

REVIEW

GLICO-OSSIDAZIONE DELLE PROTEINE ED ATEROSCLEROSI NELLA MALATTIA DIABETICA

FRANCESCO PIARULLI, DOMENICO FEDELE, ANNUNZIATA LAPOLLA

*Cattedra di Malattie del Metabolismo, Dipartimento di Medicina
Università degli Studi di Padova*

SOMMARIO

La glico-ossidazione delle proteine rappresenta un importante collegamento tra iperglicemia e complicanze croniche (micro e macroangiopatiche) del diabete. Sia i prodotti iniziali che tardivi di tale reazione sono in grado di determinare danno attraverso una serie di meccanismi quali la formazione di cross-links anomali, l'interazione con specifici recettori e l'accumulo intracellulare. Lo sviluppo di metodologie analitiche accurate e sensibili per lo studio di cinetiche di glicazione e per il riconoscimento di specifici markers, accanto a studi prospettici su ampie popolazioni, porterà sicuramente a meglio definire l'importanza clinica di tale processo.

Parole chiave: glico-ossidazione, prodotti di glicazione avanzata (AGE), diabete, aterosclerosi.

La formazione dei prodotti di glico-ossidazione

L'iperglicemia è considerata uno dei fattori patogenetici chiave nello sviluppo delle complicanze croniche del diabete.

Essa agisce attraverso vari meccanismi tra i quali uno dei più importanti è la glicazione non enzimatica delle proteine (1, 2).

Schematicamente possiamo considerare la reazione non enzimatica delle pro-

teine, o reazione di Maillard, come un processo in 3 fasi: iniziale, intermedia e terminale (*Figura 1*).

Nella *fase iniziale* il glucosio (o altri zuccheri riducenti) si lega ad un gruppo aminico libero di proteine, acidi nucleici, componenti lipidiche, per formare un composto aldiminico labile (base di Schiff).

L'aldimina, attraverso un riarrangiamento intramolecolare, si trasforma in un composto chetoaminico stabile, il prodotto di Amadori.

Tale reazione non enzimatica è influenzata *in vivo* da una serie di fattori tra i quali la durata e l'entità dell'iperglicemia, il turnover delle proteine, la permeabilità cellulare al glucosio e l'accessibilità degli amino gruppi proteici. Il glucosio è stato

Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Piarulli
Dipartimento di Medicina - DIMED
Via Giustiniani, 2 - Padova
E-mail: francesco.piarulli@unipd.it

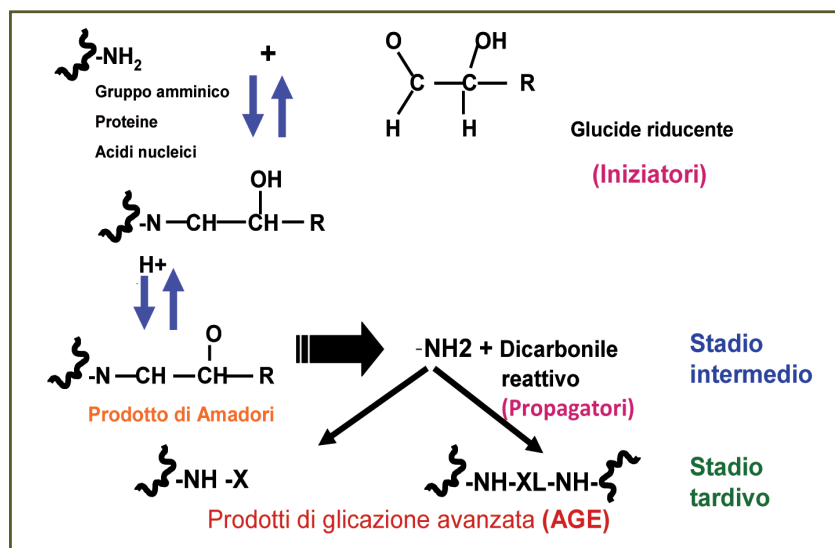


Figura 1 - La reazione di Maillard.

sino ad ora considerato il più importante iniziatore *in vivo* di tale reazione, sia perché rappresenta il principale zucchero dell'organismo sia perché la sua concentrazione è aumentata nel diabete. Ci sono comunque studi che evidenziano come anche il galattosio, il fruttosio, il ribosio, altri pentosi ed alcuni intermedi della glicolisi possono iniziare la reazione di Maillard. Il prodotto di Amadori raggiunge l'equilibrio dopo 15-20 giorni e tende ad accumularsi sia sulle proteine a breve emivita che su quelle ad emivita più lunga. L'accumulo del prodotto di Amadori sulle proteine è in grado di alterare le proprietà fisico-chimiche delle stesse, come evidenziato per esempio in un nostro studio in cui abbiamo verificato l'attività dell'insulina glicata *in vitro* (3).

Nella *fase intermedia* il prodotto di Amadori va incontro a reazioni di ossidazione e disidratazione e viene degradato in una serie di composti dicarbonilici molto reattivi che agiscono quali *propagatori* della reazione. Tali composti quali i deossigliucosoni, il gliosale ed il metilgliosale reagiscono nuovamente con i gruppi amminici liberi delle proteine e determinano la for-

mazione dei prodotti di glicazione avanzata (AGE) (4).

Nella *fase finale* una serie di reazioni di ossidazione, disidratazione, ciclizzazione, dà luogo alla formazione degli AGE, composti termodinamicamente stabili, spesso giallo-bruni e fluorescenti, che si accumulano soprattutto sulle proteine a lunga emivita.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno messo in evidenza la stretta relazione tra glicazione ed ossidazione per cui sarebbe più corretto parlare di reazioni di glicossidazione delle proteine (5). I meccanismi con cui si verificano tali reazioni sono l'autossidazione del glucosio, reazione nella quale il glucosio, in presenza di O_2 e di metalli liberi, si ossida e dà origine a radicali liberi (O_2^- , H_2O_2 , HO_2) e dicarbonili reattivi, tra i quali i deossigliucosoni, che possono reagire successivamente con le proteine formando una chetoimmina più reattiva del prodotto di Amadori e capace quindi di attivare ulteriori reazioni che conducono alla formazione degli AGE. L'altro meccanismo coinvolge invece i prodotti di Amadori già legati alle proteine che, in presenza di O_2 e metalli liberi, si os-

sidano e danno origine a proteine-enedioli e proteine-dicarbonili molto reattive ed in grado anch'esse di determinare la formazione degli AGE.

Viste le caratteristiche degli AGE, la loro valutazione sino a qualche anno fa è stata eseguita con metodiche quali la spettroscopia ad assorbanza e la fluorimetria che li valutano "*in toto*" e che hanno una buona sensibilità ma una scarsa specificità (1, 2). Più recentemente sono stati sviluppati metodi ELISA con anticorpi poli e monoclonali che, pur essendo caratterizzati da una più elevata specificità, comunque valutano gli AGE *in toto* (6). Data la complessità della reazione e l'elevato numero di prodotti che da essa si formano, l'identificazione strutturale di specifici AGE potrebbe portare un contributo notevole alla definizione dei meccanismi di danno degli stessi. Uno dei primi AGE identificato è stato l'FFI, proposto quale "cross-link" poiché originato dalla condensazione di 2 molecole di glucosio con 2 gruppi aminici liberi di 2 catene proteiche. Sfortunatamente tale composto è stato dimostrato essere un artefatto, originato dalle procedure di idrolisi acida impiegate per il suo dosaggio con metodica RIA (7).

Altri AGE strutturalmente caratterizzati sono la carbossimetillisina e la pentosidina: essi sono più propriamente prodotti di glico-ossidazione poiché per la loro formazione sono necessarie condizioni pro-ossidanti. In particolare la pentosidina è un prodotto di glico-ossidazione che deriva dalla reazione tra lisina, arginina e glucosio con formazione di un anello imidazopiridinico che funge da "cross-link" tra due strutture proteiche (8). I livelli di pentosidina sono risultati correlati all'età sia nei soggetti normali che nei diabetici; in questi ultimi infine i livelli di pentosidina sono risultati più elevati nei pazienti con complicanze micro e macroangiopatiche

(8). In questo contesto, la spettrometria di massa, tecnica con elevata sensibilità e specificità, è stata recentemente utilizzata sia per la caratterizzazione dei prodotti di glico-ossidazione (9), sia per lo studio della cinetica della glicazione non enzimatica nella malattia diabetica (10, 11).

Meccanismi di danno dei prodotti di glico-ossidazione

I principali meccanismi di danno degli AGE sono: la formazione di cross-links abnormi, il legame con specifici recettori, l'accumulo intracellulare.

Uno dei meccanismi più importanti di danno tissutale mediato dagli AGE è la loro capacità di formare ponti intermolecolari abnormi (cross-links) a carico delle proteine, ed in tal senso il collagene è stata la proteina più studiata (1, 2). La formazione di questi legami è ritenuta essere la causa delle alterate proprietà meccaniche (diminuita elasticità e solubilità) riscontrate nel collagene dei soggetti diabetici e dell'irrigidimento delle pareti arteriose, tutte alterazioni tipiche dell'aterosclerosi. La glico-ossidazione del collagene inoltre può determinare una inibizione del fattore di derivazione endoteliale ossido nitrico (NO): ridotti livelli di NO possono causare vasocostrizione, riduzione del flusso ematico con conseguente ischemia tissutale.

Studi recenti hanno evidenziato come diverse cellule siano in grado di legare gli AGE con una cinetica di tipo saturativo (12-14). Uno dei primi recettori evidenziati essere in grado di legare le proteine modificate dagli AGE è il recettore "scavenger" espresso a livello dei monociti/macrofagi e dei linfociti T. Il recettore scavenger ha la funzione di degradare le molecole senescenti; nel diabete vi è una alterata regolazione di tale recettore per cui il legame

tra esso ed i prodotti glico-ossidati innesca una serie di reazioni in grado di determinare una serie di danni tissutali caratteristici delle complicanze croniche del diabete.

Più recentemente è stato isolato il recettore RAGE, una proteina di 35 kDa che fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline ed è codificato da un gene presente sul cromosoma 6 nella regione del MHC-III; questo recettore è stato identificato a livello dei monociti/macrofagi, dei linfociti, delle cellule muscolari lisce, dei fibroblasti, delle cellule mesangiali, delle cellule endoteliali, dei neuroni.

Il legame degli AGE ai recettori dei linfociti T stimola la produzione di γ -interferone che determina a sua volta danno tissutale; quello degli AGE ai recettori dei monociti/macrofagi determina la produzione di citochine tra cui l'interleuchina 1 β (IL 1 β), ed il fattore di necrosi tumorale (TNF α).

In condizioni fisiologiche le citochine regolano l'omeostasi tissutale da una parte inducendo le cellule mesenchimali a produrre idrolisi che degradano le proteine tissutali, dall'altra stimolando la proliferazione delle cellule endoteliali e della matrice extracellulare.

Nel diabete il legame AGE-recettore determina una riduzione del processo di degradazione delle proteine tissutali ed un aumento della produzione di fattori di crescita con conseguente aumento della sintesi di matrice extracellulare.

Parimenti il legame delle proteine modificate dagli AGE ai RAGE dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce stimola la produzione di fattori di crescita cui segue proliferazione cellulare. Infine, studi recenti hanno messo in evidenza che il recettore RAGE delle cellule endoteliali è espresso a livelli molto bassi nei vasi di soggetti sani ma ha una elevata espressione in caso di vasculopatia aterosclerotica.

L'interazione tra AGE e cellule endoteliali determina, con un meccanismo di stress ossidativo, l'induzione del fattore di trascrizione NF-kB, con conseguente aumento dell'espressione a livello superficiale della molecola di adesione VCAM1 (molecola di adesione cellulare vascolare) ed aumentata adesività dei monociti all'endotelio.

Altre alterazioni conseguenti all'interazione AGE e cellule endoteliali sono la riduzione della espressione della trombomodulina, l'aumento del fattore tissutale procoagulante, l'aumento della permeabilità cellulare con conseguente aumentato passaggio transendoteliale di proteine e peptidi modificati dagli AGE che a livello subendoteliale formano cross-links con la matrice extracellulare, l'aumento dell'induzione dell'mRNA e della trascrizione genica con conseguente aumento della produzione di fibronectina e collagene IV (12).

Il terzo meccanismo di danno degli AGE è rappresentato dal loro accumulo intracellulare, accumulo documentato nei macrofagi, in cellule muscolari lisce modificate (foam cells), nella stria lipidica e nella placca aterosclerotica.

I meccanismi coinvolti sono essenzialmente due: la formazione intracellulare rapida di AGE indotta dall'iperglicemia che può determinare alterazioni sia a carico delle strutture citoplasmatiche che nucleari e l'endocitosi degli AGE mediata dai recettori specifici (15, 16) (Tabella 1).

Tabella 1 - Meccanismi di danno dei prodotti di glico-ossidazione.

Meccanismo di danno degli AGE
• Formazione di legami cross-link • Legame a recettori specifici • Accumulo intracellulare

Prodotti di glico-ossidazione ed aterosclerosi

L'importanza della glico-ossidazione delle lipoproteine e del collagene nel determinismo della macroangiopatia diabetica è evidenziata da numerosi studi.

Le lipoproteine LDL modificate dall'ossidazione o dalla glicazione provocano la risposta infiammatoria della parete arteriosa (17).

In pazienti affetti da diabete tipo 1 in cattivo controllo metabolico è stata evidenziata un'aumentata glicazione delle lipoproteine, ed in particolare delle LDL (18). Risultati simili sono stati riportati anche in pazienti affetti da diabete tipo 2 (19).

Le LDL glicate non vengono riconosciute dal loro recettore ma da un recettore "scavenger" dei monociti/macrofagi; a tale riconoscimento segue la captazione da parte dei macrofagi e la formazione delle cellule schiumose, cellule ricche in colesterolo esterificato. La formazione della stria lipidica dovuta all'accumulo di queste cellule a livello subendoteliale della parete arteriosa è il primo "step" della formazione della placca ateromatosa (20, 21).

Altri meccanismi attraverso i quali la glicazione delle lipoproteine può contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi, sono lo stimolo al rilascio di β_2 trombassano ed all'aggregazione piastrinica, tutti fattori promoventi la trombosi; la modificazione della struttura delle lipoproteine è tale da renderle immunogene, si determina perciò la formazione di anticorpi e di immunocomplessi che si depositano a livello della parete vasale (22).

Le LDL glicate vengono poi captate più rapidamente nella parete vasale ed intrappolate dal collagene glicato; esse inoltre sono in grado di generare radicali liberi con conseguente danno ossidativo (23). L'attivazione dei linfociti/macrofagi da

Tabella 2 - Prodotti di glico-ossidazione ed aterosclerosi.

Effetti degli AGE, non mediati da recettore, sull'aterogenesi

- Matrice extracellulare
 - Legami cross-link del collagene ed elevata resistenza alle collagenasi.
 - Aumento della produzione di componenti della matrice extracellulare.
 - Diminuito auto-assemblaggio dei polimeri di laminina e alterazione del legame con il collagene tipo IV e proteoglicani eparan-solfato.
 - Inibizione del NO da parte degli AGE legati al collagene.
 - Sequestro delle LDL e IgG nel sub-endotelio.
- Alterazioni delle lipoproteine
 - Diminuito riconoscimento delle AGE-LDL da parte del recettore cellulare per le LDL.
 - Aumentata suscettibilità delle LDL ai processori ossidativi.

parte delle LDL glicate determina produzione di γ interferone, rilascio di citochine e di fattori di crescita che contribuiscono a determinare l'ispessimento della parete arteriosa. Recentemente alcuni autori hanno messo in evidenza, in pazienti con diabete di tipo 2 in mediocre controllo metabolico, la presenza di AGE sia livello della parte proteica (Apo B) che della parte lipidica (amine dei fosfolipidi) delle lipoproteine.

L'incubazione di LDL con glucosio determina parallelamente formazione di AGE e modificazioni ossidative a carico delle stesse: la glicazione avanzata dei lipidi può assumere quindi un ruolo importante nell'iniziare *in vivo* l'ossidazione degli acidi grassi (18) (Tabella 2).

Oltre allo stress ossidativo, anche l'assenza di un'appropriata risposta compensatoria antiossidante è implicata nella disfunzione endoteliale sistemica, di cui la microalbuminuria è considerata essere un marker (24-26). In questo contesto, il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato che la microalbuminuria nei pazienti diabetici

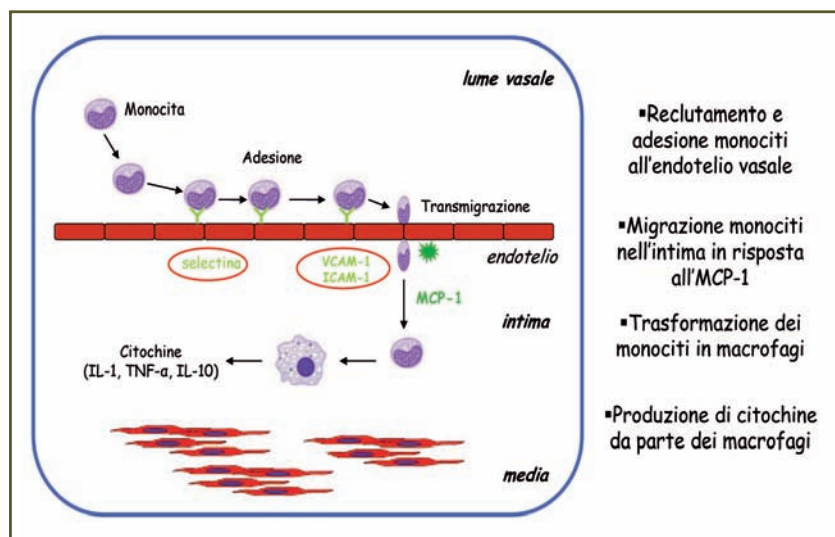


Figura 2 - Ruolo dei monociti nell'aterosclerosi.

tipo 2 può essere promossa da un'insufficienza del sistema antiossidante (27).

L'aterosclerosi, da anni considerata come una patologia da accumulo di colesterolo, oggi è sempre più vista anche come una malattia infiammatoria (28).

I monociti-macrofagi sono coinvolti anche nel determinismo delle complicanze macrovascolari del diabete, infatti l'infiltrazione dei macrofagi, quantificata su campioni istologici umani ottenuti in corso di interventi di aterectomia, è maggiore nelle placche dei diabetici, rispetto ai pazienti non diabetici (29).

I monociti non solo sono determinanti nella fase iniziale di formazione della placca (attraverso i processi di migrazione, adesione, maturazione in macrofagi con endocitosi delle LDL ossidate e trasformazione in cellule schiumose), ma hanno anche un ruolo nell'evoluzione calcifica della placca. Infatti è stato dimostrato che i monociti *in vitro* aumentano la calcificazione vascolare tramite 2 meccanismi tra loro indipendenti, l'interazione cellula-cellula e la produzione di fattori solubili quali il $\text{TNF}\alpha$ (30) (Figura 2).

I recettori degli AGE (RAGE) sono pre-

senti sulla superficie delle cellule mononucleate. Gli AGE sono chemiotattici per i monociti umani, accumulandosi nella matrice sottoendoteliale del vaso determinano la migrazione selettiva dei monociti attraverso l'endotelio. L'interazione degli AGE con i RAGE, presenti sui monociti internalizzati nella placca, sarebbe in grado di determinare l'espressione di fattori di proliferazione quali il PDGF (31).

Il legame AGE-RAGE sulla superficie dei monociti induce inoltre *in vitro* una risposta infiammatoria, con aumentata produzione di citochine quali $\text{IL1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$ ed un'amplificazione dello stress ossidativo, con incremento della produzione di radicale superossido da parte delle cellule monocitarie umane (32).

Una proteina chiave nell'interazione tra sistema AGE/RAGE e monociti sarebbe la S100b. La proteina S100b fa parte della famiglia delle calgranuline ed è uno specifico ligando dei RAGE presenti sulla superficie dei monociti. Il legame tra S100b e RAGE monocitari è in grado di attivare lo stress ossidativo e un'aumentata espressione di citochine, molecole di adesione, fattori di crescita, aumentando la risposta infiamma-

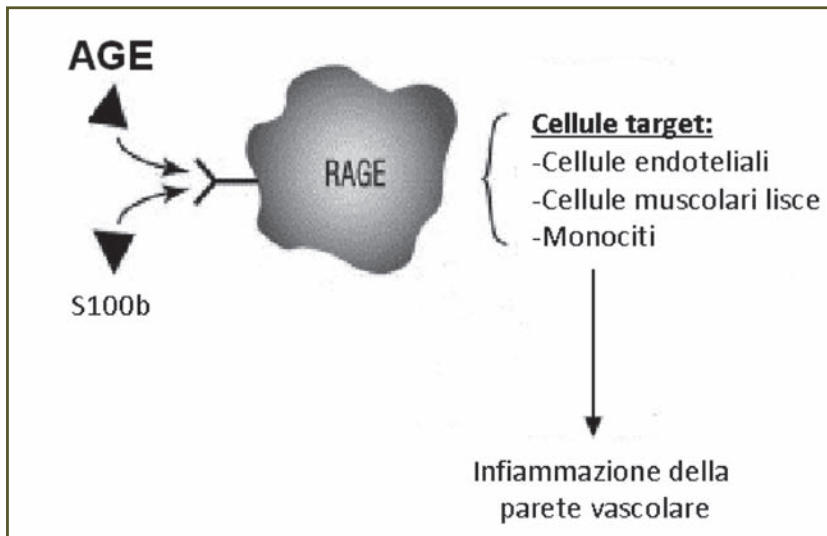


Figura 3 - Ligandi dei RAGE.

toria e la disfunzione vascolare associate alle complicanze del diabete (33). A conferma del ruolo cruciale svolto dalla S100b nell'attivazione monocitaria, è stato dimostrato che un inibitore degli AGE, chiamato LR 90, è in grado di inibire *in vitro* la risposta infiammatoria dei monociti umani, bloccando l'attivazione dell'NF-κB indotta dal legame tra RAGE ed S100b (34) (Figura 3).

Prodotti di glico-ossidazione: implicazioni cliniche

Da quanto su esposto emerge in modo chiaro il ruolo importante dell'accumulo dei prodotti di glico-ossidazione nel determinismo delle complicanze cardiovascolari della malattia diabetica.

Gli studi che hanno evidenziato l'aumento dei livelli di AGE nel plasma dei soggetti diabetici e la stretta correlazione positiva con la gravità dell'aterosclerosi coronarica (35), e l'accumulo di tali prodotti nelle placche aterosclerotiche dei pazienti affetti da diabete (36) hanno consolidato l'ipotesi che i prodotti di glico-

ossidazione possono costituire un marker importante di malattia aterosclerotica nel diabete (37-39).

Uno studio recente ha inoltre evidenziato come i livelli plasmatici di pentosidina siano significativamente più elevati in pazienti diabetici di tipo 2 affetti da arteriopatia periferica rispetto ai pazienti senza tale complicanza (40), suggerendo che la pentosidina possa essere un marker predittivo di arteriopatia periferica nel diabete tipo 2. In questo contesto è utile sottolineare che i livelli dei prodotti di glico-ossidazione non correlano necessariamente con i tradizionali parametri di controllo glicemico utilizzati nei pazienti diabetici, quali la glicemia plasmatica a digiuno e recenti livelli di HbA1c, mentre a lungo termine, uno scarso controllo glicemico è correlato con la produzione di AGE.

Anche un lungo periodo di buon controllo metabolico non è in grado di normalizzare i livelli di prodotti glico-ossidazione, come la pentosidina, dimostrando che l'iperglicemia provoca uno stress ossidativo persistente che è in grado "per sé" e indipendentemente dalle concentrazioni di glucosio di indurre e potenziare la for-

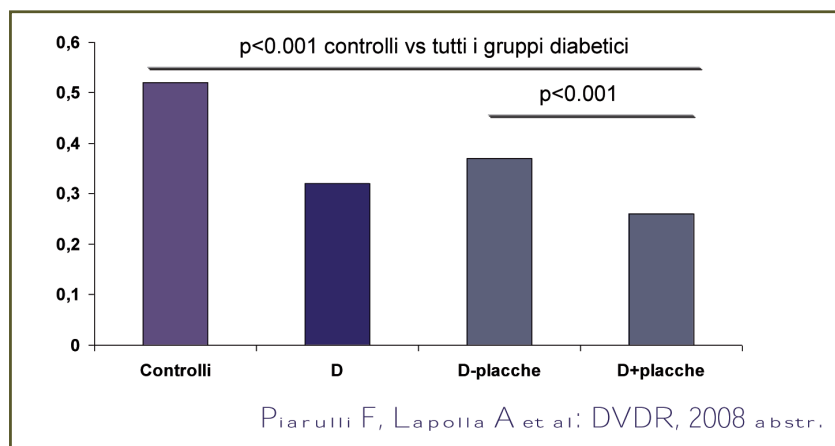


Figura 4 - esRAGE in pazienti diabetici (D) con (+) / senza (-) complicanze macrovascolari.

mazione di AGE nei pazienti diabetici (41).

AGE e pentosidina sono risultati indurre disfunzione diastolica subclinica nei pazienti diabetici tipo 2, con il contributo determinante del declino delle difese antiossidanti (42).

Anche i RAGE sono strettamente correlati all'infiammazione e allo stress ossidativo: infatti l'overespressione di questi recettori per gli AGE è risultata associata con un'importante reazione infiammatoria nella regione vulnerabile delle placche estratte in corso di endoarterectomia carotidea (43).

Le concentrazioni plasmatiche delle isoforme solubili dei RAGE, espresse come pool totale (sRAGE) e come isoforma endogena (esRAGE), tendono ad essere più basse nei pazienti diabetici e ad essere, in maniera non univoca, associate con le complicanze cardiovascolari del diabete.

In questo contesto noi abbiamo recentemente riscontrato più bassi livelli di esRAGE nei diabetici tipo 2 con placche aterosclerotiche nel distretto extracoronarico rispetto a quelli senza placche e solo in questi ultimi gli esRAGE correlavano con i parametri di glico-ossidazione, suggerendo che ci sono due fenotipi differenti di pazienti diabetici tipo 2 con diversa suscettibilità alla glico-ossidazione.

Nei pazienti senza complicanze macrovascolari, gli esRAGE sembrano avere un ruolo di protezione vascolare, neutralizzando gli effetti della glico-ossidazione (44) (*Figura 4*).

Conclusioni

Da quanto suddetto ben si comprende come la glico-ossidazione delle proteine giochi un ruolo importante nel determinismo dell'aterosclerosi nel diabete. Ma accanto all'enorme messe di evidenze sperimentali sull'argomento, va segnalata una certa carenza e contraddittorietà dei risultati degli studi clinici.

Lo sviluppo di metodologie analitiche accurate e sensibili per lo studio di cinetiche di glicazione e per il riconoscimento di specifici markers, accanto a studi prospettici su ampie popolazioni, porterà sicuramente a meglio definire l'importanza clinica di tale processo.

GLOSSARIO

AGE: prodotti di glicazione avanzata

RAGE: recettori dei prodotti di glicazione avanzata (AGE)

NF-κB: nuclear factor kappa B

NO: ossido nitrico

PDGF: platelet-derived growth factor

Bibliografia

1. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Non enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Int. Med* 1984; 101: 527.
2. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315-1321.
3. Lapolla A, Tessari P, Poli T et al. Reduced *in vivo* biological activity of *in vitro* glycosylated insulin. *Diabetes* 1988; 37: 787.
4. Thornalley PJ. Advanced glycation and the development of diabetic complications. Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. *Endocrinol Metab* 1996; 3: 149-166.
5. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
6. Lapolla A, Fedele D, Traldi P. Diabetes and mass spectrometry. 2001; 17: 99-112.
7. Lapolla A, Gerhardinger C, Pelli B et al. Absence of brown product FFI in non diabetic and diabetic rat collagen. *Diabetes* 1990; 30: 45.
8. Sell DR, Lapolla A, Odetti P et al. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992; 40: 1288.
9. Lapolla A, Baldo L, Aronica R et al. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric studies on protein glycation 2. The reaction of ribonuclease with hexoses. *Biol. Mass Spectrom* 1994; 23: 241.
10. Lapolla A, Porcu S, Traldi P. Some views on proteomics in diabetes. 2011; 49: 943-957.
11. Lapolla A, Fedele D, Seraglia R, Traldi P. The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25: 775-797.
12. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur. J. Clin. Invest* 1997; 27: 97.
13. Schmidt AM, Hofmann M, Taguchi A et al. RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 485-493.
14. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 2008; 196: 9-21.
15. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Non-enzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: a model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94: 110-117.
16. Schmidt AM, Hori O, Chen JX et al. Advanced glycation end-products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995; 96: 1395-1403.
17. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.
18. Klein RL, Laimins M, Lopes-Virella MF. Isolation, characterization and metabolism of the glycated and non glycated subfraction of low-density lipoproteins isolated from type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1995; 44: 1093.
19. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96: 1432-1437.
20. Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S et al. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 150: 343-355.
21. Sakata N, Uesugi N, Takebayashi S et al. Glycooxidation and lipid peroxidation of low density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. *Cardiovasc. Res* 2001; 49: 466-475.
22. Piarulli F, Lapolla A, Sartore G et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 653-657.
23. Moro E, Alessandrini P, Zambon C. Is glycation of LDL in patients with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med* 1999; 16: 663-669.
24. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky

- GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 599-622.
25. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997; 271: 484-490.
 26. Stehouwer CDA. von Willebrand factor, dysfunction of the vascular endothelium, and the development of renal and vascular complications in diabetes. In "The kidney and hypertension in diabetes mellitus", Mogensen CE (ed), Kluwer, Boston 1997; 155-163.
 27. Piarulli F, Sartore G, Ceriello A et al. Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2009; 52: 1419-1425.
 28. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138: S419-420.
 29. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 2003; 52: 1256-1264.
 30. Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508.
 31. Kirstein M, Brett J, Radoff S et al. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 9010-9014.
 32. Ding Y, Kantarci A, Hasturk H et al. Activation of RAGE induces elevated O₂⁻ generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 520-527.
 33. Hofmann MA, Drury S, Fu C et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; 97: 889-901.
 34. Figarola JL, Shanmugam N, Natarajan R, Rahbar S. Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. *Diabetes* 2007; 56: 647-655.
 35. Kiuchi K, Nejima J, Takano T et al. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. *Heart* 2001; 85: 87-91.
 36. Nakamura Y, Horii Y, Nishino T et al. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation endproducts (AGEs) in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993; 143: 1649-1656.
 37. Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. Role of N ϵ -(carboxymethyl)lysine in the development of ischemic heart disease in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr* 2007; 41: 97-105.
 38. Gul A, Rathman MA, Salim A, Simjee SU. Advanced glycation end-products in senile diabetic and non-diabetic patients with cardiovascular complications. *AGE* 2008; 30: 303-309.
 39. Semba RD, Bandinelli S, Sun K et al. Plasma Carboxymethyl-Lysine, an Advanced Glycation End Product, and All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Older Community-Dwelling Adults. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57: 1874-1880.
 40. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G et al. Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care* 2007; 30: 670-676.
 41. Lapolla A, Reitano R, Seraglia R et al. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 685-690.
 42. Sartore G, Piarulli F, Ragazzi E et al. Subclinical diastolic dysfunction in type 2 diabetic patients with and without carotid atherosclerosis: Relationship with glyco-oxidation, lipid-oxidation and antioxidant status. *Int J Cardiol* 2011, available online 21 June 2011.
 43. Cipollone F, Iezzi A, Fazio M et al. The Receptor RAGE as a Progression Factor Amplifying Arachidonate-Dependent Inflammatory and Proteolytic Response in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 2003; 108: 1070-1077.
 44. Piarulli F, Ragazzi E, Sartore G et al. Role of Endogenous Secretory RAGE (esRAGE) in Micro- and Macro-vascular Complications in a Group of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2008; 5: 367-368 (Abstract).