

PERCHÉ IL DIABETE HA PIÙ ATEROSCLEROSI. VIE DI SIGNALING NELLA VASCULOPATIA DIABETICA

R. De Caterina, R. Madonna

Cattedra e Istituto di Cardiologia,
Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti.

Introduzione

Secondo l'International Diabetes Federation Atlas del 2009, la stima per il 2010 della prevalenza di diabete in tutto il mondo è salita a 285 milioni, pari al 6.6% della popolazione adulta mondiale¹. Le complicanze vascolari indotte dal diabete, rappresentate dalle malattie micro- (essenzialmente causa di retinopatia, neuropatia e nefropatia, a rara insorgenza nel periodo antecedente la comparsa del diabete di tipo 1 o di tipo 2) e macrovascolare (essenzialmente l'aterosclerosi), sono le principali cause di morbilità e mortalità in questa popolazione. Nei pazienti diabetici l'aterosclerosi inizia più precocemente, e ha caratteri di maggiore gravità e con distribuzione più diffusa, in forma di malattia coronarica, malattia cerebrovascolare e malattia delle arterie periferiche^{2,3}. Due grandi studi, The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) e lo UK Prospective Diabetes Study (UKPDS), hanno chiaramente dimostrato che il trattamento intensivo dell'iperglicemia può ridurre la progressione delle complicanze microvascolari⁴. Solo di recente, il follow-up degli studi DCCT e UKPDS ha dimostrato che i pazienti che hanno ricevuto un controllo intensivo della glicemia hanno anche, sebbene a lungo termine ed in misura modesta, una minore incidenza di complicanze macrovascolari⁵. Queste osservazioni cliniche suggeriscono che l'iperglicemia è un fattore importante per la patogenesi della malattia microvascolare diabetica, mentre essa è solo uno dei tanti fattori che aumentano il rischio di aterosclerosi. Inoltre, la crescente lista di nuovi loci di rischio cardiovascolare e di polimorfismi di singoli nucleotidi (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) fornite da studi di associazione eseguiti sull'intero genoma (*genome-wide association studies*, GWAS)^{6,7}, fornisce una prova convincente del ruolo chiave della suscettibilità genetica nella patogenesi della malattia vascolare nel diabete.

Glucotossicità e malattie cardiovascolari

Cronologicamente, Haist nel 1940 fu il primo ad osservare che alte concentrazioni di glucosio esercitano molteplici effetti patologici sulle β -cellule pancreatiche⁸. Successivamente, sono stati conati i termini di “tossicità da glucosio” o “glucotossicità” allo scopo di descrivere gli effetti negativi dell’esposizione cronica delle β -cellule pancreatiche ad elevate concentrazioni di glucosio⁹. Allo stato attuale, è ben dimostrato che alte concentrazioni di glucosio esercitano molteplici effetti patologici su diverse tipologie di cellule e tessuti, incluso il sistema cardiovascolare⁴. L’iperglicemia cronica (alte concentrazioni di glucosio plasmatico a digiuno e/o di emoglobina glicata (HbA1c)), è un fattore di rischio indipendente per la malattia cardiovascolare sia nei pazienti con diabete di tipo 1 che in quelli con diabete di tipo 2⁴. Tre recenti studi multicentrici prospettici randomizzati, volti a valutare gli effetti del controllo intensivo della glicemia sulla macrovasculopatia nei pazienti con diabete di tipo 2 considerati ad alto rischio cardiovascolare hanno tuttavia fornito risultati contrastanti. Nello studio Action in Diabetes and Vascular Disease (ADVANCE) c’è stata solo una riduzione del 10% dell’outcome primario composito, costituito dagli eventi microvascolari (ridotta progressione della microalbuminuria) nel gruppo di trattamento intensivo. Nel trial Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)¹⁰, l’outcome primario (primo episodio di infarto del miocardio non fatale o ictus non fatale o morte per malattie cardiovascolari) non è stato significativamente ridotto nel gruppo di trattamento intensivo, dove, al contrario, si è registrato un aumento della mortalità di circa tre volte, probabilmente a causa della più elevata incidenza di ipoglicemia grave. Lo studio Veterans Administration researchers (VADT)¹¹ non è stato in grado di dimostrare che il raggiungimento di un obiettivo di HbA1c <7% ha un effetto statisticamente significativo sulla riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori, la morte, o l’incidenza di complicanze microvascolari, eccezione fatta per la progressione della microalbuminuria. Il messaggio che proviene da questi tre principali studi è che un controllo stretto della glicemia a valori vicini a quelli normali (che implica una notevole riduzione della glucotossicità) non ha un grande impatto sugli eventi cardiovascolari e può addirittura risultare dannoso. Contrariamente a questi dati, nello studio UKPDS il riesame del gruppo sottoposto a terapia intensiva dopo un follow-up di 10 anni ha mostrato una riduzione del rischio di infarto miocardico e di morte per qualsiasi causa, così come di complicanze microvascolari. Questo effetto ritardato dimostrerebbe gli effetti cumulativi della glucotossicità sulle malattie cardiovascolari. Nell’insieme, questi dati tuttavia dimostrano che la tossicità del glucosio esercita un ruolo importante nelle complicanze microvascolari⁴. Per converso, lo sviluppo di complicanze macrovascolari come conseguenza della glucotossicità sembrerebbe più tardivo e sarebbe più difficile da rilevare. Pertanto la glucotossicità, per decenni il principale e frequentemente l’unico obiettivo terapeutico perseguito nel paziente diabetico, è un fattore importante per la microvasculopatia, ma solo uno dei fattori che contribuiscono alla macrovasculopatia. Nelle cellule in cui il trasporto del glucosio è in parte indipendente dall’insulina, come ad esempio le cellule endoteliali, renali, retiniche e dei nervi periferici, l’iperglicemia induce un aumento delle concentrazioni intracellulari di glucosio e di molti altri intermedi glicolitici,

che sono substrati critici per diverse vie biochimiche¹². In presenza di iperglicemia cronica vi è una inadeguata riduzione dei trasportatori insulino-indipendenti, che espone le cellule ad un afflusso continuo di elevate quantità di glucosio dallo spazio extracellulare al citosol. Questo determina la produzione in eccesso di intermedi reattivi dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS)¹³. I ROS sono gli effettori finali, ma anche agenti causali dell'avvio di almeno quattro vie metaboliche derivanti dall'iperglicemia: (a) la via dei polioli; (b) la formazione di AGEs; (c) la sintesi de novo di diacilglicerolo (DAG), con conseguente attivazione delle isoforme PKC; (d) l'aumentato flusso attraverso la via delle esosamine. L'attivazione di queste vie, in parte mediata dal glucosio tramite un meccanismo iperosmolare¹⁴, può spiegare perché l'iperglicemia cronica determina modificazioni dell'omeostasi biochimica del sistema cardiovascolare, portando in ultima analisi allo sviluppo della vasculopatia diabetica (per lo più microangiopatia). L'attivazione di ognuno dei quattro suddetti meccanismi, dovuta alla formazione di ROS, determina anche una sovrapproduzione di nitrossido (NO) ed anione superossido attraverso la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni¹⁵, con formazione di anione perossinitrito. Il perossinitrito ossida i gruppi sulfidrilici delle proteine, determina la perossidazione dei lipidi e nitrosilazione di aminoacidi come la tirosina, e innesca la rottura del DNA a singolo filamento, che induce una rapida attivazione dell'enzima poli (ADPribosio) polimerasi (PARP)¹⁶. L'attivazione della PARP, a sua volta riduce le concentrazioni intracellulari di NAD⁺, rallentando la velocità della glicolisi, del trasporto degli elettroni e, in ultima analisi, della formazione di ATP; e favorisce la ribosilazione ADP-dipendente della gliceraldeide deidrogenasi 3-fosfato (GADPH). Recenti studi hanno dimostrato un ruolo centrale della ribosilazione ADP-dipendente della GADPH nella formazione di AGEs e nell'attivazione della via dei polioli, della PKC /diacilglicerolo (DAG) e della via dell'esosamina¹⁷. Tali percorsi vengono qui di seguito descritti in maggior dettaglio.

La via dei polioli

La via dei polialcoli (polioli) trasforma il glucosio intracellulare in eccesso in polialcoli, attraverso una reazione catalizzata dall'enzima aldoso-reduttasi. Questo enzima, un'ossido-reduttasi citosolica che catalizza la riduzione NADPH-dipendente di una grande varietà di composti carbonilici come il glucosio, favorisce la conversione del glucosio in sorbitolo, che a sua volta innesca una serie di modificazioni intracellulari dei tessuti vascolari. L'aldoso-reduttasi ha normalmente una bassa affinità per il glucosio. Alle normali concentrazioni di glucosio tipiche dei soggetti non diabetici, il metabolismo del glucosio attraverso questa via rappresenta solo una piccola percentuale del metabolismo totale del glucosio. Nel diabete, al contrario, l'iperglicemia induce una sovrapproduzione di ROS attraverso la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni, determinando l'attivazione della reduttasi e la successiva conversione del glucosio in sorbitolo. Il sorbitolo viene ossidato in fruttosio dalla sorbitolo-deidrogenasi, con riduzione del NAD⁺ a NADH. Questo processo determina il consumo di NADPH, e determina una diminuita rigenerazione di glutatione ridotto, con aumento della produzione di ROS¹⁸, e conseguenti effetti deleteri sul sistema vascolare (Fig. 1a).

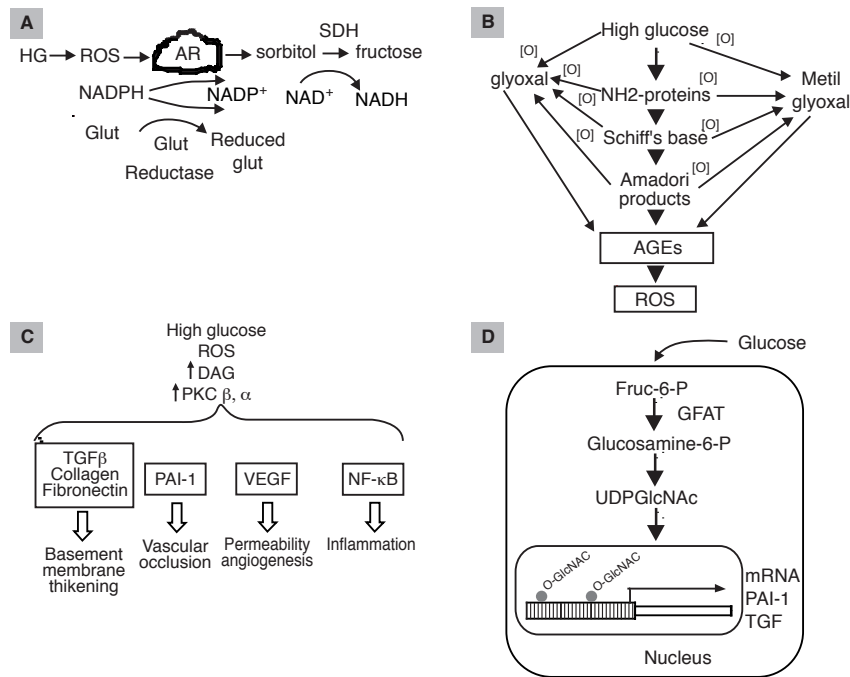


Fig. 1. Meccanismi della glucotossicità nella vasculopatia diabetica. A, glucotossicità attraverso la via dei polioli; B, glucotossicità attraverso la via degli AGEs; C, glucotossicità attraverso l'attivazione della protein kinasi C; D, glucotossicità attraverso l'aumentato flusso della via delle esosammine. Abbreviazioni: HG, iperglicemia, SDH, sorbitolo deidrogenasi; per le altre abbreviazioni, vedi il testo principale.

Prodotti finali di glicazione avanzata

L'iperglicemia è l'evento iniziale per la formazione di AGEs extracellulari e intracellulari. Gli AGEs possono derivare dall'autossidazione extracellulare e intracellulare del glucosio a glicossale, dalla decomposizione dei prodotti di Amadori a 3-deossiglucosone, e dalla frammentazione della gliceraldeide-3-fosfato a metilglicossale. Questi reattivi intracellulari dicarbonilici reagiscono con i gruppi amminici delle proteine intracellulari ed extracellulari per formare AGEs. Gli AGEs agiscono negativamente sulle cellule bersaglio attraverso tre principali meccanismi. In primo luogo, le proteine intracellulari modificate dagli AGEs hanno un'alterata funzione biologica. In secondo luogo, le componenti della matrice extracellulare modificate dagli AGEs interagiscono in maniera anomala con gli altri componenti della matrice e con i recettori della matrice, come integrine. In terzo luogo, le proteine plasmatiche modificate interagiscono con i recettori della superficie cellulare, quali il recettore per gli AGEs (RAGEs), un ligando transmembrana membro della superfamiglia delle immunoglobuline¹⁹. Altri recettori, come il recettore spazzino (scavenger) dei macrofagi P60, P90 e galectina-3, sono stati riportati essere in grado di legare gli AGEs¹⁹. Tuttavia, il legame degli AGEs con RAGE è riconosciuto come il principale processo responsabile della generazione di ROS e attivazione di fat-

tori di trascrizione come il fattore nucleare- κ B (NF- κ B), con successiva modificazione dell'espressione di molti geni coinvolti nell'infiammazione vascolare e nella disfunzione endoteliale²⁰ (Fig. 1b).

La via della protein chinasi C

Alti livelli di glucosio intracellulare attivano l'enzima PKC, con conseguente alterazione della funzione cellulare²¹. L'enzima PKC è costituito da una famiglia di almeno 12 isoforme, di cui 5 sono espresse nei tessuti diabetici. Nei ratti diabetici, l'isoforma PKC- β è attivata a livello dell'aorta e dei tessuti cardiaci, mentre le isoforme α , β ed ϵ sono attivate nella retina, e le isoforme α , β , δ , ϵ e ξ sono attivate nei glomeruli²². L'aumento della concentrazione intracellulare di glucosio aumenta il secondo messaggero DAG in cellule endoteliali, con conseguente sintesi de novo dell'intermedio della glicolisi gliceraldeide-3-fosfato attraverso riduzione dell'acilazione del glicerolo-3-fosfato. Il DAG è un potente attivatore della PKC (principalmente delle isoforme β e δ), e con questo meccanismo determina l'aumentata espressione di una serie di geni capaci, tutti insieme, di contribuire alla patogenesi delle complicanze diabetiche²¹. Per esempio, l'attivazione anomala delle isoforme β e δ di PKC contribuisce ad un aumento delle proteine della matrice microvascolare (collagene e fibronectina) attraverso l'induzione del *transforming growth factor* (TGF)- β in colture di cellule mesangiali di ratti diabetici. L'iperglicemia indotta dall'attivazione della PKC è stata inoltre coinvolta nella sovraespressione del PAI-1²³ e nell'attivazione di NF- κ B in colture di cellule endoteliali e muscolari lisce²⁴. Questo potrebbe risultare in una maggiore propensione all'occlusione vascolare aterotrombotica. Inoltre, l'attivazione della PKC dovuta ad alte concentrazioni di glucosio induce l'espressione del fattore di crescita vascolare endoteliale (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) in cellule endoteliali e muscolari lisce, con il conseguente aumento della permeabilità vascolare e angiogenesi²⁵, un meccanismo che può indurre a sua volta la rottura di placca (Fig. 1c).

La via dell'esosamina

L'aumento delle concentrazioni intracellulari di glucosio attiva la via dell'esosamina. In essa, il fruttosio-6 fosfato, un intermedio della glicolisi, viene convertito in glucosamina-6 fosfato dalla glutamina alanina fruttosio 6-fosfato aminotransferasi (GFAT)²⁵. Il principale prodotto di tali reazioni è l'uridin-difosfato N-acetilglucosamina, un substrato chiave per le successive modificazioni in serina e treonina di proteine bersaglio e fattori di trascrizione attraverso il legame dell'acetilglucosamina (O-GlcNAc). In condizioni euglicemiche solo una piccola frazione di glucosio (circa il 1-3%) è metabolizzata attraverso questa via; tale frazione aumenta in condizioni di iperglicemia. Le conseguenze funzionali dell'attivazione di questa via sono rappresentate da una maggiore espressione ed attività di PAI-1²⁵ e TGF- β ²⁶, entrambe mediate da modificazioni O-GlcNAc del fattore di trascrizione Specific Protein 1 (SP1) (Fig. 1d).

Resistenza all'insulina, iperinsulinemia e malattie cardiovascolari

Si definisce resistenza all'insulina quella condizione in cui una cellula, un tessuto oppure un organismo hanno un fabbisogno d'insulina superiore al normale per ottenerne una risposta fisiologica. L'insulino-resistenza, misurata attraverso il metodo di riferimento del clamp iperinsulinemico euglicemico oppure con metodi surrogati, come il test di tolleranza al glucosio per via endovenosa, o il test di soppressione insulinica, è presente nel 32%-76% delle persone caratterizzate dalla sindrome metabolica (un raggruppamento di fattori di rischio cardiovascolare come obesità, ipertrigliceridemia, basse concentrazioni di colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità (HDL), ipertensione, microalbuminuria, disglicemia e iperinsulinemia compensatoria)²⁷. Il legame tra malattia coronarica e alte concentrazioni d'insulina, che caratterizzano gli stati di insulino-resistenza, è stato proposto alla fine degli anni '60²⁸. Da allora, una grande quantità di dati sperimentali ha sostenuto l'ipotesi della resistenza all'insulina e dell'iperinsulinemia compensatoria come fattori di rischio per la malattia cardiovascolare²⁹. La resistenza all'insulina può riflettere l'influenza combinata di obesità, abitudini alimentari e stile di vita sedentario, e può indurre disglicemia, dislipidemia, infiammazione e trombosi²⁷. Anche se i meccanismi molecolari dell'insulino-resistenza non sono ancora completamente conosciuti, la presenza di anomalie delle vie di trasduzione intracellulari del segnale insulinico è stata descritta in diversi modelli animali di diabete di tipo 2 e – in misura minore – di diabete di tipo 1. Nei tessuti periferici e nel fegato, in condizioni normali l'insulina inizia la sua azione attraverso il legame al suo recettore cellulare di superficie, una proteina eterotetramerica composta di due subunità α extracellulari e due subunità β transmembrana, collegate da ponti disolfuro. Attraverso il legame alle subunità α extracellulari l'insulina induce un cambiamento conformazionale del recettore, che a sua volta provoca la dimerizzazione dei recettori adiacenti e attivazione del dominio della tirosin-chinasi della porzione intracellulare della subunità β . Una volta indotta l'attività della tirosin-chinasi del recettore insulinico, quest'ultima promuove l'autofosforilazione della stessa subunità β e la rapida fosforilazione delle cosiddette "proteine di ancoraggio" (docking proteins), come l'*insulin receptor substrate* (IRS) -1, -2, -3, e -4", e diverse altre proteine tra cui le *collagen homology proteins* (shc) e *src homology 2* (SH2), che a loro volta attivano diversi intermedi della via di trasduzione intracellulare (Fig. 2). Pertanto, IRS, shc e le proteine SH2 svolgono importanti ruoli di regolazione del *signaling* insulinico. Nella loro forma fosforilata queste proteine diventano punti di ancoraggio per le proteine intracellulari che contengono domini complementari SH2. In particolare, l'interazione tra proteine IRS-1 e fosfatidilinositolo (PI) 3-chinasi determina l'attivazione di Akt (nota anche come proteina chinasi B) che è di fondamentale importanza nel meccanismo di attivazione da parte dell'insulina della traslocazione di GLUT-4, permettendo il trasporto intracellulare del glucosio, e l'attivazione dell'ossido nitrico (NO) sintetasi (il cosiddetto braccio "metabolico" del signaling insulinico). Al contrario, gli effetti non metabolici, proliferativi, mitogeni e pro-infiammatori dell'insulina sono mediati dall'attivazione di Ras (soprattutto attraverso SHC e, in misura minore, attraverso IRS), Raf, e le *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (il cosiddetto braccio mitogeno del signaling insulinico)³⁰. In animali insulino-resistenti e in

modelli in vitro di insulino-resistenza vi è una ridotta attivazione del signaling insulinico attraverso la IRS-1/PI3-chinasi, con conseguente ridotta internalizzazione del glucosio, ridotta sintesi di NO e ridotta utilizzazione del glucosio nei tessuti bersaglio dell'insulina³¹. L'insulina ha un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi vascolare attraverso l'attivazione endotelio-dipendente di NO. L'insulina, infatti, aumenta la produzione di NO endoteliale mediata dalla NOS-III (NOS endoteliale) attraverso meccanismi rapidi post-traduzionali, che sono mediati dalla via di signaling di PI3K/AKT³². Negli stati di insulino-resistenza la via di PI3K/AKT è selettivamente inibita, e questo porta a disfunzione endoteliale, con conseguente ipertensione arteriosa, aumento delle interazioni tra cellule endoteliali e leucociti, e stato protrombotico. Mentre la via IRS-1/PI3-chinasi è compromessa, la via delle MAPK rimane in gran parte inalterata, consentendo quindi all'iperinsulinemia compensatoria d'indurre eventi proliferativi e pro-aterogenici a livello della muscolatura liscia vascolare e delle cellule endoteliali. Tali effetti comprendono l'aumentata produzione di PAI-1, endotelina, citochine pro infiammatorie, e l'aumentata espressione di

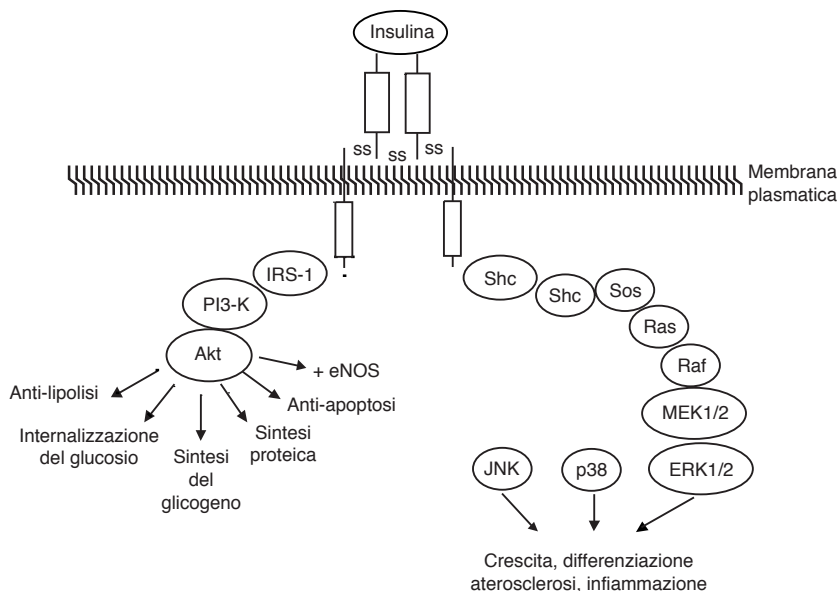


Fig. 2. Vie di trasduzione intracellulare (signaling) dell'insulina e sue alterazioni nell'insulino-resistenza. Con il legame al suo recettore della classe delle tirosin-chinasi, l'insulina induce dimerizzazione del recettore e attivazione di una serie di eventi di fosforilazione a cascata, che producono due classi di effetti: (a) effetti "metabolici", che promuovono il trasporto del glucosio, la sintesi di glicogeno e di proteine, l'inibizione della lipolisi, la protezione dall'apoptosi e la liberazione di NO (effetti anche globalmente descritti come "anti-infiammatori"); (b) effetti di promozione della crescita e della differenziazione, che portano alla promozione dell'infiammazione e dell'aterogenesi (cioè effetti mitogeni e pro-infiammatori del signaling insulinico). Abbreviazioni: IRS-1, insulin substrate receptor-1; PI3-Kinase, phosphatidylinositol(PI)3-kinase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; JNK, c-Jun NH2-1 terminal kinase; MEK, MAPK (mitogen activated protein kinase)/ERK (extracellular receptor kinase)-kinase; p38, p38 MAPK; Akt or protein kinase B (PKB).

molecole di adesione^{31,33-34}. Questa resistenza selettiva all'insulina è stata dimostrata nel muscolo scheletrico di soggetti obesi e nei pazienti con diabete di tipo 2³⁵, nonché nei tessuti vascolari e nel miocardio di ratti Zucker obesi. Oltre alla presenza di insulino-resistenza, l'iperinsulinemia di per sé può avere un ruolo diretto nella patogenesi delle complicanze macrovascolari. Solide evidenze derivanti da esperimenti su animali³⁶⁻³⁹ e diversi studi in vitro hanno fornito la plausibilità biologica dell'effetto pro-aterogenico di alte concentrazioni di insulina. Esperimenti in vitro hanno dimostrato come l'insulina sia in grado di stimolare la proliferazione e migrazione delle cellule della muscolatura liscia arteriosa³³, e di indurre l'adesione dei monociti, aumentando l'espressione di *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 in cellule endoteliali⁴⁰⁻⁴².

Conclusioni

Attraverso meccanismi legati all'iperglicemia – specifici del diabete conclamato – e all'insulino-resistenza – estesi anche alla situazione della sindrome metabolica che precede l'insorgenza del diabete di tipo 2 conclamato – siamo oggi in grado di spiegare i principali meccanismi dell'aumentata estensione, gravità e diffusione dell'aterosclerosi nel diabete, nonché l'insorgenza della microvasculopatia. Queste conoscenze stanno rivelando bersagli molecolari potenzialmente suscettibili d'interferenza farmacologica con farmaci innovativi.

Ringraziamenti

La parte sperimentale di tale lavoro è stata supportata dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica attraverso un finanziamento al Centro di Eccellenza Studi sull'Invecchiamento (Ce.S.I.) presso l'Università di Chieti (a RDC), e da finanziamenti dell'Istituto Nazionale Ricerche Cardiovascolari (INRC) a RDC e RM.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Unwin N, Gan D, Whiting D. The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87:2-3
- 2) Pajunen P, Nieminen MS, Taskinen MR, Syvanne M. Quantitative comparison of angiographic characteristics of coronary artery disease in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus compared with matched nondiabetic control subjects. *Am J Cardiol* 1997; 80:550-6
- 3) Pajunen P, Taskinen MR, Nieminen MS, Syvanne M. Angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2000; 86:1080-5
- 4) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352:854-65
- 5) Ruiz J, Egli M, Gianinazzi F, et al. [Treatments for cardiovascular risk factors and screening for coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus]. *Rev Med Suis-*

- se 2010; 6:1176-8, 80-1
- 6) *Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, et al.* Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* 2010; 375:1634-9
 - 7) *McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al.* A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007; 316:1488-91
 - 8) *Haist RE, Best CH.* Factors Affecting the Insulin Content of Pancreas. *Science* 1940; 91:410
 - 9) *DeFronzo RA.* Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:667-87
 - 10) *Glah D.* American Diabetes Association - 68th Scientific Sessions. Results for ACCORD, ADVANCE and other clinical trials. *J Drugs* 2008; 11:550-2
 - 11) *Murata GH, Duckworth WC, Shah JH, Wendel CS, Mohler MJ, Hoffman RM.* Hypoglycemia in stable, insulin-treated veterans with type 2 diabetes: a prospective study of 1662 episodes. *J Diabetes Complications* 2005; 19:10-7
 - 12) *Williamson JR, Tilton RG, Kilo C.* The polyol pathway and diabetic vascular complications. New York: Raven 1991
 - 13) *Baynes JW.* Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-12
 - 14) *Madonna R, Montebello E, Zurro M, Lazzerini G, De Caterina R.* Na⁺/H⁺ exchanger 1 - and aquaporin-1 - dependent hyperosmolarity changes decrease nitric oxide production and induce VCAM-1 expression in endothelial cells exposed to high glucose. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; in press
 - 15) *Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF.* High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96:25-8
 - 16) *Soriano FG, Virag L, Szabo C.* Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* 2001; 79:437-48
 - 17) *Du L, Zhang X, Han YY, et al.* Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278:18426-33
 - 18) *Brownlee M.* Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-20
 - 19) *Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D.* Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1521-8
 - 20) *Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al.* Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; 105:816-22
 - 21) *Das Evcimen N, King GL.* The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007; 55:498-510
 - 22) *Mellor H, Parker PJ.* The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998; 332:281-92
 - 23) *Feener EP, Xia P, Inoguchi T, Shiba T, Kunisaki M, King GL.* Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol* 1996; 118:180-7
 - 24) *Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R.* Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999; 48:855-64
 - 25) *Chakrabarti S, Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, Chen S.* Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16:393-407
 - 26) *Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED.* High glucose-in-

- duced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998; 101:160-9
- 27) *Reaven GM*. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607
 - 28) *Stout RW, Vallance-Owen J*. Insulin and atheroma. *Lancet* 1969; 1:1078-80
 - 29) *DeFronzo RA*. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010; 53:1270-87
 - 30) *Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR*. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:85-96
 - 31) *Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, et al*. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:1794-9
 - 32) *Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ*. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001; 276:30392-8
 - 33) *Golovchenko I, Goalstone ML, Watson P, Brownlee M, Draznin B*. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor-kappaB induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87:746-52
 - 34) *Ridray S*. Hyperinsulinemia and smooth muscle cell proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19 Suppl 1:S39-51
 - 35) *Cusi K, Maezono K, Osman A, et al*. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105:311-20
 - 36) *Cruz AB, Jr., Amatuzio DS, Grande F, Hay LJ*. Effect of intra-arterial insulin on tissue cholesterol and fatty acids in alloxan-diabetic dogs. *Circ Res* 1961; 9:39-43
 - 37) *Duff GL, Mc MG*. The effect of alloxan diabetes on experimental cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *J Exp Med* 1949; 89:611-30
 - 38) *Sato Y, Shiraishi S, Oshida Y, Ishiguro T, Sakamoto N*. Experimental atherosclerosis-like lesions induced by hyperinsulinism in Wistar rats. *Diabetes* 1989; 38:91-6
 - 39) *Stamler J, Pick R, Katz LN*. Effect of insulin in the induction and regression of atherosclerosis in the chick. *Circ Res* 1960; 8:572-6
 - 40) *Madonna R, Massaro M, De Caterina R*. Insulin potentiates cytokine-induced VCAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782:511-6
 - 41) *Madonna R, Massaro M, Pandolfi A, Consoli A, De Caterina R*. The prominent role of p38 mitogen-activated protein kinase in insulin-mediated enhancement of VCAM-1 expression in endothelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20:539-55
 - 42) *Madonna R, Pandolfi A, Massaro M, Consoli A, De Caterina R*. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase. *Diabetologia* 2004; 47:532-6