule alla morte indotta da stress diabetogeno (tramite farmaci che inducono stress del reticolo endoplasmatico o esposizione ad acidi grassi saturi). In particolare, si è osservato che l'assenza di GRP94 determina una degradazione più rapida di IGF-1R compromettendo la via di segnalazione IGF-1R \rightarrow PI3K \rightarrow AKT, essenziale per proteggere le cellule β dall'apoptosi (Kim et al, 2024).

Tali risultati suggeriscono che GRP94, attraverso l'interazione con IGF-1R, possiede un ruolo protettivo fondamentale nei confronti delle cellule β pancreatiche e che la sua disfunzione può contribuire allo sviluppo del diabete di tipo 2, aprendo la strada a nuove possibili strategie terapeutiche.

1.2.4 Ruolo del GLP-1R nella patogenesi del diabete

Il recettore per il peptide simil-glucagone 1 (GLP-1R) appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G ed è espresso prevalentemente nelle cellule β -pancreatiche, dove svolge un ruolo cruciale nella regolazione della secrezione insulinica e nella sopravvivenza cellulare. La sua attivazione induce una complessa rete di vie di segnalazione intracellulare che coordinano risposte trofiche e metaboliche.

Il principale meccanismo di trasduzione del segnale del GLP-1R avviene attraverso l'accoppiamento con la proteina G di tipo stimolatorio (Gs), che determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi e il conseguente aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico.

L'incremento di AMP ciclico rappresenta un evento chiave, in quanto attiva a sua volta due effettori principali:

- la proteina chinasi A (PKA);
- la proteina direttamente attivata dall'AMP ciclico (Epac).

Questi mediatori regolano molteplici processi cellulari ed in particolare, la proteina chinasi A promuove la fosforilazione di proteine coinvolte nell'esocitosi dei granuli insulinici,

mentre Epac contribuisce alla modulazione della mobilitazione del calcio intracellulare. L'aumento di AMP ciclico costituisce il nodo centrale attraverso cui il GLP-1R amplifica la secrezione insulinica in maniera dipendente dal glucosio.

Un passaggio fondamentale della segnalazione mediata da GLP-1R è rappresentato dalla regolazione dei canali ionici di membrana. L'attivazione del recettore porta, infatti, alla chiusura dei canali del potassio sensibili all'ATP, alla depolarizzazione della membrana cellulare e all'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti.

L'aumento del calcio intracellulare rappresenta il segnale diretto che innesca la fusione dei granuli contenenti insulina con la membrana plasmatica. In questo contesto, il GLP-1R non agisce come stimolo primario, ma come potenziatore della secrezione insulinica in quanto amplifica la risposta secretoria solo in presenza di concentrazioni elevate di glucosio.

Oltre alla via classica mediata dall'AMP ciclico, il GLP-1R è in grado di attivare ulteriori segnalazioni a cascata, tra queste riveste particolare importanza la via associata alla proteina Gq, che stimola la fosfolipasi C con conseguente produzione di secondi messaggeri (inositolo trifosfato e diacilglicerolo) i quali portano ad un ulteriore aumento del calcio intracellulare e all'attivazione della proteina chinasi C (PKC) con conseguente potenziamento del rilascio insulinico.

Oltre a questi effetti metabolici, il recettore GLP-1R mostra anche importanti effetti trofici in quanto promuove la trascrizione di geni coinvolti nella funzione β -cellulare, la sintesi di fattori anti-apoptotici e la proliferazione delle cellule β . In particolare, questi effetti sono mediati, almeno in parte, dall'attivazione di fattori di trascrizione come CREB, che regolano l'espressione genica in risposta all'aumento di AMP ciclico. In tal senso è possibile affermare che il GLP-1R contribuisce non solo alla secrezione insulinica, ma anche alla preservazione dell'integrità funzionale delle cellule β (Wan et al., 2023).

Alla luce dei meccanismi di segnalazione descritti, risulta evidente come il GLP-1R rappresenti non solo un regolatore della secrezione insulinica, ma anche un importante elemento per la sopravvivenza delle cellule β -pancreatiche. Alterazioni della sua funzionalità contribuiscono in maniera significativa alla patogenesi del diabete mellito di tipo 2 in quanto determinano una diminuzione della secrezione insulinica glucosio-dipendente e in una progressiva perdita della funzionalità β -cellulare. L'importanza di questo sistema è confermata anche dallo sviluppo di strategie terapeutiche mirate, tra cui gli agonisti del recettore GLP-1R, che consentono di migliorare il controllo glicemico potenziando la secrezione insulinica e contribuendo alla preservazione della funzione β -cellulare.

1.2.5 Ruolo del GLUT2 nella patogenesi del diabete

Il GLUT2 (trasportatore del glucosio di tipo 2) svolge un ruolo centrale nelle vie di segnalazione metabolica del glucosio, rappresentando un elemento chiave nel collegamento tra variazioni della glicemia e risposta cellulare. A differenza di altri trasportatori ad alta affinità, è caratterizzato da una bassa affinità e da un'elevata capacità di trasporto, proprietà che gli consente di mediare una rapida distribuzione tra glucosio extracellulare e intracellulare in funzione dei livelli glicemici.

Nelle cellule β -pancreatiche, l'attività di GLUT2 costituisce il punto di partenza della cosiddetta via metabolica di segnalazione del glucosio il quale, una volta internalizzato, viene metabolizzato attraverso la glicolisi e la fosforilazione ossidativa, determinando un aumento del rapporto ATP/ADP intracellulare. Tale variazione induce la chiusura dei canali del potassio sensibili all'ATP, determinando la depolarizzazione della membrana plasmatica e l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti; il conseguente ingresso di ioni calcio nel citoplasma rappresenta il segnale diretto per l'esocitosi dei granuli insulinici.

Oltre al suo ruolo nelle cellule β -pancreatiche, GLUT2 è espresso anche a livello epatico, dove partecipa a una diversa modalità di segnalazione, prevalentemente di tipo metabolico e trascrizionale. A questo livello il glucosio trasportato da GLUT2 modula l'attività di specifici fattori di trascrizione, come il carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), contribuendo alla regolazione dell'espressione genica di enzimi coinvolti nella glicolisi e nella lipogenesi. Quindi il GLUT2 è coinvolto non solo nelle risposte rapide legate alla secrezione insulinica, ma anche in meccanismi di adattamento a lungo termine del metabolismo cellulare.

GLUT2 è espresso anche a livello renale, intestinale e centrale, questo evidenzia la sua partecipazione ad un sistema integrato di regolazione dell'omeostasi glucidica. In particolare, i neuroni glucosensibili che esprimono GLUT2 contribuiscono alla modulazione della risposta neuroendocrina, influenzando indirettamente la secrezione insulinica e il metabolismo sistemico. Questa proteina si configura quindi come un nodo fondamentale nella rete di comunicazione tra organi coinvolti nel controllo della glicemia.

È importante sottolineare che GLUT2 non partecipa direttamente alle classiche vie di segnalazione dell'insulina attivate dal legame dell'ormone al suo recettore, tuttavia, esso agisce a monte di tali processi, regolando la disponibilità intracellulare del glucosio e, di conseguenza, la generazione del segnale che induce la secrezione insulinica.

Questa centralità di GLUT2 spiega perché alterazioni della sua espressione o funzione possano avere ripercussioni clinicamente rilevanti. Infatti, difetti di GLUT2 compromettono la capacità delle cellule β e del fegato di rispondere adeguatamente ai livelli di glucosio, favorendo l'insorgenza di iperglicemia e contribuendo allo sviluppo del diabete di tipo 2. Evidenze sperimentali confermano che tali alterazioni sono associate ad un aumentato rischio di disfunzione metabolica, sottolineando il ruolo cruciale di GLUT2 non solo nella regolazione fisiologica dell'omeostasi glucidica, ma anche nella patogenesi della malattia (Thorens, 2015). Non esistono attualmente, terapie farmacologiche mirate nei confronti dell'attività o dell'espressione di GLUT2, ma la stretta correlazione che c'è tra il suo meccanismo d'azione e la patogenesi del diabete di tipo 2 lo individua come potenziale target farmacologico per il trattamento di questa malattia.

1.3 Terapie farmacologiche

Circa un terzo dei pazienti con diabete di tipo 2 necessita di un trattamento con insulina per tutta la vita.

I farmaci di prima linea per il diabete di tipo 2 includono metformina e, nei pazienti con comorbilità cardiovascolari, renali o ad alto rischio cardiovascolare, agonisti del recettore GLP-1 (Ozempic, Rybelsus, Wegovy, Saxenda, Victoza, Mounjaro, Trulicity, Lyxumia) o inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT2i) (Forxiga, Xigdue, Jardiance, Synjardy, Invokana, Vokanamet, Steglatro, Segluromet). In Italia queste terapie farmacologiche antidiabetiche sono rimborsate dal sistema sanitario nazionale.

Diversi studi clinici randomizzati hanno dimostrato i benefici di specifici farmaci SGLT2i e GLP-1R rispetto al placebo per le malattie cardiovascolari aterosclerotiche (riduzione del rischio 12% - 26%), insufficienza cardiaca (riduzione del rischio 18% - 25%) e malattie renali (riduzione del rischio 24% - 39%) in 2-5 anni (Kalyani et al., 2025).

La metformina appartenente alla classe delle biguanidi, il suo principale meccanismo d'azione consiste nella riduzione della produzione epatica di glucosio attraverso l'inibizione della gluconeogenesi e permettendo il così controllo della glicemia a digiuno, inoltre aumenta la sensibilità insulinica nei tessuti periferici, come i muscoli scheletrici, favorendo un maggiore assorbimento del glucosio. In misura minore, questo farmaco può ridurre l'assorbimento intestinale del glucosio, contribuendo al controllo della glicemia postprandiale. Un vantaggio clinico importante della metformina è l'assenza di effetti ipoglicemizzanti rilevanti quando somministrata da sola.

Per quanto riguarda la sicurezza, la metformina è generalmente ben tollerata, ma può causare effetti collaterali gastrointestinali, che rappresentano la manifestazione più comune; tra questi si riscontrano nausea, diarrea, dolore addominale e gonfiore. Tali effetti si presentano più frequentemente all'inizio della terapia e tendono a ridursi con l'assunzione del farmaco a stomaco pieno o con un incremento graduale della dose. Si tratta di un farmaco efficace e sicuro per questo ancora oggi rimane il trattamento di prima linea contro il diabete di tipo 2.

Gli agonisti del recettore del glucagon-like peptide-1 (GLP-1RA) sono farmaci innovativi che agiscono imitando l'azione dell'ormone intestinale GLP-1, un'incretina endogena che svolge un ruolo centrale nella regolazione della glicemia post-prandiale. In particolare, i GLP-1RA stimolano la secrezione di insulina in maniera glucosio-dipendente, ossia solo in

presenza di livelli elevati di glucosio nel sangue, riducendo così il rischio di ipoglicemia rispetto ad altre terapie antidiabetiche. Parallelamente, inibiscono la secrezione di glucagone, diminuendo la produzione epatica di glucosio e contribuendo al controllo glicemico complessivo. Un ulteriore meccanismo d'azione riguarda lo svuotamento gastrico: i GLP-1RA rallentano il transito del cibo dallo stomaco all'intestino, determinando un aumento più graduale della glicemia post-prandiale. Inoltre, agendo sui centri ipotalamici della sazietà, questi farmaci riducono l'appetito e favoriscono la perdita di peso.

Per quanto riguarda la sicurezza, gli effetti collaterali più frequentemente osservati sono di natura gastrointestinale e comprendono nausea, vomito, diarrea, stitichezza e sensazione di pienezza. Questi disturbi tendono generalmente a comparire nelle prime settimane di trattamento e sono spesso attenuabili mediante l'incremento graduale del dosaggio. Come per la metformina, anche i GLP-1RA se utilizzati come monoterapia presentano un basso rischio di ipoglicemia, rendendoli una scelta terapeutica sicura ed efficace per il controllo glicemico e per la gestione del peso corporeo nei pazienti con diabete di tipo 2.

Gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT2i), a differenza della metformina e dei GLP-1RA, agiscono in maniera indipendente dall'insulina, offrendo un approccio terapeutico complementare alle classiche terapie insulinodipendenti. Il loro bersaglio principale è il trasportatore sodio-glucosio di tipo 2, localizzato nei tubuli prossimali del rene, responsabile del riassorbimento di circa il 90% del glucosio filtrato dal plasma. L'inibizione di SGLT2 riduce il riassorbimento renale del Glucosio, determinando un aumento della sua eliminazione urinaria (glicosuria) e conseguente riduzione della glicemia. La perdita di glucosio attraverso le urine comporta una riduzione calorica che si traduce in perdita di peso nei pazienti trattati, inoltre l'effetto diuretico può contribuire ad una leggera riduzione della pressione arteriosa, conferendo potenziali vantaggi cardiovascolari e renali.

Per quanto riguarda la sicurezza, gli SGLT2i sono generalmente ben tollerati e tra gli effetti collaterali più comuni si osservano infezioni genito-urinarie, come cistiti e vulvovaginiti legate all'aumento della concentrazione di glucosio nelle urine che favorisce la proliferazione batterica e fungina, inoltre si può verificare una leggera disidratazione o ipotensione che può manifestarsi con vertigini o crampi soprattutto in pazienti anziani o in quelli già sottoposti a terapia diuretica.

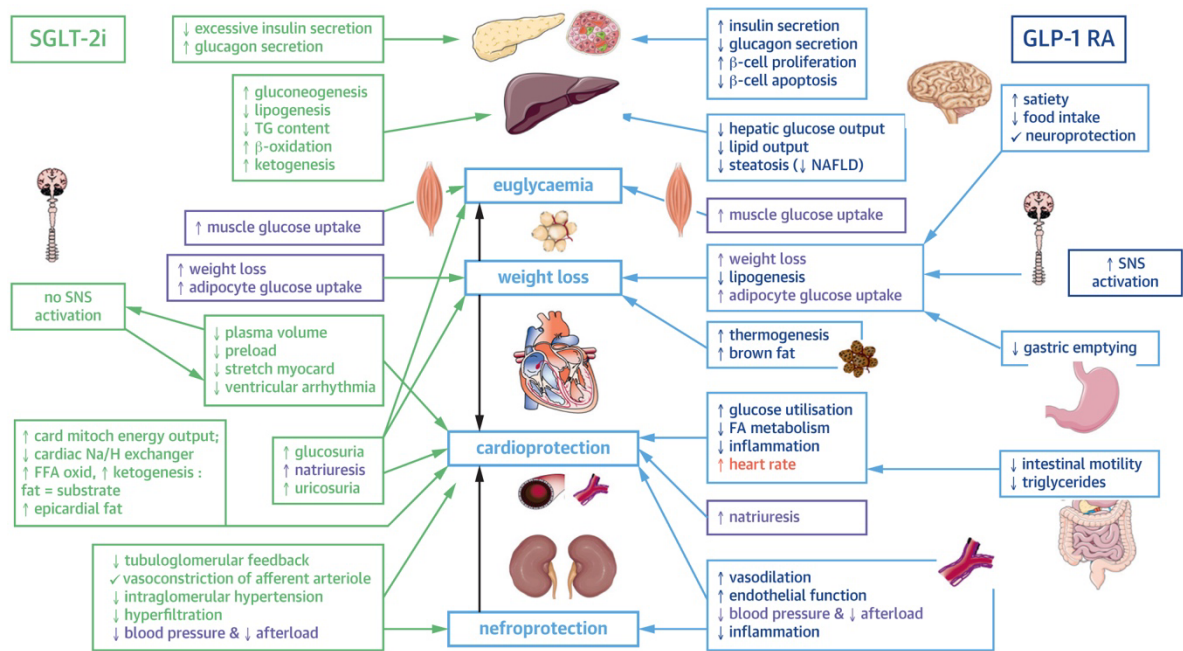


Figura 4. Meccanismi fisiologici dei nuovi agenti farmacologici per il diabete. Lo schema mostra come sia gli SGLT2i che i GLPRA hanno effetti su più organi del corpo, modulando non solo il controllo glicemico, ma anche la lipogenesi, la sazietà, il tono muscolare liscio e la filtrazione renale (Wilcox et al., 2020).

1.4 Approcci nutraceutici e probiotici nel diabete di tipo 2

1.4.1 Semi di dattero

La palma da dattero (*Phoenix dactylifera L.*) rappresenta una coltura di rilevante importanza economica e nutrizionale nelle regioni tropicali e subtropicali, in particolare nel Medio Oriente e nel Nord Africa, dove il consumo dei frutti è diffuso su larga scala e contribuisce significativamente sia alla sicurezza alimentare che all'economia locale. Negli ultimi decenni, la produzione globale di datteri ha mostrato un incremento costante, evidenziando il crescente interesse verso questa specie vegetale non solo per il frutto edibile, ma anche per i suoi sottoprodotti; tra questi, i più rilevanti risultano essere i semi di dattero che costituiscono circa il 10–15% del peso del frutto. Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse scientifico nei confronti di questa matrice vegetale, in quanto ricca di composti bioattivi associati a numerose attività biologiche, tra cui effetti antiossidanti, antinfiammatori e antidiabetici. Tali evidenze hanno portato a rivalutare i semi di dattero come possibile fonte di ingredienti funzionali e nutraceutici.

I semi di dattero presentano una composizione nutrizionale ricca in macronutrienti e composti bioattivi, tra cui fibre, proteine e lipidi. L'elevato contenuto di fibre e la presenza di acidi grassi monoinsaturi, in particolare acido oleico, contribuiscono ai potenziali effetti benefici sul metabolismo glucidico e lipidico. Inoltre, forniscono vitamine e minerali essenziali, rendendoli una promettente fonte nutrizionale e funzionale.

Particolare attenzione viene rivolta alla frazione fenolica, in quanto, i semi di dattero contengono elevate quantità di acidi fenolici (come acido gallico, caffeico, ferulico e p-cumarico) e flavonoidi (tra cui rutina, quercetina e luteolina), spesso in concentrazioni superiori rispetto ad altri frutti e semi; questi composti sono noti per le loro proprietà antiossidanti e sono ritenuti responsabili, almeno in parte, degli effetti antidiabetici che si sono osservati in alcuni modelli sperimentali.

In relazione alla composizione fitochimica descritta, numerosi studi hanno evidenziato come i semi di dattero siano dotati di diverse attività biologiche, tra cui proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche, antidiabetiche, epatoprotettive e nefroprotettive.

Tra le attività biologiche, quella antidiabetica è di particolare interesse. Studi in vitro hanno dimostrato che gli estratti di semi di dattero hanno la capacità di inibire enzimi digestivi chiave, quali α -amilasi e α -glucosidasi, determinando una riduzione dell'idrolisi dei carboidrati e del conseguente assorbimento di glucosio a livello intestinale, limitando così

l'aumento di glicemia postprandiale. È stato osservato inoltre che i composti bioattivi presenti nei semi di dattero possono modulare vie metaboliche coinvolte nell'omeostasi glucidica. In particolare, si nota un aumento dell'attività della protein chinasi attivata da AMP (AMPK) e della traslocazione del trasportatore GLUT4 con conseguente aumento dell'assorbimento di glucosio nei tessuti periferici e della sensibilità insulinica.

Parallelamente, alcuni studi suggeriscono un effetto regolatorio su enzimi epatici coinvolti nella gluconeogenesi, con una conseguente riduzione della produzione endogena di glucosio (Alkhoori et al., 2022).

Un ulteriore contributo deriva dall'azione antiossidante dei polifenoli, che consente di ridurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di limitare il danno ossidativo a carico delle cellule β -pancreatiche, preservandone la funzionalità e la capacità di secrezione insulinica. La modulazione di queste pathways contribuisce perciò a ridurre lo stato infiammatorio cronico tipico del diabete di tipo 2.

Le evidenze sperimentali ottenute in vitro sono accompagnate anche da studi in vivo su modelli animali di diabete indotto che confermano tali meccanismi, mostrando una significativa riduzione della glicemia, un miglioramento del profilo lipidico e una protezione nei confronti di fegato e reni. Questi effetti registrati sembrano essere dovuti all'azione sinergica tra inibizione enzimatica, modulazione delle vie metaboliche intracellulari e attività antiossidante per cui, nel complesso, i semi di dattero rappresentano una promettente fonte di composti bioattivi con potenziale impiego nutraceutico nella prevenzione e nel trattamento del diabete mellito, sebbene ulteriori studi clinici siano necessari per confermare tali effetti nell'uomo (Alkhoori et al., 2022).

1.4.2 Microbiota intestinale e probiotici

Il microbiota intestinale è oggi riconosciuto come un elemento chiave nella regolazione dell'omeostasi metabolica e nello sviluppo del diabete di tipo 2. Numerose evidenze indicano che alterazioni qualitative e quantitative della comunità microbica intestinale, note come disbiosi, siano strettamente associate alla patogenesi della malattia.

In condizioni fisiologiche, il microbiota contribuisce al mantenimento dell'equilibrio metabolico attraverso diversi meccanismi quali: fermentazione dei nutrienti non digeribili, produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) e modulazione del sistema immunitario.

Nei soggetti con diabete di tipo 2 si osserva una composizione microbica intestinale significativamente alterata, caratterizzata da una riduzione dei batteri benefici e un aumento di specie potenzialmente pro-infiammatorie. Tale disbiosi è associata ad un aumento della permeabilità intestinale che comporta una maggior facilità di passaggio per le endotossine batteriche, come i lipopolisaccaridi (LPS), nel circolo sistemico. L'aumento dei livelli circolanti di LPS determina l'attivazione di risposte infiammatorie che interferiscono con la segnalazione insulinica e comportano lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico che, come è stato descritto, costituisce uno dei principali meccanismi alla base dell'insulino-resistenza.

Gli acidi grassi a catena corta (SCFA), come butirrato, propionato e acetato vengono normalmente rilasciati come prodotti metabolici dal microbiota intestinale e svolgono un ruolo protettivo migliorando la sensibilità insulinica e regolando il metabolismo glucidico in quanto sono in grado di stimolare la secrezione di GLP-1 (glucagon-like peptide-1) da parte delle cellule L intestinali. Nei pazienti con diabete di tipo 2, la produzione di questi metaboliti risulta spesso ridotta. Nel complesso, emerge chiaramente che il microbiota intestinale non è solo un attore passivo, ma un vero e proprio regolatore metabolico oltre che un possibile target terapeutico (Salgaço et al., 2019).

I probiotici sono microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono benefici alla salute dell'ospite, agendo principalmente attraverso il ripristino dell'equilibrio della comunità microbica intestinale. In particolare, aumentano la presenza di batteri benefici e diminuiscono quelli potenzialmente patogeni. Questo riequilibrio determina la riduzione della permeabilità e dell'assorbimento delle endotossine batteriche nel circolo sistemico, la riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie e l'aumento della produzione degli acidi grassi a corta catena (SCFA) con conseguente stimolazione della secrezione di glucagon-like peptide-1 (GLP-1).

Nel complesso, attraverso questi meccanismi integrati, l'utilizzo opportunatamente formulato di probiotici in grado di modulare queste dinamiche molecolari, diviene importante in alcuni aspetti fisiopatologici del diabete di tipo 2. Infatti, come evidenziato in letteratura, tali modulazioni si traducono in un miglioramento dei parametri clinici rilevanti, tra cui la glicemia a digiuno, i livelli di emoglobina glicata (HbA1c) e gli indici di insulino-resistenza. Tuttavia, l'entità di tali benefici risulta variabile e dipendente da fattori quali il ceppo probiotico impiegato, il dosaggio e la durata del periodo di assunzione, rendendo necessaria un'ulteriore standardizzazione degli approcci terapeutici.

1.4.3 *Lactobacillus paracasei* F-19 come probiotico antidiabetico

Negli ultimi decenni, il crescente interesse nei confronti dei probiotici ha portato all'identificazione di ceppi batterici con proprietà funzionali specifiche, in grado di influenzare positivamente la salute dell'ospite. In questo contesto, il *Lactobacillus paracasei* F19 si distingue come uno dei ceppi maggiormente caratterizzati dal punto di vista molecolare, genetico e clinico.

Uno dei requisiti fondamentali per l'applicazione di un probiotico in ambito nutrizionale e terapeutico è la sua affidabilità nel tempo; a tal proposito, *Lactobacillus paracasei* F19 mostra una marcata stabilità genetica, caratteristica che ne supporta la sicurezza e la riproducibilità degli effetti biologici.

Dal punto di vista molecolare, gli effetti di *Lactobacillus paracasei* F19 sono il risultato di una modulazione diretta di specifiche vie di segnalazione intracellulare.

In particolare, è noto che componenti strutturali dei batteri Gram-positivi, come peptidoglicani e acidi teicoici, possano essere riconosciuti dai recettori dell'immunità innata dell'ospite, tra cui i recettori Toll-like (TLR). In questo modo, il probiotico è in grado di interagire con cellule immunitarie attivando vie di segnalazione dipendenti da Fattore Nucleare kB (NF-kB), molecola chiave nella regolazione dell'espressione genica di numerose citochine e mediatori dell'infiammazione quali TNF- α (Fattore di Necrosi Tumorale α), IL-6 (Interleuchina 6) e IL-10 (Interleuchina 10), permettendo così un bilanciamento tra risposta pro- ed antinfiammatoria. La disregolazione delle vie associate all'attività di NF-kB (Fattore Nucleare kB), risulta essere alla base dell'insorgenza di patologie croniche, incluse quelle metaboliche, di origine infiammatoria.

Un ulteriore livello di azione di *Lactobacillus paracasei* F19 riguarda l'interazione con l'ecosistema microbico intestinale. Sebbene i meccanismi molecolari di competizione non siano completamente dettagliati, è plausibile che il probiotico contribuisca alla modulazione del microbiota attraverso la produzione di metaboliti antimicrobici e la competizione per siti di adesione e nutrienti. Questo si traduce in una riduzione della colonizzazione da parte di patogeni con conseguente miglioramento dell'integrità della barriera intestinale e maggiore protezione nei confronti del passaggio di endotossine batteriche nel circolo sistemico; vi è quindi un effetto protettivo e preventivo nei confronti dell'infiammazione cronica associata a questi processi fisiopatologici.

Dal punto di vista neurofisiologico, sembra che i segnali derivanti dall'attività di *Lactobacillus paracasei* F19 possano influenzare la trasmissione neuronale intestinale attraverso mediatori biochimici, quali neurotrasmettitori, peptidi e metaboliti microbici, determinando un possibile ruolo del ceppo nella modulazione di funzioni sistemiche attraverso vie neuro-immuno-endocrine integrate.

Considerando complessivamente questi meccanismi, si osserva come l'azione di *Lactobacillus paracasei* F19 sia il risultato di una regolazione fine e multilivello di processi biologici complessi. In particolare, la modulazione della via NF-kB, il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale e l'interazione con il sistema nervoso enterico rappresentano tre nodi centrali attraverso cui il ceppo esercita i propri effetti.

Alla luce della stretta interconnessione tra infiammazione cronica, disbiosi intestinale e alterazioni metaboliche, tali meccanismi assumono una rilevanza significativa anche nel contesto delle patologie metaboliche. In particolare, la riduzione dell'attivazione infiammatoria sistemica e il miglioramento dell'integrità della barriera intestinale risultano strettamente correlati a un aumento della sensibilità insulinica, ponendo così le basi molecolari per un potenziale impiego di *Lactobacillus paracasei* F19 nel contrasto e nella prevenzione dei processi fisiopatologici alla base dello sviluppo dell'insulino-resistenza, caratteristica del diabete di tipo 2.

In conclusione, *Lactobacillus paracasei* F19 emerge come probiotico dotato di un profilo d'azione complesso, in grado di modulare specifici processi molecolari e diversi sistemi biologici dell'ospite. Le evidenze disponibili supportano il ruolo di questo ceppo nella regolazione della risposta immunitaria, nella stabilizzazione del microbiota e nell'interazione con il sistema nervoso enterico, delineando un insieme di effetti integrati che giustificano il crescente interesse nei suoi confronti (Di Cerbo e Palmieri, 2013). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi, sia clinici che traslazionali, per chiarire in modo più approfondito i meccanismi molecolari coinvolti e per definire con maggiore precisione le potenziali applicazioni terapeutiche.

2 SCOPO DELLO STUDIO

Il diabete di tipo 2 rappresenta una delle sfide sanitarie più significative del XXI secolo, con una prevalenza in costante crescita a livello globale e un impatto devastante sulla qualità di vita dei soggetti affetti e sui sistemi sanitari nazionali. Sebbene le terapie farmacologiche convenzionali abbiano migliorato significativamente la gestione glicemica e la prognosi dei pazienti, la complessità fisiopatologica della malattia e le limitazioni associate ai trattamenti attuali (effetti avversi, scarsa aderenza terapeutica, costi elevati) rendono necessaria la ricerca di approcci complementari e integrativi. In questo contesto, l'interesse scientifico verso i composti bioattivi di origine naturale e i probiotici è cresciuto considerevolmente negli ultimi anni. I semi di *Phoenix dactylifera*, ricchi di polifenoli e fibre, e i metaboliti prodotti da *Lactobacillus paracasei* F-19 rappresentano due promettenti agenti naturali con potenziale attività modulatoria sul metabolismo glucidico e sulla funzionalità β -cellulare.

L'obiettivo principale della presente tesi sperimentale è stato quello di valutare l'effetto di estratti acquosi di semi di *Phoenix dactylifera* (Macerato Acquoso di semi di dattero) e di metaboliti prodotti dal probiotico *Lactobacillus paracasei* F-19 (filtrato metabolico) sulla modulazione dell'espressione di specifici markers molecolari associati alla funzionalità delle cellule β -pancreatiche umane in un modello cellulare in vitro di diabete di tipo 2.

Gli obiettivi specifici dello studio sono stati i seguenti:

- Valutare l'effetto dell'iperglicemia cronica (Glucosio 25mM a 48 e 72 ore) sull'espressione delle proteine GRP94, Sintaxina-4, GLP-1R e GLUT2 nella linea cellulare β -pancreatica umana 1.1B4, come modello in vitro di diabete di tipo 2.
- Determinare l'effetto del Macerato Acquoso di semi di dattero (*Phoenix dactylifera*) a diverse concentrazioni sull'espressione dei markers suddetti nelle cellule 1.1B4 esposte a stress iperglicemico.
- Valutare l'effetto del filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 a diverse concentrazioni sull'espressione dei marker suddetti nelle cellule 1.1B4 in condizioni iperglicemiche.
- Analizzare gli effetti del trattamento combinato con Macerato Acquoso di semi di dattero e filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 sull'espressione dei markers β -cellulari, al fine di identificare eventuali sinergie o interazioni tra i due composti.

I risultati di questo studio potrebbero fornire basi scientifiche per lo sviluppo di strategie integrative nel trattamento del diabete di tipo 2 basate sull'utilizzo combinato di approcci nutraceutici e probiotici come complemento alla terapia farmacologica convenzionale.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Modelli cellulari in vitro per lo studio del diabete di tipo 2

3.1.1 La linea cellulare 1.1B4: modello umano di cellule β -pancreatiche

Lo studio della biologia e della fisiopatologia delle cellule β -pancreatiche richiede l'utilizzo di modelli cellulari idonei a riprodurre le caratteristiche funzionali di queste cellule specializzate. La scarsità di cellule β umane primarie, disponibili esclusivamente da donatori d'organo in numero limitato e con caratteristiche fenotipiche variabili, ha reso necessario lo sviluppo di linee cellulari stabili che mantengano le caratteristiche funzionali delle cellule β umane native.

Per molti anni, le linee cellulari di β -cellule di roditori, hanno rappresentato gli strumenti principali per la ricerca sul diabete in vitro, tuttavia, le significative differenze specie-specifiche nella risposta alla secrezione insulinica, nei meccanismi di signaling e nelle soglie di risposta al glucosio rendono i modelli di roditori scarsamente predittivi della fisiopatologia umana.

La linea cellulare umana 1.1B4 è stata generata mediante elettrofusione di cellule β -pancreatiche primarie umane con la linea di carcinoma duttale pancreatico PANC-1. Questa metodica di ibridazione cellulare ha permesso di combinare le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule β umane (secrezione insulinica glucosio-dipendente, espressione di geni β -cellulari specifici) con la capacità proliferativa stabile della linea tumorale. (McCluskey et al., 2011). La linea 1.1B4 è commercialmente disponibile attraverso l'European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).

La caratterizzazione funzionale della linea 1.1B4 ha evidenziato che queste cellule sono in grado di esprimere e secernere insulina umana endogena in risposta a stimoli glucidici e non glucidici; esprimono geni specifici delle cellule β quali GCK (glucochinasi), PCSK1 (proconvertasi 1), PCSK2 (proconvertasi 2) e ABCC8 (subunità SUR1 dei canali K-ATP); mostrano attività calcio-dipendenti in risposta al glucosio e ad altri secretagoghi; inoltre, esprimono i principali componenti del macchinario di esocitosi dei granuli insulinici. In un esperimento di impianto in vivo, le cellule 1.1B4 sono state impiantate sottocute a topi diabetizzati con Streptozotocina e hanno determinato la riduzione delle concentrazioni plasmatiche di glucosio nel corso di quattro settimane e migliorato la tolleranza al glucosio rispetto ai controlli non impiantati (McCluskey et al., 2011).

Rispetto ad altre linee cellulari umane di cellule β , come la linea EndoC- β H1, la linea 1.1B4 presenta una risposta al glucosio di tipo dose-dipendente su un range di concentrazioni fisiologicamente rilevanti, una maggiore resistenza alle manipolazioni sperimentali e una stabilità fenotipica nel lungo periodo; tuttavia, come tutte le linee cellulari ibride, la 1.1B4 non riproduce completamente la complessità funzionale delle cellule β native, in particolare per quanto riguarda la secrezione insulinica bifasica e la sensibilità alle incretine (Vasu et al., 2013).

3.1.2 Effetti dell'iperglicemia sulla funzionalità β -cellulare

Il modello di glucotossicità in vitro mediante esposizione cronica a concentrazioni sovralfisiologiche di glucosio rappresenta uno degli approcci più utilizzati per riprodurre le condizioni di stress iperglicemico che caratterizzano il diabete di tipo 2 in vivo (Vasu et al., 2013).

L'esposizione delle cellule β a Glucosio 25mM, concentrazione notevolmente superiore ai livelli fisiologici (5 - 7 mM), per periodi prolungati (tipicamente 48 - 72 ore), determina una serie di alterazioni funzionali e molecolari che rispecchiano molti aspetti della disfunzione β -cellulare osservata nel diabete di tipo 2 conclamato.

È stato condotto uno studio sistematico delle risposte cellulari della linea 1.1B4 all'iperglicemia cronica per 48 e 72 ore con Glucosio 25 mM (Vasu et al., 2013) ed i risultati hanno evidenziato:

- Riduzione significativa del contenuto cellulare di insulina a 72 ore;
- Compromissione della risposta secretoria acuta a glucosio 16.7 mM a entrambi i tempi di trattamento (48 e 72 ore);
- Riduzione dell'attività della glucochinasi a 72 ore;
- Alterazione dell'espressione genica con downregolazione di INS, GCK, PCSK1, PCSK2, GJA1, ABCC8 e KCNJ11;
- Danni al DNA con aumento dell'apoptosi indotta dall'iperglicemia evidenziata dall'aumento dell'attività delle caspasi 3/7 e dalla riduzione della proteina anti-apoptotica BCL2.

Questi fenomeni sono mediati da molteplici meccanismi molecolari convergenti: l'aumento della produzione di ROS, la glicosilazione non enzimatica delle proteine (glicazione avanzata, AGE), l'attivazione della via della protein chinasi C (PKC) e lo stress del reticolo

endoplasmatico; La glucotossicità determina inoltre l'attivazione delle vie associate a NF- κ B con conseguente risposta infiammatoria intracellulare, che amplifica ulteriormente il danno β -cellulare (Gerber e Rutter, 2017).

Il modello di glucotossicità con Glucosio 25mM per 48 e 72 ore sulle cellule 1.1B4 è stato scelto nel presente studio in quanto rappresenta un sistema ben caratterizzato per la valutazione dell'effetto protettivo di composti bioattivi sulla funzionalità β -cellulare, con markers molecolari (GRP94, Sintaxina-4, GLP-1R, GLUT2) la cui riduzione è stata valutata in condizioni di stress iperglicemico e la cui modulazione da parte dei trattamenti in studio è stata valutata con tecniche immunochimiche (Western Blot, Elisa e immunofluorescenza).

3.1.3 Linea cellulare 1.1B4 utilizzata nello studio

Lo studio ha coinvolto l'utilizzo della linea cellulare 1.1B4 acquistata dalla ECACC "*European Collection of Authenticated Cell Cultures*" (Fig. 6a; Fig. 6b).

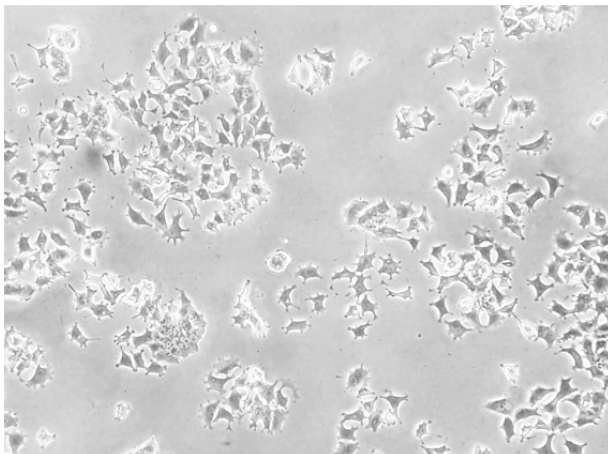


Figura 6a. Linea cellulare 1.1B4 a bassa densità.

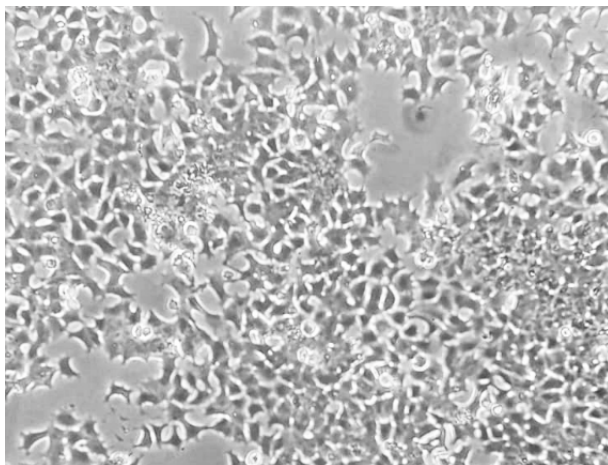


Figura 6b. Linea cellulare 1.1B4 ad alta densità (confluenza).

3.1.4 Medium di coltura

Per la linea cellulare 1.1B4 è stato utilizzato come mezzo di coltura l' RPMI-1640 w/o L-glutammina (EuroClone) al quale è stato addizionato: 10% di FBS decomplesmentarizzato, 1% di L-glutammina 2mM (Sigma-Aldrich), e 1% di Penicillina-Streptomicina 1x (EuroClone).

3.1.5 Tripsina-EDTA

La linea cellulare 1.1B4 prevede un tipo di crescita in adesione, quindi per essere contate e splittate alla densità opportuna sono state staccate dal supporto attraverso una soluzione 1x di Tripsina-EDTA in PBS sterile w/o Ca^{2+} e Mg^{2+} .

La tripsina è una proteasi in grado di tagliare i peptidi su Lys e Arg scindendo in questo modo il legame tra le integrine presenti sulla membrana cellulare ed il ligando che riveste il fondo del supporto; l'EDTA presente in soluzione agisce chelando gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} che, presenti nel medium, andrebbero ad inibire l'azione della tripsina.

La tripsina-EDTA è stata acquistata come stock 100x (Sigma-Aldrich) e portata alla concentrazione 1x con PBS sterile w/o Ca^{2+} e Mg^{2+} (EuroClone), un buffer salino-fosfato che per la sua isotonicità permette di mantenere l'osmolarità delle cellule senza comprometterne la vitalità; la tripsina così preparata è stata conservata a -20°C per mantenerne il potere d'azione, mentre per poter esplicitare la sua attività è stata scaldata a 37°C .

3.2 Semi di dattero

3.2.1 Procedure estrattive dei semi di *Phoenix dactylifera*

Gli estratti acquosi dei semi di dattero sono stati forniti dal prof. Alessandro Di Cerbo (Università di Camerino - UNICAM), in particolare, si tratta di due estratti ottenuti attraverso due procedure estrattive differenti.

Macerato Acquoso (Maq):

2,5g di semi di dattero sono stati polverizzati e trasferiti in una Falcon da 50ml; sono stati aggiunti 50ml di acqua distillata; la miscela è stata agitata con vortex per 1 minuto e successivamente è stata lasciata a macerare per 72 ore a temperatura ambiente; in seguito la miscela è stata centrifugata (4000 rpm, 5 minuti) per poi raccogliere il surnatante e filtrarlo con carta Whatman, in modo da eliminare l'eventuale particolato solido residuo, trasferendo il contenuto in una Falcon da 50ml; la soluzione ottenuta è stata filtrata in condizioni di sterilità con filtro sterile monouso da 0,22 μ m ottenendo così la soluzione sterile che costituisce lo stock [50mg/ml] di partenza da cui sono stati ottenuti i diversi trattamenti utilizzati nello studio mediante diluizione in medium di coltura RPMI; (conservazione a -20°C).

Estratto Acquoso sonicato (Eaq-sonicato):

2,5g di semi di dattero sono stati polverizzati e trasferiti in una Falcon da 50ml; sono stati aggiunti 50ml di acqua distillata; la miscela è stata agitata con vortex per 1 minuto e successivamente è stata lasciata a macerare per 72 ore a temperatura ambiente; in seguito, la miscela è stata sottoposta a sonicazione in sonicatore a bagnetto per un ora alla temperatura di 40°C (37kHz); successivamente la miscela è stata centrifugata (4000 rpm, 5 minuti) per poi raccogliere il surnatante e filtrarlo con carta Whatman, in modo da eliminare l'eventuale particolato solido residuo, trasferendo il contenuto in una Falcon da 50ml; la soluzione ottenuta è stata filtrata in condizioni di sterilità con filtro sterile monouso da 0,22 μ m ottenendo così la soluzione sterile che costituisce lo stock [50mg/ml] di partenza da cui sono stati ottenuti i diversi trattamenti utilizzati nello studio mediante diluizione in medium di coltura RPMI; (conservazione -20°C).

3.3 *Lactobacillus paracasei* F19

3.3.1 Procedura di ottenimento del filtrato metabolico

Il filtrato metabolico del *Lactobacillus paracasei* F19 è stato fornito dalla Prof.ssa Carla Sabia (Università di Modena e Reggio Emilia - UNIMORE)

Il *Lactobacillus paracasei* F19 (identificazione effettuata mediante il sistema API® 50 CHL bioMerieux) è stato seminato su supporto di MRS agar (composizione in Figura 7a) e incubato a 37°C per 48h in condizioni di anaerobiosi, successivamente è stato inoculato in MRS brodo (composizione in Figura 7b) e incubato a 37°C per 48h.

La brodocoltura così ottenuta è stata centrifugata (10000rpm, 20 minuti) in modo da precipitare i residui cellulari solidi e successivamente recuperare il surnatante, il quale è stato successivamente filtrato tramite filtro Sartorius da 0.45µm per rimuovere l'eventuale particolato solido residuo.

La soluzione ottenuta è stata liofilizzata per poi essere risospesa in medium di cultura RPMI ed infine filtrata in condizioni di sterilità con filtro sterile monouso da 0,22µm ottenendo così la soluzione sterile che costituisce il filtrato metabolico stock di partenza da cui sono stati ottenuti i diversi trattamenti utilizzati nello studio mediante diluizione in medium di coltura RPMI. (conservazione -20°C).

Figura 7a. MRS Agar.	g/L
Peptone	10.00
Estratto di carne	10.00
Estratto di lievito	5.00
Glucosio	20.00
Potassio fosfato bib.	2.00
Sodio acetato	5.00
Diammonio citrato	2.00
Magnesio solfato	0.20
Manganese solfato	0.05
Agar	15.0

Figura 7b. MRS Brodo.	g/L
Peptone	10.00
Estratto di carne	10.00
Estratto di lievito	5.00
Glucosio	20.00
Potassio fosfato bib.	2.00
Sodio acetato	5.00
Diammonio citrato	2.00
Magnesio solfato	0.20
Manganese solfato	0.05
Tween 80	1.00mL

3.3.2 Liofilizzazione del filtrato metabolico

La Liofilizzazione è un processo tecnologico che consente la disidratazione di un prodotto per sublimazione (passaggio dallo stato solido a quello aeriforme senza passare attraverso la fase liquida), consentendo così di mantenere inalterata la struttura molecolare e le proprietà del composto.

Partendo quindi da una soluzione è possibile ottenere un solido stabile nel tempo, poroso, friabile, igroscopico e facilmente solubilizzabile.

La tecnica di Liofilizzazione si compone di tre fasi distinte:

- Congelamento della soluzione: prima fase in cui il campione da liofilizzare viene congelato rapidamente a -80°C (la rapidità di congelamento permette di ottenere cristalli piccoli e ben distribuiti che non danneggiano la struttura del composto).
- Essiccazione primaria (Liofilizzazione): seconda fase in cui viene sublimato il ghiaccio interstiziale grazie al vuoto che si crea nella camera; il vapore acqueo che viene sequestrato su un'apposita serpentina la cui temperatura è compresa tra -60°C e -70°C .
- Essiccazione secondaria: terza fase in cui viene effettuato un breve riscaldamento che raggiunge al massimo i 50°C in modo da allontanare tutta l'acqua residua nel campione e non alterare i componenti più termolabili presenti al suo interno.

Questa tecnica permette di ottenere dei prodotti disidratati con un tasso di umidità molto basso che si aggira tra 1-5% rendendo il campione solido estremamente solubilizzabile; nel caso di questo studio ha permesso di ottenere un peso secco esatto del filtrato metabolico (non ancora sterilizzato) in modo che, risospingendolo, si potesse far affidamento ad una concentrazione esatta della soluzione stock dalla quale sono stati ottenuti tutti i trattamenti utilizzati a diverse concentrazioni.



Figura 8. Liofilizzatore utilizzato in questo studio: LIO 5P 4K (SARIN).

3.4 Mantenimento, splitting, conta e semina cellulare

La conservazione della linea cellulare 1.1B4 è stata effettuata all'interno criovials da 2ml contenenti un volume di 1ml costituito da: 10% di FBS, 10% di DMSO e 80% di cellule ottenute dallo splitting di una cultura a confluenza e risospese in medium RPMI; in queste condizioni è possibile conservare le cellule a -80°C per 2-3 mesi e successivamente è necessario trasferirle in azoto liquido a -196°C.

Quando è necessario utilizzarle si mette il criovials nel bagnetto riscaldato a 37°C per circa 5 minuti, dopodiché ci si pone in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare e si trasferisce tutto il volume in una dish sterile da 100mm (la scelta dipende dal numero di cellule) precedentemente riempita con un volume adeguato di medium riscaldato a 37°C, successivamente si trasferisce la dish in incubatore (37°C, 5% di CO₂) per consentire il mantenimento e l'amplificazione della linea cellulare.

Il giorno successivo o 5-6h dopo la messa in coltura (tempo necessario alle cellule per aderire alla dish e riattivarsi) viene cambiato il medium così da allontanare definitivamente il DMSO presente.

Quando le cellule raggiungono la confluenza (90 - 100%) vengono tagliate (splittate) così da ampliare la linea cellulare o utilizzarla per i test dose-risposta seminando le cellule nelle piastre multi well ad opportune densità.

Lo splitting cellulare viene eseguito, per le cellule in adesione, mediante rimozione del mezzo di coltura con pipetta graduata sterile monouso, lavaggio con PBS 1x e successiva aggiunta di Tripsina-EDTA 1x a 37°C (1000µl per dish 100mm), dopodiché si pone la dish nell'incubatore per 5 minuti per poi bloccare l'azione della tripsina aggiungendo il doppio del volume di medium riscaldato a 37°C (2000µl medium per dish 100mm); prima di interrompere l'azione della tripsina si verifica il distacco delle cellule dal supporto; a questo punto le cellule distaccate vengono raccolte e trasferite in una Falcon da 15ml sterile che viene sottoposta a centrifugazione (3500rpm per 5 min), dopodiché viene rimosso il surnatante e risospeso delicatamente il pellet con alcuni ml di medium (dai 2 ai 5ml di medium a 37°C in funzione delle dimensioni del pellet presente).

Le cellule così risospese possono essere contate e seminate ad opportuna densità nelle multi well secondo il layout, oppure possono essere trasferite in una nuova dish per il mantenimento della linea cellulare.

Affinché si possano seminare le cellule ad una densità ben precisa è necessario conoscere la quantità di cellule presenti nel pellet cellulare risospeso con nuovo medium; la conta cellulare è possibile grazie all'ausilio di un di emocitometro, che in questo studio è rappresentato dalla *Camera Neubauer* (Fig. 12).

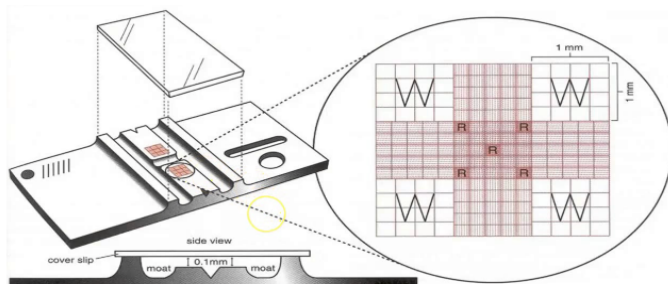


Figura 9. Camera di Neubauer.

L'emocitometro, come si può vedere in figura, è costituito da un particolare vetrino portaoggetti su cui sono presenti due siti distinti per la conta cellulare spessi 0,1mm; su ciascun sito di conta sono visibili al microscopio ottico (ingrandimento 10x) 9 quadrati grandi con una superficie di 1mm ciascuno. I 4 quadrati grandi delimitati da linee triple e disposti agli angoli (indicati in figura con W), sono a loro volta suddivisi in 16 quadrati più piccoli ed è in questi che si vanno a contare le cellule.

Per contare le cellule presenti in un certo volume di medium si prelevano 10µl della sospensione cellulare e si caricano in una delle camere tenendo premuto il vetrino coprioggetto sul portaoggetti così da permettere una corretta distribuzione delle cellule senza avere bolle; il numero di cellule/ml sarà dato dal numero medio di cellule contate nei quattro quadrati moltiplicato per 10^4 (deriva dalla conversione di $0,1\text{mm}^2$ a ml) moltiplicato a sua volta per il fattore di diluizione utilizzato (ml di medium con cui è stato sospeso il pellet cellulare). Conoscendo la concentrazione cellulare [numero di cellule/ml], il numero dei pozzetti da seminare e il volume di cellule che si vogliono seminare all'interno di ogni pozzetto, si esegue l'opportuna diluizione in una nuova Falcon e si procede con la semina.

Nello studio sono state utilizzate 2 tipologie di piastre multi well:

- Multi 6-well: impiegate allo scopo di fare raggiungere la confluenza cellulare per poi estrarne le proteine totali utili per i successivi saggi di Western Blot ed ELISA. In questo caso il volume di semina di ciascun pozzetto è stato di 3ml e corrisponde a quello del trattamento.
- Multi 96-well: impiegate allo scopo di valutare la citotossicità dei campioni. In questo caso il volume di semina di ciascun pozzetto è stato di 100µl mentre quello del trattamento è stato di 200µl.

3.5 Test tossicologici: citotossicità con CCK

I test tossicologici sono stati condotti in piastre multi 96-well sterili monouso con pozzetti pretrattati per consentire l'adesione cellulare; la tossicità è stata valutata alle 48h e 72h valutando in prima istanza la vitalità cellulare mediante Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories) con lettura spettrofotometrica a $\lambda=450\text{nm}$.

È stato deciso di condurre il saggio utilizzando una densità cellulare pari a 7000 cells/well per le 48h e 5000 cells/well per le 72h utilizzando un volume di semina di 100 μl /well e come volume di trattamento 200 μl /well. In particolare, le cellule sono state seminate al mattino e trattate dopo 24h in modo da far trascorrere il tempo necessario alla corretta adesione cellulare; il layout stabilito per condurre il saggio di citotossicità prevede un numero di replicati pari a 4 per ciascuna diluizione del trattamento testata e come controllo è stato utilizzato medium RPMI rinfrescato al momento del trattamento.

Al termine del tempo di esposizione (48 o 72 ore) si aggiungono 20 μl /well di CCK-8, (soluzione pronta all'uso), il quale consente saggi colorimetrici sensibili per la determinazione della vitalità cellulare nei test di proliferazione cellulare e citotossicità.

Il sale di Tetrazolio altamente idrosolubile (WST-8) viene ridotto dall'attività dell'enzima deidrogenasi (attiva solo nelle cellule vive) a Formazano di colore giallo, che è solubile nei terreni di coltura del tessuto. La quantità di colore di Formazano, generato dall'attività delle deidrogenasi nelle cellule, è direttamente proporzionale al numero di cellule viventi.

La misura della vitalità cellulare è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica ad una $\lambda = 450\text{nm}$. I dati così ottenuti vengono inseriti in file Excel per calcolare media, deviazione standard e scarto percentuale così da poter valutare l'effetto di ciascun trattamento sulla vitalità cellulare.

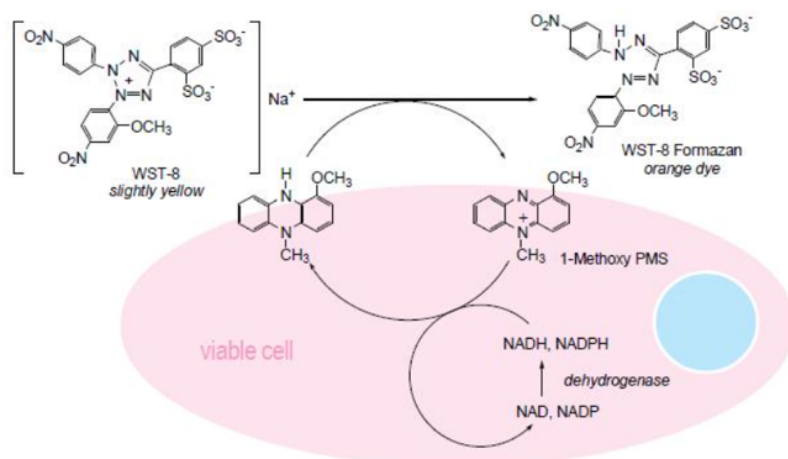


Figura 10. Meccanismo di rilevazione della vitalità cellulare mediante reazione di riduzione del WST-8 a Formazano (arancione) per azione delle deidrogenasi cellulari. [Dojindo.eu.com]

3.6 Estrazione e quantificazione proteica

3.6.1 Trattamenti per Western Blot ed ELISA

Per eseguire i saggi immunochimici di Western blot ed ELISA è necessario coltivare le cellule, in presenza dei trattamenti, in modo tale che al termine del periodo di esposizione siano a confluenza o in quantità tale da permettere una efficace estrazione proteica totale.

Considerando la velocità di crescita delle 1.1B4 è stato deciso di seminare 300000 cells/well sia per le 48 ore che per le 72 ore, la semina è stata effettuata in piastre multi 6-well che consentono l'adesione cellulare. Sono stati seminati tre replicati per ogni variabile con le seguenti modalità:

- 3 pozzetti per il controllo (solo RPMI)
- 3 pozzetti per il glucosio (solo Glucosio 25mM diluito in RPMI) (Purezza 96%, Sigma Aldrich, St. Louis USA)
- 3 pozzetti per il Glucosio + Macerato Acquoso di dattero (Glucosio 25mM + Maq 2,5mg/ml diluito in RPMI)
- 3 pozzetti per il Glucosio + Filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19 (Glucosio 25mM + LP 1,25mg/ml diluito in RPMI)
- 3 pozzetti per il Glucosio + Macerato Acquoso di dattero + Filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19 (Glucosio 25mM + Maq 2,5mg/ml + LP 1,25mg/ml diluiti in RPMI)

I trattamenti sono stati addizionati 24 ore dopo la semina cellulare (in modo da consentire la corretta adesione delle cellule al supporto) e al termine dei tempi di esposizione previsti è stata effettuata l'estrazione proteica di ciascun pozzetto (a ciascun pozzetto corrisponde un replicato).

3.6.2 Estrazione proteica dalle cellule della linea 1.1B4

Il primo step dell'estrazione proteica prevede di togliere il medium ed eseguire due lavaggi con PBS 1X sotto cappa in condizioni di sterilità. Successivamente le piastre multi 6-well vengono messe in ghiaccio per evitare di provocare danni alle proteine.

Si procede con la rimozione del PBS e con l'aggiunta di 90µl del Buffer di lisi composto da RIPA 1X addizionato di inibitori di proteasi e fosfatasi (Protease Phosphatase Single-Use

Inhibitor Cocktail 100X, ThermoFisher Scientific, USA) in rapporto 50:1, il quale viene lasciato agire per cinque minuti in ghiaccio.

Componenti del Buffer di lisi:

- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Cloruro di sodio 0,137 M (Sodium Chloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Sodio desossicolato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- SDS (Sodium Dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Successivamente le cellule vengono staccate dal supporto tramite l'utilizzo di uno scraper per poi trasferire la sospensione cellulare in eppendorf. Seguono tre cicli di congelamento e scongelamento a -20°C intervallati da dieci minuti di sonicazione. In seguito, le eppendorf vengono centrifugate a 13000rpm per 15 minuti in modo da precipitare le proteine insolubili. Il surnatante ottenuto viene trasferito in nuove eppendorf per la quantificazione proteica e conservato a -80°C.

3.6.3 Quantificazione proteica

La quantificazione proteica permette di determinare ed esprimere la concentrazione proteica totale in $\mu\text{g/ml}$ degli estratti precedentemente ottenuti.

In primo luogo, viene costruita la curva di calibrazione con Albumina, la quale è necessaria per la successiva quantificazione dei campioni: la curva di calibrazione vede lo studio di un range di concentrazioni tra 5 e 2000 $\mu\text{g/ml}$ di Albumina. Le diluizioni di Albumina o dei campioni vengono sempre preparate con acqua distillata.

Lo strumento di lettura utilizzato per la quantificazione proteica è Spectramax Mini (Molecular Devices, Milano, Italy)

Per eseguire la quantificazione proteica è necessario avvalersi di una piastra multi 96-well e seguire i seguenti passaggi:

1. Diluire di dieci volte i campioni con acqua distillata (per 50 μL finali aggiungere 5 μL di estratto proteico e 45 μL di acqua distillata) e preparare un campione di Buffer di lisi utilizzato nell'estrazione proteica, il quale rappresenta il bianco dell'esperimento;

2. In uno stesso pozzetto della piastra multi 96-well porre 10 μ L campione diluito e 80 μ L di Working Reagent, il quale è costituito da Reagente A e Reagente B in rapporto 50:1 (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford USA). Per ogni campione, vengono riportati 4 replicati per fini statistici;
3. Incubare la piastra a 37°C per 30 minuti;
4. Procedere alla lettura della piastra a 562nm. Ai valori di assorbimento riportati viene sottratto il valore medio del RIPA 1X e vengono poi messi in relazione con la curva di taratura costruita in precedenza.

Di seguito vengono riportati i valori di Concentrazione Proteica Totale ottenuti dai vari campioni in relazione alle Densità Ottiche (OD) rilevate dallo strumento, considerando che nel bianco (solo Buffer di lisi) è stata rilevata una OD = 0,150 (Fig. 11a, Fig.11b).

CAMPIONI - 48h	(Densità Ottica) OD	Concentrazione proteica totale [μ g/mL]
Ctrl-a	0,899	1,41
Ctrl-b	0,924	1,45
Ctrl-c	0,911	1,43
Glu-a	0,837	1,31
Glu-b	0,805	1,26
Glu-c	0,901	1,41
Glu-d	0,734	1,15
LP+Glu-a	0,978	1,53
LP+Glu-b	0,975	1,53
LP+Glu-c	0,754	1,18
Maq+Glu-a	0,76	1,19
Maq+Glu-b	0,865	1,36
Maq+Glu-c	0,665	1,04
LP+Maq+Glu-a	0,942	1,48
LP+Maq+Glu-b	0,934	1,46
LP+Maq+Glu-c	0,719	1,13

Figura 11a. Quantificazione proteica dei campioni trattati per 48 ore.

CAMPIONI - 72h	(Densità Ottica) OD	Concentrazione proteica totale [μ g/mL]
Ctrl-a	0,937	1,47
Ctrl-b	0,925	1,45
Ctrl-c	0,7	1,1
Glu-a	0,61	0,96
Glu-b	0,704	1,1
Glu-c	0,667	1
Glu-d	0,805	1,26
LP+Glu-a	0,823	1,29
LP+Glu-b	0,922	1,44
LP+Glu-c	0,705	1,11
Maq+Glu-a	0,96	1,5
Maq+Glu-b	1,026	1,6
Maq+Glu-c	0,718	1,13
LP+Maq+Glu-a	0,905	1,42
LP+Maq+Glu-b	0,888	1,39
LP+Maq+Glu-c	0,829	1,3

Figura 11b. Quantificazione proteica dei campioni trattati per 72 ore.

3.7 Western blot

Il Western blot è un metodo semi-quantitativo che permette di valutare l'espressione delle proteine di interesse presenti come miscela nei campioni, sfruttandone il diverso peso molecolare e il legame con anticorpi specifici; il procedimento prevede la separazione delle proteine mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e il loro trasferimento su una membrana di nitrocellulosa, per i quali si utilizza lo strumento PowerEase™ Touch 120W. Dopo il trasferimento, la membrana viene trattata con anticorpi specifici in grado di riconoscere la proteina d'interesse e dare un'idea semiquantitativa della proteina nel campione trattato rispetto al controllo. Inizialmente la membrana viene incubata con l'anticorpo primario specifico per la proteina; l'anticorpo primario viene poi legato da un anticorpo secondario associato a un cromoforo in grado di emettere fluorescenza, grazie a cui è possibile rivelare la proteina attraverso una lastra ad impressione. In aggiunta alle proteine in studio, si valuta sempre l'espressione di una proteina ubiquitaria presente in elevate quantità, che viene considerata come "housekeeping" (β -Tubulina) e in relazione alla quale si analizzano i risultati delle altre permettendo di eseguire un'analisi semi-quantitativa delle proteine di interesse.

La protocollo del Western blot si può quindi suddividere nelle seguenti fasi:

1. Preparazione dei campioni caricamento su gel;
2. Corsa elettroforetica;
3. Trasferimento gel-membrana;
4. Legame tra proteine e anticorpi;
5. Sviluppo;
6. Stripping di membrana.

3.7.1 Preparazione dei campioni e caricamento su gel

In ciascun pozzetto del gel di poliacrilammide utilizzato (NuPAGE Bis-Tris 4-12% 10 well, Invitrogen, Carlsbad USA) vengono aggiunti 20 μ L di campione così costituiti:

- 25% Loading Buffer (NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, Invitrogen, Carlsbad USA);
- 10% Agente Riducente (NuPAGE DDT Sample Reducing Agent 10X, Invitrogen, Carlsbad USA);
- 65% Acqua MilliQ e Proteine precedentemente quantificate.

Prima di essere caricati i campioni vengono scaldati a 70°C per 10 minuti e nell'attesa si prepara il Running Buffer ($\approx 500\text{mL}$ per ogni camera), così composto:

- 25mL Running Buffer (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X, Invitrogen, Carlsbad USA);
- Portare a volume (500mL) con Acqua MilliQ;

Si caricano i campioni, i controlli, il Loading Buffer e il Marker ($3\mu\text{L}$ – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Vilnius Lithuania) nei pozzetti del gel facendo attenzione a non rompere il gel stesso poi si aggiunge alla camera il running buffer senza versarlo direttamente sui pozzetti e si addiziona l'antiossidante $\approx 500\mu\text{l}$ (NuPAGE Antioxidant, Invitrogen, Carlsbad USA).

La concentrazione proteica di ciascun campione è stata normalizzata in modo da caricare una quantità di proteine pari a $15\mu\text{g}/20\mu\text{l}$. Questa operazione è necessaria per rendere i risultati semi-quantitativamente confrontabili tra loro.

La corretta preparazione del campione è un passaggio essenziale per ottenere una separazione proteica efficiente; le procedure svolte in questa fase, infatti, hanno lo scopo di denaturare, conferire carica negativa e linearizzare il più possibile le proteine in modo da garantirne una corretta migrazione nella successiva fase della corsa elettroforetica.

3.7.2 Corsa elettroforetica

In seguito al caricamento, viene avviata la corsa elettroforetica delle proteine impostando sul dispositivo il programma 200V per 42 minuti. Si pone del ghiaccio attorno alla camera per evitare un surriscaldamento della stessa.

In questa fase le proteine, precedentemente trattate in modo tale da presentare una carica negativa complessiva, vengono sottoposte ad un campo elettrico e migrano verso il polo positivo (anodo).

Durante la migrazione, le proteine più piccole si muovono più velocemente attraverso la matrice del gel, mentre quelle più grandi vengono rallentate. Il risultato è una separazione delle proteine in bande distinte in base al loro peso molecolare.

3.7.3 Trasferimento gel-membrana

Durante la corsa elettroforetica, si prepara il Transfer Buffer ($\approx 200\text{ml}$), così composto:

- 10ml Transfer Buffer (NuPAGE Transfer Buffer 20X, Invitrogen, Carlsbad USA);
- 20ml Metanolo (Merk KGaA, Germany);
- Portare a volume ($\approx 200\text{mL}$) con Acqua MilliQ.

Prima che termini la corsa proteica si immergono nel Transfer Buffer due spugne, due fogli di carta assorbente e la membrana di nitrocellulosa (Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich, Invitrogen, Carlsbad USA).

Una volta terminata la corsa, si estrae il gel dagli spessori di plastica che lo contenevano e si prepara il “sandwich”, il quale permette di trasferire le proteine già separate dal gel alla membrana. La stratificazione del “sandwich”, dal polo negativo al positivo, è costituita nel seguente modo: spugna, carta assorbente, gel, membrana, carta assorbente e spugna.

È importante disporre nell’ordine corretto questi elementi, in particolare il gel e la membrana di nitrocellulosa, poiché il trasferimento delle proteine avviene grazie al passaggio di corrente dal polo negativo al polo positivo.

Una volta assemblato il “sandwich” lo si introduce nel dispositivo adibito al trasferimento, il quale viene poi introdotto nella camera e successivamente immerso nel Transfer Buffer con l’aggiunta di $\approx 500\mu\text{L}$ antiossidante (NuPAGE Antioxidant, Invitrogen, Carlsbad USA). A questo punto viene avviato il trasferimento selezionando il programma 10V per 55 minuti. Applicando il campo elettrico, le proteine (cariche negativamente) migrano dal gel alla membrana, mantenendo la loro disposizione spaziale e fissandosi su di essa, risultando così accessibili agli anticorpi che vengono aggiunti nella fase successiva.

3.7.4 Legame tra proteine e anticorpi

Terminato il trasferimento, si estrae la membrana e la si colora con il Rosso Ponceau (Ponceau S Solution, Sigma Aldrich, St. Louis USA) per valutare la qualità della corsa; la colorazione è utile anche per tagliare la membrana in più parti in base ai pesi molecolari, mostrati dal marker, delle proteine di interesse:

- β -Tubulina ≈ 50 kDa; (Cell Signaling Technology, Danvers USA)
- GRP-94 ≈ 94 kDa; (ABCAM, Cambridge UK)
- GLP1-R ≈ 55 kDa; (ABCAM, Cambridge UK)
- Sintaxina-4 ≈ 35 kDa. (ABCAM, Cambridge UK)

Le membrane tagliate vengono poste in dish diverse, a queste viene aggiunto NaOH 1N per eliminare il residuo della colorazione rossa e poi si effettuano alcuni lavaggi con acqua distillata per rimuovere l' NaOH. In seguito, viene addizionato il Blotto A, composto da:

- 2ml TBS 10X;
- 1g Milk (Bongiovanni S.r.l., Villanova Mondovi CN, Italy);
- 20µl Tween20 (Sigma Aldrich, St. Louis USA);
- Portare a volume con Acqua MilliQ (fino a 20ml).

Il Blotto A viene lasciato a contatto con le membrane per tre ore in lenta agitazione e serve per saturare i siti di legame presenti nelle proteine, allo scopo di ridurre ed evitare il legame aspecifico tra gli anticorpi e le proteine di non interesse diminuendo così il background in fase di sviluppo. Al termine dell'incubazione, il Blotto A viene rimosso e vengono aggiunti gli Anticorpi Primari (10ml), i quali sono specifici per ogni proteina di interesse. Le dish contenenti ciascuna membrana con il proprio Anticorpo Primario specifico vengono incubati per tutta notte in frigo a +4°C. Gli Anticorpi, sia Primari che Secondari, vengono diluiti in Blotto A e la loro composizione risulta essere:

- 1ml TBS 10X;
- 100µl Tween20 (Sigma Aldrich, St. Louis USA);
- 0.5g Milk (Bongiovanni S.r.l., Villanova Mondovi CN, Italy);
- 10µl Anticorpo (per una diluizione 1:1000)
- Portare a volume con Acqua MilliQ (fino a 10ml);

Il mattino seguente vengono rimossi gli Anticorpi Primari e le membrane vengono lavate per 3 volte ponendole in lenta agitazione per 5 minuti con il Wash Buffer (10ml) composto da:

- 50mL TBS 10X;
- 500µL Tween20 (Sigma Aldrich, St. Louis USA);
- portare a volume con Acqua Distillata (fino a 500ml).

Al termine dei lavaggi, viene aggiunto l'Anticorpo Secondario (HRP linked antibody, Cell Signaling Technology, Danvers USA) incubando le membrane a temperatura ambiente per due ore in lenta agitazione. L'Anticorpo Secondario è in grado di legare gli Anticorpi Primari solo se possiede la medesima derivazione animale. In questo studio, sono stati utilizzati anticorpi che derivano tutti dal coniglio (Primari Rabbit, Secondario Anti-Rabbit).

L'Anticorpo Secondario si lega all'Anticorpo Primario in modo da amplificarne il segnale attraverso il legame con l'agente luminescente aggiunto in seguito.

3.7.5 Sviluppo

Al termine delle due ore di incubazione, viene rimosso l'Anticorpo Secondario e le membrane vengono lavate per 3 volte ponendole in lenta agitazione per 5 minuti con il Wash Buffer (10ml).

A questo punto, ad ogni membrana, vengono aggiunti 500 μ l di Luminolo composto da Luminol-Enhancer Solution e Peroxide Solution in rapporto 1:1 (Westar Supernova, Cyanagen S.r.l., Bologna Italy). Le membrane addizionate di Luminolo vengono lasciate al buio per 5 minuti e in seguito si procede con lo sviluppo della lastra.

Il Luminolo, legandosi all'Anticorpo Secondario, emette una luminescenza direttamente proporzionale alla quantità di proteina presente.

In camera oscura le membrane vengono poste a contatto con una pellicola fotografica, che viene poi immersa nel Liquido di Sviluppo, sciacquata in acqua e immersa nuovamente nel Liquido di Fissaggio. Al termine si ottiene una pellicola con fondo scuro sulla quale sono evidenziate le bande relative alle proteine di interesse. Maggiore è l'intensità della banda e maggiore è l'espressione di quella proteina. L'intensità delle bande viene posta in relazione con l'intensità della banda dell'anticorpo housekeeping (β -Tubulina) per avere un dato quantificabile utilizzando un densitometro (Amersham, UK) e analizzando le bande con il software ImageStudio-Lite.

3.7.6 Stripping

Essendo la β -Tubulina ed il GLP-1R proteine di simile peso molecolare (50kDa vs 55kDa) non è stato possibile svilupparle simultaneamente, di conseguenza è stato necessario eseguire lo Stripping in modo da utilizzare la stessa membrana per sviluppare i due anticorpi in momenti diversi.

La procedura dello Stripping prevede che, in seguito al primo sviluppo, la membrana venga sottoposta a due lavaggi con Wash Buffer della durata di cinque minuti ciascuno, per poi essere incubata per 20 minuti con Renew Stripping Buffer (Cyanagen, Italia), il quale ha lo scopo di scindere il legame tra gli anticorpi primario, secondario e la membrana. Al termine dell'incubazione viene rimosso lo Stripping Buffer e si effettua un lavaggio da cinque minuti con il Wash Buffer.

A questo punto la membrana subisce la medesima procedura utilizzando, questa volta, l'anticorpo primario che non si è potuto utilizzare in precedenza.

3.8 ELISA

Il Kit ELISA Human Glucose Transporter GLUT2 (Antobodies.com) è un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) in fase solida a sandwich. Il saggio sfrutta anticorpi monoclonali, assorbiti sulla placca, diretti contro un distinto epitopo di insulina, il quale può essere presente nel campione in esame. Un secondo anticorpo specifico viene aggiunto e si lega al complesso anticorpo-antigene. All'ultimo anticorpo aggiunto è legato un enzima specifico e, aggiungendo il suo substrato, si forma un prodotto colorato rilevabile mediante spettrofotometria UV-Vis che permette la quantificazione della proteina GLUT2.

La preparazione dei campioni, sotto forma di estratti proteici totali, è stata condotta normalizzando le concentrazioni proteiche di ciascun campione in modo da caricare in ogni pozzetto una quantità di proteine pari a 40µg/100µl. Questa operazione è necessaria per rendere i risultati statisticamente comparabili tra loro ed effettuare l'analisi quantitativa di ciascun campione.

Protocollo:

- Determinare il numero di 8-well strips necessarie per l'analisi e inserirle nello specifico supporto; (tre pozzetti per ogni condizione sia a 48 che 72 ore);
- Aggiungere 100µl di ogni standard, controlli e campioni nell'opportuno pozzetto secondo il layout ed incubare a 37°C per 90 minuti;
- Rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto e lavare 2 volte con Wash Buffer;
- Aggiungere 100µl di detection antibody biotinilato all'interno di ogni pozzetto ed incubare a 37°C per 60 minuti;
- Rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto e lavare 3 volte con Wash Buffer;
- Aggiungere 100µl di soluzione HRP-streptavidina-coniugata dentro ogni pozzetto;
- Rimuovere il contenuto da ciascun pozzetto e lavare 5 volte con Wash Buffer;
- Aggiungere 90µl di Chromogen Solution dentro ogni pozzetto e incubare per 10-20 minuti a 37°C al buio;
- Aggiungere 100µl di Stop Solution in ogni pozzetto. Agitare delicatamente per miscelare. La soluzione nel pozzetto dovrebbe virare dal blu al giallo;
- Leggere l'assorbanza allo spettrofotometro a 450 nm e riportare sulla curva di taratura fatta con gli standard i valori di assorbanza misurati per i campioni incogniti ed estrapolare il contenuto di GLUT2 espresso in ng/ml.

3.9 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica che consente la caratterizzazione morfologica delle cellule avvalendosi dell'uso di anticorpi specifici contenenti marcatori fluorescenti, quindi facilmente rilevabili, come specifici reagenti per localizzare gli antigeni complementari all'interno delle cellule. L'anticorpo secondario, emettendo fluorescenza ad una determinata lunghezza d'onda, consente l'osservazione mediante uno specifico microscopio, della morfologia cellulare. Attraverso l'uso di un marcatore fluorescente che si lega al DNA e assorbe a lunghezza d'onda diversa dagli anticorpi, è possibile osservare anche la morfologia del nucleo cellulare.

La metodica che è stata utilizzata è la seguente:

Le cellule 1.1B4 sono state seminate ad una opportuna densità e trattate a tempi e dosi previsti dal protocollo sperimentale adottato, su vetrini preventivamente ricoperti di collagene V. Al termine del trattamento si procede alla fissazione delle cellule aggiungendo paraformaldeide a temperatura ambiente allo 0,4% in PBS per 10 minuti. Si rimuove la paraformaldeide e vengono effettuati 3 lavaggi con PBS. Le cellule vengono permeabilizzate con Triton X-100 all'0.1% in PBS per 5 minuti (ogni trattamento è seguito da lavaggi in PBS).

I vetrini vengono incubati con BSA al 3% in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con l'Anticorpo Primario anti-insulina-FITC (Invitrogen, Carlsbad USA) over night. Dopo 3 lavaggi in PBS i campioni vengono marcati con DAPI 1µg/ml in acqua e poi montati con un medium anti-fading (0,21 M DABCO e glicerolo 90% in Tris 0,02 M, pH 8.0). L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante un microscopio a fluorescenza in contrasto di fase Olympus CKX53 LED.

3.10 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati presentati come media \pm DS (deviazione standard) di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato o quadruplicato. L'analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) e il test di Tukey (post-hoc test) sono stati utilizzati per confrontare le differenze tra i gruppi, come indicato nelle figure (GraphPad Prism 10 Software Inc., San Diego, CA, USA). Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi.

4 RISULTATI

4.1 Test di citotossicità diretta sulle 1.1B4

4.1.1 Effetto del Glucosio 25mM

Lo studio ha previsto una prima valutazione citotossica (dose/risposta) a 24, 48 e 72 ore del Glucosio 25mM sulle cellule della linea 1.1B4, allo scopo di verificare se tale concentrazione fosse in grado di indurre uno stato di stress iperglicemico senza tuttavia compromettere la vitalità cellulare. Questo passaggio preliminare è fondamentale nella definizione del modello sperimentale in quanto, affinché il sistema riproduca fedelmente le condizioni fisiopatologiche del diabete di tipo 2, la concentrazione di glucosio utilizzata deve essere sufficientemente elevata da indurre disfunzione β -cellulare, ma non tale da determinare morte cellulare massiva, che renderebbe il modello non biologicamente interpretabile.

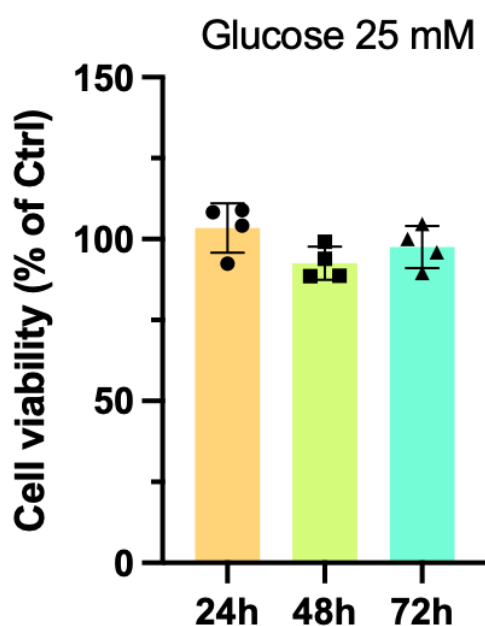


Figura 12. Rappresentazione mediante istogramma della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al trattamento con Glucosio 25mM dopo 24, 48 e 72 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100%. Il grafico riporta i valori medi percentuali e la deviazione standard dei risultati. [GraphPad Prism]

La quantificazione della vitalità cellulare è stata effettuata con il CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies) unitamente alla lettura spettrofotometrica a $\lambda = 450\text{nm}$.

I risultati ottenuti hanno confermato che il Glucosio 25mM non esercita effetti citotossici significativi sulla linea 1.1B4 ai tempi di trattamento considerati (vitalità di oltre il 90%), validando il suo utilizzo come agente stressante nel modello in vitro di diabete di tipo 2 adottato nel presente studio.

4.1.2 Effetto degli estratti acquosi dei semi di *Phoenix dactylifera*

È stata eseguita una valutazione citotossica sulla linea cellulare 1.1B4 dei due estratti acquosi di semi di *Phoenix dactylifera* disponibili: il Macerato Acquoso (Maq) e l'Estratto Acquoso Sonicato (Eaq-sonicate). I due estratti differivano esclusivamente per un passaggio estrattivo aggiuntivo presente nell'Eaq-Sonicate, nel quale i semi di dattero, oltre alla macerazione, sono stati sottoposti anche ad un processo di sonicazione, che consente una rottura meccanica più efficiente delle strutture cellulari vegetali e una conseguente maggiore estrazione dei composti bioattivi.

La soluzione stock di ciascun estratto è stata preparata in modo da ottenere una concentrazione di 50 mg/ml (2.5g di semi di dattero polverizzati in 50ml di acqua). Le concentrazioni testate (working solution) per entrambi gli estratti sono state ottenute mediante diluizione seriale in medium di coltura RPMI, sia per gli esperimenti a 48 che per quelli a 72 ore. Working solution utilizzate: 0,5 mg/ml - 1,0 mg/ml - 1,5 mg/ml - 1,75 mg/ml - 2,0 mg/ml - 2,25 mg/ml - 2,5 mg/ml. La valutazione di citotossicità è stata condotta in due fasi successive.

Nella prima fase (Fig. 13), è stata eseguita un'analisi di citotossicità a 48 ore su entrambi gli estratti, con l'obiettivo di identificare il miglior candidato da impiegare nelle successive indagini sperimentali. Il criterio di selezione era analogo a quello adottato per il glucosio, quindi, individuare la concentrazione massima alla quale l'estratto non esercitava effetti citotossici significativi, con la differenza che, in questo caso, l'obiettivo per gli esperimenti successivi non era quello di indurre stress cellulare bensì ottenere un effetto protettivo nei confronti del danno metabolico provocato dalla co-somministrazione di Glucosio 25mM.

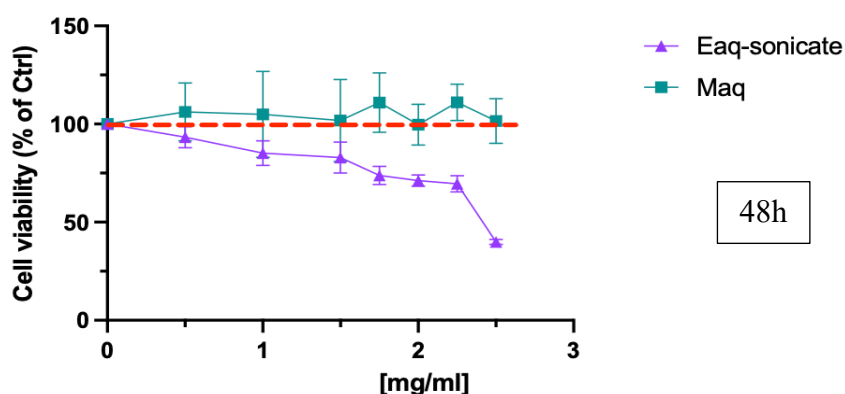


Figura 13. Rappresentazione mediante grafico cartesiano della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al trattamento con Maq ed Eaq-sonicate, a diverse concentrazioni, dopo 48 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100% (evidenziato dalla linea rossa tratteggiata). Il grafico riporta i valori medi percentuali e la deviazione standard dei risultati. [GraphPad Prism]

In questa prima fase di valutazione della citotossicità a 48 ore, i due estratti di semi di *Phoenix dactylifera* hanno mostrato comportamenti nettamente differenti. L'Estratto Acquoso Sonicato (Eaq-sonicate) ha evidenziato un effetto citotossico dose-dipendente, con una riduzione progressiva della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione. La *cell viability* si è mantenuta tra il 90% e il 75% fino alla concentrazione di 2.25 mg/ml, per poi diminuire nettamente al di sotto del 50% alla concentrazione di 2.5 mg/ml. Il Macerato Acquoso (Maq), al contrario, non ha mostrato alcun effetto citotossico significativo a nessuna delle concentrazioni testate in quanto la vitalità cellulare si è mantenuta in prossimità del 100% per l'intero range di concentrazioni analizzato e, in alcuni casi, ha addirittura superato il valore del controllo, raggiungendo valori prossimi al 110%.

Sulla base di questi risultati, il Macerato Acquoso (Maq) è stato individuato come miglior candidato per le successive indagini sperimentali, in quanto privo di effetti citotossici ed utilizzabile a concentrazioni elevate.

Nella fase successiva fase (Fig. 14), dopo aver identificato il Macerato Acquoso (Maq) come estratto di elezione, è stata condotta un'ulteriore valutazione di citotossicità di tale estratto a 72 ore, allo scopo di determinarne l'effetto anche per un periodo più prolungato di esposizione e di definire con maggiore precisione la concentrazione ottimale da utilizzare negli esperimenti successivi. I risultati della valutazione sulla citotossicità del Macerato Acquoso (Maq) estesa a 72 ore hanno confermato quelli ottenuti a 48 ore, con un andamento della vitalità cellulare sostanzialmente sovrapponibile a quello precedentemente osservato per tutte le concentrazioni utilizzate.

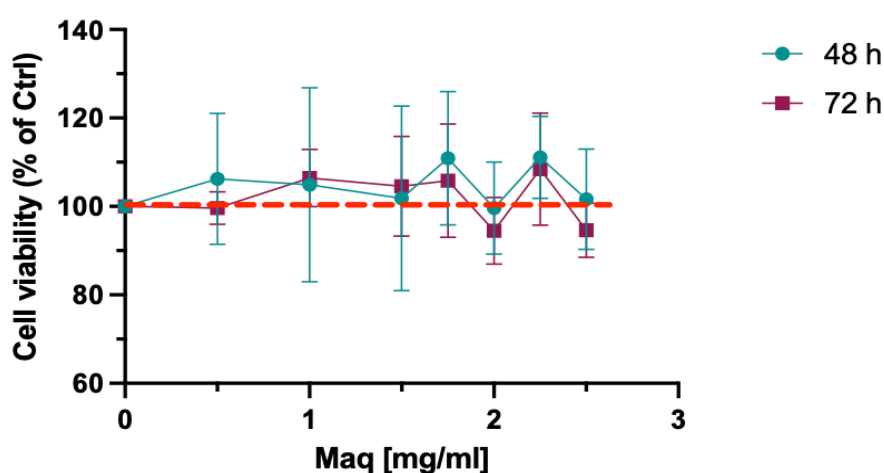


Figura 14. Rappresentazione mediante grafico cartesiano della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al trattamento con Maq, a diverse concentrazioni, dopo 48 e 72 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100% (evidenziato dalla linea rossa tratteggiata). Il grafico riporta i valori medi percentuali e la deviazione standard dei risultati. [GraphPad Prism]

4.1.3 Effetto del filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19

Il filtrato metabolico ottenuto da *Lactobacillus paracasei* F19 è stato liofilizzato ottenendo un residuo solido del peso di 0,1527g, il quale è stato successivamente risospeso in 2ml di medium di coltura RPMI, costituendo così lo stock a concentrazione di 76,35 mg/ml. Dalla soluzione stock di filtrato metabolico (LP) sono stati preparati i diversi trattamenti a diverse concentrazioni (0,25 mg/ml - 0,5 mg/ml - 1,25 mg/ml - 2,5 mg/ml) mediante diluizione seriale in medium di coltura RPMI. Su questi trattamenti è stata eseguita una valutazione citotossica sulla linea cellulare 1.1B4 a 48 e 72 ore allo scopo di identificare la concentrazione ideale da utilizzare negli esperimenti successivi. Il criterio di selezione ha seguito le stesse considerazioni fatte per gli estratti acquosi di *Phoenix dactylifera*.

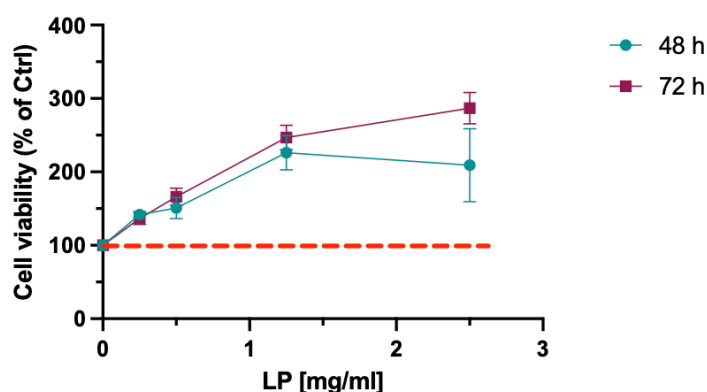


Figura 15. Rappresentazione mediante grafico cartesiano della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al trattamento con LP, a diverse concentrazioni, dopo 48 e 72 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100% (evidenziato dalla linea rossa tratteggiata). Il grafico riporta i valori medi percentuali e la deviazione standard dei risultati. [GraphPad Prism]

I risultati hanno mostrato chiaramente che il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19 (LP) non esercita alcun tipo di attività citotossica nei confronti delle cellule 1.1B4, al contrario, sembra promuoverne attivamente il metabolismo e la proliferazione. La *cell viability* è risultata superiore al controllo (100%) a tutte le concentrazioni analizzate, con un incremento dose-dipendente fino alla concentrazione 1.25 mg/ml, sia a 48 che a 72 ore, raggiungendo valori prossimi al 200 - 250% rispetto al controllo. A concentrazioni più elevate, l'andamento temporale ha mostrato un comportamento differente tra i due tempi di esposizione: a 72 ore la vitalità cellulare ha continuato ad aumentare, mentre a 48 ore si è osservata una lieve flessione. Inoltre, per ciascuna concentrazione analizzata, i valori di vitalità rilevati a 72 ore sono risultati complessivamente superiori a quelli ottenuti a 48 ore, suggerendo che un tempo di esposizione più prolungato al filtrato metabolico (LP) possa potenziare ulteriormente l'effetto proliferativo osservato.

4.1.4 Effetto dell'associazione tra Macerato Acquoso di semi di *Phoenix dactylifera* e filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19

Sulla base dei risultati ottenuti dai saggi di citotossicità dei due campioni somministrati singolarmente alle cellule 1.1B4, sono state formulate le seguenti considerazioni in merito alla scelta delle concentrazioni da impiegare negli esperimenti successivi.

Il Macerato Acquoso (Maq) non ha evidenziato alcun effetto citotossico a nessuna delle concentrazioni analizzate, mantenendo una vitalità cellulare prossima al 100% con un andamento sovrapponibile in entrambe le tempistiche di esposizione (48 e 72 ore). Pertanto, è stata scelta la concentrazione massima testata di 2,5 mg/ml.

Il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 (LP) non ha mostrato alcun effetto citotossico a nessuna delle concentrazioni analizzate; al contrario, ha determinato un incremento significativo della vitalità cellulare rispetto al controllo. L'andamento è risultato sovrapponibile nelle due tempistiche di esposizione fino alla concentrazione di 1,25 mg/ml, oltre la quale i due profili temporali hanno iniziato a divergere: a 72 ore la vitalità cellulare ha continuato ad aumentare proporzionalmente alla concentrazione, mentre a 48 ore si è osservata una lieve flessione. Considerando questo comportamento discordante a concentrazioni superiori a 1,25 mg/ml, e al fine di garantire la massima riproducibilità e coerenza dei risultati tra le due tempistiche, è stata selezionata la concentrazione di 1,25 mg/ml.

Nonostante la certezza che i due campioni non fossero individualmente citotossici per le cellule 1.1B4, non era possibile escludere a priori che la loro associazione potesse esercitare un effetto citotossico. Per tale ragione, è stata eseguita una valutazione di citotossicità anche per il trattamento combinato, articolata in due modalità sperimentali.

- La prima modalità (Fig. 16a) ha previsto la co-somministrazione, a 48 e 72 ore, di Maq e LP mantenendo fissa la concentrazione di LP a 1,25mg/ml e variando quella di Maq alle seguenti concentrazioni: 1,0mg/ml, 1,5mg/ml, 2,0mg/ml e 2,5mg/ml;
- La seconda modalità (Fig. 16b) ha invece previsto la co-somministrazione, a 48 e 72 ore, di Maq e LP mantenendo fissa la concentrazione di Maq a 2,5 mg/ml e variando quella di LP alle seguenti concentrazioni: 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 1,25mg/ml e 2,5mg/ml.

I seguenti grafici riportano una rappresentazione della distribuzione dei dati in quartili, in particolare: la linea tratteggiata inferiore di ciascun violino rappresenta Q1 che è il valore al di sotto del quale si trovano il 25% dei dati, la linea tratteggiata superiore invece rappresenta Q3 che è il valore al di sotto del quale si trovano il 75% dei dati; Q2 corrisponde alla mediana e quindi rappresenta il valore che divide i dati esattamente a metà di cui 50% sopra e 50% sotto; maggiore è l'ampiezza in una determinata zona del violino e maggiore è la presenza di dati in quel punto. Per comprendere meglio l'andamento del grafico si fa riferimento alla mediana (Q2) di ciascun violino.

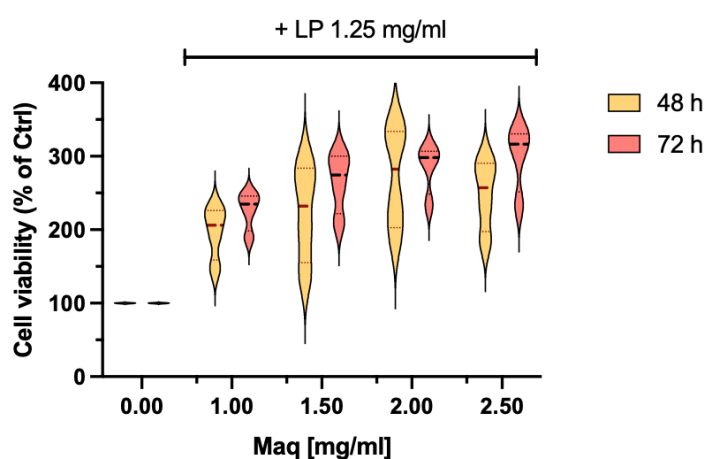


Figura 16a. Rappresentazione mediante grafico a violino della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al co-trattamento con [LP] fisso + [Maq] variabile, dopo 48 e 72 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100% (evidenziato dalla linea tratteggiata). Il grafico riporta i valori percentuali e la loro suddivisione in quartili [GraphPad Prism].

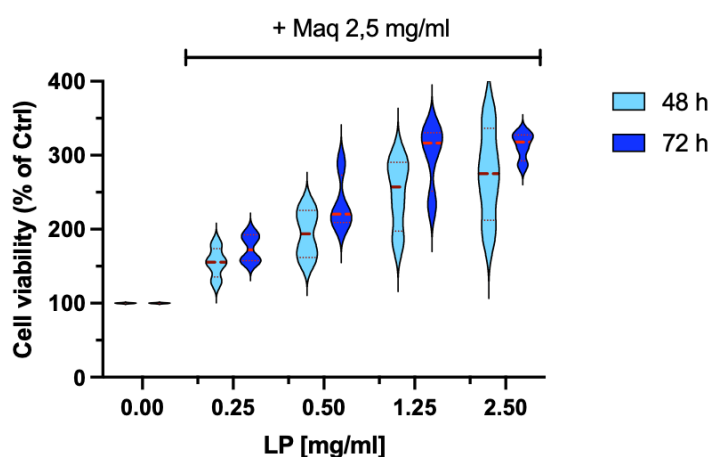


Figura 16b. Rappresentazione mediante grafico a violino della vitalità cellulare della linea 1.1B4 in risposta al co-trattamento con [Maq] fisso + [LP] variabile, dopo 48 e 72 ore. Sono stati utilizzati i valori percentuali di ogni singolo replicato (n=4) rispetto al controllo (solo medium RPMI) al quale viene attribuito una vitalità del 100% (evidenziato dalla linea tratteggiata). Il grafico riporta i valori percentuali e la loro suddivisione in quartili [GraphPad Prism].

In entrambe le modalità di co-somministrazione, il trattamento combinato Maq + LP non ha evidenziato alcun effetto citotossico sulle cellule 1.1B4. Analogamente a quanto osservato per i singoli campioni, la vitalità cellulare si è mantenuta costantemente al di sopra del 100% a tutte le concentrazioni testate e in entrambe le tempistiche di esposizione (48 e 72 ore), confermando l'assenza di tossicità dell'associazione.

Nell'esperimento di co-somministrazione con LP fisso a 1,25 mg/ml + Maq variabile (Fig. 16a), la vitalità cellulare ha mostrato valori compresi tra il 200% e il 300% senza una chiara tendenza dose-dipendente al variare della concentrazione di Maq. Nell'esperimento di co-somministrazione con Maq fisso a 2,5 mg/ml + LP variabile, si è invece osservato un andamento più chiaramente dose-dipendente, con la vitalità cellulare che aumentava progressivamente all'aumentare della concentrazione di LP, raggiungendo valori prossimi al 300 - 350% alla concentrazione massima testata di 2,5 mg/ml. In entrambi i casi i valori registrati a 48 ore sono risultati complessivamente sovrapponibili a quelli a 72 ore.

Sulla base di questi risultati, per gli esperimenti successivi sono state confermate le concentrazioni precedentemente selezionate per i singoli campioni, ovvero 2,5 mg/ml per il Maq e 1,25 mg/ml per il LP, in quanto entrambe prive di effetti citotossici sia singolarmente che in associazione e in grado di garantire condizioni sperimentali riproducibili e biologicamente interpretabili.

4.2 Analisi immunochemica di Sintaxina-4, GRP94 e GLP-1R

I markers molecolari GRP-94, GLP-1R e Sintaxina-4 sono stati analizzati tramite l'analisi immunochemica Western blot con l'obiettivo di valutare l'effetto dei trattamenti sulla loro espressione proteica in condizioni di stress iperglicemico indotto da Glucosio 25mM. In particolare, è stata valutata l'influenza del Macerato Acquoso di semi di *Phoenix dactylifera* alla concentrazione di 2,5 mg/ml e del filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 alla concentrazione di 1,25 mg/ml, somministrati singolarmente e in associazione, a 48 e 72 ore di trattamento.

I risultati ottenuti sono illustrati in Figura 17a per le 48 ore ed in Figura 17b per le 72 ore.

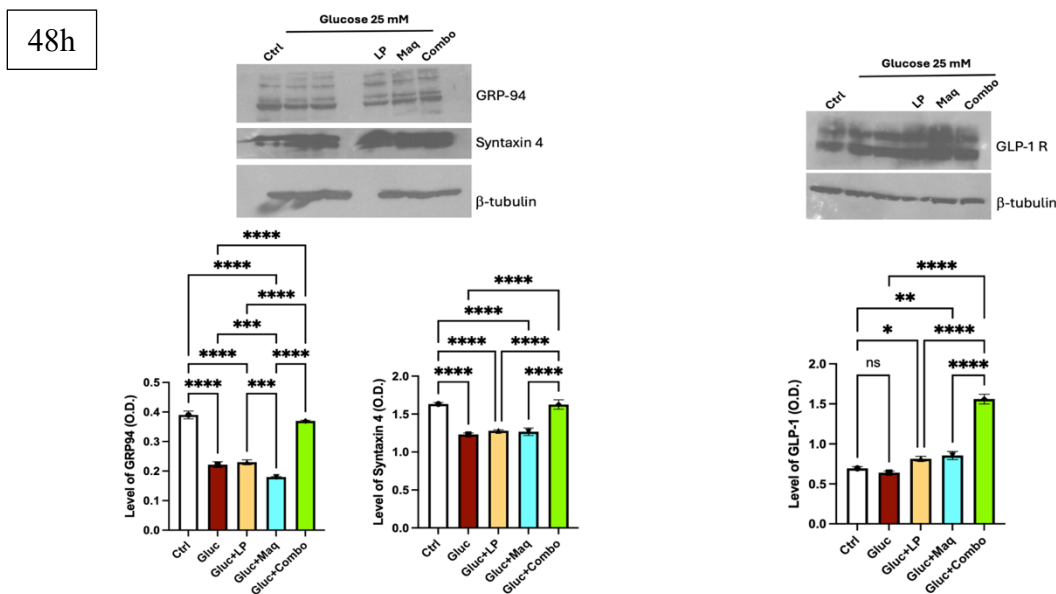


Figura 17a. Rappresentazione delle lastre ottenute in seguito allo sviluppo del Western blot dei campioni proteici derivanti dal trattamento per 48 ore con relativo istogramma rappresentate la valutazione semi-quantitativa dell'influenza dei vari trattamenti sull'espressione delle proteine Sintaxina-4, GRP94 e GLP-1R in relazione e quella della proteina housekeeping β -Tubulina. Sono stati utilizzati i valori di Densità Ottica, ottenuti mediante lettura al densitometro, elaborati con analisi statistica ANOVA. [GraphPad Prism]

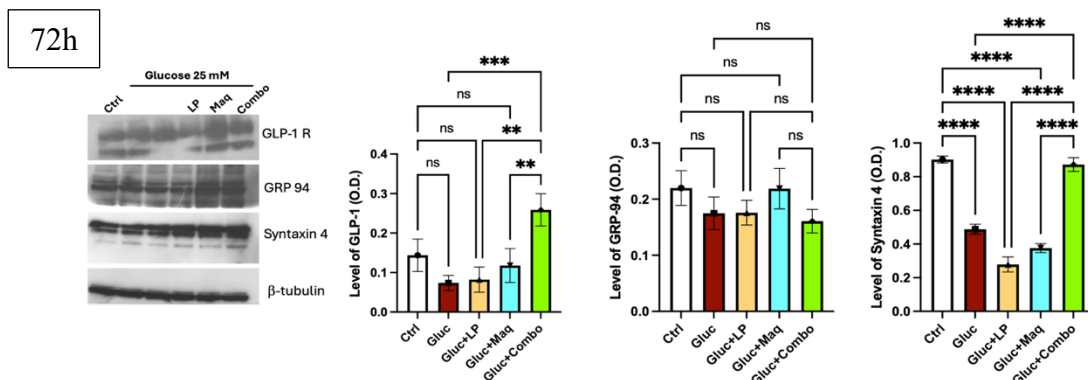


Figura 17b. Rappresentazione delle lastre ottenute in seguito allo sviluppo del Western blot dei campioni proteici derivanti dal trattamento per 72 ore con relativo istogramma rappresentate la valutazione semi-quantitativa dell'influenza dei vari trattamenti sull'espressione delle proteine Sintaxina-4, GRP94 e GLP-1R in relazione e quella della proteina housekeeping β -Tubulina. Sono stati utilizzati i valori di Densità Ottica, ottenuti mediante lettura al densitometro, elaborati con analisi statistica ANOVA. [GraphPad Prism]

Come si può osservare in Figura 17a, dopo 48 ore di trattamento, il Glucosio 25mM ha determinato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di espressione di GRP94 e Sintaxina-4 rispetto al controllo, mentre sui livelli di GLP-1R ha mostrato una diminuzione non significativa. I trattamenti singoli con LP 1,25 mg/ml e Maq 2,5 mg/ml, in presenza di Glucosio 25mM, non hanno determinato alcun aumento significativo della densità di banda delle proteine analizzate rispetto alla sola condizione iperglicemica, mantenendosi al di sotto dei livelli di espressione proteica del controllo. Di particolare interesse è invece il risultato ottenuto con il trattamento combinato (Combo). La co-somministrazione di LP e Maq in presenza di Glucosio 25mM è stata in grado di riportare i livelli di espressione di GRP94 e Sintaxina-4 a valori comparabili a quelli del controllo e di incrementare i livelli di GLP-1R al di sopra di quelli delle cellule non trattate, suggerendo un effetto additivo o sinergico dei due composti sulla protezione della funzionalità β -cellulare in condizioni di stress iperglicemico.

Il quadro osservato a 72 ore (Fig. 17b) presenta alcune differenze rispetto alla tempistica precedente. In presenza di Glucosio 25mM si conferma una tendenza generale alla riduzione dei livelli di espressione delle proteine considerate, tuttavia solo Sintaxina-4 raggiunge una diminuzione statisticamente significativa rispetto al controllo. Analogamente a quanto osservato a 48 ore, i trattamenti singoli con LP 1,25 mg/ml e Maq 2,5 mg/ml in presenza di glucosio non hanno determinato variazioni significative rispetto alla sola condizione iperglicemica. Il trattamento combinato (Combo) ha invece mostrato, anche a questa tempistica, un aumento statisticamente significativo dei livelli di espressione di GLP-1R e Sintaxina-4 rispetto al Glucosio 25mM, evidenziando come l'associazione dei due composti mantenga la propria efficacia protettiva anche a 72 ore di trattamento. GRP94, al contrario, non ha mostrato differenze rilevanti rispetto alla condizione iperglicemica a 72 ore, rappresentando il principale elemento di divergenza rispetto ai risultati delle 48 ore.

Confrontando complessivamente i risultati ottenuti alle due tempistiche, emergono alcune considerazioni di rilievo. La riduzione dell'espressione proteica di GRP94, Sintaxina-4 e GLP-1R indotta dal Glucosio 25mM rappresenta un elemento di fondamentale importanza per la validazione del modello sperimentale adottato. Questo, infatti, significa che le condizioni iperglicemiche adottate sono state efficaci nell'indurre uno stato di disfunzione β -cellulare nelle cellule 1.1B4, riproducendo efficacemente alcuni degli aspetti molecolari caratteristici del diabete di tipo 2.

Il verificarsi di tali condizioni nel presente studio rafforza la validità del modello in vitro utilizzato e, di conseguenza, la rilevanza biologica dei risultati ottenuti con i trattamenti sperimentali.

Passando all'analisi comparativa tra le due tempistiche, l'effetto del Glucosio 25mM appare più selettivo a 48 ore rispetto alle 72 ore, in quanto, mentre a 48 ore la condizione iperglicemica determina una riduzione significativa di GRP-94 e Syntaxina 4, a 72 ore solo Syntaxina 4 raggiunge la significatività statistica, suggerendo che le tre proteine analizzate presentino una diversa cinetica di risposta allo stress iperglicemico prolungato. Coerentemente con questo quadro, l'inefficacia dei trattamenti singoli nel contrastare gli effetti del Glucosio 25mM risulta consistente in entrambe le tempistiche, indicando che le concentrazioni utilizzate di LP e Maq, se somministrate individualmente, non sono sufficienti a modulare in modo apprezzabile l'espressione dei markers β -cellulari in condizioni di stress metabolico. Il dato più rilevante emerge tuttavia dall'analisi del trattamento combinato, infatti, l'effetto protettivo del Combo si conferma in entrambe le tempistiche per GLP-1R e Syntaxina-4, mentre GRP94 risponde favorevolmente solo a 48 ore. Questo potrebbe suggerire che GRP-94 sia una proteina più sensibile alla durata dello stress iperglicemico e che il suo recupero, osservabile a 48 ore, non sia mantenuto a 72 ore, verosimilmente a causa di una compromissione cellulare più consolidata che il trattamento combinato non riesce a contrastare completamente in una finestra temporale più prolungata.

4.3 Analisi immunochimica di GLUT2

In seguito agli studi di Western blot, l'attenzione del presente studio è stata rivolta alla valutazione, tramite l'analisi immunochimica ELISA, dell'effetto sulla modulazione dell'espressione di GLUT2 nelle cellule 1.1B4 del Macerato Acquoso di *Phoenix dactylifera* alla concentrazione di 2,5 mg/ml e del filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 alla concentrazione di 1,25 mg/ml, somministrati singolarmente e in associazione, a 48 e 72 ore di trattamento, in condizioni iperglicemiche (Glucosio 25mM).

I risultati ottenuti sono illustrati in Fig. 18a per le 48 ore ed in Fig. 18b per le 72 ore.

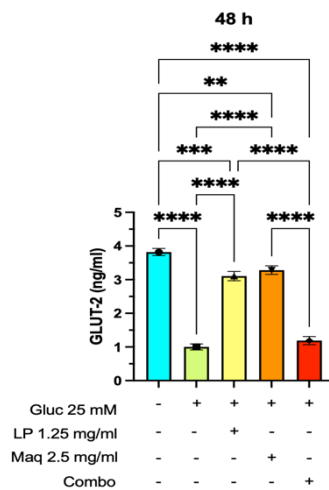


Figura 18a. Rappresentazione dell'istogramma relativo alla quantificazione dell'espressione di GLUT2 in seguito al trattamento delle cellule 1.1B4 per 48 ore. Sono stati utilizzati i valori di concentrazione di GLUT2 espressi in ng/ml, ottenuti dalla conversione dei valori di Densità Ottica, grazie alla costruzione della curva di taratura. I risultati sono stati elaborati con analisi statistica ANOVA. [GraphPad Prism]

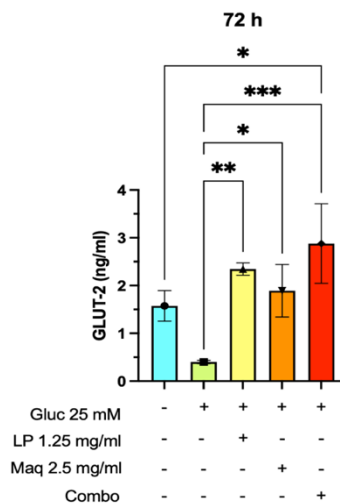


Figura 18b. Rappresentazione dell'istogramma relativo alla quantificazione dell'espressione di GLUT2 in seguito al trattamento delle cellule 1.1B4 per 72 ore. Sono stati utilizzati i valori di concentrazione di GLUT2 espressi in ng/ml, ottenuti dalla conversione dei valori di Densità Ottica, grazie alla costruzione della curva di taratura. I risultati sono stati elaborati con analisi statistica ANOVA. [GraphPad Prism]

Come evidenziato in Fig. 18a, a 48 ore di trattamento il Glucosio 25mM ha determinato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di espressione di GLUT2 rispetto al controllo. Questo dato riveste un'importanza fondamentale ai fini della validazione del modello sperimentale adottato, in quanto, la riduzione dell'espressione di GLUT2 in condizioni iperglicemiche è infatti una caratteristica molecolare tipica della disfunzione β -cellulare nel diabete di tipo 2, e la sua osservazione nelle cellule 1.1B4 trattate con Glucosio 25mM conferma che tali condizioni siano rappresentative di uno stato di stress metabolico biologicamente rilevante, confermando ulteriormente la possibilità di utilizzare questo sistema come modello in vitro per lo studio del diabete di tipo 2. I trattamenti singoli con LP 1,25 mg/ml e Maq 2,5 mg/ml in presenza di Glucosio 25mM hanno invece mostrato un incremento significativo dei livelli di GLUT2 rispetto alla sola condizione iperglicemica, raggiungendo valori prossimi a quelli del controllo non trattato. Il trattamento combinato (Combo), al contrario, non ha mostrato un effetto di recupero dell'espressione di GLUT2 a 48 ore, mantenendosi a valori comparabili a quelli della sola condizione iperglicemica, rappresentando un risultato inatteso rispetto a quanto osservato con i trattamenti singoli.

Il quadro a 72 ore (Fig. 18b) presenta un profilo differente e, per alcuni aspetti, più omogeneo. Il Glucosio 25mM determina nuovamente una riduzione statisticamente significativa dei livelli di GLUT2 rispetto al controllo, confermando che lo stress iperglicemico indotto da questa concentrazione di glucosio esercita un effetto soppressivo sull'espressione di GLUT2 consistente e riproducibile in entrambe le tempistiche analizzate. La coerenza di questo effetto a 48 e 72 ore costituisce un ulteriore elemento a sostegno della validità e della riproducibilità del modello cellulare adottato, potenziando la rilevanza biologica dei risultati ottenuti con i trattamenti sperimentali. A differenza di quanto osservato a 48 ore, nelle 72 ore tutti i trattamenti, sia singoli che combinato, hanno mostrato un incremento statisticamente significativo dei livelli di GLUT2 rispetto alla condizione iperglicemica, con il trattamento combinato che ha raggiunto i valori più elevati tra tutti i gruppi trattati.

Confrontando le due tempistiche, emerge un quadro complessivo di particolare interesse. La riduzione di GLUT2 indotta dal Glucosio 25mM si conferma in entrambe le condizioni, ulteriormente avvalorando la validità del modello iperglicemico adottato e la sua capacità di riprodurre in vitro aspetti molecolari chiave del diabete di tipo 2. Un elemento di riflessione riguarda il diverso comportamento dei trattamenti singoli tra le due tempistiche: mentre a 48 ore LP e Maq sono già in grado di recuperare significativamente i livelli di GLUT2,

portandoli a valori prossimi ma ancora lievemente inferiori al controllo, a 72 ore questo effetto risulta addirittura potenziato, con i singoli trattamenti che superano i valori del controllo non trattato. Questo dato suggerisce che la prolungata esposizione ai singoli composti ne amplifichi progressivamente la capacità modulatore sulla espressione di GLUT2, verosimilmente attraverso meccanismi d'azione che richiedono un tempo di attivazione più lungo per esplicarsi pienamente in condizioni di stress iperglicemico cronico. L'aspetto più rilevante rimane tuttavia il comportamento divergente del trattamento combinato tra le due tempistiche: inefficace a 48 ore, dove sorprendentemente non aggiunge alcun beneficio rispetto ai singoli trattamenti, diventa il più efficace a 72 ore, superando persino i valori ottenuti con LP e Maq somministrati singolarmente. Tale evidenza potrebbe suggerire che anche l'effetto sinergico di LP e Maq sulla modulazione di GLUT2 richieda un tempo di esposizione più prolungato per manifestarsi, e che i meccanismi molecolari sottesi all'azione combinata dei due composti su questo specifico trasportatore abbiano una cinetica di attivazione più lenta rispetto a quella dei singoli trattamenti. Questa osservazione apre interessanti prospettive di ricerca futura, in particolare per quanto riguarda l'identificazione dei pathway molecolari attraverso cui LP e Maq agiscono in sinergia sulla regolazione dell'espressione di GLUT2 in condizioni di stress iperglicemico prolungato.

4.4 Analisi in immunofluorescenza dei contenuti insulinici

Le immagini acquisite mediante microscopia in fluorescenza (Fig. 19) hanno permesso una valutazione qualitativa della distribuzione intracellulare dell'insulina nelle cellule 1.1B4 in risposta ai diversi trattamenti, attraverso l'utilizzo dell'anticorpo anti-insulina coniugato con FITC, che emette fluorescenza verde, e del DAPI, colorante nucleare che emette fluorescenza blu e consente di identificare e localizzare i nuclei cellulari.

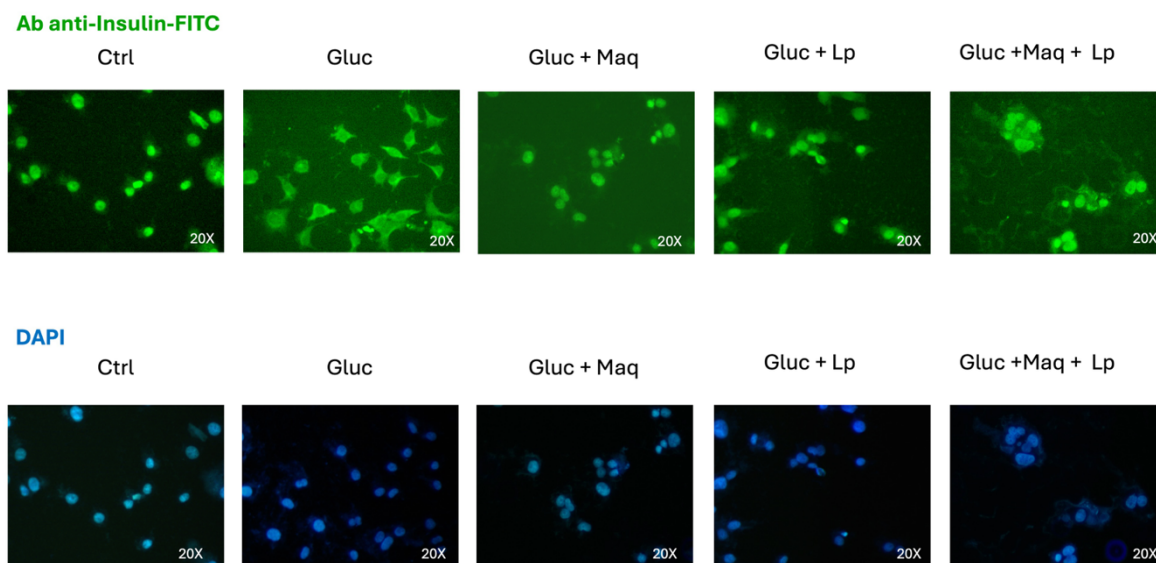


Figura 19. Rappresentazione delle immagini acquisite mediante microscopia in fluorescenza delle cellule 1.1B4 trattate per 48 ore con Glucosio 25mM, LP 1,25 mg/ml e Maq 2,5 mg/ml, successivamente marcate con DAPI e Anticorpo anti-Insulin-FITC. Utilizzando il filtro adeguato è possibile osservare la differente fluorescenza dei due anticorpi utilizzati. Il DAPI serve ad individuare i nuclei cellulari.

Nelle cellule del controllo (Ctrl) si è osservata una fluorescenza verde intensa e prevalentemente concentrata a livello nucleare e peri-nucleare, con un pattern puntiforme caratteristico della distribuzione dei granuli insulinici nelle cellule β nelle condizioni basali. Le cellule trattate con solo Glucosio 25mM (Gluc) hanno mostrato invece una riduzione dell'intensità della fluorescenza nucleare e peri-nucleare, accompagnata da una distribuzione più diffusa e disomogenea del segnale fluorescente nel citoplasma, suggerendo un'alterazione della normale organizzazione e distribuzione dei granuli insulinici in risposta allo stress iperglicemico. Questo pattern è coerente con quanto atteso in un modello di glucotossicità β -cellulare.

Le cellule trattate con Maq 2,5 mg/ml in presenza di Glucosio 25mM (Gluc + Maq) e quelle trattate con LP 1,25 mg/ml in presenza di Glucosio 25mM (Gluc + LP) hanno mostrato entrambe un parziale recupero del pattern di fluorescenza osservato nel controllo, con un'intensità del segnale verde a livello nucleare e peri-nucleare superiore a quella rilevata nel trattato con solo Glucosio 25mM, suggerendo che entrambi i trattamenti singoli siano stati in grado di preservare parzialmente la normale distribuzione dei granuli insulinici in condizioni iperglicemiche. Il trattamento combinato (Gluc + Maq + LP) mostra un pattern di fluorescenza più simile a quello del controllo tra tutti i gruppi trattati con Glucosio 25mM, con una fluorescenza intensa e ben concentrata a livello nucleare e peri-nucleare, indicando che la co-somministrazione dei due composti eserciti un effetto protettivo più marcato sulla distribuzione dell'insulina intracellulare rispetto ai singoli trattamenti.

È importante sottolineare che la microscopia in fluorescenza fornisce in questo contesto una valutazione di natura esclusivamente qualitativa. L'intensità del segnale fluorescente non consente una quantificazione assoluta dei granuli insulinici, ma permette di apprezzare in modo immediato le differenze nella distribuzione dell'insulina intracellulare tra i diversi campioni, fornendo un dato complementare e coerente con i risultati ottenuti mediante Western blot ed ELISA.

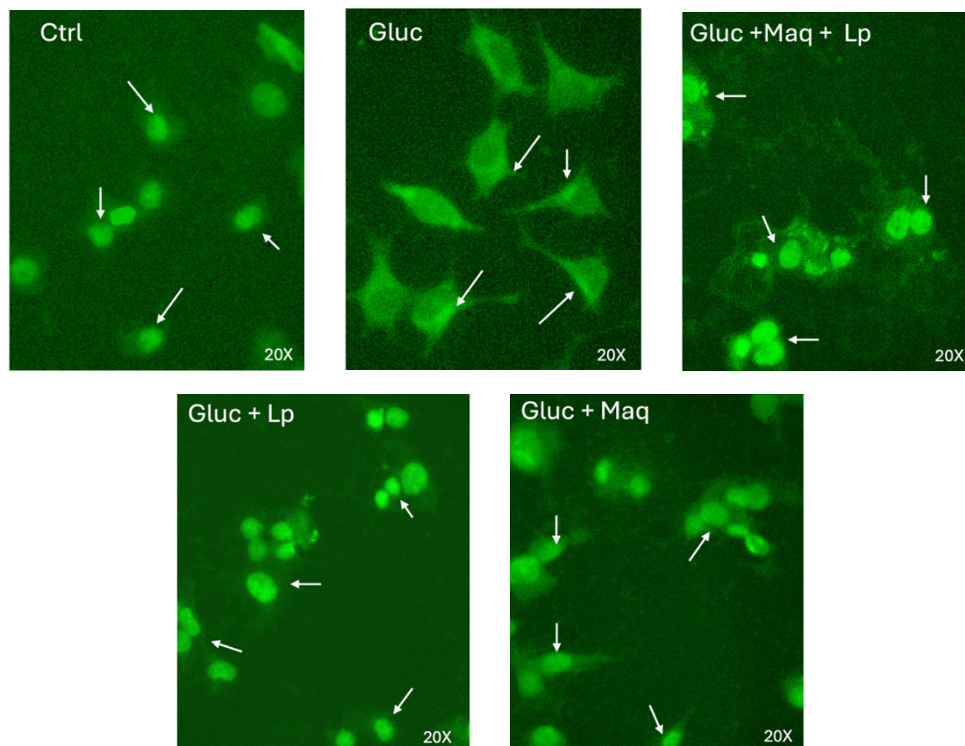


Figura 20. Rappresentazione ingrandita delle immagini acquisite mediante microscopia in fluorescenza delle cellule 1.1B4 trattate per 48 ore con Glucosio 25mM, LP 1,25 mg/ml e Maq 2,5 mg/ml marcate con Anticorpo anti-Insulin-FITC.

5 DISCUSSIONE

Il diabete di tipo 2 rappresenta una delle patologie metaboliche croniche più diffuse a livello globale, caratterizzata da una progressiva disfunzione delle cellule β -pancreatiche e da insulino-resistenza periferica che, instaurandosi in un circolo vizioso, conducono all'iperglicemia cronica e alle sue molteplici complicanze. Nonostante i significativi progressi terapeutici degli ultimi decenni, l'elevata prevalenza della malattia, la complessità della sua fisiopatologia e le limitazioni associate alle terapie convenzionali rendono necessaria la ricerca di approcci complementari e integrativi.

Il presente studio si è proposto quindi di valutare il potenziale modulatore di due composti di origine naturale, il Macerato Acquoso di semi di *Phoenix dactylifera* (Maq) e il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19 (LP), sull'espressione di markers molecolari chiave per la funzionalità β -cellulare, quali GRP94, Sintaxina-4, GLP-1R e GLUT2, in un modello in vitro di diabete di tipo 2 basato sulla linea cellulare umana 1.1B4 esposta a Glucosio 25mM.

I saggi di citotossicità condotti sui singoli composti e sulla loro associazione hanno rappresentato un passaggio preliminare indispensabile per la definizione delle condizioni sperimentali ottimali.

I risultati hanno evidenziato un profilo di sicurezza nettamente differente tra i due estratti di semi di *Phoenix dactylifera* a disposizione. L'Estratto Acquoso Sonicato ha mostrato un effetto citotossico dose-dipendente a concentrazioni elevate, verosimilmente attribuibile alla maggiore resa estrattiva del processo di sonicazione, che potrebbe aver portato all'estrazione di composti bioattivi in quantità tali da risultare tossici per le cellule. Il Macerato Acquoso, al contrario, non ha mostrato alcun effetto citotossico in tutto il range di concentrazioni testato, con valori di vitalità cellulare che in alcuni casi hanno superato il 100%, suggerendo un possibile effetto pro-metabolico o lievemente proliferativo dei composti estratti per macerazione. Sulla base di questi risultati, il Maq è stato selezionato come estratto di elezione, confermando che una metodica estrattiva più delicata può preservare un profilo di bioattività favorevole riducendo al contempo il rischio di tossicità.

Il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F19 (LP) ha mostrato un comportamento peculiare e biologicamente interessante presentando, non solo assenza di citotossicità, ma anche un incremento dose-dipendente della vitalità cellulare fino alla concentrazione di 1,25 mg/ml, oltre la quale i profili temporali a 48 e 72 ore hanno iniziato a divergere. Questo

effetto pro-proliferativo è coerente con quanto riportato in letteratura per i metaboliti prodotti da ceppi di *Lactobacillus paracasei*, che includono acidi grassi a catena corta, peptidi bioattivi e polisaccaridi in grado di stimolare la proliferazione e il metabolismo cellulare. La scelta della concentrazione di 1,25 mg/ml come concentrazione di lavoro è stata motivata dalla necessità di garantire la massima coerenza e riproducibilità dei risultati in entrambe le tempistiche. Anche per il trattamento combinato, la vitalità cellulare si è mantenuta costantemente al di sopra del 100% in tutte le condizioni testate, escludendo qualsiasi effetto citotossico sinergico e confermando la sicurezza biologica dell'associazione alle concentrazioni selezionate. La successiva analisi dell'espressione proteica su quattro markers molecolari direttamente coinvolti nella fisiopatologia β -cellulare del diabete di tipo 2 ha fornito i dati più rilevanti dello studio, consentendo di valutare il possibile effetto antidiabetico dei trattamenti.

La riduzione dell'espressione di GRP94, Sintaxina-4, GLP-1R e GLUT2 indotta dal Glucosio 25mM, osservata in modo consistente sia a 48 che a 72 ore, ha costituito un elemento di primaria importanza per la validazione del modello sperimentale adottato.

Ciascuno di questi markers riveste un ruolo specifico e ben caratterizzato nella fisiologia delle cellule β :

- GRP94 garantisce il corretto ripiegamento della proinsulina e la stabilità di IGF-1R, proteggendo le cellule β dall'apoptosi attraverso la via IGF-1R \rightarrow PI3K \rightarrow AKT;
- Sintaxina-4 è un componente critico del macchinario SNARE che media l'esocitosi dei granuli insulinici in entrambe le fasi della secrezione;
- GLP-1R amplifica la risposta secretoria insulinica in maniera glucosio-dipendente attraverso la via cAMP-PKA-Epac e promuove la sopravvivenza β -cellulare;
- GLUT2 rappresenta il sensore glicemico primario delle cellule β , consentendo l'accoppiamento tra la concentrazione extracellulare di glucosio e la risposta secretoria.

La soppressione coordinata di tutti questi markers in condizioni iperglicemiche ha permesso di riprodurre fedelmente gli aspetti molecolari della glucotossicità β -cellulare tipica del diabete di tipo 2.

Un aspetto di particolare interesse ha riguardato la diversa significatività statistica dell'effetto del Glucosio 25mM tra le due tempistiche. A 48 ore, la riduzione di GRP94 e Sintaxina-4 è risultata statisticamente significativa, mentre GLP-1R non ha raggiunto la significatività. A 72 ore solo Sintaxina-4 ha mostrato una riduzione statisticamente significativa, mentre

GRP94 e GLP-1R presentavano una tendenza alla riduzione senza però raggiungere la soglia di significatività. Questo comportamento differenziato potrebbe essere interpretato alla luce delle diverse cinetiche di risposta allo stress iperglicemico delle tre proteine. GRP94 e Sintaxina-4, essendo proteine direttamente coinvolte nella sintesi e nel rilascio acuto dell'insulina, potrebbero rispondere più precocemente allo stress iperglicemico, con una downregolazione già evidente alle 48 ore, essendo questo periodo iniziale una fase di crisi per la cellula, e che alle 72 ore le cellule potrebbero tendere a adattarsi all'ambiente iperglicemico, riducendo la risposta di stress immediata, pur mantenendo valori comunque ridotti. L'andamento dell'espressione di Sintaxina-4, invece, si può intendere come un adattamento patologico allo stress metabolico sia acuto che cronico, che simula l'ambiente pre-diabetico. Di conseguenza, questa down-regulation potrebbe compromettere la capacità delle cellule di formare i complessi SNARE necessari per un'efficiente secrezione insulinica stimolata dal glucosio e l'uptake del glucosio stesso, contribuendo all'insulino-resistenza e alla disfunzione delle cellule β -pancreatiche.

L'inefficacia dei trattamenti singoli con Maq e LP nel contrastare la riduzione dei markers β -cellulari indotta dal Glucosio 25mM, osservata in modo consistente in entrambe le tempistiche al Western blot, merita una riflessione. Tale risultato potrebbe suggerire che, alle concentrazioni utilizzate, i singoli composti non siano sufficientemente potenti da contrastare individualmente la cascata di eventi molecolari innescata dallo stress iperglicemico cronico su GRP94, Sintaxina-4 e GLP-1R. Diverso è invece il quadro emerso dall'analisi di GLUT2, dove i trattamenti singoli con Maq e LP hanno mostrato un incremento significativo dell'espressione del trasportatore rispetto alla sola condizione iperglicemica, raggiungendo valori prossimi al controllo a 48 ore e mantenendo un effetto significativo anche a 72 ore. Questo dato suggerisce che Maq e LP possano esercitare un'azione modulativa preferenziale su GLUT2 rispetto agli altri markers analizzati, ipotizzando che i meccanismi attraverso cui questi composti agiscono su questo specifico trasportatore siano sufficientemente efficaci anche se somministrati singolarmente, mentre per gli altri markers la loro azione complementare si manifesta appieno solo in associazione.

Il dato più rilevante e biologicamente significativo dell'intero studio emerge infatti dall'analisi del trattamento combinato. La co-somministrazione di Maq e LP ha mostrato effetti chiaramente superiori a quelli dei singoli composti, con il recupero dell'espressione proteica statisticamente significativa per GRP94 e Sintaxina-4, per GLP-1R a 48 ore e per

GLP-1R e Syntaxina-4 a 72 ore. Questi risultati suggeriscono un possibile effetto additivo o sinergico tra i due composti, plausibile alla luce dei loro diversi meccanismi d'azione.

I polifenoli presenti nel Maq, in particolare le procianidine e gli acidi fenolici, agiscono prevalentemente come antiossidanti, riducendo lo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia e attenuando l'attivazione del pathway NF- κ B, che rappresenta uno dei principali mediatori del danno β -cellulare da glucotossicità.

I metaboliti di LP, costituiti principalmente da acidi grassi a catena corta, peptidi bioattivi e componenti della parete cellulare batterica, potrebbero invece agire su vie di segnalazione distinte, come l'inibizione degli HDAC con conseguente modulazione epigenetica dell'espressione genica, l'attivazione della via cAMP-CREB che promuove la trascrizione di geni coinvolti nella sopravvivenza β -cellulare, o la stimolazione di recettori di membrana sensibili agli acidi grassi a catena corta (SCFA).

La convergenza di questi meccanismi complementari potrebbe spiegare il motivo per cui la combinazione produca effetti che i singoli composti non riescono ad esercitare individualmente.

Il comportamento divergente del trattamento combinato rispetto a GLUT2 tra le due tempistiche, inefficace a 48 ore ma più efficace di tutti i singoli trattamenti a 72 ore, rappresenta uno degli elementi più intriganti dello studio. L'assenza di effetto del trattamento combinato a 48 ore potrebbe essere spiegata ipotizzando che la co-somministrazione di Maq e LP determini, nelle prime fasi del trattamento, una competizione o interferenza tra i rispettivi meccanismi d'azione sui pathway che regolano l'espressione di GLUT2. A 72 ore, l'effetto sinergico sembra invece manifestarsi pienamente, suggerendo che i meccanismi molecolari sottesi all'azione combinata dei due composti su questo specifico trasportatore richiedano un tempo di attivazione più lungo rispetto a quelli dei singoli trattamenti. Questo comportamento temporalmente bifasico indica che l'efficacia della combinazione Maq + LP su GLUT2 sia strettamente dipendente dalla durata del trattamento, un aspetto di potenziale rilevanza per un eventuale impiego clinico di questi composti.

Per GRP-94, il recupero osservato a 48 ore ma non a 72 ore potrebbe indicare che il danno chaperonico accumulato a seguito dell'esposizione prolungata allo stress iperglicemico superi la capacità protettiva del trattamento combinato in una finestra temporale più estesa, o che i meccanismi di ER stress attivati a 72 ore siano di entità tale da non essere più controbilanciati dai composti testati alle concentrazioni utilizzate.

L'analisi molecolare trova conferme anche mediante microscopia in fluorescenza.

Il pattern di fluorescenza osservato nelle cellule trattate con solo glucosio, caratterizzato da riduzione dell'intensità nucleare e peri-nucleare e da una distribuzione citoplasmatica più diffusa e disomogenea dell'insulina, è coerente con la nota alterazione del trafficking dei granuli insulinici in condizioni di glucotossicità. In particolare, la diffusione del segnale dal compartimento nucleare/peri-nucleare verso il citoplasma potrebbe riflettere un'alterazione dei meccanismi di ancoraggio e mobilizzazione dei granuli, direttamente correlabile alla riduzione di Syntaxina-4 rilevata con i saggi di immunochimica, infatti, la minore disponibilità di questo componente SNARE potrebbe compromettere la corretta redistribuzione dei granuli insulinici nel citoplasma. Il recupero del pattern puntiforme nucleare e peri-nucleare osservato nei gruppi trattati con Maq e LP, singolarmente e in combinazione, supporta i dati di Western blot che mostrano un parziale recupero dell'espressione di Syntaxina-4 in risposta al trattamento combinato, mostrando il pattern più simile al controllo e confermando a livello morfo-funzionale l'effetto antidiabetico della combo.

6 CONCLUSIONI

I risultati del presente studio dimostrano che il Macerato Acquoso di semi di *Phoenix dactylifera* e il filtrato metabolico di *Lactobacillus paracasei* F-19, somministrati in associazione, sono in grado di modulare favorevolmente l'espressione di markers molecolari chiave per la funzionalità β -cellulare in un modello in vitro di diabete di tipo 2, suggerendo un potenziale ruolo di questi composti come agenti nutraceutici e probiotici complementari nella prevenzione e nel trattamento del diabete di tipo 2.

Tuttavia, è necessario sottolineare i limiti intrinseci del presente lavoro, in quanto, si tratta di uno studio preliminare condotto esclusivamente su un modello cellulare in vitro, privo di un farmaco di riferimento positivo che avrebbe consentito di contestualizzare l'entità degli effetti osservati rispetto a trattamenti farmacologici di efficacia nota.

I meccanismi molecolari specifici attraverso cui Maq e LP esercitano i loro effetti, nonché le basi della loro sinergia, necessitano di ulteriori indagini approfondite, inclusi studi di trascrittomico e/o proteomico su larga scala, nonché di approfondimento delle pathway coinvolte. Inoltre, la validazione dell'attività degli estratti dovrà essere necessariamente essere validata in modelli biologici più complessi quali isole pancreatiche primarie, organoidi e modelli animali. Nonostante questi punti importanti, il presente studio suggerisce che il potenziale impiego di Maq e LP, come integrazione probiotica-nutraceutica nella gestione del diabete di tipo 2, possa essere una via percorribile e valutabile sia in termini di prevenzione che come affiancamento alla terapia convenzionale.

7 BIBLIOGRAFIA

Lu X, Xie Q, Pan X, Zhang R, Zhang X, Peng G, Zhang Y, Shen S, Tong N. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Oct 2;9(1):262. doi: 10.1038/s41392-024-01951-9. PMID: 39353925; PMCID: PMC11445387.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. *Lancet*. 2024 Nov 23;404(10467):2077-2093. doi: 10.1016/S0140-6736(24)02317-1. Epub 2024 Nov 13. Erratum in: *Lancet*. 2025 Apr 5;405(10485):1146. doi: 10.1016/S0140-6736(25)00620-8. PMID: 39549716; PMCID: PMC7616842.

Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Sep;18(9):525-539. doi: 10.1038/s41574-022-00690-7. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35668219; PMCID: PMC9169030.

Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Mar 27;4:37. doi: 10.3389/fendo.2013.00037. PMID: 23542897; PMCID: PMC3608918.

Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J*. 2022 Jan;46(1):15-37. doi: 10.4093/dmj.2021.0280. Epub 2021 Dec 30. PMID: 34965646; PMCID: PMC8831809.

Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2087-102. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.052. PMID: 17498505.

Kalyani RR, Neumiller JJ, Maruthur NM, Wexler DJ. Diagnosis and Treatment of Type 2 Diabetes in Adults: A Review. *JAMA*. 2025 Sep 16;334(11):984-1002. doi: 10.1001/jama.2025.5956. PMID: 40549398; PMCID: PMC13014273.

Tecce N, Proganò M, Menafra D, Docimo A, Zarrilli S, Scairati R, Lisa Pelosi A, Pivonello R, Colao A. Integrated strategies for type 2 diabetes prevention: The role of diet and exercise. *AIMS Public Health*. 2025 Apr 8;12(2):418-450. doi: 10.3934/publichealth.2025024. PMID: 40697264; PMCID: PMC12277773.

Wilcox T, De Block C, Schwartzbard AZ, Newman JD. Diabetic Agents, From Metformin to SGLT2 Inhibitors and GLP1 Receptor Agonists: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Apr 28;75(16):1956-1974. doi: 10.1016/j.jacc.2020.02.056. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2020 Oct 6;76(14):1719-1722. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.023. PMID: 32327107; PMCID: PMC7219531.

Van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 2023 Jun 28;51(3):1057-1069. doi: 10.1042/BST20221066. PMID: 37248992; PMCID: PMC10317183.

Xie L, Zhu D, Dolai S, Liang T, Qin T, Kang Y, Xie H, Huang YC, Gaisano HY. Syntaxin-4 mediates exocytosis of pre-docked and newcomer insulin granules underlying biphasic glucose-stimulated insulin secretion in human pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2015 Jun;58(6):1250-9. doi: 10.1007/s00125-015-3545-4. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25762204.

Kim DS, Song L, Gou W, Kim J, Liu B, Wei H, Muise-Helmericks RC, Li Z, Wang H. GRP94 is an IGF-1R chaperone and regulates beta cell death in diabetes. *Cell Death Dis*. 2024 May 29;15(5):374. doi: 10.1038/s41419-024-06754-y. PMID: 38811543; PMCID: PMC11137047.

Wan W, Qin Q, Xie L, Zhang H, Wu F, Stevens RC, Liu Y. GLP-1R Signaling and Functional Molecules in Incretin Therapy. *Molecules*. 2023 Jan 11;28(2):751. doi: 10.3390/molecules28020751. PMID: 36677809; PMCID: PMC9866634.

Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015 Feb;58(2):221-32. doi: 10.1007/s00125-014-3451-1. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25421524.

Alkhoori MA, Kong AS, Aljaafari MN, Abushelaibi A, Erin Lim SH, Cheng WH, Chong CM, Lai KS. Biochemical Composition and Biological Activities of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Seeds: A Review. *Biomolecules*. 2022 Nov 3;12(11):1626. doi: 10.3390/biom12111626. PMID: 36358976; PMCID: PMC9687710.

Salgaço MK, Oliveira LGS, Costa GN, Bianchi F, Sivieri K. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Dec;103(23-24):9229-9238. doi: 10.1007/s00253-019-10156-y. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31664483.

Di Cerbo A, Palmieri B. *Lactobacillus Paracasei* subsp. *Paracasei* F19; a farmacogenomic and clinical update. *Nutr Hosp*. 2013 Nov 1;28(6):1842-50. PMID: 24506359.

McCluskey JT, Hamid M, Guo-Parke H, McClenaghan NH, Gomis R, Flatt PR. Development and functional characterization of insulin-releasing human pancreatic beta cell lines produced by electrofusion. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):21982-92. doi: 10.1074/jbc.M111.226795. Epub 2011 Apr 22. PMID: 21515691; PMCID: PMC3121343.

Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Apr 1;26(10):501-518. doi: 10.1089/ars.2016.6755. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27225690; PMCID: PMC5372767.

Vasu S, McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR. Cellular responses of novel human pancreatic β -cell line, 1.1B4 to hyperglycemia. *Islets*. 2013 Jul-Aug;5(4):170-7. doi: 10.4161/isl.26184. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23985558.

8 RINGRAZIAMENTI

Giungere al termine di questo percorso rappresenta per me un traguardo che non avrei potuto raggiungere senza il supporto e la vicinanza di tante persone care, alle quali voglio dedicare queste righe.

Il primo e più sentito ringraziamento va al Prof. Lorenzo Corsi, con il quale ho condiviso molto più di un semplice rapporto accademico. La sua guida scientifica è stata preziosa e imprescindibile, ma altrettanto importante è stato il rapporto umano che si è creato tra noi, fatto di stima reciproca, dialogo aperto e fiducia.

Ringrazio il Prof. Alessandro Di Cerbo e Mario, con i quali abbiamo collaborato attivamente nel portare avanti questo progetto di ricerca. Il loro contributo, la loro disponibilità e la passione con cui si sono approcciati a questo lavoro hanno reso tutto più stimolante e significativo.

Un ringraziamento profondo va ai miei genitori. Mi hanno insegnato il valore del sacrificio e della fatica, trasmettendomi la convinzione che per ottenere ciò che si desidera occorre impegnarsi al massimo, non solo in funzione dell'obiettivo finale, ma in tutto ciò che si fa, con costanza e dedizione. Grazie a loro ho compreso che la disciplina e la precisione non sono semplici strumenti, ma un modo di essere che, nel tempo, ripaga sempre ogni sforzo compiuto. Nei momenti di difficoltà ci sono sempre stati.

Ringrazio i miei più cari amici Alfredo, Naheli, Riccardo, Davide, Gianluca, Maria ed Erica per il loro supporto e la loro vicinanza lungo tutto questo percorso.

Per ultima, ma con un posto che non ha eguali nel voglio ringraziare Chiara. Non esistono parole sufficienti per descrivere quanto tu abbia significato per me in questi anni. Sei stata la mia forza nei momenti difficili, la mia gioia in quelli belli e la persona senza la quale tutto questo semplicemente non sarebbe stato possibile.

Grazie a tutti, grazie a Dio, a *majora semper*.