

il Diabete

Organo ufficiale della
Società Italiana di Diabetologia

Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

Co-direttori

Luca D'Onofrio (Roma, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Comitato di Redazione

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

CONSIGLIO DIRETTIVO SID

Presidente

Angelo Avogaro (Padova)

Presidente Eletto

Raffaella Buzzetti (Roma)

Tesoriere

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Segretario

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

Consiglieri

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

Sommario

– **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO

151 **Farmaci innovativi per ridurre il colesterolo LDL: una nuova era nel campo delle dislipidemie**
Giuseppe Della Pepa

168 **Alla scoperta del “Nuovo Mondo”: le insuline basali settimanali**
Paolo Di Bartolo

181 – **EDITORIALI** A CURA DI SEBASTIANO SQUATRITO

Sempre più in basso: l’evoluzione nel tempo dei target per il colesterolo LDL nel diabete
Edoardo Mannucci

187 – **AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ** A CURA DI LUCIA FRITTITTA

L’Associazione Europea per lo Studio dell’Obesità (EASO) propone un nuovo schema per la diagnosi, la stadiazione ed il trattamento dell’obesità nell’adulto
Luca Busetto, Paolo Sbraccia

197 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

Importanza dell’aderenza terapeutica nel raggiungimento del target di LDL-C: dati dal registro JET-LDL

199 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

203 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**

A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D’ONOFRIO PER IL GRUPPO YoSID

Una finestra aperta sulla disfunzione endoteliale: il modello HUVEC

Federica Carrieri, Caterina Pipino, Nadia Di Pietrantonio, Giorgia Centorame, Maria Pompea Antonia Baldassarre

215 – **AGGIORNAMENTO CLINICO** A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D’ONOFRIO PER IL GRUPPO YoSID

Un insolito tipo di diabete “non 1” e “non 2”

Ilaria Milani, Marianna Chinucci, Frida Leonetti, Danila Capoccia

il Diabete

Vol. 36, N. 3, ottobre 2024

Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

Direttore Responsabile

Mattia Righi

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2024 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-533-2

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2403

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

Fondazione Bologna University Press

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882

e-mail: info@buponline.com

www.buponline.com

Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

Avvertenza ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

a cura di Carla Greco¹ e Luca D'Onofrio² per il gruppo YoSID

¹Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia; ²Unità di Diabetologia, AOU Policlinico Umberto I di Roma e Sapienza Università di Roma

Una finestra aperta sulla disfunzione endoteliale: il modello HUVEC. ♦ An open window into endothelial dysfunction: the HUVEC model

Federica Carrieri^{1,2}, Caterina Pipino^{2,3}, Nadia Di Pietrantonio^{2,3}, Giorgia Centorame^{1,2}, Maria Pompea Antonia Baldassarre^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara; ²Center for Advanced Studies and Technology (CAST), Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara; ³Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia24o3f>

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a prevalent chronic disease globally, with complications such as retinopathy, nephropathy, neuropathy, and cardiovascular disease being major causes of morbidity and mortality. Endothelial dysfunction is a central factor in these complications. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) serve as a valuable in vitro model within translational research, enabling detailed investigation of endothelial dysfunction and evaluation of therapeutic interventions. HUVEC-based studies bridge basic science and clinical applications, offering a reproducible and accessible model that closely mimics human vascular biology, making them instrumental in developing targeted therapies for cardiovascular complications in diabetes.

KEYWORDS

HUVEC, endothelial dysfunction, diabetes mellitus, gestational diabetes, translational research.

DISFUNZIONE ENDOTELIALE NEL DIABETE MELLITO: IL PRIMUM MOVENS DELLE COMPLICANZE VASCOLARI

Il diabete mellito di tipo 2 (DMT2) rappresenta una delle patologie croniche più diffuse a livello globale. Le sue complicanze, tra cui la retinopatia, la nefropatia, la neuropatia e la malattia cardiovascolare, rappresentano le principali cause di morbilità e mortalità tra le persone con diabete (1).

Alla base di queste complicanze vi è un comune denominatore fisiopatologico: la disfunzione endoteliale, una condizione in cui le cellule endoteliali che rivestono la superficie interna dei vasi sanguigni non funzionano correttamente (2). Le cellule endoteliali svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, regolando il tono vascolare, la permeabilità, la coagulazione e l'infiammazione (3). Quando queste funzioni sono compromesse, si verifica un'aumentata adesione di cellule infiammatorie all'endotelio, insieme alla proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari e alla formazione di placche aterosclerotiche. Questi processi costituiscono il substrato di eventi cardiovascolari come l'infarto del miocardio, l'ictus cerebrale e la vasculopatia cerebrale e periferica (4).

Nel diabete, diversi fattori contribuiscono alla disfunzione endoteliale, tra cui lo stress ossidativo, l'infiammazione cronica, la resistenza all'insulina, le alterazioni del metabolismo dei lipidi e la disregolazione del sistema dell'ossido nitrico

(5-6). In aggiunta, recenti studi suggeriscono che anche meccanismi epigenetici, come la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni, possano svolgere un ruolo chiave nella patogenesi della disfunzione endoteliale nel diabete (7). Lo studio dell'endotelio e della disfunzione endoteliale è diventato un tema centrale nella ricerca dedicata alla malattia cardiovascolare (6). Infatti, indagare a fondo la disfunzione endoteliale non solo potrebbe contribuire a prevenire la progressione della malattia diabetica e delle sue complicanze vascolari, ma accelererebbe anche lo sviluppo di terapie più efficaci per la gestione delle complicanze cardiovascolari.

Per comprendere i meccanismi molecolari sottostanti la disfunzione endoteliale nel diabete e testare l'efficacia di potenziali approcci terapeutici, è fondamentale disporre di un modello in vitro affidabile dal punto di vista clinico. In questo contesto, le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) rappresentano un modello promettente per lo studio della disfunzione endoteliale nel diabete (8-9).

Le HUVEC sono cellule endoteliali primarie isolate dal cordone ombelicale umano, un annesso fetale che si sviluppa durante la quinta settimana di gestazione e che fisiologicamente contiene al suo interno due arterie e una vena ombelicale circondate da tessuto stromale privo di capillari e vasi linfatici (10-11).

Sebbene le cellule endoteliali umane ad uso sperimentale possano avere diverse origini (ad esempio: Human Aortic Endothelial Cells - HAEC, Cardiac microvascular endothelial cells - CMECs), le HUVEC sono un eccellente modello per lo studio delle proprietà dell'endotelio vascolare e dei principali pathway coinvolti nella funzione endoteliale (12). Infatti, le HUVEC sono ampiamente utilizzate nella ricerca cardiovascolare poiché riproducono fedelmente le risposte delle cellule endoteliali in vivo a vari stimoli, come lo stress ossidativo, l'infiammazione e le alterazioni metaboliche (11-12). Inoltre, questo modello in vitro offre numerosi vantaggi rispetto agli studi clinici in vivo o agli esperimenti su animali. In primo luogo, permette di studiare direttamente le cellule endoteliali umane, evitando potenziali differenze di specie. Inoltre, consente di controllare rigorosamente le condizioni sperimentali e di manipolare specifici fattori di rischio o vie metaboliche, facilitando l'identificazione dei meccanismi causali (13).

L'importanza scientifica dell'utilizzo di questo modello risiede, quindi, nell'esigenza di comprendere i meccanismi molecolari sottostanti la disfunzione endoteliale nel diabete e identificare biomarcatori predittivi e potenziali approcci nutrizionali e terapeutici. Il modello HUVEC è stato infatti ampiamente utilizzato per studiare questi meccanismi e valutare l'efficacia di potenziali interventi terapeutici, inclusi i nutraceutici. I nutraceutici sono composti bioattivi derivati da fonti naturali, come piante, alghe e microrganismi, che possiedono proprietà benefiche per la salute e possono essere impiegati come integratori alimentari o come componenti di alimenti funzionali (14).

Numerosi studi hanno evidenziato che alcuni nutraceutici come i polifenoli, i carotenoidi, i fitosteroli e gli acidi grassi omega-3, possono esercitare effetti protettivi sull'endotelio vascolare, contrastando lo stress ossidativo, l'infiammazione e le alterazioni metaboliche associate alla disfunzione endoteliale (15). In questo contesto, le HUVEC rappresentano un modello cellulare ideale per valutare gli effetti di tali composti a livello molecolare e funzionale.

Ad esempio, diversi polifenoli, come il resveratrolo, la quercetina e l'epigallocatechina gallato (EGCG), hanno dimostrato di migliorare la funzione endoteliale nelle HUVEC attraverso molteplici meccanismi; in particolare, aumentano la biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO), un potente vasodilatatore prodotto dalle cellule endoteliali, stimolando l'attività dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) e riducendo lo stress ossidativo (16). Inoltre, modulano l'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione, nell'adesione cellulare e nell'angiogenesi, contribuendo a migliorare la funzione endoteliale (17-18).

Gli studi sulle HUVEC hanno anche evidenziato il potenziale dei carotenoidi, come il licopene e la luteina, nel contrastare la disfunzione endoteliale riducendo lo stress ossidativo e l'espressione di molecole di adesione e citochine pro-infiammatorie (19). Inoltre, i carotenoidi sono stati identificati come potenziali modulatori delle vie di segnale coinvolte nella regolazione della proliferazione, migrazione e angiogenesi delle cellule endoteliali (20-21).

Anche gli acidi grassi omega-3, come l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), hanno dimostrato effetti benefici sulle HUVEC: migliorano la funzione endoteliale attraverso diversi meccanismi, tra cui la riduzione dell'infiammazione, l'aumento della biodisponibilità dell'NO e la modulazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico (22-23).

Un altro gruppo di nutraceutici che ha suscitato interesse nello studio della disfunzione endoteliale sono i fitosteroli. I fitosteroli, strutturalmente simili al colesterolo, sembrano ridurre l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale e migliorare il profilo lipidico. Studi sulle HUVEC hanno dimostrato che i fitosteroli esercitano anche effetti diretti sulle cellule endoteliali, riducendo l'infiammazione, lo stress ossidativo e l'adesione delle cellule infiammatorie (24-26).

Inoltre, le HUVEC sono state utilizzate per valutare gli effetti di nutraceutici derivati da fonti meno convenzionali, come alghe e microrganismi. Ad esempio, le fucoxantine, carotenoidi presenti nelle alghe brune, hanno dimostrato di migliorare la funzione endoteliale riducendo lo stress ossidativo e l'infiammazione (27-28).

Uno dei vantaggi dell'utilizzo delle HUVEC nello studio dei nutraceutici è la possibilità di valutarne l'effetto su specifici processi cellulari e molecolari coinvolti nella disfunzione endoteliale. Ad esempio, attraverso esperimenti con HUVEC, è possibile analizzare l'espressione genica e l'attività di enzimi chiave, come eNOS e la NADPH ossidasi, coinvolti nella produzione di NO e specie reattive dell'ossigeno (ROS) (29). Inoltre, le HUVEC consentono di valutare l'effetto dei nutraceutici sulla proliferazione, migrazione, adesione e formazione di strutture simil-vascolari, processi cruciali nella regolazione della funzione endoteliale e dell'angiogenesi (11, 30).

Oltre ad essere utilizzate per lo studio degli effetti dei nutraceutici sull'endotelio vascolare, le HUVEC sono un modello sperimentale ideale per indagare i meccanismi fisiopatologici alla base degli effetti cardioprotettivi delle nuove terapie farmacologiche utilizzate nella cura del DMT2. La pubblicazione dell'EMPA-REG OUTCOME (31) nel 2015 è stata la prima pubblicazione a fornire evidenze scientifiche a favore dell'utilizzo di nuove molecole, come gli inibitori del cotrasportatore sodio-glicolico di tipo 2 (SGLT2i) e gli agonisti del recettore del glucagon-like peptide-1 (GLP1-RAs), nel ridurre il rischio di eventi cardiovascolari maggiori nei pazienti con DMT2. Tali evidenze sono talmente rilevanti nella gestione della persona con diabete, che le attuali linee guida SID-AMD raccomandano l'utilizzo di queste terapie come trattamento di prima linea per pazienti con eventi cardiovascolari pregressi (32) o elevato rischio cardiovascolare (Consensus ADA-EASD 2022) (33).

Gli outcome benefici cardioprotettivi degli SGLT2i e dei GLP1-RAs potrebbero essere spiegati non solo dal miglioramento del compenso glicemico, ma anche dall'effetto diretto che queste molecole hanno sull'endotelio (11). Studi in vitro effettuati su HUVEC ottenute da donne sane e esposte a diversi stimoli pro-infiammatori e/o pro-ossidanti suggeriscono che gli SGLT2i condividono un effetto di classe nel ridurre i ROS, nell'aumentare la biodisponibilità di NO e nel ripristinare la disfunzione endoteliale attenuando l'infiammazione (34). In particolare, empagliflozin ha dimostrato di ridurre la produzione di ROS sopprimendo l'attività di NHE nelle cellule endoteliali umane attivate dal fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) (35); studi condotti su dapagliflozin ne hanno evidenziato le proprietà antiossidanti sia in HUVEC non pre-trattate (36) che esposte a H₂O₂ (37): dapagliflozin ha ripristinato la fosforilazione della serina di eNOS e l'espressione della sirtuina 1 (SIRT1), portando a una riduzione dei marcatori associati alla senescenza endoteliale, come la β -galattosidasi (SA- β -gal), p21 e p53 (37). Il modello HUVEC è stato, inoltre, utile a studiare gli effetti antinfiammatori degli SGLT2i in colture cellulari pretrattate con LPS o TNF- α . Uno dei primi studi in vitro condotto da Gaspari et al (38), ha dimostrato che il trattamento con basse dosi di dapagliflozin (1,0-5,0 nM) ha attenuato l'espressione di molecole di adesione quali ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1) in HUVEC esposte a iperglicemia o TNF- α per 24 ore. Abdollahi et al, invece, hanno riscontrato con la stessa molecola una ridotta secrezione di IL-6 e IL-8 in HUVEC trattate con LPS (20 ng/mL per 24 ore) mediata dalla soppressione di NF- κ B e del recettore toll-like 4 (39).

Studi simili sono stati condotti anche utilizzando i GLP1-RAs. È stato osservato che le HUVEC esposte in vitro ad iperglicemia e pretrattate con liraglutide mostrano un minor tasso di apoptosi, minore produzione di ROS e disfunzione mitocondriale (40-42).

In conclusione, le HUVEC rappresentano un modello ex vivo prezioso per lo studio della disfunzione endoteliale e per la valutazione dell'efficacia di nutraceutici e farmaci nel migliorare la funzione endoteliale. Tuttavia, è fondamentale integrare questi risultati con approcci in vitro più complessi (come le colture tridimensionali o le co-culture di cellule endoteliali con altri tipi cellulari) e studi clinici effettuati in vivo, per ottenere una completa comprensione dei meccanismi coinvolti e garantire la rilevanza traslazionale dei risultati ottenuti. Inoltre, nonostante i numerosi vantaggi dell'utilizzo delle HUVEC, esse rappresentano un sistema semplificato rispetto alla complessità dell'endotelio

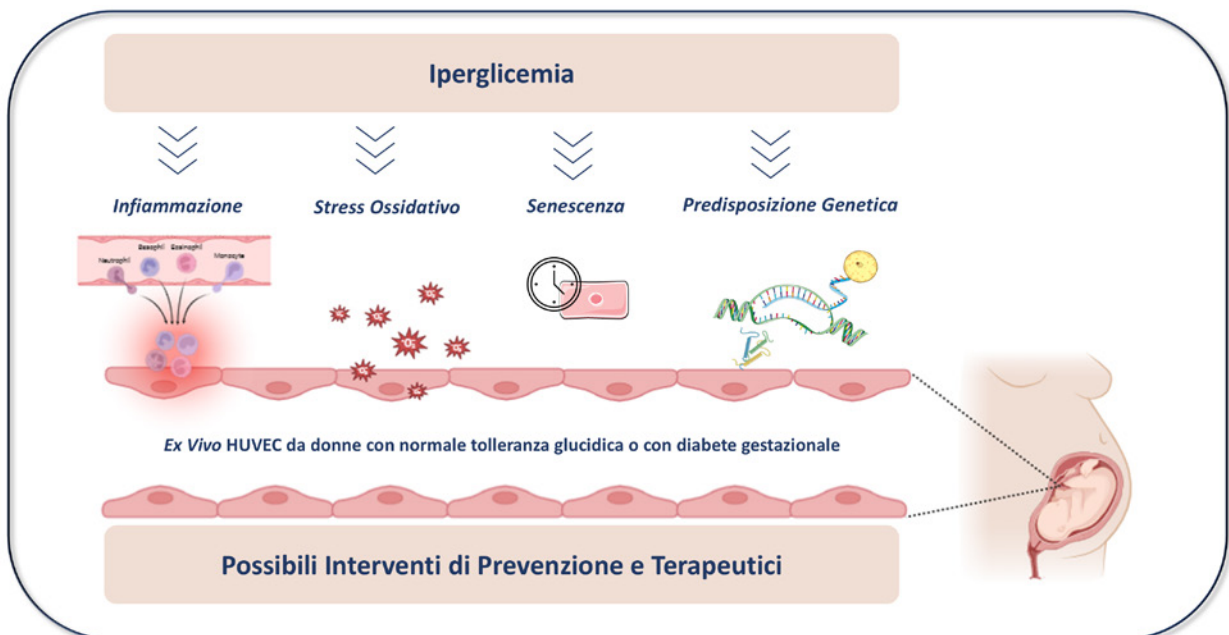
vascolare in vivo, dove le cellule endoteliali interagiscono con diversi tipi cellulari e sono esposte a molteplici stimoli metabolici e meccanici.

Oltre a ciò, nella maggior parte degli studi, le HUVEC derivano da cordoni ombelicali di donne sane; quindi, potrebbero non riflettere pienamente le caratteristiche delle cellule endoteliali di individui con patologie come il diabete o l'aterosclerosi. In questo contesto, confrontare le caratteristiche in vitro delle HUVEC ottenute da donne affette da diabete gestazionale (GD-HUVEC) e di controllo (C-HUVEC) rappresenta una strategia promettente per individuare manifestazioni fenotipiche diverse espresse nelle due linee cellulari (9). Identificate le differenze, è possibile procedere quindi ad indagare ipotesi patogenetiche alla base della disfunzione endoteliale, studiando possibili interventi nutrizionali e/o terapeutici atti a prevenire e trattare la malattia diabetica e le sue complicanze (19, 43).

HUVEC DERIVANTI DA DONNE CON DIABETE GESTAZIONALE: UN MODELLO SPERIMENTALE PROMETTENTE

Un innovativo modello sperimentale sta emergendo come strumento prezioso per comprendere meglio l'impatto del diabete gestazionale sulla salute vascolare (Fig. 1). Questo approccio si basa sul confronto diretto tra GD-HUVEC e quelle ottenute da donne con normale tolleranza glucidica (C-HUVEC). A differenza degli studi tradizionali che utilizzano principalmente HUVEC da cordoni ombelicali di donne sane, questo modello offre una rappresentazione più accurata delle alterazioni cellulari associate alla patologia. Confrontando GD-HUVEC e C-HUVEC, i ricercatori possono esaminare in dettaglio come l'esposizione temporanea all'iperglicemia cronica durante la gravidanza influenzi vari aspetti della funzione endoteliale, tra cui la risposta all'ipossia, l'infiammazione, lo stress ossidativo, la sensibilità all'insulina, la reazione alle infezioni e l'angiogenesi. Questo approccio comparativo promette di rivelare preziose informazioni sulle caratteristiche patologiche specifiche delle cellule endoteliali esposte a condizioni legate all'iperglicemia, aprendo nuove strade per la comprensione e il potenziale trattamento della disfunzione endoteliale.

Figura 1 ♦ Rappresentazione schematica dell'utilizzo delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) isolate da donne con normale tolleranza glucidica (C-HUVEC) e da donne con diabete gestazionale (GD-HUVEC) come modello *ex vivo* per lo studio della disfunzione endoteliale. La figura illustra i principali processi patologici osservati nelle GD-HUVEC, tra cui infiammazione, stress ossidativo, senescenza e predisposizione genetica. Il modello cellulare fornisce una base per lo sviluppo di interventi mirati alla prevenzione e al trattamento delle malattie cardiovascolari associate al diabete



Infiammazione

Studi hanno dimostrato che le GD-HUVEC sviluppano un fenotipo pro-infiammatorio e pro-ossidante che persiste anche quando coltivate in condizioni di glucosio normali (9, 19, 44). Questo le rende particolarmente adatte per lo studio della regolazione della subunità p65 del fattore di trascrizione nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), un attivatore chiave della pathway infiammatoria (7). NF-κB p65 è noto per l'attivazione di geni codificanti per molecole di adesione vascolare, come ICAM-1 e VCAM-1, che appartengono alla famiglia delle immunoglobuline e giocano un ruolo cruciale nell'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali durante gli stati infiammatori acuti (7). Nelle GD-HUVEC si osserva una maggiore traslocazione nucleare di NF-κB p65, che a sua volta porta ad un aumento dell'espressione delle molecole di adesione (19, 42). Un saggio funzionale ha inoltre mostrato un aumento dell'adesione dei monociti alle cellule endoteliali esposte a condizioni di diabete gestazionale, suggerendo un meccanismo predisponente alla disfunzione endoteliale e alla formazione di placche aterosclerotiche (19, 42).

Stress ossidativo

L'infiammazione è strettamente interconnessa con lo stress ossidativo, soprattutto in condizioni di iperglicemia cronica, che porta a un aumento dei ROS. I ROS interagiscono con il monossido di azoto (NO), formando perossinitrito, una molecola dannosa che può ossidare l'enzima Ossido Nitrico Sintasi (NOS) e il cofattore tetraidrobiopterina (BH₄), compromettendo la produzione di NO a favore dell'anione superossido. Studi in vitro su GD-HUVEC hanno mostrato livelli elevati di nitrotirosina, un indicatore di perossinitrito e danno ossidativo, associati a una ridotta biodisponibilità di NO, correlata a una compromissione della vasodilatazione endoteliale nei soggetti con diabete. Inoltre, si riscontra una ridotta attività degli enzimi antiossidanti, come catalasi e superossido dismutasi, e una diminuzione della localizzazione nucleare di Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), un fattore trascrizionale cruciale per la difesa antiossidante (45).

Memoria glicemica

È stato dimostrato che l'esposizione a elevati livelli di glucosio provoca un aumento persistente dei marcatori di stress ossidativo e infiammazione nelle HUVEC, anche dopo la normalizzazione della glicemia. Questo fenomeno, noto come "memoria iperglicemica endoteliale", suggerisce che le cellule conservano un ricordo dell'esposizione a condizioni iperglicemiche, il che potrebbe spiegare perché il controllo rigoroso della glicemia non riesce a prevenire completamente le complicanze del diabete. In questo contesto, le GD-HUVEC rappresentano un modello efficace per lo studio della memoria iperglicemica endoteliale e delle sue implicazioni nella senescenza precoce dell'endotelio e nelle complicanze cardiovascolari associate al diabete (45).

Senescenza

Il diabete accelera la senescenza vascolare, un processo associato a infiammazione cronica e stress ossidativo, che sono fattori chiave nella disfunzione endoteliale. Recentemente, è stato ipotizzato che l'acetiltransferasi p300 giochi un ruolo nella promozione di un fenotipo vascolare senescente precoce, contribuendo a infiammazione e stress ossidativo correlati al diabete (46).

Studi in vitro hanno confermato che le GD-HUVEC mostrano una difesa antiossidante compromessa e livelli elevati di ROS, associati a una diminuzione della localizzazione nucleare di Nrf2 e a una ridotta attività della deacetilasi SIRT1. Inoltre, le GD-HUVEC presentano un aumento dell'acetilazione della proteina p53 mediata da p300 rispetto ai controlli. L'inibizione di p300 ha ridotto sia i livelli di p300 e p53 acetilato indotti da alte concentrazioni di glucosio sia i loro livelli basali nelle cellule GD, suggerendo il coinvolgimento della via SIRT1/P300/P53 nel fenotipo senescente precoce di queste cellule (45).

Pathway insulinica

Tra i meccanismi che contribuiscono alle complicanze cardiovascolari nel diabete, un ruolo significativo è giocato dall'insulino-resistenza. In condizioni normali, l'insulina si lega ai recettori presenti sulle cellule, facilitando l'in-

gresso del glucosio all'interno delle cellule stesse, dove viene utilizzato come fonte di energia o immagazzinato sotto forma di glicogeno. Tuttavia, in caso di insulino-resistenza, le cellule diventano meno sensibili all'azione dell'insulina, riducendo l'assorbimento del glucosio e aumentando i livelli di glucosio nel sangue. Per compensare, il pancreas produce più insulina, portando a iperinsulinemia. L'aumento dei livelli di glucosio e insulina contribuisce a un'inflammatione cronica di basso grado che può danneggiare i vasi sanguigni e accelerare il processo di aterosclerosi.

L'insulino-resistenza può compromettere la funzione delle cellule endoteliali, che rivestono l'interno dei vasi sanguigni. Questo deterioramento riduce la capacità dei vasi di dilatarsi e contrarsi in risposta alle esigenze del corpo, aumentando così il rischio di ipertensione e malattie cardiovascolari.

Le HUVEC sono un modello ideale per lo studio dei meccanismi alla base della compromissione del segnale insulinico. L'insulina stimola la produzione di NO nelle cellule endoteliali attraverso l'attivazione di eNOS. Tuttavia, in condizioni di insulino-resistenza, questo processo è compromesso, portando a una riduzione della biodisponibilità di NO. L'insulina normalmente attiva la via di segnale PI3K/Akt, che è cruciale per la produzione di NO nelle cellule endoteliali. Quando si verifica l'insulino-resistenza, questa via di segnale è interrotta, riducendo così l'attività di eNOS e, di conseguenza, la produzione di NO. Questo compromette la capacità di vasodilatazione dell'endotelio.

Alcuni studi in vitro hanno utilizzato le HUVEC come modello per studiare la compromissione della cascata di segnale insulinica Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)/PI3K/Phosphoinositide-dependent kinase-1(PDK-1)/Akt, in particolare associata alla variante genetica G972R del gene IRS-1. La variante G972R compromette la regolazione dell'ossido nitrico da parte dell'insulina nelle cellule endoteliali umane coltivate (47). L'insulino-resistenza provoca anche un aumento dell'attivazione della via mitogen-activated protein kinase (MAPK), che promuove la proliferazione cellulare e l'inflammatione. Questo fenomeno è stato osservato in modelli di HUVEC nel contesto dell'obesità. Infatti, in vitro, HUVEC esposte a plasma proveniente da individui obesi mostrano un significativo aumento dei livelli di ROS, una maggiore esposizione di molecole di adesione vascolare e intercellulare, e aumentata interazione tra monociti e cellule endoteliali. Questo è stato associato a uno squilibrio tra le vie di segnale insulinica pro- e anti-aterogeniche endoteliali, evidenziato da un aumento della via MAPK e una diminuzione della fosforilazione delle proteine IRS-1/Akt/eNOS, insieme a una maggiore attivazione della proteina S6K1. In maniera interessante, l'inibizione della via mTORC1-S6K1 mediante rapamicina ha significativamente ripristinato l'attivazione della via IRS-1/Akt/eNOS, insieme a una maggiore attivazione della proteina S6K1. Inoltre, l'inibizione della via mTORC1-S6K1 mediante rapamicina ha significativamente ripristinato l'attivazione della via IRS-1/Akt/eNOS, suggerendo un meccanismo di regolazione a feedback del segnale IRS-1/Akt attraverso S6K1 (48).

Varianti genetiche

È noto che le persone con DMT2 sono maggiormente a rischio di complicanze cardiovascolari; tuttavia, la suscettibilità agli effetti aterogeni del diabete varia da paziente a paziente, in parte a causa del background genetico (49). Negli ultimi anni si è prestata particolare attenzione all'identificazione delle varianti genetiche che modulano tale suscettibilità. La conoscenza di queste varianti genetiche potrebbe fornire importanti informazioni sui meccanismi attraverso i quali l'iperglicemia favorisce la formazione e la progressione della placca ateromatosa. Oltre a identificare i sottogruppi di soggetti che rispondono meglio alle terapie cardiovascolari già note, gli studi genetici possono rivelarsi utili anche per individuare nuovi bersagli e trattamenti per le malattie cardiovascolari (CVD). Inoltre, queste varianti potrebbero essere utili per identificare precocemente individui a rischio cardiovascolare elevato in modo da sottoporli a trattamenti specifici, nell'ambito di un approccio di medicina di precisione (50).

In tale contesto, il modello delle cellule endoteliali è uno strumento prezioso per studiare varianti genetiche associate ad aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti con DMT2. Queste cellule rivestono l'interno dei vasi sanguigni e svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della funzione vascolare e nella risposta infiammatoria. Un esempio di notevole importanza è rappresentato dall'analisi delle cellule endoteliali portatrici del polimorfismo rs10911021, associato ad aumentato rischio di CVD, specifico nelle persone con DMT2 (51). Il polimorfismo rs10911021 è situato nel locus 1q25, in prossimità del gene della glutammato-ammonio ligasi (GLUL), che codifica per l'enzima responsabile

della sintesi della glutammina a partire dall'acido glutammico e dall'ammoniaca. I pazienti portatori dell'allele a rischio in questo locus presentano un'espressione significativamente ridotta del gene *GLUL* nelle cellule endoteliali. Inoltre, essi mostrano un rapporto plasmatico più basso tra acido piroglutammico e acido glutammico, suggerendo una compromissione del ciclo γ -glutammile, coinvolto nella produzione dell'antiossidante naturale glutatione (GSH). Questo potrebbe rappresentare il meccanismo attraverso cui il polimorfismo conferisce un aumentato rischio CVD. Pertanto, lo studio sulle cellule endoteliali è stato cruciale per esplorare questa ipotesi e comprendere i meccanismi sottostanti. In dettaglio, a sostegno di tale ipotesi, è stato riscontrato che l'allele a rischio rs10911021 era associato, nelle cellule endoteliali, a segnali biochimici di disfunzione del ciclo γ -glutammile e a una ridotta detossificazione del composto aterogeno metilgliosale (MG) – due caratteristiche che possono accelerare l'aterogenesi intensificando lo stress ossidativo tipico del DMT2 (52). Questo approccio su cellule endoteliali permette di identificare meccanismi molecolari alla base dell'aumento del rischio di CVD nel DMT2 e di valutare potenziali interventi terapeutici, come l'integrazione di glutammina, per mitigare tali rischi. Questo modello cellulare è stato fondamentale per dimostrare che gli effetti negativi della down-regolazione di *GLUL*, ottenuta tramite shRNA, possono essere completamente prevenuti esponendo le cellule alla glutammina (il prodotto della reazione enzimatica catalizzata dall'enzima codificato da *GLUL*) (52). In particolare, una minore attività di *GLUL* associata all'allele a rischio 1q25, che potrebbe determinare una detossificazione compromessa del metilgliosale e un aumento dello stress ossidativo nei pazienti con T2D, potrebbe essere prevenuta dall'aumento del rapporto redox fornito dall'integrazione di glutammina. Pertanto, l'integrazione di glutammina potrebbe essere un intervento semplice per ridurre il rischio di CVD nei pazienti con T2D che portano il genotipo a rischio 1q25.

Un modello genetico di insulino-resistenza associato ad alterazione della sensibilità insulinica e disfunzione endoteliale è costituito dal polimorfismo *TRIB3* Q84R, un inibitore di Akt. Questa variante determina un aumento della funzione inibitoria di *TRIB-3* con riduzione del segnale a valle di Akt. Gli effetti vascolari di questo polimorfismo sono stati studiati in HUVEC ottenute da portatrici della variante. In tali studi è stato dimostrato che la presenza della variante altera la trasduzione del segnale dell'insulina mediato da Akt, con conseguente riduzione della attivazione di eNOS e della produzione di NO. I portatori della variante mostravano una riduzione della funzione endoteliale valutata mediante pletismografia.

In sintesi, il confronto tra le C e le GD HUVEC rappresenta un modello valido per lo studio delle complicanze vascolari associate al diabete, offrendo una visione dettagliata dei processi infiammatori e ossidativi coinvolti nella disfunzione endoteliale. È necessario, inoltre, ricordare che le GD-HUVEC derivano da un annesso del feto che è esposto solo per poche settimane a un ambiente materno caratterizzato da iperglicemia. Lo sviluppo della disfunzione endoteliale nelle gravidanze complicate da diabete gestazionale è influenzato da uno squilibrio tra molecole pro- e anti-infiammatorie, non limitato alla sola iperglicemia che può causare, come precedentemente descritto, una senescenza vascolare precoce e disfunzione endoteliale. Inoltre, il diabete gestazionale sembrerebbe associarsi a modifiche epigenetiche che potrebbero trasmettere il fenotipo “diabetico” materno alla prole. Infatti, le GD-HUVEC esposte in vivo a un ambiente metabolico alterato tipico del diabete, sembrano mantenere un “fenotipo cardiovascolare diabetico” anche dopo una lunga esposizione *in vitro* a livelli normali di glucosio, configurando una sorta di controllo epigenetico dell'espressione genica (9, 53). Pertanto, questo modello consentirebbe di esplorare meccanismi cellulari e molecolari critici, fornendo spunti per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la prevenzione e il trattamento delle complicanze diabetiche.

ESEMPI DI APPLICAZIONE DEL MODELLO SPERIMENTALE GD-HUVEC SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE: UN NUTRACEUTICO...

Gli integratori a base di inositolo e antiossidanti potrebbero rappresentare un valido approccio terapeutico nella gravidanza complicata da diabete e resistenza all'insulina, al fine di migliorare il metabolismo del glucosio e ritardare o evitare la terapia insulinica quando necessario (54). Esistono pochi ma interessanti dati preclinici riguardanti il ruolo degli inositoli nella prevenzione e nel trattamento delle alterazioni endoteliali. Sembrerebbe che una variante

isomerica del mioinositolo riduca la progressione del danno vascolare modulando l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), l'attività della via dell'esosamina e la formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (55). Secondo questi risultati, l'inositolo potrebbe svolgere un ruolo cruciale non solo nella trasmissione del segnale insulinico ma anche nella disfunzione endoteliale.

Il modello descritto nel paragrafo precedente ha permesso di indagare le potenziali azioni antinfiammatorie/antiossidanti del mioinositolo in uno studio traslazionale (44). Sono state valutate HUVEC di donne con diabete gestazionale trattate con dieta associata all'integrazione di mioinositolo durante la gravidanza, rispetto alle HUVEC con diabete gestazionale trattate solo con dieta. Nel dettaglio, sono stati valutati: l'adesione delle cellule monocitarie alle HUVEC, l'esposizione delle molecole di adesione sulla membrana e i livelli di stress ossidativo. Per studiare ulteriormente gli effetti vascolari del mioinositolo, le stesse valutazioni sono state eseguite su C-HUVEC e GD-HUVEC dopo una stimolazione in vitro di 48 ore con mioinositolo. In sintesi, è stato osservato che le GD-HUVEC ottenute da donne che avevano assunto un'integrazione di mioinositolo durante la gravidanza mostravano una minor adesione dei monociti all'endotelio, una minore esposizione di molecole di adesione e livelli inferiori di ROS intracellulari rispetto alle GD-HUVEC ottenute da donne trattate solo con la dieta. L'effetto anti-infiammatorio/antiossidante del mioinositolo è stato confermato nell'esperimento in vitro; il mioinositolo ha ridotto significativamente l'adesione monociti all'endotelio indotta dal TNF- α sia nelle C-HUVEC che nelle GD-HUVEC. Inoltre, il mioinositolo è stato in grado di ridurre significativamente l'esposizione di membrana di VCAM-1 e ICAM-1 indotta dal TNF- α in entrambi i modelli cellulari (C e GD). Infine, il mioinositolo ha ridotto la produzione di ROS nelle cellule GD, mentre nelle cellule di controllo non si è osservata una variazione significativa. Nel complesso, la possibilità di usare questo modello sperimentale ha permesso di dimostrare un chiaro effetto antinfiammatorio e antiossidante del mioinositolo nelle cellule umane ed ipotizzare una azione protettiva contro l'infiammazione cronica indotta dalla disfunzione endoteliale nel diabete.

...UN FARMACO

I GLP1-RAs sono raccomandati dalle principali società scientifiche per migliorare il controllo glicemico e ridurre il rischio di eventi cardiovascolari nelle persone con DMT2. Sebbene l'efficacia cardioprotettiva dei GLP-1RAs ed il loro effetto sui fattori di rischio modificabili tradizionali siano ben documentati, gli esatti meccanismi attraverso cui i GLP-1RAs agiscono sull'aterosclerosi non sono del tutto noti. Studi meccanicistici hanno mostrato una azione diretta sul sistema vascolare con meccanismi legati o meno alla presenza del recettore del GLP1 sulle cellule endoteliali. Uno di questi, già qualche anno fa, ha valutato l'effetto di uno dei farmaci della classe dei GLP-1RAs (liraglutide) sulle HUVEC derivate da donne con diabete gestazionale e di controllo (42). Nelle GD-HUVEC, liraglutide è stata in grado di ridurre in modo significativo l'adesione dei monociti all'endotelio indotta da TNF- α , così come l'espressione e l'esposizione di VCAM-1 e ICAM-1 sulla membrana plasmatica. Inoltre, nelle stesse cellule, liraglutide ha ridotto l'attivazione delle vie MAPK/NF-kB, i livelli di perossinitrito e il rilascio di vescicole extracellulari rilasciate nel mezzo di coltura, un marcatore di attivazione/stress cellulare. Anche in questo ulteriore esempio, le HUVEC sono state un eccellente modello cellulare, fondamentale per studiare i meccanismi molecolari alla base della disfunzione endoteliale e la loro modulazione ad opera di un farmaco.

CONCLUSIONI

In conclusione, le HUVEC rappresentano un modello ex vivo di grande valore per lo studio della funzionalità del sistema vascolare e delle complicanze cardiovascolari, in particolare quelle legate al DMT2. La facilità di accesso e le caratteristiche peculiari di queste cellule le rendono ideali per indagare i meccanismi molecolari alla base della disfunzione endoteliale e per valutare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici, inclusi farmaci e nutraceutici. Un aspetto innovativo e rilevante è l'utilizzo delle GD-HUVEC, che offrono un'opportunità unica per studiare come l'esposizione all'iperglicemia materna durante la gravidanza influenzi la salute vascolare e contribuisca alla disfunzione endo-

teliale di un annesso appartenente al feto (Fig. 1). Le GD-HUVEC hanno permesso di esplorare in dettaglio i processi patologici, come l'infiammazione e lo stress ossidativo, e di identificare potenziali target terapeutici per prevenire e trattare le complicanze vascolari nel diabete. Tuttavia, è cruciale ricordare che i risultati ottenuti con le HUVEC, devono essere convalidati e integrati con studi in vivo e clinici per assicurare la rilevanza traslazionale e l'applicabilità dei risultati alla pratica clinica. L'isolamento e la caratterizzazione delle HUVEC hanno rappresentato un progresso significativo nella biologia vascolare, facilitando lo studio delle malattie cardiovascolari e contribuendo allo sviluppo di nuove terapie e metodi diagnostici. Sebbene gli studi condotti su HUVEC non sostituiscano completamente i modelli in vivo, essi offrono vantaggi significativi nella ricerca di base e rappresentano un tassello fondamentale nella ricerca traslazionale, potendo contribuire in modo decisivo allo sviluppo di strategie terapeutiche mirate alla prevenzione e al trattamento delle malattie cardiovascolari associate al diabete.

BIBLIOGRAFIA

1. Committee ADAPP, ElSayed NA, Aleppo G, Bannuru RR, Bruemmer D, Collins BS, et al. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes 2024. *Diabetes Care* (Internet). 2024 Jan 1 (cited 2024 Jul 19); 47(Suppl1):S20-42. Available from: <https://dx.doi.org/10.2337/dc24-S002>.
2. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* (Internet]. 2003 Oct 1 (cited 2024 Jul 19); 42(7):1149-1160. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14522472/>.
3. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(10):1057-1069. Doi: 10.7150/ijbs.7502. eCollection 2013.
4. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1):III27-32.
5. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, De Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: The role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care*. 2011; 34(Suppl 2):S285-290.
6. Yang DR, Wang MY, Zhang CL, Wang Y. Endothelial dysfunction in vascular complications of diabetes: a comprehensive review of mechanisms and implications. *Front Endocrinol*. 2024; 5(15): 1359255. Doi: 10.3389/fendo.2024.1359255. eCollection 2024.
7. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: *European Heart Journal*. 2013; 34(31):2436-2443.
8. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec; 1832(12):2216-2231.
9. Di Fulvio P, Pandolfi A, Formoso G, Di Silvestre S, Di Tomo P, Giardinelli A, et al. Features of endothelial dysfunction in umbilical cord vessels of women with gestational diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2014; 24(12):1337-1345.
10. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition*. Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition. 2013.
11. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. *Applied Sciences* (Switzerland). 2020; 10(3).
12. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2007; 2(3):481-485.
13. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012; 15(1):151-163.
14. Santini A, Cammarata SM, Capone G, Ianaro A, Tenore GC, Pani L, et al. Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. *Br J Clin Pharmacol* (Internet). 2018 Apr 1 (cited 2024 Jul 22); 84(4):659-672. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29433155/>.
15. Caminiti R, Carresi C, Mollace R, Macrì R, Scarano F, Oppedisano F, et al. The potential effect of natural antioxidants on endothelial dysfunction associated with arterial hypertension. *Front Cardiovasc Med*. 2024 Feb 2; 11:1345218.

16. Chareghomi S, Rahban M, Moosavi-Movahedi Z, Habibi-Rezaei M, Saso L, Moosavi-Movahedi AA. The Potential Role of Curcumin in Modulating the Master Antioxidant Pathway in Diabetic Hypoxia-Induced Complications. *Molecules* (Internet). 2021 Dec 1 (cited 2024 Jul 22); 26(24). Available from: [/pmc/articles/PMC8706440/](#).
17. Xiong F, Zhang Y, Li T, Tang Y, Song SY, Zhou Q, et al. A detailed overview of quercetin: implications for cell death and liver fibrosis mechanisms. *Front Pharmacol* (Internet). 2024 (cited 2024 Jul 22); 15. Available from: [/pmc/articles/PMC11157233/](#).
18. Karpurapu M, Kakarala KK, Chung S, Nie Y, Koley A, Dougherty P, et al. Epigallocatechin gallate regulates the myeloid-specific transcription factor PU.1 in macrophages. *PLoS One* (Internet). 2024 Apr 1 (cited 2024 Jul 22); 19(4):e0301904. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0301904>.
19. Ucci M, Di Tomo P, Tritschler F, Cordone VGP, Lanuti P, Bologna G, et al. Anti-inflammatory role of carotenoids in endothelial cells derived from umbilical cord of women affected by gestational diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 8184656.
20. Sowmya PRR, Ambedkar R, Lakshminarayana R. Role of Carotenoids on Oxidative Stress-Mediated Signaling in Cancer Cells. *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects* (Internet). 2021 (cited 2024 Jul 22); 1-20. Available from: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-981-15-4501-691-1>.
21. Chen X, Zheng L, Zhang B, Deng Z, Li H. Synergistic protection of quercetin and lycopene against oxidative stress via SIRT1-Nox4-ROS axis in HUVEC cells. *Curr Res Food Sci* (Internet). 2022 Jan 1 (cited 2024 Jul 22); 5:1985. Available from: [/pmc/articles/PMC9593281/](#).
22. Drenjančević I, Pitha J. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids-Vascular and Cardiac Effects on the Cellular and Molecular Level (Narrative Review). *Int J Mol Sci* (Internet). 2022 Feb 1 (cited 2024 Jul 22); 23(4). Available from: [/pmc/articles/PMC8879741/](#).
23. Sherratt SCR, Dawoud H, Bhatt DL, Malinski T, Mason RP. Omega-3 and omega-6 fatty acids have distinct effects on endothelial fatty acid content and nitric oxide bioavailability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (Internet). 2021 Oct 1 (cited 2024 Jul 22); 173. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34464785/>.
24. Liu D, Wu M, Lu Y, Xian T, Wang Y, Huang B, et al. Protective effects of 6-Gingerol on vascular endothelial cell injury induced by high glucose via activation of PI3K-AKT-eNOS pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Biomed Pharmacother* (Internet). 2017 Sep 1 (cited 2024 Jul 22); 93:788-795. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28709132/>.
25. Lee JH, Parveen A, Do MH, Lim Y, Shim SH, Kim SY. Lespedeza cuneata protects the endothelial dysfunction via eNOS phosphorylation of PI3K/Akt signaling pathway in HUVECs. *Phytomedicine* (Internet). 2018 Sep 15 (cited 2024 Jul 22); 48:1-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30195866/>.
26. Barkas F, Bathrellou E, Nomikos T, Panagiotakos D, Liberopoulos E, Kontogianni MD. Plant Sterols and Plant Stanols in Cholesterol Management and Cardiovascular Prevention. *Nutrients* (Internet). 2023 Jul 1 (cited 2024 Jul 22); 15(13). Available from: [/pmc/articles/PMC10343346/](#).
27. Sugawara T, Matsubara K, Akagi R, Mori M, Hirata T. Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *J Agric Food Chem* (Internet). 2006 Dec 27 (cited 2024 Jul 22); 54(26): 9805-9810. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17177505/>.
28. Mumu M, Das A, Emran T Bin, Mitra S, Islam F, Roy A, et al. Fucoxanthin: A Promising Phytochemical on Diverse Pharmacological Targets. *Front Pharmacol* (Internet). 2022 Aug 2 (cited 2024 Jul 22); 13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35983376/>.
29. Kim MJ, Kang HH, Seo YJ, Kim KM, Kim YJ, Jung SK. Paeonia lactiflora root extract and its components reduce biomarkers of early atherosclerosis via anti-inflammatory and antioxidant effects in vitro and in vivo. *Antioxidants*. 2021; 10(10).
30. Cheng HW, Chen YE, Wong JM, Weng CW, Chen HY, Yu SL, et al. Cancer cells increase endothelial cell tube formation and survival by activating the PI3K/Akt signalling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2017; 36(1).
31. Steiner S. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. Vol. 13, *Zeitschrift fur Gefassmedizin*. Krause und Pachernegg GmbH; 2016. pp. 17-18.

32. Linea Guida della Società Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione dei Medici Diabetologi (AMD). La terapia del diabete mellito di tipo 2. 2021.
33. Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2022. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2022 Nov 1; 45(11):2753-2786.
34. Mylonas N, Nikolaou PE, Karakasis P, Stachteas P, Fragakis N, Andreadou I. Endothelial Protection by Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: A Literature Review of In Vitro and In Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024; 25.
35. Uthman L, Li X, Baartscheer A, Schumacher CA, Baumgart P, Hermanides J, et al. Empagliflozin reduces oxidative stress through inhibition of the novel inflammation/NHE/[Na⁺]_c/ROS-pathway in human endothelial cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022 Feb 1; 146:112515.
36. Cappetta D, De Angelis A, Ciuffreda LP, Coppini R, Cozzolino A, Micciché A, et al. Amelioration of diastolic dysfunction by dapagliflozin in a non-diabetic model involves coronary endothelium. *Pharmacol Res*. 2020; 157:104781.
37. Zhou Y, Tai S, Zhang N, Fu L, Wang Y. Dapagliflozin prevents oxidative stress-induced endothelial dysfunction via sirtuin 1 activation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023; 165:115213.
38. Gaspari T, Spizzo I, Liu H Bin, Hu Y, Simpson RW, Widdop RE, et al. Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis. *Diab Vasc Dis Res*. 2018; 15(1):64-73.
39. Abdollahi E, Keyhanfar F, Delbandi AA, Falak R, Hajimiresmaiel SJ, Shafiei M. Dapagliflozin exerts anti-inflammatory effects via inhibition of LPS-induced TLR-4 overexpression and NF-κB activation in human endothelial cells and differentiated macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2022; 918:174715.
40. Zhang Y, Wang S, Chen X, Wang Z, Wang X, Zhou Q, et al. Liraglutide prevents high glucose induced HUVECs dysfunction via inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy. *Mol Cell Endocrinol*. 2022; 545:111560.
41. Li Q, Lin Y, Wang S, Zhang L, Guo L. GLP-1 Inhibits High-Glucose-Induced Oxidative Injury of Vascular Endothelial Cells. *Sci Rep*. 2017; 7(1).
42. Tomo P Di, Lanuti P, Pietro N Di, Pompea M, Baldassarre A, Marchisio M, et al. Liraglutide mitigates TNF-α induced pro-atherogenic changes and microvesicle release in HUVEC from diabetic women. 2017 Nov; 33(8).
43. Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: A systematic review. *Obesity Reviews*. 2016; 17(7):573-586.
44. Baldassarre MPA, Di Tomo P, Centorame G, Pandolfi A, Di Pietro N, Consoli A, et al. Myoinositol Reduces Inflammation and Oxidative Stress in Human Endothelial Cells Exposed In Vivo to Chronic Hyperglycemia. *Nutrients (Internet)*. 2021 Jul 1 (cited 2024 Aug 2); 13(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34199095/>.
45. Di Tomo P, Alessio N, Falone S, Pietrangelo L, Lanuti P, Cordone V, et al. Endothelial cells from umbilical cord of women affected by gestational diabetes: A suitable in vitro model to study mechanisms of early vascular senescence in diabetes. *FASEB Journal*. 2021; 35(6):e21662.
46. Di Pietrantonio N, Di Tomo P, Mandatori D, Formoso G, Pandolfi A. Diabetes and Its Cardiovascular Complications: Potential Role of the Acetyltransferase p300. *Cells*. 2023; 12(3):431.
47. Federici M, Pandolfi A, De Filippis EA, Pellegrini G, Menghini R, Lauro D, et al. G972R IRS-1 Variant Impairs Insulin Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cultured Human Endothelial Cells. *Circulation*. 2004; 109(3).
48. Di Pietrantonio N, Palmerini C, Pipino C, Baldassarre MPA, Bologna G, Mohn A, et al. Plasma from obese children increases monocyte-endothelial adhesion and affects intracellular insulin signaling in cultured endothelial cells: Potential role of mTORC1-S6K1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021; 1867(4):166076.
49. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, D'Agostino RB, Pencina MJ, Vasan RS, et al. Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;115(12):1544-1550.
50. Doria A. Leveraging genetics to improve cardiovascular health in diabetes: The 2018 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes*. 2019; 68(3):479-489.

51. Qi L, Qi Q, Prudente S, Mendonca C, Andreozzi F, Di Pietro N, et al. Association between a genetic variant related to glutamic acid metabolism and coronary heart disease in individuals with type 2 diabetes. *JAMA*. 2013; 310(8):821-828.
52. Pipino C, Shah H, Prudente S, Di Pietro N, Zeng L, Park K, et al. Association of the 1q25 diabetes-specific coronary heart disease locus with alterations of the γ -glutamyl cycle and increased methylglyoxal levels in endothelial cells. *Diabetes*. 2020; 69(10):2206-2216.
53. P. Di Tomo, N. Alessio, S. Falone, L. Pietrangelo, P. Lanuti, V. Cordone, S. Junior Santini, N. Di Pietrantonio, M. Marchisio, F. Protasi, N. Di Pietro, G. Formoso, F. Amicarelli UG and AP. Endothelial cells from umbilical cord of women affected by gestational diabetes: a suitable in vitro model to study mechanisms of early vascular senescence in diabetes. *The FASEB Journal*. in press.
54. Formoso G, Baldassarre MPA, Ginestra F, Carlucci MA, Bucci I, Consoli A. Inositol and antioxidant supplementation: Safety and efficacy in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019; 35(5):e3154.
55. Nascimento NRF, Lessa LMA, Kerntopf MR, Sousa CM, Alves RS, Queiroz MGR, et al. Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Internet). 2006 Jan 3 (cited 2018 Apr 3); 103(1):218-223. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509779103>.