

## Instabilità di placca e attivazione del sistema immunitario. Verso un vaccino per l'infarto?

Paolo Golino, Beniamino Casillo, Marco Malvezzi, Raffaele De Palma\*

Cattedra di Cardiologia, Seconda Università di Napoli

A.O. S. Anna e S. Sebastiano - Caserta

\*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Seconda Università di Napoli

### Riassunto

Durante l'ultima decade, il coinvolgimento del sistema immune nella fisiopatologia delle sindromi coronariche acute (SCA) è stato ripetutamente suggerito da diversi studi. Solo recentemente, tuttavia, uno studio del nostro gruppo, prendendo vantaggio da campioni di placca prelevati mediante aterectomia coronarica direzionale, ha direttamente dimostrato per la prima volta l'esistenza di una reazione infiammatoria antigene-dipendente all'interno delle lesioni "culprit" di pazienti con SCA. Questa reazione rappresenta un fenomeno locale, poiché non è stato possibile evidenziare nessuna attivazione periferica del sistema immunitario. Questi dati suggeriscono che l'instabilità di placca è il risultato di una attivazione antigene-mediata dei linfociti T. Possibili antigeni implicati in questo fenomeno sono antigeni microbici o antigeni self modificati e riconosciuti come estranei, come le lipoproteine ossidate. Studi ulteriori saranno necessari per identificare la natura dell'antigene(); l'identificazione di tale antigeni potrebbe portare allo sviluppo di strategie farmacologiche innovative mirate a prevenire la complicanza della placca su base immunologica.

### Summary

In the last 10 years, the involvement of the immune system in the pathophysiology of acute coronary syndromes (ACS) has been repeatedly suggested. It was only recently, however, that a study from our group using human atherosclerotic plaque specimens obtained during directional atherectomy directly demonstrated for the first time the existence of an antigen-driven inflammatory reaction present in the culprit lesions of patients with ACS. This reaction is a local phenomenon, as no peripheral activation of the immune system was observed. These findings suggest that plaque instability occurs as a result of antigen-driven T-cell activation. Putative antigens for the observed phenomenon might be microbial or modified self-antigens such as oxidized lipoproteins. Further studies are needed to identify the antigen(s) responsible for the activation of T cells within the unstable lesions. Identification of such antigen(s) could lead to pharmacological strategies aimed at preventing antigen-mediated plaque complications in high-risk patients.

**Parole chiave:** Sindromi coronariche acute, Placca instabile, Sistema immunitario

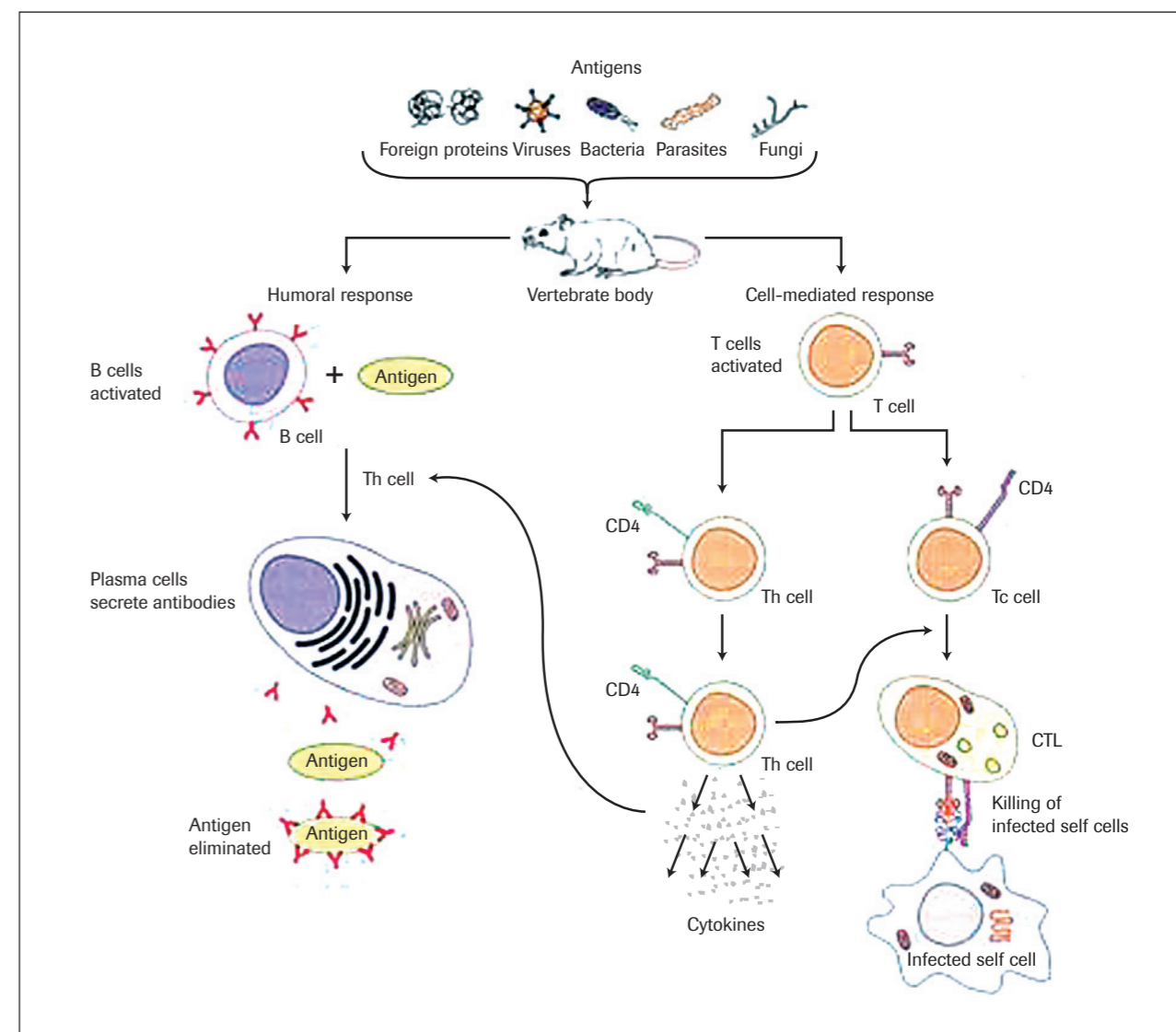
**Key words:** Acute coronary syndromes, Unstable plaque, Immune system

### Il contesto clinico

L'aterosclerosi è una malattia della parete arteriosa delle arterie di medio e grande calibro, compresa l'aorta, le carotidi, le coronarie e le arterie periferiche. Sebbene da tempo siano stati identificati fattori di rischio multipli in grado di contribuire in maniera variabile all'insorgenza e alla progressione dell'aterosclerosi, è oggi riconosciuto dalla maggior parte dei ricercatori che la velocità con la quale si sviluppano le lesioni aterosclerotiche sia il risultato dell'interazione del "background" genetico di un determinato individuo con l'ambiente, inteso come

presenza dei fattori di rischio classici.

Le sindromi coronariche acute (SCA) rappresentano la complicanza più temibile dell'aterosclerosi localizzata a livello coronarico e sono di solito scatenate dalla complicanza improvvisa di un ateroma. La complicanza (rottura, ulcerazione, etc) di una placca aterosclerotica coronarica è stata infatti identificata come la causa più frequente di SCA. La rottura della placca espone sostanze pro-trombotiche contenute nella placca stessa (tissue factor, collagene, fattore di von Willebrand, etc) che attivano la cascata della coagulazione e le piastrine circolanti e che culminano quindi con la formazione di un trombo



**Fig. 1** - L'immunità acquisita è formata da due bracci distinti, l'immunità umorale, che culmina con la produzione di anticorpi e l'immunità cellulo-mediata, che comporta l'attivazione di cloni di linfociti T. I linfociti T, attraverso la produzione e secrezione di varie citochine, regolano finemente tutta l'attività del sistema immunitario. Essi infatti, non solo sono in grado di attivare i linfociti T citotossici (CTL) che determinano la lisi della cellula bersaglio, ma anche di regolare la differenziazione delle cellule B in plasmacellule e quindi la produzione di anticorpi.

intracoronarico. La complicanza della placca rappresenta dunque l'evento chiave per la comparsa di una SCA.

Le placche che sono destinate a rompersi sono difficili da identificare, anche perché la severità della stenosi causata dalla placca aterosclerotica misurata con l'angiografia mal si correla con l'insorgenza clinica di una SCA. Infatti, molti studi hanno dimostrato in maniera inequivocabile che le placche cosiddette "vulnerabili", cioè quelle maggiormente predisposte alla rottura, causano in genere stenosi non significative, in molti casi addirittura meno del

50% del diametro luminale. Queste placche vulnerabili e instabili, poiché sono non significative dal punto di vista emodinamico, sono di solito silenti sul piano clinico, fino a quando vanno incontro a rottura e, attraverso una improvvisa riduzione del flusso ematico coronarico, causano l'insorgenza della SCA.

I meccanismi responsabili della complicanza della placca sono stati attivamente studiati nel corso degli ultimi 15 anni: una grande massa di dati ha contribuito a far avanzare le nostre conoscenze sulla fisiopatologia delle SCA, dimostrando, ad esempio, che

l'infiammazione e il coinvolgimento del sistema immunitario giocano un ruolo importante nel determinismo della complicità della placca. Questo articolo descrive brevemente il ruolo fisiopatologico del sistema immunitario nel determinismo delle SCA, con particolare riguardo al ruolo dei linfociti T e di alcune metodiche di studio del loro repertorio per indagare la dinamica della risposta mediata da queste cellule all'interno delle placche vulnerabili.

### Meccanismi immuno-infiammatori nelle SCA

Viene oggi largamente riconosciuto che la lesione aterosclerotica possiede tutte le caratteristiche di una malattia infiammatoria cronica a progressione lenta<sup>1</sup>, compreso la presenza di cellule immuno-infiammatorie come i monociti/macrofagi, le mast cellule, le cellule dendritiche, i linfociti T e le cellule "natural killer". Inoltre, nelle lesioni avanzate si ritrovano anche componenti del sistema del complemento in stretta vicinanza alla proteina C reattiva insieme a immunoglobuline spesso legate ad antigeni specifici a formare immuno-complessi<sup>1</sup>. Il ruolo del sistema immunitario nel modulare lo sviluppo e la crescita delle lesioni aterosclerotiche viene anche indirettamente dimostrato dai numerosi articoli pubblicati che dimostrano come l'andamento dell'atero-

genesi possa essere significativamente modificato da interventi che interferiscono con vari aspetti della risposta immune<sup>2</sup>. Ma certamente di maggiore interesse è il concetto che il sistema immunitario possa attivamente contribuire alla complicità della placca aterosclerotica, convertendo così una malattia lentamente progressiva e relativamente benigna come l'aterosclerosi in una potenzialmente letale come le SCA. Questa affascinante ipotesi venne inizialmente formulata sulla scorta di alcune osservazioni che dimostrarono la presenza di linfociti T e macrofagi in numero molto più elevato nelle placche complicate rispetto alle loro controparti stabili<sup>3</sup>. Qual è allora il ruolo preciso e come può il sistema immunitario alterare la stabilità di una placca aterosclerotica?

### Il riconoscimento dell'antigene nell'immunità acquisita

Per comprendere meglio il ruolo dei linfociti T nella fisiopatologia delle SCA è utile rivedere rapidamente l'organizzazione del sistema immunitario. Classicamente, il sistema immunitario è stato diviso in due "bracci", l'immunità innata e quella acquisita. L'essenza della immunità acquisita (Fig. 1) è di generare recettori specifici sulle cellule T (immunità cellulo-mediata) e sulle cellule B (immunità umorale) che possiedono grande specificità ed affinità nei confronti di antigeni esterni.

Componenti dell'immunità acquisita comprendono le cellule B, le cellule T e, almeno in parte, le cellule dendritiche. Le cellule B sono responsabili della produzione di anticorpi, mentre le cellule T sono specializzate a produrre e secernere fattori solubili che regolano la funzione di altre cellule effettrici, nonché la produzione di anticorpi da parte delle cellule B. Le cellule T, inoltre, possono agire esse stesse come cellule effettrici e causare la lisi della cellula bersaglio. Le cellule dendritiche sono cellule specializzate nel presentare l'antigene alle cellule T attraverso le molecole di istocompatibilità (HLA). Al contrario di quelle innate, le risposte dell'immunità acquisita sono mediate da linfociti che esprimono recettori unici e specifici per un determinato antigene; ciascun clone linfocitario possiede quindi un solo tipo di recettore che è unico e specifico per quel determinato antigene (fenomeno della *distribuzione clonale dei recettori*). Il numero totale delle cellule T e B, ciascuna equipaggiata con il proprio recettore, costituisce il "repertorio" delle cellule T e B di un determinato individuo, capace di riconoscere uno spettro di antigeni praticamente illimitato. Ciò può essere ottenuto grazie alla estrema diversità del repertorio dei recettori, ottenuta originariamente da un complesso processo di riarrangiamento genico dei segmenti genici V, D, J e C che codificano per le regioni variabili, di giunzione e costanti dei recettori. Le cellule T e B vanno poi incontro ad un processo di selezione tale da eliminare quei cloni che reagiscono contro antigeni propri (self). La tolleranza verso il self quindi è un processo acquisito, non ereditato, e rappresenta il principio base sul quale si poggia la capacità di reagire solo contro il non-self. Le cellule T vengono selezionate nel timo durante la vita fetale sulla base della loro capacità di non reagire contro antigeni self e quando lo lasciano esse non riarrangiano nuovamente i geni che codificano per il proprio recettore (*T-cell receptor*, o TCR); pertanto una cellula T esprime il pro-

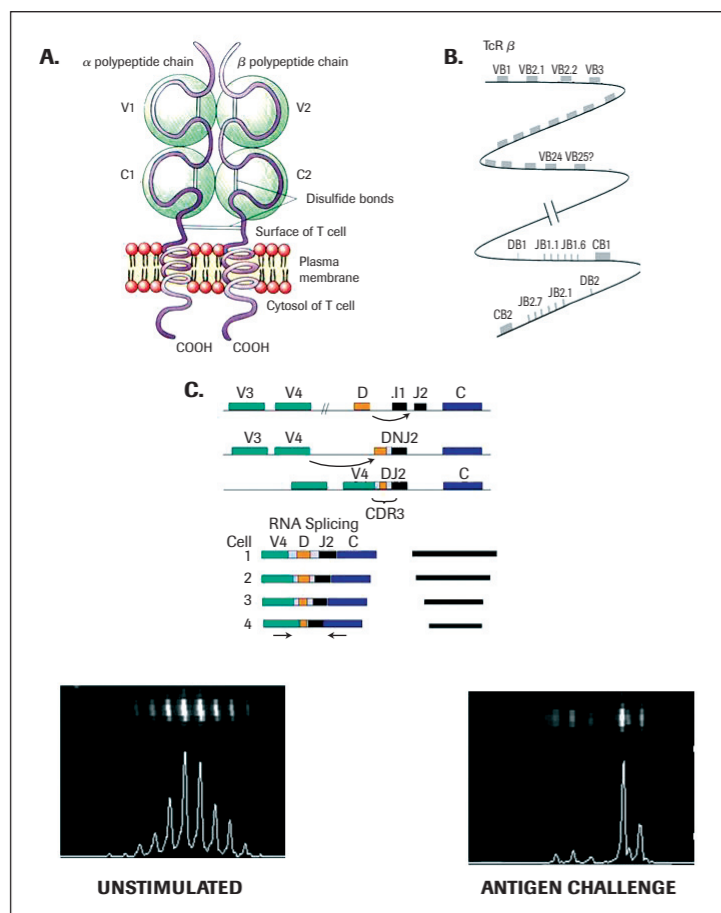
prio TCR specifico per tutta la vita. A seguito del processo di riarrangiamento, ciascuna catena che compone il TCR possiederà una sequenza unica in corrispondenza della regione CDR3, che è quella responsabile della specificità nei confronti dell'antigene (Fig. 2). La caratterizzazione della regione CDR3, quindi, fornisce informazioni preziose per analizzare la risposta T e B coinvolta nella risposta a specifici antigeni (vedi oltre). Quindi, l'evento fondamentale che attiva la risposta immune acquisita è il riconoscimento dell'antigene. Gli antigeni esterni vengono captati da cellule specializzate nella presentazione dell'antigene stesso, degradati in piccoli peptidi e trasportati sulla superficie cellulare legati alle molecole HLA. I recettori TCR sulle cellule T sono complementari alla struttura che si crea quando un antigene si lega nei solchi

delle molecole HLA. Esistono poi altre molecole che contribuiscono al contatto tra cellule T e cellule dendritiche, come ad esempio il CD4 che si lega alla parte esterna delle molecole HLA di classe II o il CD8 che invece si lega alle molecole HLA di classe I.

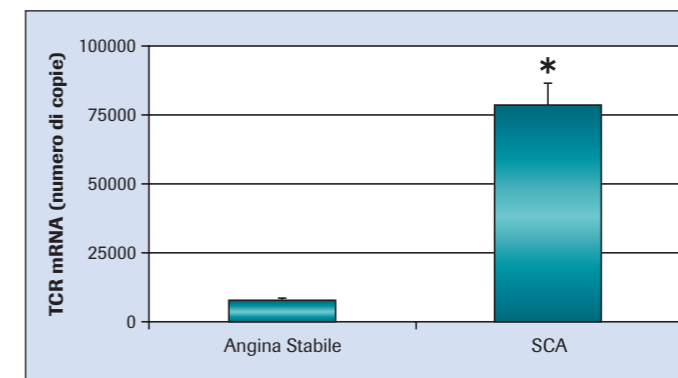
Per essere attivata definitivamente in risposta ad uno specifico antigene, la cellula T richiede poi ulteriori segnali *co-stimolatori* che sono importanti perché introducono diversi livelli di controllo. Infatti, se gli antigeni vengono riconosciuti in assenza di segnale co-stimolatorio, la cellula T può andare incontro ad apoptosi o addirittura entrare in uno stato di anergia. La somma dei segnali derivati dal riconoscimento dell'antigene e la presenza di segnali co-stimolatori determina la qualità e la intensità della risposta immune che ne deriva.

### Attivazione antigene-dipendente delle cellule T nelle placche instabili

La deposizione di lipidi nello spazio sub-intimale, particolarmente di colesterolo LDL, può portare alla



**Fig. 2 - A)** Struttura del recettore dei linfociti T, o *T-cell receptor* (TCR). Analogamente alle Immunoglobuline (Ig), il TCR può essere suddiviso in una regione variabile (V) e in una costante (C), separate dalla regione di giunzione J. Come accade per i geni delle Ig, anche per il TCR segmenti genici V, D, J e C riarrangiano in maniera non predefinita dando origine ad una proteina unica che definisce il clonotipo cellulare. **B)** Schema della catena beta del TCR. Ogni cellula T può riarrangiare una sola catena beta in maniera produttiva a causa di un fenomeno di esclusione allelica. Finora sono state identificate 25 famiglie Vbeta (VB1...VB25). L'analisi estesa del repertorio del TCR avviene mediante tecniche basate sulla Polymerase Chain Reaction (PCR). **C)** Il repertorio TCR può essere studiato usando una particolare tecnica basata sulla PCR che consiste nell'analisi delle regioni CDR3 (quelle responsabili del contatto con l'antigene) delle famiglie del TCR visualizzate a seconda delle differenti lunghezze, denominata "spectratyping".



**Fig. 3 -** Valutazione dell'infiltrato di cellule T all'interno delle placche prelevate da pazienti affetti da angina stabile e pazienti affetti da sindrome coronarica acuta (SCA) mediante misurazione del numero di copie di mRNA per il TCR con real-time PCR. Nelle placche prelevate da pazienti con SCA è evidente l'aumento, pari a circa 10 volte, del numero delle copie del TCR che riflette un aumento del numero delle cellule T. \* = p < 0.01

formazione della lesione aterosclerotica o ateroma, formata sostanzialmente da un core lipidico extracellulare rivestito di tessuto fibroso. Inizialmente, la presenza di componenti acellulari apparentemente inerti all'interno dell'ateroma fecero erroneamente concludere che le conseguenze biologiche delle placche aterosclerotiche fossero principalmente di tipo meccanico (ostruzione più o meno marcata del lume vascolare). Tuttavia, recenti osservazioni indicano che molte componenti dell'ateroma non sono affatto inerti dal punto di vista immunologico. Quindi, le due domande da porre sono: L'instabilità di placca può essere la conseguenza di un riconoscimento di uno o più antigeni all'interno della lesione? Quale antigene (o gruppo di antigeni) può essere responsabile della rottura della placca?

La sequenza di eventi che porta alla complicanza della placca non è nota, ma fattori meccanici, come lo stress tangenziale di parete e la composizione del cappuccio fibroso che riveste il core lipidico giocano sicuramente un ruolo importante nell'influenzare il destino della placca. Accanto a questa teoria puramente "meccanica" è

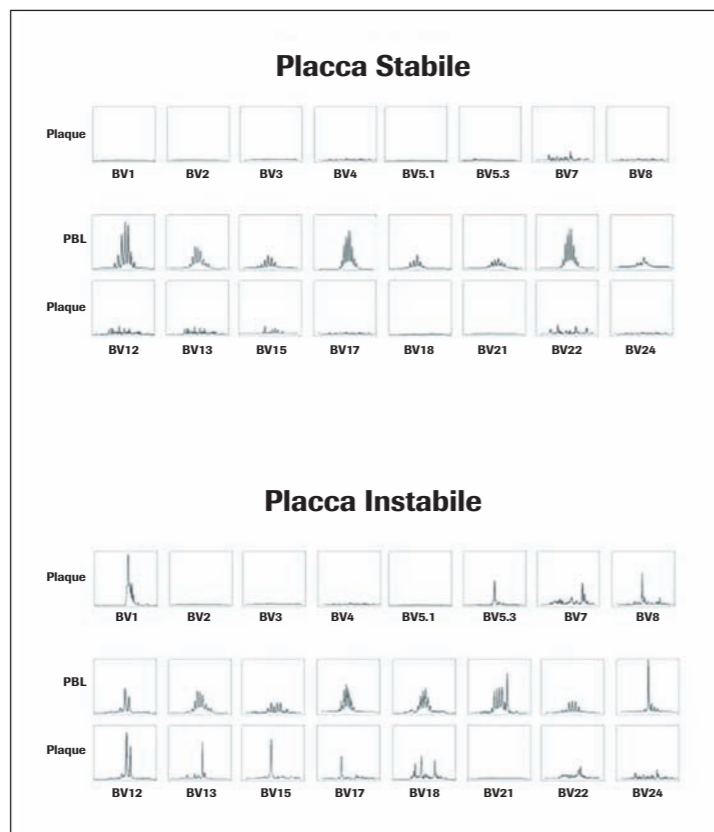
affascinante pensare ad un ruolo dei macrofagi come cellule effettrici del fenomeno. Queste cellule infatti, una volta attivate, sono in grado di rilasciare radicali dell'ossigeno e vari enzimi proteolitici, come le metalloproteasi, che possono contribuire al danno tessutale e quindi alla complicanza della placca<sup>5</sup>. Questa teoria trova riscontro nell'osservazione che le metalloproteasi sono presenti in eleva-

te concentrazioni nelle placche complicate insieme ad altri prodotti di derivazione macrofagica, come il *tissue factor*, principale iniziatore della cascata della coagulazione<sup>6</sup>. Cosa porta dunque all'attivazione dei macrofagi all'interno della placca? Evidenze indirette suggeriscono che le cellule T all'interno della placca mostrano un fenotipo attivato, prerequisito indispensabile per ipotizzare la presenza di un antigene. In seguito al legame con il proprio antigene

specifico, le cellule T cominciano a esprimere i recettori per l'interleuchina (IL)-2 e a secernere IL-2, iniziando un meccanismo di autoattivazione che facilita l'espansione delle cellule T antigene-mediate. van der Wal et al. hanno dimostrato che nelle placche stabili solo il 2% delle cellule T esprime i recettori per IL-2, mentre nelle placche di pazienti con SCA questa percentuale aumenta dall'8 al 19%<sup>7</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che nelle placche ottenute da pazienti con infarto miocardico acuto si osserva una marcata risposta infiammatoria caratterizzata dalla presenza di macrofagi, linfociti e attivazione delle cellule muscolari lisce che

iperesprimono molecole HLA di classe II<sup>3, 8</sup>; ciò suggerisce una reazione immuno-infiammatoria acuta, mediata dalla compartecipazione di diversi tipi cellulari, all'interno delle placche complicate.

Poiché è noto che i macrofagi possono essere attivati dai linfociti T<sup>1-3, 5, 9, 10</sup>, l'attivazione delle cellule T all'interno della placca può rappresentare un meccanismo fisiopatologico importante nella genesi delle



**Fig. 4** - Analisi Spectratyping del repertorio del TCR all'interno di due placche aterosclerotiche prelevate da un paziente con angina stabile (pannello in alto) e uno con sindrome coronarica acuta (pannello in basso). È possibile notare come nella placca stabile il segnale per il TCR sia molto scarso e comunque distribuito in maniera gaussiana, mentre nella placca instabile molte famiglie BV del TCR hanno subito proliferazione mono-oligoclonale, con presenza di picchi allo spettrogramma caratteristici di una stimolazione antigenica. È interessante notare che tali alterazioni non si rilevavano nel sangue periferico (PBL), a supporto del concetto che l'attivazione delle cellule T è un fenomeno locale (all'interno della placca) e non sistemico.

SCA. In questo senso vi sono diverse evidenze, anche se indirette, dell'esistenza di tale fenomeno. Per esempio, studi autoptici hanno rivelato l'esistenza di cellule T attivate all'interno della placca instabile<sup>11</sup>, mentre altri studi che hanno impiegato linfociti T isolati dal sangue periferico hanno descritto alterazioni più o meno marcate del repertorio dei linfociti T associate alla presenza di SCA<sup>12-14</sup>. Questi studi, sebbene di grande importanza perché stabiliscono per la prima volta il concetto dell'ipotesi immunologica della complicanza della placca, soffrono però l'importante limitazione di non fornire prove dirette circa la dinamica dell'attivazione delle cellule T all'interno della placca stessa. In particolare, al momento non sono note le dinamiche dell'attivazione dei linfociti T all'interno della placca in rapporto alla loro eventuale attivazione sistemica evidenziata nel sangue periferico. Per stabilire dunque l'esatto ruolo dell'attivazione delle cellule T all'interno della placca e per chiarire la relazione che questo fenomeno ha con l'infiammazione sistemica sarebbe importante studiare il comportamento delle cellule T direttamente all'interno della placca prelevata da soggetti viventi e confrontarla simultaneamente con le alterazioni che si verificano in periferia.

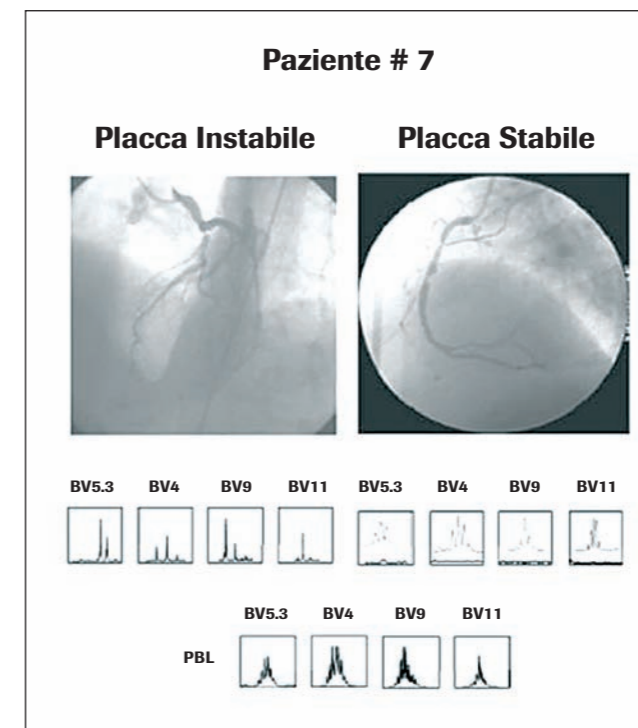
Ambedue questi requisiti sono stati soddisfatti da uno studio recente del nostro gruppo che ha dimostrato per la prima volta che l'insorgenza di una SCA può essere causata da eventi infiammatori antigene-dipendenti all'interno della placca instabile<sup>15</sup>. Lo studio ha tratto vantaggio dalla aterectomia coronarica direzionale, una tecnica di rivascolarizzazione percutanea simile alla PTCA tradizionale che consiste però nella rimozione della placca piuttosto che nel suo rimodellamento, e dall'analisi "Spec-

trotyping" del repertorio delle cellule T (vedi anche Fig. 2). Tale analisi si basa sulla caratterizzazione del segmento CDR3 (responsabile del riconoscimento dell'antigene) del recettore TCR mediante metodiche basate sull'impiego della PCR (polymers chain reaction). Nel nostro studio dunque, abbiamo prelevato 11 placche "instabili" da altrettanti pazienti ricoverati per SCA e sottoposti a rivascolarizzazione percutanea d'urgenza; 10 pazienti con angina stabile da sforzo hanno fornito altrettante placche "stabili" che rappresentavano il controllo interno dello studio. Un primo dato rilevato nel

nostro studio era che il numero di copie di mRNA per il TCR era notevolmente aumentato (circa 10 volte) nelle placche instabili rispetto a quelle stabili, a dimostrazione del fatto che le placche instabili possiedono un grande infiltrato di cellule T (Fig. 3). Ma il dato più interessante emergeva dall'analisi Spectratyping del repertorio delle cellule T: si è osservata, infatti, una marcata alterazione del repertorio delle cellule T all'interno delle placche instabili, con prevalenza di uno o pochi cloni ("skewing" del repertorio), indicativa di una specifica stimolazione antigene-dipendente. Tale fenomeno non era presente, o era presente

in misura molto marginale, nelle placche ottenute dai pazienti di controllo affetti da angina stabile (Fig. 4). Un'altra importante osservazione del nostro studio è rappresentata dal fatto che l'alterazione del repertorio delle cellule T non veniva osservata nel sangue periferico, a dimostrazione del fatto che il fenomeno di attivazione dei linfociti T era dovuto ad una attivazione locale all'interno della placca e non a livello sistemico (Fig. 4).

Un altro dato particolarmente interessante del nostro studio è rappresentato dal fatto che in un paziente è



**Fig. 5** - Analisi Spectratyping di due placche, una instabile e l'altra stabile ottenute dallo stesso paziente. Anche in questo caso, nella placca instabile si osservava una marcata alterazione del repertorio del TCR che però era del tutto assente nella placca stabile, dimostrando la natura strettamente locale del fenomeno.

stato possibile ottenere, durante la stessa procedura, due tipi diversi di placche: una instabile, localizzata sulla arteria discendente anteriore prossimale e responsabile dell'insorgenza della SCA (lesione "culprit"), e una stabile, localizzata sulla coronaria destra (Fig. 5). L'analisi Spectratyping in questo paziente mostrava nuovamente una severa alterazione del repertorio delle cellule T solamente nella placca instabile, mentre sia nella placca stabile che nel sangue periferico il repertorio del TCR era normale. Questo dato, sebbene aneddótico perché rilevato in un solo paziente, supporta ulteriormente il concetto che l'attivazione delle cellule T antigene-mediato sia la conseguenza di un fenomeno locale all'interno della placca instabile e non sistemico.

### Implicazioni cliniche

L'attivazione di meccanismi infiammatori ed immunologici può determinare il destino di una placca aterosclerotica, deviandola dalla semplice crescita "stabile" verso una rapida evoluzione in termini di degradazione della matrice, indebolimento del cappuccio fibroso e quindi di rottura della placca stessa. I linfociti T giocano un ruolo chiave nel determinare lo spostamento di questi fenomeni verso la fase di instabilità e di complicanza della placca. La possibilità di otte-

nere placche aterosclerotiche umane dal circolo coronarico di soggetti viventi ci ha dato la possibilità di studiare la dinamica del coinvolgimento delle cellule T direttamente all'interno della placca; abbiamo per la prima volta descritto in maniera inequivocabile che all'interno delle lesioni instabili si verifica una attivazione antigene-dipendente dei linfociti T. Il dato interessante che emerge è la dimostrazione che questi fenomeni siano la conseguenza di eventi locali, cioè limitati alle placche instabili e non che, come spesso sostenuto, rappresentino fenomeni di attivazione sistemica. Ne deriva che, almeno in alcune circostanze, le sindromi coronariche acute possono essere causate dalla presenza di un antigene all'interno della placca vulnerabile in grado di attivare il sistema immunitario. Non è ancora chiaro quali sono gli antigeni implicati in questa attivazione delle cellule T, anche se alcune sostanze proprie dell'organismo non più riconosciute come self, come le LDL ossidate, alcuni prodotti di ossidazione del colesterolo o anche alcuni antigeni microbici rappresentano potenziali candidati. Studi ulteriori saranno necessari per cercare di identificare l'antigene o la classe di antigeni responsabili; la loro eventuale identificazione potrebbe essere molto importante per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative (vaccino, desensibilizzazione) mirate a prevenire la complicanza della placca nei pazienti a rischio più elevato.

### Bibliografia

1. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420(6917): 868-74.
2. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(7): 508-19.
3. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan Z-Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002; 91: 281-291.
4. Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res*. 2003; 93: 106-113.
5. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996; 98(11): 2572-9.
6. Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Matsui K, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Azumi H, Ejiri J, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Yokozaki H, Itoh H, Yokoyama M. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(8): 1398-404.
7. de Boer OJ, van der Wal AC, Verhagen CE, Becker AE. Cytokine secretion profiles of cloned T cells from human aortic atherosclerotic plaques. *J Pathol*. 1999; 188(2): 174-9.
8. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2): 115-26.
9. van der Wal AC, Li X, de Boer OJ. Tissue factor expression in the morphologic spectrum of vulnerable atherosclerotic plaques. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32(1): 40-7.
10. van der Wal AC, Becer AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994; 89: 36-44.
11. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101: 2883-2888.
12. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*. 1999; 100: 2135-2139.
13. Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, Palmieri G, Partenzi A, Sangiorgi G, Crea F. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40: 1579-1588.
14. Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res*. 2003; 93: 106-113.
15. De Palma R, Del Galdo F, Abbate G, Chiariello M, Calabro R, Forte L, Cimmino G, Papa MF, Russo MG, Ambrosio G, Giombolini C, Tritto I, Notaristefano S, Berrino L, Rossi F, Golino P. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism. *Circulation*. 2006; 113(5): 640-6.