



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE E
CHIRURGICHE TRASLAZIONALI**

CICLO XXXVII°

**Fenotipizzazione dei pazienti affetti da diabete di tipo 2 e
malattia coronarica aterosclerotica stratificati sulla base
della presenza di complicanze microvascolari: uno
studio di imaging e laboratoristico.
II PHENO-DIACAD STUDY**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Nicola Sverzellati**

**Tutore:
Chiar.ma Prof. Giampaolo Niccoli**

Dottorando: Filippo Luca Gurgoglione

Anni accademici 2021/2022 – 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 DIABETE DI TIPO 2 E MALATTIA ATEROSCLEROTICA CORONARICA.....	4
1.2 MECCANISMI FISIOPATOGENETICI DELL'ATEROSCLEROSI NEI PAZIENTI CON DIABETE MELLITO.....	5
1.3 TOMOGRAFIA OTTICA COMPUTERIZZATA CORONARICA.....	7
1.4 ETEROGENEITA' CLINICA E DELLA MORFOLOGIA DELLE PLACCHE CORONARICHE NEI PAZIENTI CON DIABETE MELLITO.....	8
1.5 NUOVI ATTORI IMPLICATI NELL'ATEROSCLEROSI CORONARICA.....	10
2. MATERIALI E METODI.....	13
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	23
4. RISULTATI ATTESI DELLO STUDIO.....	25
5. POSSIBILI RIPERCUSSIONI DELLO STUDIO.....	26
6. ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI.....	29
7. BIBLIOGRAFIA.....	30

1. INTRODUZIONE

1.1 Diabete mellito di tipo 2 e malattia aterosclerotica coronarica

Il diabete mellito (DM) è una condizione metabolica che, nel 2021, ha interessato 537 milioni di persone a livello globale, con una prevalenza stimata del 10.5% [1]. Molto spesso il DM è asintomatico e risulta non diagnosticato in oltre il 40% degli adulti nel mondo. Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è la forma più comune di questa patologia, rappresentando il 90% dei casi totali e caratterizzandosi per una resistenza dei tessuti all'insulina, associata a un deficit insulinico relativo, che provoca un incremento della glicemia [2].

La malattia aterosclerotica coronarica (CAD) rappresenta la principale causa di morbidità e mortalità nei pazienti affetti da T2DM. Studi epidemiologici hanno evidenziato una prevalenza del DM tra il 20% e il 35% nei pazienti con sindrome coronarica acuta (SCA) [1].

La correlazione tra diabete e infarto miocardico acuto (IMA) è inoltre circa tre volte superiore rispetto agli infarti non fatali a causa di lesioni aterosclerotiche coronariche più severe nei soggetti diabetici. Inoltre, in uno studio condotto da Juutilaanen e colleghi su 2.422 soggetti finlandesi seguiti per 18 anni, è stato osservato che i pazienti diabetici senza precedenti eventi infartuali presentavano un'incidenza di IMA paragonabile a quella di soggetti con malattia cardiovascolare pregressa. Questa correlazione ha consolidato il paradigma per cui il diabete è considerato un "equivalente di malattia aterosclerotica cardiovascolare" [3].

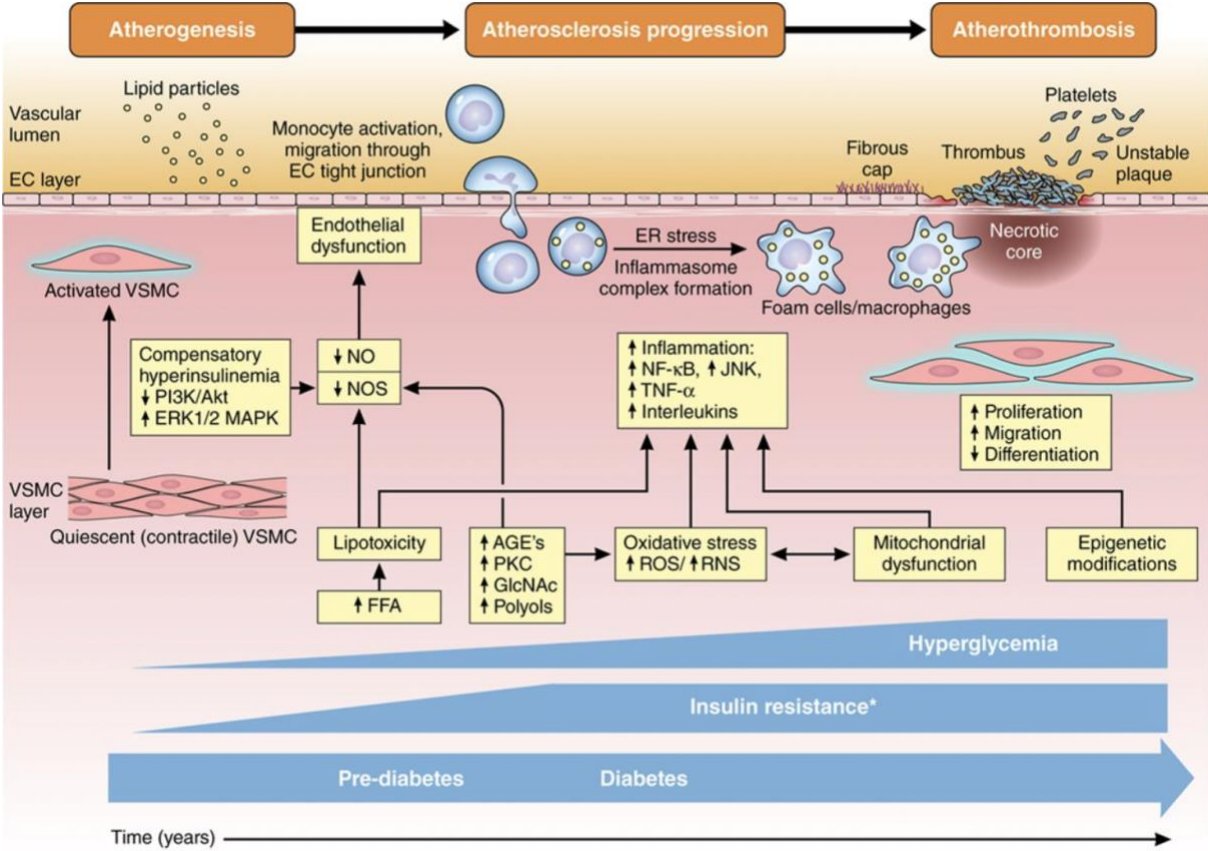
1.2 Meccanismi fisiopatogenetici dell'aterosclerosi nei pazienti con diabete mellito

Il T2DM si caratterizza per un substrato metabolico e funzionale che promuove lo sviluppo della CAD e facilita la sua progressione e destabilizzazione, aumentando così il rischio di SCA [4]. L'iperglicemia, principale manifestazione del T2DM, è un fattore cruciale nella genesi della disfunzione endoteliale coronarica. L'endotelio funge da barriera selettiva per la traslocazione delle sostanze a livello vascolare e secerne peptidi vasoattivi, come endotelina-1, ossido nitrico (NO), prostaciclina e angiotensina II, nonché molecole di adesione [5]. Inoltre, l'endotelio è essenziale per l'omeostasi vascolare, regolando la permeabilità della parete vascolare, il tono vascolare e la trombogenesi locale [6].

In presenza di iperglicemia, l'endotelio sviluppa uno squilibrio tra enzimi ossidanti e antiossidanti, con aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e riduzione della sintesi di NO. Inoltre, si rileva un incremento dei livelli intracellulari di proteina chinasi C e del fattore nucleare NF- κ B, che stimolano l'espressione di molecole di adesione e citochine pro-infiammatorie [7]. L'iperglicemia favorisce inoltre aumentati livelli intracellulari di prodotti di glicazione avanzata (AGE), i quali, legandosi al proprio recettore, intensificano ulteriormente la produzione di ROS e attivano mediatori pro-infiammatori, accelerando così la disfunzione endoteliale e la progressione della CAD [8].

L'iperinsulinemia rappresenta un ulteriore meccanismo fisiopatogenetico della CAD ed è implicata nello sviluppo di uno stato protrombotico attraverso l'aumento dei livelli di inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1, fibrinogeno e fattore tissutale [9]. Infine, l'elevata glicemia altera l'omeostasi dei livelli di calcio a livello piastrinico, promuovendo uno stato di attivazione funzionale e di iperaggregazione piastrinica [10] (**Figura 1**).

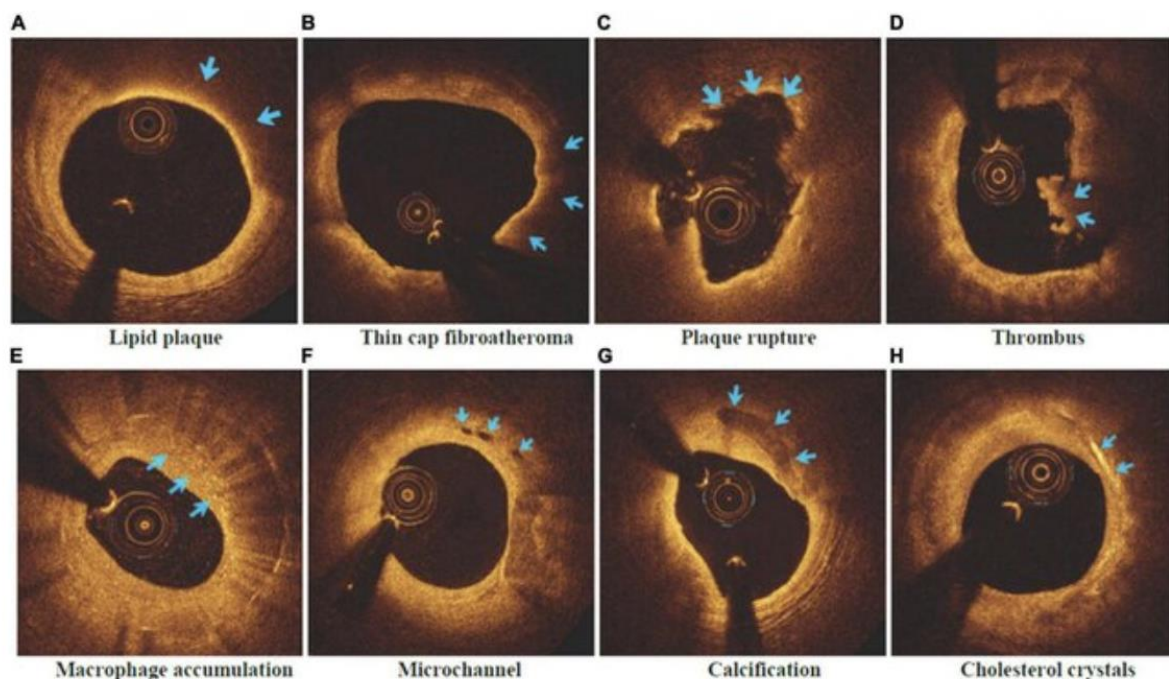
Figura 1. Meccanismi di insorgenza e progressione della CAD nel T2DM



1.3 Tomografia ottica computerizzata coronarica

La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una modalità di imaging endovascolare che fornisce in tempo reale sezioni tomografiche delle arterie coronarie ad elevata risoluzione assiale (10-15 μm) e ad alta frequenza di campionamento [11]. L'OCT utilizza luce infrarossa trasportata da una fibra ottica all'interno di un catetere a basso profilo (2.4-2.8 F) per produrre immagini su scala microscopica. La luce, illuminando rapidamente la parete vascolare, consente una scansione longitudinale dell'arteria coronaria analizzata (7.5-15 cm) in pochi secondi (2-3.5 s). L'iniezione simultanea di mezzo di contrasto (3-4.5 ml/s a seconda delle dimensioni del vaso) permette alla luce di interagire con le strutture vascolari circostanti senza interferenze. I tessuti e le strutture vasali riflettono e assorbono la luce in modo diverso a seconda della loro composizione. L'intensità e l'attenuazione del segnale ottico riflesso costituiscono la base della caratterizzazione tissutale effettuata tramite OCT [12] (**Figura 2**).

Figura 2. *Rappresentazione OCT di caratteristiche di vulnerabilità delle placche aterosclerotiche coronariche*



1.4 Eterogeneità clinica e della morfologia delle placche coronariche nei pazienti con diabete mellito

Le evidenze scientifiche indicano un'elevata eterogeneità nel rischio di sviluppare CAD e nel fenotipo delle placche aterosclerotiche tra i pazienti con T2DM.

Sugiyama e colleghi hanno incluso 322 pazienti (95 diabetici, 227 non diabetici) con SCA sottoposti a valutazione OCT. I pazienti diabetici presentavano una maggior prevalenza di placche lipidiche (58.9% vs 44.9%, $p=0.030$) e di accumulo di macrofagi (60.0% vs 44.9%, $p=0.019$) nella lesione “colpevole” dell'IMA rispetto ai pazienti non diabetici. Inoltre, nei diabetici è stato osservato un arco lipidico più ampio ($24.9^{\circ}\pm 83.9^{\circ}$ vs $179.9^{\circ}\pm 58.3^{\circ}$, $p=0.006$) e un cappuccio fibroso più sottile (17.2% vs 6.3%, $p=0.031$) rispetto al gruppo senza DM nelle lesioni “non colpevoli” dell'IMA. Questi risultati suggeriscono una “pan-vulnerabilità coronarica” nella popolazione diabetica, ovvero lesioni aterosclerotiche più suscettibili alla destabilizzazione e un aumentato rischio di SCA [13].

Al contrario, Niccoli e colleghi hanno analizzato le caratteristiche angiografiche e OCT di 167 pazienti con SCA, di cui 47 diabetici e 120 non diabetici. I pazienti con T2DM si presentavano al primo evento di SCA in età più avanzata e con un grado di malattia aterosclerotica più severo (maggior prevalenza di CAD multivasale e multifocale), ma con caratteristiche di minore vulnerabilità rispetto ai non diabetici, come indicato da una maggiore prevalenza di macrocalcificazioni e una minore frequenza di placche lipidiche [14].

Evidenze sempre più consistenti indicano che le complicanze microvascolari del diabete (DMC), come retinopatia diabetica (DR), nefropatia diabetica (DKD) e neuropatia diabetica (DN), influenzano significativamente il decorso clinico e la prognosi di questi pazienti [15].

I pazienti con DMC (DMC+) presentano tipicamente un controllo glicemico subottimale, un fabbisogno insulinico maggiore e una durata più lunga della malattia diabetica. Al contrario, i pazienti senza DMC (DMC-) mostrano un fenotipo tipico della sindrome metabolica,

caratterizzato da insulino-resistenza, maggiore prevalenza di dislipidemia, livelli più elevati di lipoproteine LDL (a bassa densità) e obesità [16]. Queste differenze biochimiche e cliniche potrebbero rappresentare il substrato per una diversa progressione del processo aterosclerotico nei pazienti con T2DM e DMC.

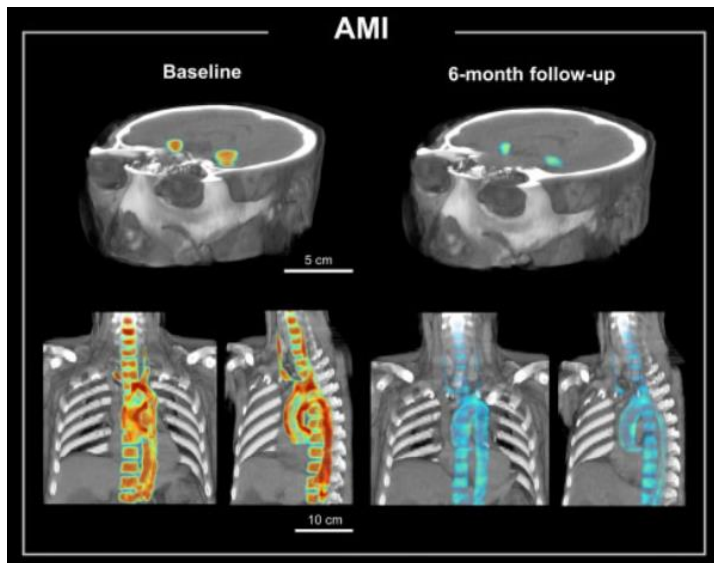
In un recente studio del nostro gruppo, sono stati analizzati 320 pazienti consecutivi con T2DM, di cui 172 (53.75%) con DMC. Nei pazienti DMC+ è stata riscontrata una malattia aterosclerotica più estesa, come evidenziato da una maggiore prevalenza di CAD multivasale (109 [63.4%] vs 68 [45.9%], $p=0.002$). Inoltre, le placche coronariche dei pazienti DMC+, rispetto a quelle dei pazienti DMC-, erano significativamente più lunghe (15.8 ± 7.2 mm vs 13.5 ± 5.9 mm, $p=0.014$), più frequentemente fibrotiche (53 [64.6%] vs 27 [31.0%], $p<0.001$) e caratterizzate da macrocalcificazioni (65 [79.3%] vs 35 [40.2%], $p<0.001$), oltre a mostrare una prevalenza maggiore di placche “healed” (18 [22.0%] vs 8 [9.2%], $p=0.018$). Al contrario, i pazienti DMC- presentavano una maggiore prevalenza di calcificazioni “spotty” (39 [44.8%] vs 15 [18.3%], $p=0.003$) e placche lipidiche (60 [69.0%] vs 29 [35.4%], $p<0.001$) rispetto ai pazienti DMC+. A un follow-up medio di 33 mesi, l’incidenza di eventi avversi cardiovascolari maggiori è risultata significativamente più alta nei pazienti DMC+ rispetto a quelli DMC- (25 [14.5%] vs 12 [8.1%], $p=0.007$), guidate da una maggior occorrenza di rivascolarizzazioni coronariche per sindrome coronarica cronica (CCS) (16 [9.3%] vs 5 [3.4%], $p=0.004$), senza differenze nell’incidenza di morte per cause cardiovascolari (3 [1.7%] vs 1 [0.7%], $p=0.257$) e IMA non fatale (6 [3.5%] vs 6 [4.1%], $p=0.755$) [17]. Questi risultati suggeriscono un pattern aterosclerotico più esteso nei pazienti DMC+, caratterizzato tuttavia da placche aterosclerotiche meno inclini a provocare SCA e con una maggiore propensione alla guarigione spontanea. Comprendere i meccanismi che sottendono tale eterogeneità tra pazienti DMC+ e DMC- affetti da CAD è essenziale per prevenire l’insorgenza dell’aterosclerosi e per favorire un approccio terapeutico personalizzato, adattato ai diversi fenotipi di T2DM e CAD.

1.5 Nuovi attori implicati nell'aterosclerosi coronarica

Asse Amigdala-Midollo Osseo-Vasi Periferici

Un recente studio condotto da Kang e colleghi [18] ha identificato un nuovo meccanismo di aterogenesi coronarica, legato all'iperattivazione di un asse fisioanatomico composto dall'amigdala, dal midollo osseo e dai vasi periferici (**Figura 3**). Nel dettaglio, una maggiore attività dell'amigdala (AmygA), centro nevralgico nella regolazione delle emozioni e della risposta allo stress [19], è in grado di promuovere alterazioni strutturali e metaboliche nel midollo osseo, stimolando la mielopoiesi e determinando un aumento dei livelli di monociti (MON) e macrofagi nel circolo sanguigno e nelle pareti vascolari periferiche. Questo processo infiammatorio vascolare favorisce la progressione dell'aterosclerosi, contribuendo alla destabilizzazione di placche infiammate e vulnerabili e predisponendo all'insorgenza di SCA. Questo asse fisioanatomico può essere analizzato in vivo mediante la tomografia a emissione di positroni (PET) e tomografia computerizzata (CT) con 18F-fluorodesossiglucosio (FDG). Tale nuovo meccanismo di aterogenesi potrebbe essere implicato nella iniziazione e progressione della CAD nei pazienti affetti da DM. Infatti, è stato osservato come le DMC sono associate ad alterazioni neurostrutturali e neurochimiche a livello dell'amigdala [20], a cambiamenti microvascolari nell'ambiente del midollo osseo [21] e sono in grado di indurre uno stato di infiammazione cronica di basso grado nelle arterie di grande calibro [22].

Figura 3. Attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo-vasi periferici in un paziente con IMA



Inflammatione monocito-macrofagica

L'inflammatione è riconosciuta come un fattore centrale nella promozione, progressione e destabilizzazione delle lesioni aterosclerotiche [23]. Tra le cellule coinvolte, la linea monocito-macrofagica riveste un ruolo chiave nello sviluppo delle placche aterosclerotiche. In particolare, i macrofagi sono determinanti nella formazione e progressione della placca: infiltrano la parete arteriosa, fagocitano lipidi ossidati e si trasformano in cellule schiumose ricche di colesterolo, promuovendo così uno stato di inflammatione cronica che sostiene la crescita della placca. Inoltre, i macrofagi secernono enzimi degradativi come le metalloproteinasi che degradano il cappuccio fibroso che riveste la placca, rendendola vulnerabile alla rottura e aumentando il rischio di eventi avversi cardiovascolari [24].

Diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra i livelli di MON circolanti e il rischio di sviluppare CAD [25]. Tuttavia, evidenze più recenti suggeriscono che lo squilibrio tra sottopopolazioni monocitarie, piuttosto che il numero totale di MON, possa rappresentare un indicatore più accurato della composizione e progressione delle placche coronariche.

I MON umani esprimono in misura variabile il recettore per il lipopolisaccaride CD14 e il recettore a bassa affinità per le IgG (CD16) sulla loro superficie, permettendo una classificazione in tre sottotipi: MON classici (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedi (CD14⁺⁺CD16⁺) e non classici (CD14⁺CD16⁺⁺) [26]. Ciascun sottotipo presenta caratteristiche fenotipiche e funzionali specifiche, orchestrando aspetti diversi della risposta infiammatoria. I MON classici si distinguono per un'elevata attività fagocitica e rilasciano citochine pro-infiammatorie, come interleuchina-1 β e -6, proteina chemiotattica dei monociti 1 e tumor necrosis factor- α , manifestando una spiccata capacità di migrazione trans-endoteliale. Al contrario, i MON non classici sono coinvolti nell'omeostasi dell'endotelio vascolare e nei processi di riparazione tissutale, mentre i MON intermedi rappresentano un fenotipo transitorio tra i due estremi e secernono citochine pro-infiammatorie. Studi recenti indicano che i MON intermedi, caratterizzati da una marcata attività pro-infiammatoria, rappresentano il sottotipo più strettamente associato allo sviluppo dell'aterosclerosi [27]. In particolare, uno studio di Yamamoto e colleghi ha rilevato una correlazione tra la presenza di MON intermedi e la vulnerabilità delle placche aterosclerotiche [28].

È stato recentemente identificato un ulteriore sottogruppo di MON che co-esprimono osteocalcina (OCN) e fosfatasi alcalina specifica dell'osso (BAP), con un potenziale ruolo nella promozione delle calcificazioni vascolari all'interno delle placche aterosclerotiche carotidiche in pazienti con T2DM [29]. Di particolare interesse, tali MON sembrano essere implicati nel processo di guarigione delle placche aterosclerotiche instabili, favorendo la differenziazione delle cellule muscolari lisce vascolari verso fenotipi osteoblastici, essenziali per indurre le calcificazioni e fornire il supporto meccanico necessario alla stabilizzazione delle placche [30]. Questi monociti osteocalcifici potrebbero avere un ruolo specifico nell'aterogenesi dei pazienti con T2DM, in particolare nel sottogruppo DMC⁺. Tuttavia, questa ipotesi rimane da verificare in studi clinici e preclinici futuri.

2. MATERIALI E METODI

Lo studio PHENO-DIACAD coinvolge due centri in Italia: l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara. L'obiettivo è reclutare, presso le Unità di Cardiologia di entrambi i centri, un totale di 120 pazienti con T2DM, suddivisi equamente tra pazienti DMC+ e DMC-. Di seguito sono riportati i criteri di inclusione ed esclusione per i partecipanti.

Criteri di inclusione

- Diagnosi di T2DM: definita da una storia clinica pregressa di T2DM o da una nuova diagnosi secondo le linee guida dell'American Diabetes Association, ovvero:
 - emoglobina glicata (HbA1c) $\geq 6.5\%$;
 - glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL;
 - glicemia ≥ 200 mg/dL durante un test di tolleranza al glucosio;
 - glicemia ≥ 200 mg/dL in presenza di sintomi classici del diabete.
- Diagnosi di CCS: definita in accordo con le più recenti linee guida della European Society of Cardiology:
 - sintomatologia anginosa tipica (dolore toracico anginoso "tipico");
 - evidenza strumentale di ischemia miocardica inducibile tramite test da sforzo fisico o stress farmacologico (come scintigrafia miocardica, ecocardiogramma da sforzo, PET, o risonanza magnetica cardiaca);
 - presenza di placche aterosclerotiche $\geq 30\%$ all'esame di tomografia computerizzata coronarica.
- Evidenza di CAD ostruttiva: all'esame angiografico coronarico, definita da:
 - stenosi $\geq 50\%$ nel tronco comune;
 - stenosi $\geq 70\%$ in un vaso epicardico o riserva di flusso frazionale < 0.80 .

Criteri di esclusione

- età <18 anni e ≥85 anni;
- storia cardiovascolare pregressa: storia di rivascularizzazione coronarica percutanea o chirurgica, scompenso cardiaco, malattie valvolari di grado moderato o superiore, malattie cardiache congenite;
- presenza di patologie neoplastiche in fase attiva;
- diagnosi di malattie infiammatorie acute o croniche, o di patologie autoimmuni;
- assunzione di terapie corticosteroidee o di altre terapie antinfiammatorie;
- ospedalizzazione recente (<3 mesi) per malattie infettive;
- rifiuto o incapacità del paziente di fornire il consenso informato.

I pazienti saranno arruolati al termine dell'angiografia coronarica, una volta accertata la presenza dei criteri di inclusione e l'assenza di controindicazioni all'esecuzione dello studio.

Lo studio PHENO-DIACAD include le valutazioni clinico-strumentali mostrate in **figura 4** e di seguito elencate.

1.Valutazione con OCT delle placche aterosclerotiche coronariche e valutazione angiografica del burden di malattia

Tutte le placche aterosclerotiche ostruttive saranno esaminate mediante OCT nei laboratori di emodinamica delle Aziende Ospedaliero-Universitarie di Parma e di Ferrara. Le immagini verranno acquisite mediante l'utilizzo di un catetere intracoronarico dedicato, effettuando un pullback alla velocità di 20mm/sec. Successivamente, le immagini saranno analizzate offline tramite workstation (Ilumien Optis, St. Jude Medical) [12] per valutare i seguenti parametri:

- area minima del lume (MLA): l'area minima del lume verrà misurata lungo l'intero decorso del segmento coronarico esaminato.

- composizione della placca aterosclerotica:
 - placche lipidiche con cappuccio fibroso sottile (TCFA): le placche lipidiche sono identificate in presenza di un arco lipidico superiore a 90° in almeno una sezione trasversale della placca. L'indice lipidico sarà calcolato come prodotto dell'arco lipidico medio per la lunghezza lipidica. Sarà, inoltre, quantificato lo spessore del cappuccio fibroso, definito come una banda iperintensa omogenea che ricopre il core lipidico della placca. Un cappuccio fibroso $< 75 \mu\text{m}$ sarà diagnosticato come TCFA.
 - placche calcifiche: le calcificazioni saranno identificate come aree ipointense con bordi netti all'interno della placca. Verranno ulteriormente classificate in:
 - calcificazioni “spotty” (arco massimo $<90^\circ$ e lunghezza $<4 \text{ mm}$);
 - macro-calcificazioni (arco massimo $\geq 90^\circ$ o lunghezza $\geq 4 \text{ mm}$).
 - placche “healed”: considerate tali se presentano almeno tre strati consecutivi con segnali di diversa densità ottica e una chiara demarcazione rispetto ai componenti sottostanti.
- presenza di macrofagi intralesionali: i macrofagi saranno identificati come regioni ricche di segnali puntiformi o confluenti che superano l'intensità delle regioni circostanti.

Infine, il punteggio angiografico di Gensini sarà determinato per quantificare il grado e la localizzazione delle stenosi arteriose, fornendo un'indicazione del carico aterosclerotico complessivo [31].

2.Valutazione del fenotipo clinico del T2DM

Durante il ricovero presso l'Unità di Cardiologia, ogni paziente sarà sottoposto a una raccolta

approfondita della storia clinica e a un esame fisico mirato per individuare la presenza di DMC, permettendo di assegnare ciascun paziente a uno dei due gruppi di studio (DMC+ o DMC-).

Le valutazioni specifiche per identificare queste complicanze includeranno:

1. Retinopatia diabetica (DR): uno specialista in oculistica eseguirà una retinografia per analizzare il fondo oculare. La retinopatia sarà classificata, secondo la classificazione dell'International Council of Ophthalmology [2], come:
 - non proliferante (stadi 2-4);
 - proliferante (stadio 5).
2. Neuropatia diabetica (DN):
 - la neuropatia periferica sarà valutata tramite il Michigan Neuropathy Screening Instrument [32];
 - la neuropatia autonoma sarà indagata utilizzando il questionario COMPASS 31 [33].
3. Nefropatia diabetica (DKD): per valutare la microangiopatia renale sarà raccolto un campione urinario per la misurazione del rapporto albumina/creatinina. Un valore di albuminuria compreso tra 30 e 300 mg/g sarà considerato indicativo di microalbuminuria [2].

Queste indagini cliniche e strumentali permetteranno di classificare i pazienti nel gruppo DMC+ (presenza di almeno una complicanza microangiopatica, ovvero DR, DN o DKD) o nel gruppo DMC- (assenza di complicanze microangiopatiche).

3.Valutazione del flusso ematico retinico mediante tecnologia Laser speckle flowgraphy (LSFG).

Questa sotto-analisi dello studio PHENO-DIACAD sarà effettuata sui pazienti reclutati presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e si concentrerà sull'utilizzo della Laser Speckle

Flowgraphy (LSFG). Questo dispositivo, composto da una fotocamera per il fundus (RetFlow, Nidek Co. LTD, Giappone) e un laser a diodo da 830 nm con una fotocamera CCD digitale (750 x 360 pixel), consente di quantificare il Mean Blur Rate (MBR), un parametro che riflette la velocità del flusso sanguigno retinico e coroidale [34]. L'uso della LSFG può rappresentare uno strumento essenziale per individuare precocemente le alterazioni della rete vascolare retinica e coroidale. Monitorare questi cambiamenti permette di approfondire i meccanismi biologici della DR e di studiare la correlazione tra i suoi stadi iniziali, l'attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo, la distribuzione delle sottopopolazioni di MON e le caratteristiche delle placche aterosclerotiche (in termini sia quantitativi che qualitativi).

4.Valutazione dei monociti circolanti e dei marcatori osteocalcifici e infiammatori

Il giorno successivo all'arruolamento, ogni paziente ricoverato presso l'Unità di Cardiologia sarà sottoposto a un prelievo di sangue venoso (5 ml) in EDTA per l'analisi dei MON circolanti e dei marcatori osteocalcifici e infiammatori. Il protocollo di analisi prevede la lisi dei globuli rossi, seguita dall'incubazione di 150 µL di sangue con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi specifici per CD14, CD16, OCN e BAP. Questa preparazione consente di identificare e quantificare le diverse sottopopolazioni di monociti: classici (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermedi (CD14⁺ CD16⁺), non classici (CD14⁺ CD16⁺⁺) e osteogenici (CD14⁺-OCN⁺-BAP⁺). Le analisi saranno eseguite tramite citometria a flusso utilizzando un citometro BD FACSAria™ (Becton Dickinson), con l'ausilio del software BD FACSDiva, sotto la supervisione di un operatore esperto [35]. Inoltre, saranno misurati i livelli ematici dei principali marcatori di calcificazione vascolare, tra cui osteoprotegerina, fetuina A, OCN, osteopontina, sclerostina e fattore di crescita dei fibroblasti 23, tramite metodica ELISA. Inoltre, sarà effettuata un'analisi proteomica completa di 96 proteine infiammatorie (Olink company) per una valutazione dettagliata del profilo infiammatorio sistemico dei pazienti.

5. Valutazione dell'asse amigdala-midollo osseo e del burden infiammatorio vascolare

Entro dieci giorni dall'arruolamento, i pazienti saranno sottoposti a PET/TC con 18F-FDG, eseguita presso la Divisione di Medicina Nucleare delle strutture partecipanti. La procedura inizierà con una misurazione della glicemia per assicurarsi che sia <10 mmol/l. A digiuno da almeno 8 ore, verrà somministrata una dose di 18F-FDG di 3 MBq/kg, e le immagini saranno acquisite 60 minuti dopo l'iniezione tramite scanner 3D integrati (Discovery IQ, GE Healthcare a Parma e Biograph mCT flow, Siemens Medical Solutions a Ferrara).

Protocollo di acquisizione delle immagini

Il protocollo PET/TC prevede un topogramma per definire il campo visivo, seguito da una scansione TC a basso dosaggio (120 kV, 50 mA) senza contrasto per la correzione dell'attenuazione e la correlazione anatomica.

Analisi delle immagini

L'analisi, centralizzata a Parma, sarà effettuata in cieco da due medici nucleari su workstation Advantage 4.0 (GE Healthcare). Per valutare l'accordo inter-osservatore, verranno calcolati i coefficienti di correlazione intra-classe. I risultati di uptake del tracciante FDG nei tessuti target saranno espressi come SUVmax e SUVmean, oltre ai TBR (Target-to-Background Ratios).

Misurazione dell'attività dell'amigdala (AmygA)

L'amigdala sarà localizzata tramite punti di riferimento anatomici TC e l'uptake di FDG verrà quantificato posizionando ROIs 3D nelle amigdale destra e sinistra. L'attività sarà corretta rispetto all'attività cerebrale di fondo calcolando il TBR (SUVmax dell'amigdala/SUVmean dei lobi temporali ipsilaterali). Per ogni paziente, sarà considerato l'AmygA con valore più alto [19].

Misurazione dell'attività ematopoietica

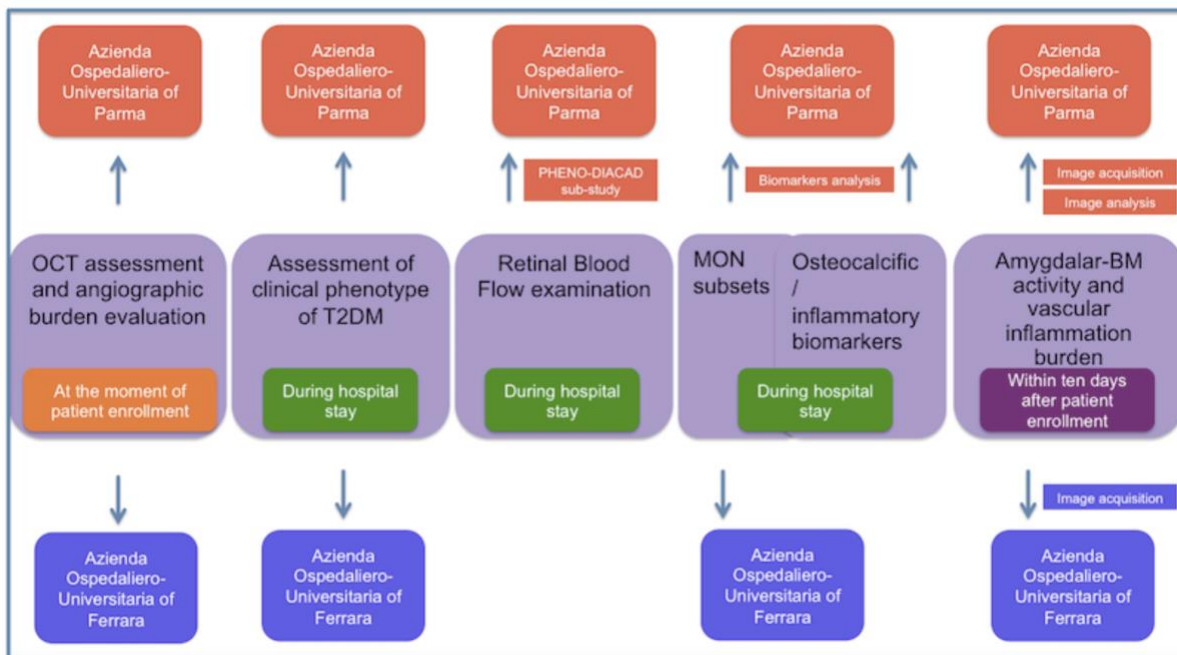
Il midollo osseo sarà analizzato posizionando ROIs 3D in ciascuna vertebra da T1 a L5, registrando SUVmax per ogni vertebra e calcolando l'attività BM come media di questi valori. Per la milza, verranno misurate le ROIs nelle sezioni assiale, sagittale e coronale, e il valore medio dei tre SUVmax rappresenterà l'attività splenica. L'attivazione del midollo osseo sarà definita in base ad un SUVmax superiore alla mediana [36].

Misurazione dell'inflammazione vascolare

L'assorbimento di FDG nelle arterie sarà analizzato tramite ROIs a livello delle lesioni, sommando il punteggio di captazione per dieci segmenti arteriosi (aorta e arterie principali). I valori di captazione saranno classificati da 0 a 3 (da nessuna captazione ad una captazione superiore a quella epatica). I valori medi e massimi di SUV saranno riportati come TBRmax e TBRmean, calcolati dividendo SUVmax o SUVmean dei segmenti arteriosi per il SUVmean del pool venoso.

Questo protocollo permette una dettagliata valutazione delle attività infiammatorie e metaboliche nell'intero sistema vascolare e nelle principali strutture anatomiche, fornendo dati cruciali per correlare i livelli di infiammazione e calcificazione con la patologia diabetica e l'aterosclerosi [37].

Figura 4. Valutazioni clinico-strumentali previste nello studio PHENO-DIACAD



Analisi statistica

Il calcolo della dimensione campionaria è stato effettuato tenendo in considerazione gli endpoint primari (la percentuale di attivazione dell'asse amigdala-BM mediante FDG-PET/CT e la prevalenza di MON circolanti osteogenici (CD14+-OCN+-BAP+) nei pazienti con T2DM in base alla presenza/assenza di DMC utilizzando evidenze presenti nella letteratura scientifica.

- Percentuale di attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo alla FDG-PET/CT:
Considerando studi precedenti che riportano una percentuale di attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo al FDG-PET/CT intorno al 63% nei pazienti con T2DM e una differenza relativa del 43% nell'incidenza di MACE a medio termine tra DMC+ e DMC- [17], abbiamo calcolato che una dimensione campionaria di 52 pazienti per ciascun gruppo assicura una potenza statistica dell'80% per rilevare una differenza statisticamente significativa nella percentuale di attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo utilizzando il test statistico Chi-quadro, considerando un livello di significatività (alfa) di 0.050.

- Prevalenza del sottogruppo di MON CD14+-OCN+-BAP all'analisi citofluorimetrica:
sulla base di un precedente studio che ha osservato una differenza nella prevalenza di MON osteogenici (CD14+-OCN+-BAP+) nei soggetti diabetici con e senza malattie cardiovascolari [29], abbiamo calcolato che una dimensione campionaria di 60 pazienti per ciascun gruppo assicura una potenza dell'80.523% per rilevare una differenza di $\mu_1 - \mu_2 = 1.6 - 2.4 = -0.8$ utilizzando il test statistico U di Mann-Whitney o il test Wilcoxon Rank-Sum, assumendo che la distribuzione dei dati sia normale e con un livello di significatività (alfa) di 0.050 e deviazione standard di 1.5 in entrambi i gruppi.

Per essere il più cauti possibile, abbiamo pianificato di adottare la dimensione campionaria più ampia tra le due calcolate. Pertanto, è previsto l'arruolamento di un totale di 120 pazienti affetti da T2DM (60 DMC+ e 60 DMC-).

Considerato il numero di pazienti affetti da CAD e T2DM ricoverati annualmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e di Ferrara, si prevede un potenziale arruolamento di un numero di pazienti che soddisfino i criteri di inclusione compreso tra un minimo di 40 e un massimo di 60 casi all'anno per ciascun centro. L'arruolamento sarà competitivo. Inoltre, una volta completato l'arruolamento in uno dei due gruppi di studio (DMC+ e DMC-), il reclutamento continuerà nell'altro gruppo di studio fino al raggiungimento della dimensione totale del campione programmata.

Le variabili continue saranno espresse come media aritmetica e deviazione standard o valore mediano con range interquartile, mentre le variabili quantitative saranno espresse come frequenze assolute e percentuali. I test statistici Student t o Mann-Whitney U saranno utilizzati per confrontare le variabili continue a seconda della presenza o meno di una distribuzione

normale dei valori, mentre il test Chi-quadro o il test esatto di Fisher saranno utilizzati per confrontare le variabili categoriche.

I confronti delle caratteristiche delle placche aterosclerotiche all'analisi OCT saranno eseguiti utilizzando un approccio GEE (generalized estimating equations) per minimizzare eventuali bias dati dalla presenza di lesioni aterosclerotiche multiple in un singolo paziente. Infine, la presenza di eventuali assi fisio-anatomici, in particolare l'asse amigdala-midollo osseo, sarà testata mediante analisi statistiche di mediazione. Tutti i test statistici saranno eseguiti con alfa a due code = 0.05 e intervallo di confidenza del 95%.

Considerazioni etiche

Lo studio PHENO-DIACAD è stato approvato dal Comitato Etico Territoriale “Area Vasta Emilia Nord” in data 09/04/2024.

Il Nucleo Provinciale di Valutazione ha espresso parere favorevole all'acquisizione dell'OCT in data 12/09/2024.

Tutti i pazienti considerati per lo studio forniranno un consenso informato scritto per essere arruolati nello studio PHENO-DIACAD.

Finanziamento dello studio

Lo studio è stato finanziato dal Ministero dell'Istruzione e della Ricerca tramite bandi PRIN 2022 – settore LS4. Il finanziamento complessivo ammonterà a 231.431 euro.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio PHENO-DIACAD, attraverso una valutazione approfondita dei due gruppi di pazienti con e senza complicanze microvascolari del diabete (DMC+ e DMC-), si pone i seguenti obiettivi:

Endpoint primario:

1. Attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo: valutata attraverso l'analisi dell'assorbimento di 18F-FDG con PET/CT per quantificare l'attivazione dell'amigdala e del midollo osseo.
2. Prevalenza di MON circolanti CD14+-OCN+-BAP+: i MON osteocalcifici saranno quantificati tramite analisi citometrica per stabilire la loro prevalenza nei due gruppi di studio.

Endpoint secondari:

1. Analisi OCT delle placche coronariche:
 - Valutazione della prevalenza di TCFA, placche calcifiche e “healed”
 - Identificazione della presenza di macrofagi e calcolo dell' MLA.
 - Determinazione del punteggio di Gensini per quantificare il burden angiografico di CAD.
2. Analisi laboratoristica dei sottogruppi MON e biomarcatori:
 - Valutazione dei sottogruppi MON (classici, intermedi e non classici) per quantificarne la prevalenza nei due gruppi.
 - Misurazione dei marcatori di calcificazione vascolare e infiammatori per analizzare le differenze tra pazienti DMC+ e DMC-.
3. Attività infiammatoria vascolare:
 - Valutazione dell'attività infiammatoria nei segmenti arteriosi con FDG-PET/CT per stabilire l'intensità dell'infiammazione arteriosa in dieci segmenti principali.

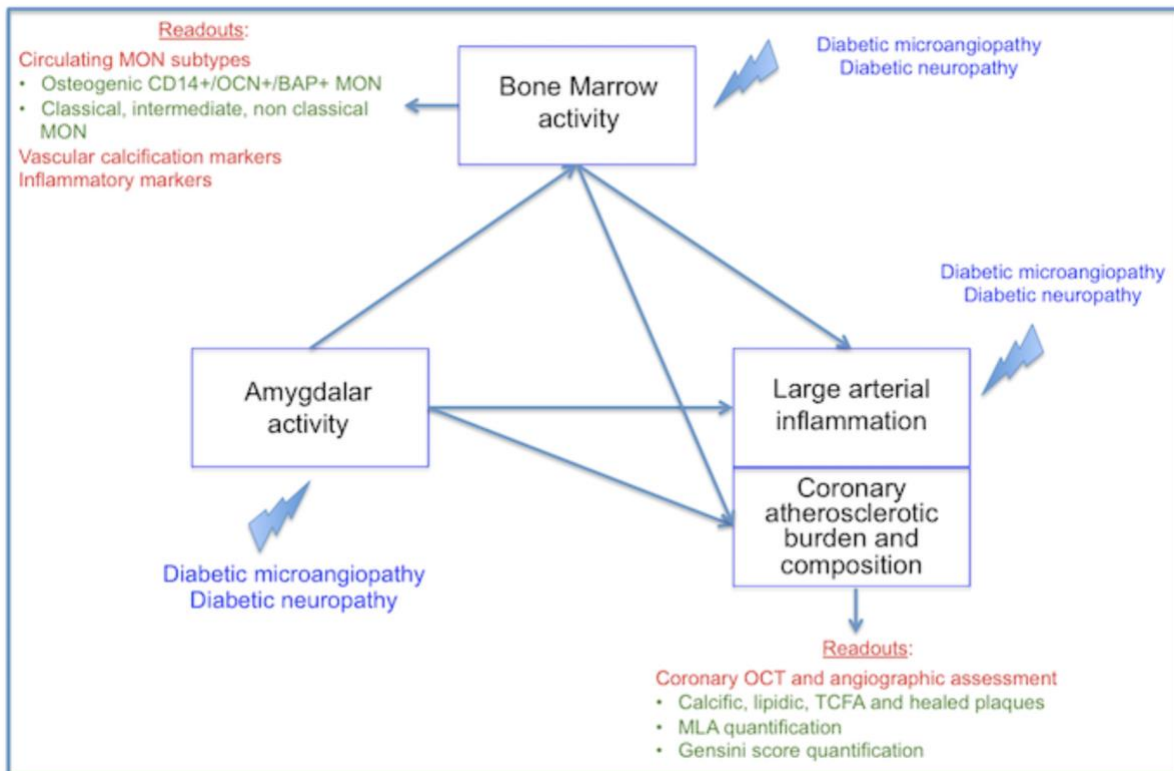
4. Correlazione tra asse amigdala-BM e variabili infiammatorie e aterosclerotiche:
 - Analisi della relazione tra l'attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo, rilevata con FDG-PET/CT, e i parametri descritti negli endpoint secondari (OCT, marcatori infiammatori e calcificazioni).
5. Associazione con flusso sanguigno retinico e coroideale (LSFG):
 - Correlazione tra la velocità del flusso sanguigno retinico e coroideale, misurata con LSFG, e i risultati ottenuti dagli endpoint primari e secondari.
6. Associazione con ciascuna complicanza microvascolare:
 - Analisi della correlazione tra le singole complicanze microangiopatiche del diabete (neuropatia diabetica, nefropatia diabetica e retinopatia diabetica) e i parametri analizzati negli endpoint primari e secondari.

Questi endpoint permetteranno di ottenere una visione dettagliata dell'interazione tra infiammazione sistemica, attività ematopoietica e complicanze microangiopatiche in pazienti con T2DM, contribuendo ad una migliore comprensione della progressione dell'aterosclerosi e delle calcificazioni vascolari.

4. RISULTATI ATTESI DELLO STUDIO

Partendo dalle evidenze presenti in letteratura scientifica, abbiamo ipotizzato che il gruppo DMC+ possa mostrare una maggior prevalenza di attivazione dell'asse amigdala-midollo osseo e del sottotipo MON osteocalcifico (CD14+-OCN+-BAP+) rispetto ai pazienti DMC-. Tali risultati potrebbero spiegare la CAD più estesa, ma con caratteristiche di stabilità, osservata in studi precedenti [17] nei pazienti DMC+, rispetto al gruppo DMC- (**Figura 5**).

Figura 5. Razionale dello studio PHENO-DIACAD



5. POSSIBILI RIPERCUSSIONI DELLO STUDIO

Lo studio PHENO-DIACAD mira a fornire una comprensione più approfondita dei meccanismi biologici e fisiopatologici che determinano lo sviluppo della CAD nei pazienti affetti da T2DM.

Ripercussioni cliniche

Lo studio PHENO-DIACAD si propone di identificare fenotipi specifici di T2DM (DMC+ versus DMC-) diversi in termini di fisiopatologia e caratteristiche cliniche che potrebbero riflettersi in differenze qualitative e quantitative della CAD. Inoltre, si propone di valutare eventuali differenze in sottogruppi con diverso coinvolgimento diabetico microvascolare DMC diverse (DR, DN, DKD). Questi risultati potrebbero fornire una base scientifica per colmare la mancanza di raccomandazioni cliniche mirate per la diagnosi, la gestione e il trattamento di particolari sottogruppi di T2DM, contribuendo alla personalizzazione della terapia diabetica e cardiovascolare.

Ripercussioni fisiopatologiche

Lo studio PHENO-DIACAD potrebbe chiarire la natura dell'infiammazione coronarica nella CAD diabetica, distinguendo tra processi infiammatori locali nelle placche coronariche e infiammazione sistemica generalizzata, potenzialmente rilevando biomarcatori specifici associati a queste due diverse condizioni fisiopatologiche. Inoltre, potrebbe indirizzare verso l'identificazione di marcatori associati alla vulnerabilità della CAD nel T2DM, tra cui indicatori di infiammazione e calcificazione che potrebbero indicare fenotipi a maggior rischio di CAD con fenotipo vulnerabile.

Ripercussioni diagnostiche

Lo studio PHENO-DIACAD integra metodiche diagnostiche avanzate per approfondire la conoscenza sui meccanismi alla base della CAD nel T2DM. Le tecniche utilizzate, tra cui la valutazione dell'asse amigdala-midollo osseo tramite FDG-PET/CT, l'analisi dei diversi

sottotipi di monociti (MON), e un ampio pannello di biomarcatori infiammatori e osteogenici, potrebbero identificare nuovi attori implicati nella genesi e progressione della CAD in questo contesto.

L'impiego dell'FDG-PET/CT consente di monitorare l'attività dell'amigdala e del midollo osseo, due componenti chiave del sistema immunitario coinvolte nel processo infiammatorio, offrendo potenzialmente una nuova chiave interpretativa sull'infiammazione cronica alla base dell'aterosclerosi diabetica. Inoltre, la correlazione di tali marcatori con l'analisi dettagliata delle caratteristiche fenotipiche della CAD mediante OCT potrebbe contribuire a chiarire il motivo per cui l'aterosclerosi si sviluppa con caratteristiche di stabilità (predominanza di placche calcifiche e "healed") o instabilità (prevalenza di placche lipidiche e infiammate) nei diversi pazienti. Pertanto, lo studio PHENO-DIACAD potrebbe identificare nuovi marcatori di stabilità e vulnerabilità della CAD, contribuendo a migliorare la stratificazione del rischio di CAD nel singolo individuo.

Ripercussioni terapeutiche

Lo studio PHENO-DIACAD si propone di delineare nuovi bersagli terapeutici per la prevenzione della CAD e nuovi target protettivi in grado di ridurre il carico aterosclerotico e promuovere la stabilizzazione delle placche. Lo studio PHENO-DIACAD offrirà quindi una base razionale per futuri studi farmacologici. Infine, sottolineando il ruolo dell'AmyGA nell'incremento del rischio di CAD, questo studio potrebbe suggerire di ampliare gli approcci terapeutici. Questo potrebbe portare ad un approccio terapeutico multidisciplinare, che include strategie di gestione dello stress accanto a interventi cardiovascolari tradizionali, con l'obiettivo di ridurre il rischio cardiovascolare in maniera olistica.

È importante sottolineare come questi risultati potrebbero essere di interesse generale e non limitati alla sola popolazione diabetica.

In sintesi, lo studio PHENO-DIACAD potrebbe segnare un cambio di paradigma nella diagnosi e nella terapia della CAD, incoraggiando un approccio personalizzato e innovativo per la gestione della CAD, sia nei pazienti diabetici che non diabetici. Questo studio potrebbe offrire una base solida per futuri studi farmacologici finalizzati a prevenire la CAD e a stabilizzare le placche aterosclerotiche, contribuendo ad un significativo sviluppo della medicina cardiovascolare personalizzata.

6. ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI

L'arruolamento dei pazienti è iniziato a marzo 2025, in seguito all'implementazione del dispositivo OCT presso il laboratorio di Emodinamica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Si prevede un tempo complessivo di arruolamento dei pazienti di 12 mesi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Marx, N., Federici, M., Schütt, K., Müller-Wieland, D., Ajjan, R. A., Antunes, M. J., Christodorescu, R. M., Crawford, C., Di Angelantonio, E., Eliasson, B., Espinola-Klein, C., Fauchier, L., Halle, M., Herrington, W. G., Kautzky-Willer, A., Lambrinou, E., Lesiak, M., Lettino, M., McGuire, D. K., Mullens, W., ... ESC Scientific Document Group (2023). 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes. *European heart journal*, 44(39), 4043–4140. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad192>
2. American Diabetes Association (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 27 Suppl 1, S5–S10. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.2007.s5>
3. Juutilainen, A., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., & Laakso, M. (2005). Type 2 diabetes as a "coronary heart disease equivalent": an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes care*, 28(12), 2901–2907. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.12.2901>
4. Li, Y., Liu, Y., Liu, S., Gao, M., Wang, W., Chen, K., Huang, L., & Liu, Y. (2023). Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 152. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01400-z>
5. Medina-Leyte, D. J., Zepeda-García, O., Domínguez-Pérez, M., González-Garrido, A., Villarreal-Molina, T., & Jacobo-Albavera, L. (2021). Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3850. <https://doi.org/10.3390/ijms22083850>

6. Kong, P., Cui, Z. Y., Huang, X. F., Zhang, D. D., Guo, R. J., & Han, M. (2022). Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 131. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7>
7. Bhatti, J. S., Sehrawat, A., Mishra, J., Sidhu, I. S., Navik, U., Khullar, N., Kumar, S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2022). Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free radical biology & medicine*, 184, 114–134. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.019>
8. Kosmopoulos, M., Drekolias, D., Zavras, P. D., Piperi, C., & Papavassiliou, A. G. (2019). Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(3), 611–619. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.006>
9. Stegenga, M. E., van der Crabben, S. N., Levi, M., de Vos, A. F., Tanck, M. W., Sauerwein, H. P., & van der Poll, T. (2006). Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans. *Diabetes*, 55(6), 1807–1812. <https://doi.org/10.2337/db05-1543>
10. Singla, A., Antonino, M. J., Bliden, K. P., Tantry, U. S., & Gurbel, P. A. (2009). The relation between platelet reactivity and glycemic control in diabetic patients with cardiovascular disease on maintenance aspirin and clopidogrel therapy. *American heart journal*, 158(5), 784.e1–784.e7846. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2009.08.013>
11. Gurgoglione, F. L., Denegri, A., Russo, M., Calvieri, C., Benatti, G., & Niccoli, G. (2023). Intracoronary Imaging of Coronary Atherosclerotic Plaque: From Assessment of Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Implication. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5155. <https://doi.org/10.3390/ijms24065155>

12. Araki, M., Park, S. J., Dauerman, H. L., Uemura, S., Kim, J. S., Di Mario, C., Johnson, T. W., Guagliumi, G., Kastrati, A., Joner, M., Holm, N. R., Alfonso, F., Wijns, W., Adriaenssens, T., Nef, H., Rioufol, G., Amabile, N., Souteyrand, G., Meneveau, N., Gerbaud, E., ... Jang, I. K. (2022). Optical coherence tomography in coronary atherosclerosis assessment and intervention. *Nature reviews. Cardiology*, 19(10), 684–703. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00687-9>
13. Sugiyama, T., Yamamoto, E., Bryniarski, K., Xing, L., Fracassi, F., Lee, H., & Jang, I. K. (2018). Coronary Plaque Characteristics in Patients With Diabetes Mellitus Who Presented With Acute Coronary Syndromes. *Journal of the American Heart Association*, 7(14), e009245. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009245>
14. Niccoli, G., Giubilato, S., Di Vito, L., Leo, A., Cosentino, N., Pitocco, D., Marco, V., Ghirlanda, G., Prati, F., & Crea, F. (2013). Severity of coronary atherosclerosis in patients with a first acute coronary event: a diabetes paradox. *European heart journal*, 34(10), 729–741. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs393>
15. Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2019). Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists. *International journal of cardiology*, 291, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.02.030>
16. Rosenson, R. S., Fioretto, P., & Dodson, P. M. (2011). Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes?. *Atherosclerosis*, 218(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.029>
17. Montone, R. A., Pitocco, D., Gurgoglione, F. L., Rinaldi, R., Del Buono, M. G., Camilli, M., Rizzi, A., Tartaglione, L., Rizzo, G. E., Di Leo, M., Flex, A., Russo, M., Liuzzo, G., Magnani, G., Bonadonna, R. C., Ardissino, D., Crea, F., & Niccoli, G. (2022). Microvascular complications identify a specific coronary atherosclerotic phenotype in

- patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology*, 21(1), 211.
<https://doi.org/10.1186/s12933-022-01637-y>
18. Kang, D. O., Eo, J. S., Park, E. J., Nam, H. S., Song, J. W., Park, Y. H., Park, S. Y., Na, J. O., Choi, C. U., Kim, E. J., Rha, S. W., Park, C. G., Seo, H. S., Kim, C. K., Yoo, H., & Kim, J. W. (2021). Stress-associated neurobiological activity is linked with acute plaque instability via enhanced macrophage activity: a prospective serial 18F-FDG-PET/CT imaging assessment. *European heart journal*, 42(19), 1883–1895.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa1095>
19. Tawakol, A., Ishai, A., Takx, R. A., Figueroa, A. L., Ali, A., Kaiser, Y., Truong, Q. A., Solomon, C. J., Calcagno, C., Mani, V., Tang, C. Y., Mulder, W. J., Murrough, J. W., Hoffmann, U., Nahrendorf, M., Shin, L. M., Fayad, Z. A., & Pitman, R. K. (2017). Relation between resting amygdalar activity and cardiovascular events: a longitudinal and cohort study. *Lancet (London, England)*, 389(10071), 834–845. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31714-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31714-7)
20. Parashar, A., Mehta, V., & Malairaman, U. (2018). Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated with Social Recognition Memory Deficit and Altered Dopaminergic Neurotransmission in the Amygdala. *Annals of neurosciences*, 24(4), 212–220.
<https://doi.org/10.1159/000479637>
21. Dang, Z., Maselli, D., Spinetti, G., Sangalli, E., Carnelli, F., Rosa, F., Seganfredo, E., Canal, F., Furlan, A., Paccagnella, A., Paiola, E., Lorusso, B., Specchia, C., Albiero, M., Cappellari, R., Avogaro, A., Falco, A., Quaini, F., Ou, K., Rodriguez-Arabaolaza, I., ... Madeddu, P. (2015). Sensory neuropathy hampers nociception-mediated bone marrow stem cell release in mice and patients with diabetes. *Diabetologia*, 58(11), 2653–2662.
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3735-0>

22. Rupprecht, S., Finn, S., Hoyer, D., Guenther, A., Witte, O. W., Schultze, T., & Schwab, M. (2020). Association Between Systemic Inflammation, Carotid Arteriosclerosis, and Autonomic Dysfunction. *Translational stroke research*, 11(1), 50–59. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00706-x>
23. Libby P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2045–2051. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>
24. Fang, F., Xiao, C., Li, C., Liu, X., & Li, S. (2022). Tuning macrophages for atherosclerosis treatment. *Regenerative biomaterials*, 10, rbac103. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac103>
25. Choi, S. H., Kim, J. H., Lim, S., Lim, J. Y., Kim, K. W., Park, K. S., & Jang, H. C. (2017). Monocyte count as a predictor of cardiovascular mortality in older Korean people. *Age and ageing*, 46(3), 433–438. <https://doi.org/10.1093/ageing/afw226>
26. Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic research*, 53(1-3), 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
27. Dregoes, M. I., Țigu, A. B., Bekkering, S., van der Heijden, C. D. C. C., Rodwell, L., Bolboacă, S. D., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Riksen, N. P., & Iancu, A. C. (2024). Intermediate monocytes are associated with the first major adverse cardiovascular event in patients with stable coronary artery disease. *International journal of cardiology*, 400, 131780. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2024.131780>
28. Yamamoto, H., Yoshida, N., Shinke, T., Otake, H., Kuroda, M., Sakaguchi, K., Hirota, Y., Toba, T., Takahashi, H., Terashita, D., Uzu, K., Tahara, N., Shinkura, Y., Kuroda, K., Nagasawa, Y., Nagano, Y., Tsukiyama, Y., Yanaka, K. I., Emoto, T., Sasaki, N., ... Hirata, K. I. (2018). Impact of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients. *Atherosclerosis*, 269, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.010>

29. Fadini, G. P., Albiero, M., Menegazzo, L., Boscaro, E., Vigili de Kreutzenberg, S., Agostini, C., Cabrelle, A., Binotto, G., Rattazzi, M., Bertacco, E., Bertorelle, R., Biasini, L., Mion, M., Plebani, M., Ceolotto, G., Angelini, A., Castellani, C., Menegolo, M., Grego, F., Dimmeler, S., ... Avogaro, A. (2011). Widespread increase in myeloid calcifying cells contributes to ectopic vascular calcification in type 2 diabetes. *Circulation research*, 108(9), 1112–1121. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234088>
30. Collin, J., Gössl, M., Matsuo, Y., Cilluffo, R. R., Flammer, A. J., Loeffler, D., Lennon, R. J., Simari, R. D., Spoon, D. B., Erbel, R., Lerman, L. O., Khosla, S., & Lerman, A. (2015). Osteogenic monocytes within the coronary circulation and their association with plaque vulnerability in patients with early atherosclerosis. *International journal of cardiology*, 181, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.11.156>
31. Neeland, I. J., Patel, R. S., Eshtehardi, P., Dhawan, S., McDaniel, M. C., Rab, S. T., Vaccarino, V., Zafari, A. M., Samady, H., & Quyyumi, A. A. (2012). Coronary angiographic scoring systems: an evaluation of their equivalence and validity. *American heart journal*, 164(4), 547–552.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.07.007>
32. Herman, W. H., Pop-Busui, R., Braffett, B. H., Martin, C. L., Cleary, P. A., Albers, J. W., Feldman, E. L., & DCCT/EDIC Research Group (2012). Use of the Michigan Neuropathy Screening Instrument as a measure of distal symmetrical peripheral neuropathy in Type 1 diabetes: results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 29(7), 937–944. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03644.x>
33. Greco, C., Di Gennaro, F., D'Amato, C., Morganti, R., Corradini, D., Sun, A., Longo, S., Lauro, D., Pierangeli, G., Cortelli, P., & Spallone, V. (2017). Validation of the Composite Autonomic Symptom Score 31 (COMPASS 31) for the assessment of symptoms of

- autonomic neuropathy in people with diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 34(6), 834–838. <https://doi.org/10.1111/dme.13310>
34. Calzetti, G., Mora, P., Favilla, S., Ottonelli, G., Devincenzi, G., Carta, A., Tedesco, S., Mursch-Edlmayr, A., Garhöfer, G., Gandolfi, S., & Schmetterer, L. (2020). Assessment of Choroidal Neovascularization Perfusion: A Pilot Study With Laser Speckle Flowgraphy. *Translational vision science & technology*, 9(5), 9. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.5.9>
35. Derlindati E, et al. Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0119751.
36. Emami, H., Singh, P., MacNabb, M., Vucic, E., Lavender, Z., Rudd, J. H., Fayad, Z. A., Lehrer-Graiwer, J., Korsgren, M., Figueroa, A. L., Fredrickson, J., Rubin, B., Hoffmann, U., Truong, Q. A., Min, J. K., Baruch, A., Nasir, K., Nahrendorf, M., & Tawakol, A. (2015). Splenic metabolic activity predicts risk of future cardiovascular events: demonstration of a cardiosplenic axis in humans. *JACC. Cardiovascular imaging*, 8(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2014.10.009>
37. Slart, R. H. J. A., Writing group, Reviewer group, Members of EANM Cardiovascular, Members of EANM Infection & Inflammation, Members of Committees, SNMMI Cardiovascular, Members of Council, PET Interest Group, Members of ASNC, & EANM Committee Coordinator (2018). FDG-PET/CT(A) imaging in large vessel vasculitis and polymyalgia rheumatica: joint procedural recommendation of the EANM, SNMMI, and the PET Interest Group (PIG), and endorsed by the ASNC. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 45(7), 1250–1269. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3973-8>