- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

La placca carotidea instabile: marker bioumorali e cellulari di vulnerabilità

Giannignazio Luigi Carbone, Alessandro Mauriello*, Michael Christiansen**, Claus Oxvig***, Luigi Giusto Spagnoli*, Robert S. Schwartz§, Giuseppe Sangiorgi

*Laboratorio di Emodinamica, Istituto Policlinico San Donato, San Donato Milanese (MI), *Dipartimento di Anatomia Patologica, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma, **Dipartimento di Biochimica, Staten Serum Institute, Copenaghen, Danimarca, ***Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Aarhus, Aarhus, Danimarca, §Dipartimento di Cardiologia, Minneapolis Heart Institute, Minneapolis, MN, USA*

Key words:
Atherosclerosis; Carotid arteries; Plaque.

Stroke is the second most common cause of death in developed countries. Carotid plaque disruption and distal embolization of atheromatous debris are the most common pathogenic mechanisms for cerebral ischemia from carotid atherosclerotic disease. Morphologic composition of the atherosclerotic plaque, rather than the stenotic severity, appears to be central in determining the risk of both plaque rupture and subsequent thrombosis. Histologic features of vulnerable plaques include a large lipid core, a thin fibrous cap, intraplaque hemorrhage, and an increased number of inflammatory cells, mostly monocyte-macrophages. Due to the catastrophic implications of thrombus formation and embolization on the arterial plaque, detection before major neurologic events occur is now a major goal of cardiovascular clinicians and researchers. New detection imaging techniques such as intravascular thermography, optical coherence tomography, photonic spectroscopy, and elastography have been developed in order to document atherosclerotic lesion composition. This review will focus on the new possibilities under investigation for vulnerable atherosclerotic carotid plaque detection by means of the serologic markers of plaque instability. New markers, such as pregnancy-associated protein A, P-selectin, interleukin-6 and interleukin-12, metalloproteinases, lipoprotein(a), and oxidation products have been reviewed. Most of the promising serologic markers in this article are still in a nascent phase of development and remain to be validated in clinical settings. However, these biohumoral markers, and their potential combination of techniques, may hold promise for the future characterization of the vulnerable plaque and moreover of the vulnerable patient.

(Ital Heart J Suppl 2003; 4 (5): 398-406)

© 2003 CEPI Srl

Premio Giovani Ricercatori, SIC 2002.

Ricevuto il 5 febbraio 2003; nuova stesura il 29 aprile 2003; accettato il 30 aprile 2003.

Per la corrispondenza:

Dr. Giuseppe Sangiorgi

EMO Centro Cuore Columbus
Via M. Buonarroti, 48
20145 Milano
E-mail: sangiorgi@emocolumbus.it

Introduzione

Lo stroke è la seconda causa di morte più comune nei paesi industrializzati con un'incidenza approssimativa di 400/100 000 nuovi casi per anno nella popolazione generale[1-3].

Sebbene sia possibile che alcuni stroke associati alla malattia aterosclerotica carotidea possano essere dovuti ad ipoperfusione[4], la maggioranza degli stroke è legata a processi di embolizzazione di una placca aterosclerotica o ad occlusione acuta di un'arteria carotidea con propagazione del trombo a distanza.

Il grado di stenosi, dovuto alla presenza di una placca carotidea aggettante nel lume, costituisce il criterio più comunemente utilizzato per l'identificazione di sottogruppi di pazienti ad alto rischio di stroke[5]. Evidenze cliniche cumulative riportate da diversi trial suggeriscono che gradi più importanti di stenosi sono correlati con una maggiore severità del quadro clinico[6,7]. Inoltre, il rischio di stroke è chiaramente aumentato in pazienti portatori di stenosi sintomatiche[8]. Per stenosi < 50% il rischio annuale di stroke è dell'1% mentre per stenosi > 50% diviene pari al 3%. Per quanto riguarda i pazienti che hanno già sperimentato un episodio ischemico cerebrale, secondo i dati del NASCET[6] il rischio annuale di stroke è pari al 13% in presenza di una stenosi carotidea > 70%.

Diversa sembra essere la storia naturale delle stenosi asintomatiche. Infatti, dallo studio ACAS[9] è emerso che in 88 pazienti con un grado di stenosi tra l'80 e il 99% non vi era un rischio di stroke superiore rispetto ai pazienti con stenosi tra il 70 e l'80%, né rispetto ai pazienti portatori di stenosi tra il 60 e il 70%. A supporto di questo concetto, vi è il dato che la frequenza di embolizzazione al Doppler transcranico nelle 24 ore è maggiore in pazienti con attacchi ischemici transitori recenti, rispetto a pazienti con gradi di stenosi simili ma asintomatici[10].

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

Questi dati suggeriscono quindi che, a prescindere dal grado di stenosi, vi siano due tipi di malattia aterosclerotica carotidea: una forma stabile, con un basso rischio di produrre un'embolia di materiale friabile dalla placca stessa, ed una seconda forma, instabile, ad alto rischio di complicanze emboligene e/o trombotiche ed insorgenza conseguente di stroke. In definitiva, è ormai chiaro da una parte come il solo grado di stenosi non basti ad identificare pazienti ad alto rischio di sviluppare un evento cerebrovascolare acuto, e dall'altra come il riconoscimento di altri fattori sia oggi diventato assolutamente necessario per stratificare correttamente il rischio di complicanze ischemiche cerebrovascolari in pazienti portatori di aterosclerosi carotidea. La ricerca deve quindi spostarsi, attraverso lo studio di marcatori biologici che identifichino la placca vulnerabile, dal concetto di "quando" trattare al concetto di "chi" trattare.

La placca vulnerabile: dall'istologia alla biologia

La biforcazione carotidea è più frequentemente sede di placche a struttura disomogenea, fibrocalcifica proprio perché situate in una regione ad alta turbolenza di flusso. La placca aterosclerotica è composta da un denso cappuccio connettivale circondato da cellule muscolari lisce che ricoprono un core necrotico-lipidico. La placca contiene inoltre cellule schiumose, monociti-macrofagi e linfociti T. L'interazione tra queste cellule è determinante per lo sviluppo e la progressione della placca e per l'insorgenza di complicanze quali la trombosi e la rottura della placca stessa.

L'analisi anatomo-patologica comparata di campioni di endarterectomia carotidea di soggetti con o senza sintomi neurologici ha fornito indicazioni sui determinanti di instabilità della placca carotidea, risultati molto simili a quelli responsabili della vulnerabilità a livello coronarico. La vulnerabilità alla rottura è caratterizzata da: ridotto spessore del cappuccio fibroso, grosso core lipidico-necrotico, ed infine un maggiore infiltrato di cellule infiammatorie all'interno della placca (in particolare macrofagi e linfociti T)[11]. Uno studio effettuato da Virmani et al.[12] ha evidenziato come nelle placche vulnerabili coronariche vi sia un sottile cappuccio fibroso (il cui spessore è $\leq 150\ \mu m$) che ricopre un core lipidico nello spessore della parete. Inoltre, sebbene alcuni autori abbiano mostrato che la quantità di lipidi estraibili dalle placche di pazienti sintomatici sia maggiore rispetto a quella delle placche dei pazienti asintomatici[13], altri hanno suggerito che il fattore determinante la rottura sia rappresentato dalla vicinanza del core lipidico al cappuccio fibroso. In particolare, Bassioumy et al.[14] hanno dimostrato che a parità di diametro del core lipidico, la vicinanza di quest'ultimo ad un cappuccio più sottile predispone maggiormente alla rottura. Inoltre, è stato dimostrato come la rottura della placca e l'ulcerazione sono significativamente maggiori nei pazienti sintomatici, mentre la trombosi luminale e l'emorragia intraplacca sono egualmente rappresentate nelle placche ottenute da pazienti sintomatici o asintomatici[15].

Il rischio di rottura è legato inoltre non solo alle caratteristiche intrinseche della placca (vulnerabilità), ma anche a forze meccaniche ed emodinamiche che agiscono dall'esterno (*trigger*), ed in particolare a livello della biforcazione carotidea nelle regioni laterali della placca, dove il cappuccio fibroso è più sottile[16]. I fattori emodinamici sembrano influenzare la stessa composizione cellulare. A tal proposito Dirksen et al.[17] hanno dimostrato come diverse aree della placca abbiano una diversa composizione cellulare. In particolare, le aree della placca a valle del flusso sono più ricche di cellule muscolari lisce, mentre aree localizzate a monte rispetto al flusso subiscono un maggiore *shear stress* e sono più ricche di macrofagi.

La progressione di placche carotidee stabili in placche vulnerabili è probabilmente legata inoltre ad un particolare "microambiente" della placca stessa, a sua volta dipendente da un bilancio tra migrazione/proliferazione cellulare, produzione/degradazione di matrice extracellulare ed infiltrato infiammatorio rappresentato da macrofagi e linfociti T (Fig. 1). È ormai noto che i linfociti T, attraverso la produzione di interferone (IFN)-γ, da un lato stimolano i macrofagi a produrre le metalloproteinasi (MMP), e dall'altro inibiscono la sintesi del collagene. Tale squilibrio tra produzione di collagene e matrice extracellulare e la sua digestione comporta un assottigliamento del cappuccio[18]. Alti livelli di MMP sono stati dimostrati nel cappuccio fibroso[19,20], mentre un aumento dell'apoptosi delle cellule muscolari lisce è di frequente riscontro in placche aterosclerotiche instabili[21]. Inoltre, l'accumulo di cellule T e di macrofagi, attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie, è stato correlato con l'ulcerazione della placca carotidea, la frequenza di microemboli e l'insorgenza di sintomi corticali cerebrali[22-24].

L'importanza del microambiente nella progressione delle lesioni aterosclerotiche e la possibilità di modulare le interazioni esistenti tra i suoi diversi componenti è stata ulteriormente chiarita da studi sperimentali che hanno dimostrato come il trattamento con farmaci ipolipidemizzanti quali fluvastatina e pravastatina su conigli sottoposti a dieta ipercolesterolemica, oltre a ridurre i livelli plasmatici dei lipidi, abbassano i livelli di MMP-1, MMP-3 ed MMP-9 ed aumentano la sintesi di pro-collagene da parte delle cellule muscolari lisce[25], stabilizzando la lesione.

Correlazione tra patologia coronarica e carotidea

Le modificazioni della composizione istocitologica della placca carotidea sembrano giocare un ruolo chiave nel determinismo degli eventi cerebrovascolari legati alle complicanze, quali emorragia, embolizzazione e

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

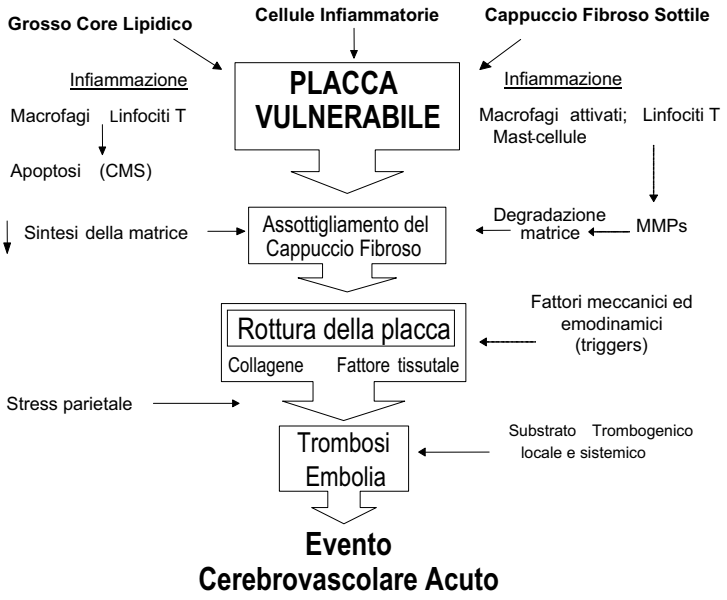

Figura 1. *Caratteristiche del "microambiente" che porta alla progressione da una placca vulnerabile ad una complicata da trombosi e/o embolia con conseguente insorgenza di un evento cerebrovascolare acuto. CMS = cellule muscolari lisce; MMPs = metalloproteinasi.*

trombosi, che seguono la "destabilizzazione" della placca aterosclerotica stessa. In questo contesto, è stato dimostrato che determinati fattori di rischio, similmente a quanto osservato nel distretto coronarico[12], modificando la composizione istologica della placca, possono favorire la trasformazione di una placca stabile in una placca carotidea "instabile".

In uno studio condotto su pazienti sottoposti ad endarterectomia carotidea, Spagnoli et al.[26] hanno dimostrato che la composizione istomorfologica della placca aterosclerotica carotidea correla significativamente con singoli fattori di rischio cardiovascolare. In particolare, placche fibrose erano più specificatamente associate al diabete mellito, placche granulomatose ricche in cellule giganti all'ipertensione arteriosa, placche ricche in cellule schiumose all'ipercolesterolemia, mentre nei pazienti fumatori la placca appariva più spesso complicata da trombosi. Più recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che, tra i diversi fattori di rischio, soggetti con più elevati livelli di fibrinogeno presentavano un maggior infiltrato di cellule infiammatorie ed un cappuccio fibroso più sottile a livello della placca aterosclerotica carotidea, con conseguente maggior rischio di trombosi e di rottura rispetto alle placche di soggetti con più bassi livelli di fibrinogeno, indipendentemente dagli altri fattori di rischio[27].

Come ampiamente dimostrato nel distretto coronarico, anche nel distretto periferico la presenza di elevati indici sistemici di infiammazione è da considerare un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di malattia cerebrovascolare. Nello studio retrospettivo del Physicians' Health Study sono stati valutati i livelli plasmatici basali di proteina C reattiva (PCR) di soggetti sani. Il rischio di sviluppare uno stroke era di 2 volte superiore nei soggetti con PCR nel quartile più alto rispetto ai soggetti con PCR nel quartile più basso. Tale rischio non era modificato dal fumo ed era indipendente dagli altri fattori di rischio[28]. Recentemente Erren et al.[29] hanno valutato i livelli plasmatici di alcuni indici infiammatori in pazienti con aterosclerosi coronarica e delle arterie periferiche. In 147 pazienti sottoposti a coronarografia sono stati misurati i livelli plasmatici di PCR, fibrinogeno, amiloide A, interleuchina (IL)-6 e di altri marker dell'infiammazione. Tutti gli indici infiammatori testati risultavano in maggiore concentrazione nei pazienti con malattia coronarica e periferica rispetto a pazienti con sola malattia coronarica o a pazienti sani di controllo, suggerendo quindi l'esistenza di un maggior grado di attivazione infiammatoria nei pazienti con vasculopatia polidistrettuale. In questo stesso studio è stata anche dimostrata una significativa correlazione positiva tra i livelli di PCR, fibrinogeno e IL-6 ed il grado di stenosi coronarica. Ne consegue che il livello di PCR non è solamente un marker della presenza della malattia aterosclerotica ma è anche un indicatore quantitativo dell'estensione della malattia.

Alcuni studi hanno dimostrato come in pazienti con patologia aterosclerotica carotidea clinicamente evidente (pregresso attacco ischemico transitorio o stroke di moderata entità) in assenza di malattia coronarica nota è frequente in realtà il riscontro di una coronaropatia misconosciuta[30-33]. La stretta associazione esistente tra la patologia carotidea e quella coronarica è stata dimostrata in diversi studi autoptici[34-36] ed *in vivo*, in numerosi studi epidemiologici e clinici[30,32,37-40]. Uno dei più interessanti, sia per il numero dei pazienti studiati (5184 pazienti di entrambi i sessi di età compresa

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

tra 30 e 62 anni) che per la durata del follow-up (24 anni), è il Framingham Study, in cui Kannel et al.[41] hanno evidenziato come il rischio di stroke nella popolazione studiata era basso in assenza di coronaropatia e come tale rischio aumentava in relazione alla gravità di presentazione della malattia coronarica (minore per l'angina, maggiore per l'infarto), soprattutto nei pazienti di sesso femminile. D'altra parte la presenza di malattia carotidea aumenta di 2 volte il rischio di morte per malattia cardiovascolare[42]. Eagle et al.[43] hanno confrontato la sopravvivenza in pazienti coronaropatici stabili affetti da malattia vascolare periferica (2296 pazienti) e non (13 953 pazienti). Le curve di sopravvivenza a 12 anni dimostravano una mortalità statisticamente più significativa nel gruppo di pazienti con vasculopatia periferica rispetto a quelli senza. Inoltre, all'analisi multivariata la malattia vascolare periferica risultava una delle variabili cliniche che meglio correlava con la mortalità nel follow-up. Inoltre, l'importanza clinica della correlazione tra malattia aterosclerotica carotidea e coronarica è espressa maggiormente dalla nozione dell'aumentata incidenza di infarto miocardico perioperatorio in pazienti sottoposti ad intervento di endarterectomia carotidea e di aumentato rischio di ictus cerebrale in pazienti sottoposti ad intervento di bypass aorto-coronarico[5,44].

In questo contesto il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che l'instabilità del distretto coronarico sembra influenzare in maniera significativa anche la composizione della placca carotidea[45], con conseguente maggior rischio di sviluppare un evento cerebrovascolare acuto. In particolare, in campioni istologici prelevati da pazienti sottoposti ad endarterectomia carotidea, abbiamo dimostrato una maggiore quantità di infiltrato infiammatorio (macrofagi e linfociti T) ed una maggiore espressione di IL-6 e PCR in placche aterosclerotiche di pazienti affetti da angina instabile rispetto a placche di pazienti con angina stabile.

Nuovi approcci per l'identificazione delle placche carotidee vulnerabili

Come già detto, il grado di stenosi, che è possibile determinare accuratamente con indagine ultrasonografica, non è in grado singolarmente di identificare sottogruppi di pazienti a rischio di sviluppare un evento cerebrovascolare acuto[46]. Da qui la necessità di riuscire a caratterizzare la morfologia della placca con metodiche non invasive più sofisticate. Gray-Weale et al.[47] per primi hanno classificato la placca aterosclerotica in quattro differenti tipi sulla base dell'ecogenicità, classificazione in parte accettata da altri autori, in parte criticata perché interamente basata sulla sola percezione visiva e dunque largamente operatore-dipendente. Successivamente, con l'ausilio di tecnologie più avanzate, altri parametri sono stati messi a punto al fine di caratterizzare al meglio la placca aterosclerotica. Aly e Bishop[48] hanno condotto un'analisi ultrasonografica quantitativa su placche carotidee di 17 pazienti utilizzando il conteggio medio dei pixel (MPV) effettuato su immagini statiche per meglio definire l'ecogenicità delle placche, individuate secondo la classificazione di Gray-Weale et al. e comparando l'analisi ultrasonografica con i reperti istologici. Lo studio ha mostrato che placche soffici (ad elevato contenuto di lipidi e focolai emorragici) avevano un più basso MPV rispetto a placche fibrocalcifiche con un più elevato MPV ($p < 0.002$). Tuttavia, l'analisi è stata condotta *off-line* ovvero su immagini statiche la qual cosa potrebbe essere di per sé fonte di artefatti. Più recentemente, Lal et al.[49] hanno utilizzato l'analisi della distribuzione dei pixel di immagini ultrasonografiche digitalizzate al fine di ottenere una miglior quantificazione dei singoli costituenti istologici della placca carotidea. L'analisi ultrasonografica è stata condotta su 20 placche carotidee di 19 pazienti (7 sintomatici e 13 asintomatici), successivamente prelevate in corso di endarterectomia e sottoposte ad esame istologico. L'analisi della distribuzione dei pixel ha mostrato differenze statisticamente significative in termini di quantità di lipidi, di calcio e focolai emorragici all'interno della placca ed una buona correlazione con i dati istologici, confermando che placche di pazienti sintomatici sono caratterizzate da un maggior contenuto di lipidi e da focolai emorragici. Tuttavia, queste nuove metodiche sono ancora in corso di validazione e potranno essere integrate nella pratica clinica a completamento dell'attuale screening ultrasonografico solo allorché ulteriori studi, verosimilmente multicentrici e comprendenti un elevato numero di pazienti, ne confermeranno l'accuratezza diagnostica e la riproducibilità.

Nuove tecniche impiegate per il riconoscimento di lesioni vulnerabili utilizzano procedure di interrogazione locale della placca e tipicamente sono basati su metodiche di immagine, sulla caratterizzazione tessutale[50-54] e sul contenuto lipidico della placca, o sul riconoscimento di particolari caratteristiche quali le alterazioni della temperatura dovute all'infiammazione presente in particolari regioni della placca stessa[55,56]. Sebbene sia ipotizzabile che in futuro le tecniche di immagine saranno non invasive, a tutt'oggi qualsiasi tecnica utilizzata richiede il contatto diretto con la placca e/o con l'arteria ed è quindi chiaro come queste metodiche invasive siano costose, dispendiose in termini di tempo e non completamente scevre da rischi per il paziente.

Dati preliminari suggeriscono che la misurazione nel sangue di particolari marker di vulnerabilità possa essere utilizzata per definire pazienti ad alto rischio[57]. Purtroppo, non esistono ancora marker specifici che permettano una determinazione accurata. Questi marker potrebbero rappresentare per il distretto carotideo l'equivalente fisiopatologico delle troponine T ed I e della creatinchinasi-MB, tutti marker specifici e sensibili per l'infarto miocardico. Comunque, il paradigma che è alla base dell'utilizzo di marker plasmatici per il riconoscimento di placche vulnerabili sia coronariche

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

che carotidee si basa sul principio che citochine, elementi cellulari attivati ed altri fattori bioumorali presenti nelle placche vulnerabili, possano essere quantificati nella circolazione periferica.

Proteina A associata alla gravidanza. Recentemente Bayes-Genis et al.[58] hanno studiato l'attività della proteina A associata alla gravidanza (PAPP-A), una zincoproteina appartenente al gruppo delle MMP, inizialmente identificata nel siero delle donne gravide[59] e recentemente riscontrata nei macrofagi e nelle cellule muscolari lisce all'interno di placche aterosclerotiche coronariche instabili.

Questa proteasi scinde il legame tra fattore di crescita insulinico (IGF)-1 ed il suo naturale inibitore (IGFBP-4 e IGFBP-5), aumentando quindi i livelli circolanti di IGF-1 libero[60]. È stato ampiamente dimostrato che quest'ultimo, inducendo la chemiotassi dei monociti-macrofagi all'interno della placca, la loro attivazione con conseguente produzione e rilascio di citochine pro-infiammatorie e di enzimi proteolitici, e stimolando la migrazione e l'organizzazione delle cellule endoteliali con conseguente neoangiogenesi, sia uno dei più importanti mediatori nella trasformazione di una placca stabile in una vulnerabile (Fig. 2)[58]. La neoangiogenesi a sua volta può favorire un maggior richiamo di macrofagi all'interno della lesione ateromasica. In particolare, O'Brien et al.[61] hanno dimostrato che le molecole di adesione vascolare (VCAM-1), intercellulare (ICAM-1), P-selectina e I-selectina sono maggiormente espresse nelle cellule endoteliali della neovascolatura. Inoltre, la stimolazione dei macrofagi da parte dell'IGF-1 induce la sintesi da parte di questi di fattore di necrosi tumorale[62]. Questa citochina amplifica i meccanismi di destabilizzazione della placca ateromasica sia direttamente, che attraverso altre interleuchine (IL-1, IL-6, IFN-γ). L'IL-1 e l'IFN-γ prodotti dai linfociti T, inducono l'apoptosi delle cellule muscolari lisce (principali produttrici di collagene, elastina ed inibitori delle MMP all'interno della placca), riducendo così la produzione di collagene; d'altra parte questi stessi mediatori stimolano i macrofagi a produrre MMP, enzimi che digeriscono il collagene e la matrice extracellulare del cappuccio fibroso delle placche aterosclerotiche[63]. Come conseguenza il cappuccio fibroso è più vulnerabile alle forze tangenziali e di conseguenza all'esposizione del core lipidico, che a sua volta, essendo ricco di fattore tessutale, predispone all'aggregazione piastrinica e alla successiva trombosi della placca.

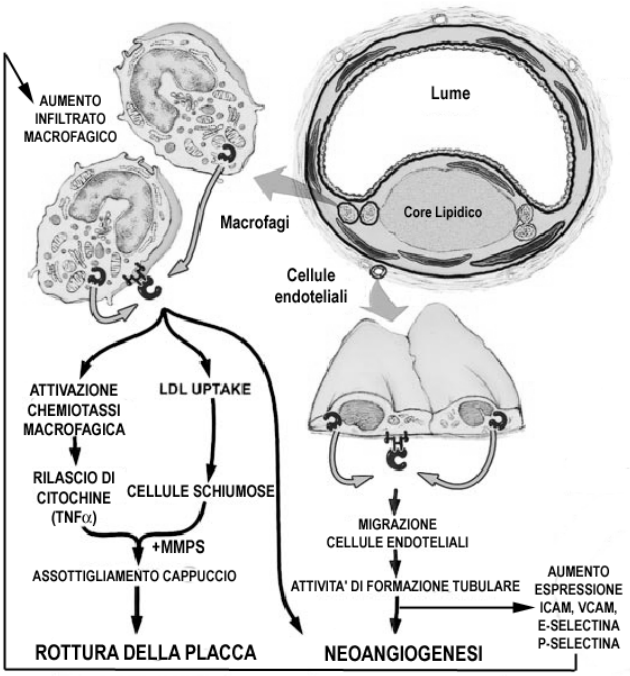

Figura 2. *Meccanismi di destabilizzazione della placca aterosclerotica legati alla produzione di fattore di crescita insulinico-1 libero dopo l'azione della proteina A associata alla gravidanza sul legame tra fattore di crescita insulinico-1 ed il suo inibitore (IGFBP-4). ICAM = molecola di adesione intercellulare; LDL = lipoproteine a bassa densità; MMPS = metalloproteinasi; TNFα = fattore di necrosi tumorale-α; VCAM = molecola di adesione vascolare. Da Bayes-Genis et al.[58], modificata.*

Bayes-Genis et al.[64] hanno dimostrato come la PAPP-A sia maggiormente espressa nel siero dei pazienti affetti da sindromi coronariche acute (angina instabile e infarto miocardico), rispetto ai pazienti affetti da angina stabile. Inoltre, l'espressione della PAPP-A non sembra correlare con l'estensione del processo ateromasico nell'albero coronarico, ma con la presenza di placche instabili. In particolare, i livelli sierici di PAPP-A in concentrazioni > 10 mIU/l hanno una sensibilità dell'89% ed una specificità del 78% nel riconoscere uno stato di vulnerabilità del paziente. In aggiunta, non vi è differenza nei livelli sierici tra uomini e donne affetti da sindromi coronariche acute, né tra i pazienti diabetici e non; infine, non vi è differenza significativa nei livelli sierologici tra i pazienti affetti da angina instabile ed infarto del miocardio.

Recentemente abbiamo dimostrato come anche a livello carotideo vi sia un'aumentata espressione della PAPP-A a livello di placche complesse, vulnerabili e di placche rotte con trombosi, rispetto a placche stabili, o placche con trombosi organizzata[65]. Inoltre alla microscopia confocale ad immunofluorescenza la PAPP-A è risultata maggiormente espressa dalle cellule macrofagiche, rispetto alle cellule muscolari lisce ed ai linfociti T. In considerazione del fatto che siamo oggi in grado di misurare con metodica ELISA i livelli di PAPP-A nel siero, questa proteasi potrebbe rappresentare un marker facilmente riconoscibile di vulnerabilità, identificando un sottogruppo di pazienti a rischio di sviluppare un evento cerebrovascolare prima dell'insorgenza dello stesso.

Altri potenziali marker di vulnerabilità. L'attenzione su nuovi potenziali marker si sta focalizzando anche sulle molecole di adesione cellulare, sulla P-selectina, sull'IL-6 e sul fattore di necrosi tumorale-α.

Le molecole di adesione cellulare sono da considerarsi potenziali candidati in virtù del fatto che sono at-

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

tivate dalle citochine infiammatorie e quindi rilasciate a livello endoteliale[66,67]. Queste molecole rappresentano quindi l'unico marker disponibile per valutare l'attivazione endoteliale e l'infiammazione arteriosa. Lo studio Physicians' Health Study ha valutato più di 14 000 soggetti sani dimostrando che le ICAM-1 correlavano con il rischio cardiovascolare e che soggetti nel quartile più alto avevano un rischio 1.8 volte maggiore rispetto ai pazienti nel quartile più basso[67]. Inoltre è stato dimostrato che i livelli di ICAM-1 e di VCAM-1 solubili correlano con l'estensione della patologia aterosclerotica periferica[68].

L'IL-6 è riscontrabile nelle fasi precoci dell'infiammazione ed è il principale stimolo alla produzione epatica di PCR. Anche questa sostanza risulta aumentata in pazienti affetti da aterosclerosi e il rischio di sviluppare un evento acuto risulta 2.3 volte maggiore nei soggetti nel quartile alto rispetto a quelli nel quartile più basso[67]. Altre citochine infiammatorie possono essere coinvolte. Ad esempio, il ligando CD40, che si ritrova sulla superficie cellulare, è un omologo del fattore di necrosi tumorale-α che stimola la produzione di sostanze proteolitiche da parte di macrofagi attivati[69].

L'IL-18 è una citochina pro-infiammatoria principalmente prodotta da monociti e macrofagi, che agisce in sinergia con l'IL-12. Entrambe sono espresse nella placca aterosclerotica e stimolano l'induzione dell'IFN-γ, che a sua volta inibisce la sintesi del collagene, prevenendo in tal modo la formazione di un cappuccio fibroso di spessore consistente in modo tale da prevenire la destabilizzazione della placca. Mallat et al.[70] hanno esaminato 40 placche aterosclerotiche stabili ed instabili di pazienti sottoposti ad endarterectomia carotidea evidenziando come l'IL-18 fosse altamente espressa nei macrofagi e nelle cellule endoteliali di placche carotidee instabili rispetto a quelle stabili, e correlasse con la presenza sia di segni clinici (placche sintomatiche) che istologici (ulcerazione) di vulnerabilità.

Nella lista di possibili marker di vulnerabilità della placca carotidea va peraltro menzionata la lipoproteina(a), ampiamente riconosciuta come fattore di rischio indipendente per la malattia aterosclerotica in funzione dei livelli plasmatici[71]. Sulla base dell'osservazione che l'apoproteina(a), la più piccola isoforma della lipoproteina(a), è scissa da alcune MMP in due principali frammenti (F1 e F2)[72], ed essendo noto il ruolo delle MMP nel processo di degradazione della matrice extracellulare e dunque nell'aterogenesi, Fortunato et al.[73] hanno dimostrato che i frammenti dell'apoproteina(a), F2 in maggior quantità rispetto ad F1, si accumulano in placche carotidee instabili in prossimità di zone di erosione ed ulcerazione laddove è maggiore peraltro la concentrazione di MMP-2 e MMP-9, suggerendo una forte associazione tra frammenti dell'apoproteina(a), MMP e destabilizzazione della placca aterosclerotica. Recentemente, Mallat et al.[74] hanno inoltre dimostrato come un aumento dello stress ossidativo in placche carotidee correli con l'instabilità della placca stessa.

Il riconoscimento di placche vulnerabili attraverso marcatori nel sangue circolanti potrebbe anche essere effettuato utilizzando come bersaglio le cellule infiammatorie che causano la vulnerabilità delle placche stesse. Per esempio, l'IFN-γ prodotto dalle cellule CD4(+) e CD28 (null) sotto stimolo macrofagico risulta aumentato nelle sindromi coronariche acute[75,76], suggerendo che delle sottopopolazioni particolari di cellule T sono coinvolte nella rottura e nell'erosione della placca aterosclerotica. Le fasi di instabilità del processo aterosclerotico sia coronarico che periferico potrebbero essere quindi legate a popolazioni monoclonali di cellule T, in maniera simile a quello in corso di gammopatie monoclonali[75,76].

Conclusioni

Negli ultimi anni è ormai stato acquisito il concetto che il meccanismo responsabile degli eventi acuti coronarici e cerebrovascolari sia dovuto al progressivo accrescimento, progressione e destabilizzazione di una placca aterosclerotica con formazione di un trombo occludente o con l'embolizzazione di parti di questo a distanza. Studi anatomo-patologici e clinici hanno ormai chiarito che il rischio di rottura è legato più alle caratteristiche istomorfologiche della placca che alle sue dimensioni e al grado di stenosi luminale che essa provoca. Placche instabili sono caratterizzate da un grosso core lipidico, un cappuccio fibroso sottile, un ricco infiltrato di cellule infiammatorie macrofagiche e scarse cellule muscolari lisce.

La metodica di immagine ecografica è estremamente utile per un primo screening di individuazione dei pazienti portatori di lesioni aterosclerotiche stenosanti del circolo carotideo. L'impiego routinario di software che si avvalgono dell'analisi quantitativa della scala dei grigi o dell'analisi integrata degli echi riflessi recentemente sviluppati[77,78], sebbene di grande valenza nel riconoscimento di lesioni vulnerabili, sono ancora in attesa di una validazione clinica su larga scala e risultano ancora di difficile integrazione nella pratica clinica per la loro complessità. Vi è inoltre da considerare che essendo la prevalenza di soggetti ad alto rischio bassa nella popolazione generale, la problematica della sensibilità e specificità di una metodica per il riconoscimento di una lesione vulnerabile risulta maggiormente amplificato. In considerazione che nessun test è così sensibile e specifico, vi è ancora un'alta percentuale di errori diagnostici, con numerosi falsi positivi e falsi negativi. Riteniamo però che la sensibilità e la specificità nel riconoscere lesioni aterosclerotiche complesse possono però oggi essere migliorate, affiancando alle tecniche di immagine[50-54] delle batterie di marker bioumorali di rischio facilmente ottenibili e riproducibili. Tale informazione potrebbe risultare di notevole ausilio per stabilire non solo la "placca" a rischio, ma soprattutto il "paziente" a rischio di sviluppare un evento cerebrovascolare acuto.

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

Riassunto

Lo stroke rappresenta la seconda causa di morte più comune nei paesi industrializzati. La rottura della placca carotidea con embolizzazione distale di materiale ateromasico è il meccanismo patogenetico responsabile degli accidenti cerebrovascolari legati alla malattia aterosclerotica del distretto carotideo. La composizione morfologica della placca aterosclerotica più che il grado di stenosi appare quindi determinante nel produrre la rottura della placca stessa e la trombosi che ne consegue. Le caratteristiche istologiche di vulnerabilità sono rappresentate da un grosso core lipidico, un cappuccio fibroso sottile, un'emorragia intraplacca ed un infiltrato infiammatorio ricco in cellule monocitarie e macrofagiche. Ad oggi, la nostra capacità nel riconoscere pazienti a rischio di sviluppare eventi cerebrovascolari maggiori è estremamente limitata. Nuove metodiche quali l'ecografia intravascolare con termografia, la tomografia a coerenza ottica, la spettroscopia a fotoni e l'elastografia sono state sviluppate per meglio determinare la composizione tessutale della lesione aterosclerotica. Questa rassegna si focalizza su tecniche non invasive di riconoscimento della placca vulnerabile grazie alla valutazione di marker bioumorali di instabilità. Nuove sostanze quali la proteina A associata alla gravidanza, l'interleuchina-6 e l'interleuchina-12, le metalloproteinasi, la lipoproteina(a) ed i prodotti di ossidazione della placca sono esaminate. Molti di questi marker sierologici riportati sono ancora in fase sperimentale e devono ancora essere validati definitivamente nella pratica clinica. Comunque, la loro quantificazione e le potenzialità offerte da tecniche combinate, promettono un sempre maggiore precisione nel riconoscimento della placca e soprattutto del paziente vulnerabile.

Parole chiave: Arterie carotidi; Aterosclerosi; Placca.

Bibliografia

1. Wolfe CDA, Tilling K, Beech R, Rudd AG. Variations in case fatality and dependency from stroke in western and central Europe. Stroke 1999; 30: 350-6.
2. Hollander M, Koudstaal P, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Breteler MM. Incidence, risk, and case fatality of first ever stroke in the elderly population. The Rotterdam Study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003; 74: 317-21.
3. Gibbs RJ, Todd JC, Irvine C, et al. Relationship between the regional and national incidence of transient ischemic attack and stroke and performance of carotid endarterectomy. Eur J Vasc Surg 1998; 16: 47-52.
4. Ringelstein EB, Sievers C, Ecker S, Schneider PA, Otis SM. Noninvasive assessment of CO_2-induced cerebral vasomotor response in normal individuals and patients with internal carotid artery occlusion. Stroke 1988; 19: 963-9.
5. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, et al. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. Circulation 1998; 97: 501-9.
6. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade stenosis. N Engl J Med 1991; 325: 445-53.
7. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). Lancet 1998; 351: 1379-87.
8. Bennett HJ, Taylor W, Eliasziw M, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. N Engl J Med 1998; 339: 1415-25.
9. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. JAMA 1995; 273: 1421-8.
10. Markus HS, Thomson ND, Brown MM. Asymptomatic cerebral embolic signals in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease. Brain 1995; 118 (Part 4): 1005-11.
11. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. Stroke 2000; 31: 774-81.
12. Virmani R, Burke AP, Farb AH, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. Prog Cardiovasc Dis 2002; 44: 349-56.
13. Seeger JM, Barratt E, Lawson GA, Klingman N. The relationship between carotid plaque composition, plaque morphology and neurologic symptoms. J Surg Res 1995; 58: 330-6.
14. Bassioumy HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA, et al. Juxtalumen location of plaques necrosis and neoformation in symptomatic carotid stenosis. J Vasc Surg 1997; 26: 585-94.
15. Hatsukami TS, Ferguson MS, Beach KW, et al. Carotid plaque morphology and clinical events. Stroke 1997; 28: 95-100.
16. Arroyo LH, Lee RT. Mechanism of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. Cardiovasc Res 1999; 41: 369-75.
17. Dirksen MT, van der Wal AC, van der Berg FM, van der Loos CM, Becker AE. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow. Circulation 1998; 98: 200-3.
18. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. Circulation 1995; 92: 1565-9.
19. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. Circ Res 1994; 75: 181-9.
20. Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, et al. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1579-88.
21. Best P, Hasdai D, Sangiorgi G, et al. Apoptosis: basic concepts and implications in coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 14-22.
22. Sitzer M, Muller W, Siebler M, et al. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. Stroke 1995; 26: 1231-3.
23. Jander S, Sitzer M, Schumann R, et al. Inflammation in high-grade carotid stenosis. A possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. Stroke 1998; 29: 1625-30.
24. De Michele M, Ascione L, Guarini P, Perrotta S, Tuccillo B. Determinanti dell'instabilità della placca carotidea: dall'istologia agli ultrasuoni. Ital Heart J Suppl 2001; 2: 606-13.
25. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, et al. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Circulation 2001; 103: 993-9.
26. Spagnoli LG, Mauriello A, Palmieri G, Santeusanio G,

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

Amante A, Taurino M. Relationships between risk factors and morphological patterns of human carotid atherosclerotic plaques: a multivariate discriminant analysis. Atherosclerosis 1994; 108: 39-60.
27. Mauriello A, Sangiorgi G, Palmieri G, et al. Hyperfibrinogenemia is associated with specific histocytological composition and complications of atherosclerotic carotid plaques in patients affected by transient ischemic attacks. Circulation 2000; 101: 744-50.
28. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin and risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 1997; 336: 973-9.
29. Erren M, Reinecke H, Junker R, et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2355-63.
30. Hertzer NR, Young GR, Bevent G, et al. Coronary angiography in 506 patients with extracranial cerebrovascular disease. Arch Intern Med 1985; 145: 849-52.
31. Di Pasquale G, Andreoli A, Pinelli G, et al. Cerebral ischemia and asymptomatic coronary artery disease: a prospective study of 83 patients. Stroke 1986; 17: 1098-101.
32. Craven T, Ryu J, Espeland M, et al. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. Circulation 1990; 82: 1230-42.
33. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. Stroke 1992; 23: 1752-60.
34. Youg W, Gofman JW, Tandy R. The quantification of atherosclerosis III. The extent of correlation of degrees of atherosclerosis within and between the coronary and cerebral vascular beds. Am J Cardiol 1960; 6: 300-8.
35. Mitchell JR, Schwartz CJ. Relationship between arterial disease in different sites. A study of the aorta and coronary, carotid and iliac arteries. BMJ 1962; 4: 1293-301.
36. Mathur KS, Kashyap SK, Kumar V. Correlation and the extent and severity of atherosclerosis in the coronary and cerebral arteries. Circulation 1963; 27: 929-34.
37. Howard G, Ryu JE, Evans GW, et al. Extracranial carotid atherosclerosis in patients with and without transient ischemic attacks and coronary artery disease. Arteriosclerosis 1990; 10: 714-9.
38. Tanaka H, Nishino M, Ishida M. Progression of carotid atherosclerosis in Japanese patients with coronary artery disease. Stroke 1992; 23: 946-51.
39. Crouse J. Carotid and coronary atherosclerosis: what are the connections? Postgrad Med 1991; 90: 175-9.
40. Chimowitz M, Mancini G. Asymptomatic coronary artery disease in patients with stroke. Stroke 1991; 26: 23-7.
41. Kannel WB, Wolf PA, Verter J. Manifestations of coronary disease predisposing to stroke. The Framingham Study. JAMA 1983; 250: 2942-6.
42. Wolf PA, Kannel WB, Sorlie P, McNamara P. Asymptomatic carotid bruit and the risk of stroke. The Framingham study. JAMA 1981; 245: 1442-5.
43. Eagle KA, Rihal CS, Foster ED, Mickel MC, Gersh BJ. Long-term survival in patients with coronary artery disease: importance of peripheral vascular disease. The Coronary Artery Surgery Study (CASS) Investigators. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 1091-5.
44. Jones E, Craver J, Michalic R, et al. Combined carotid and coronary operations: when are they necessary? J Thorac Cardiovasc Surg 1984; 87: 7-16.
45. Sangiorgi G, Mauriello A, Trimarchi S, et al. Does carotid plaque inflammatory infiltrate differ between patients affected by stable or unstable angina? (abstr) Eur Heart J 2000; 21 (Suppl): P3569.
46. Barnett HJ, Meldrum HE, Eliasziw M. The dilemma of surgical treatment for patients with asymptomatic carotid disease. Ann Intern Med 1995; 123: 723-5.
47. Gray-Weale AC, Graham JC, Burnett JR, Byrne K, Lusby RJ. Carotid artery atheroma: comparison of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology. J Cardiovasc Surg (Torino) 1988; 29: 676-81.
48. Aly S, Bishop CC. An objective characterization of atherosclerotic lesion. An alternative method to identify unstable plaque. Stroke 2000; 31: 1921-4.
49. Lal BK, Hobson RW, Pappas PJ, et al. Pixel distribution analysis of B-mode ultrasound scan images predicts histologic features of atherosclerotic carotid plaque. J Vasc Surg 2002; 35: 1210-7.
50. Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, et al. Optical coherence tomography for optical biopsy. Properties and demonstration of vascular pathology. Circulation 1996; 93: 1206-13.
51. Romer TJ, Brennan JF III, Puppels GJ, et al. Intravascular ultrasound combined with Raman spectroscopy to localize and quantify cholesterol and calcium salts in atherosclerotic coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 478-83.
52. Cespedes EI, de Korte CL, van der Steen AF, von Birgelen C, Lancee CT. Intravascular elastography: principles and potentials. Semin Interv Cardiol 1997; 2: 55-62.
53. Shinnar M, Fallon JT, Wehrli S, et al. The diagnostic accuracy of ex vivo MRI for human atherosclerotic plaque characterization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2756-61.
54. Helft G, Worthley SG, Beygui F, et al. Identification of unstable coronary atherosclerotic plaques. Arch Mal Coeur Vaiss 2001; 94: 583-90.
55. Cassells W, Hathorn B, David M, et al. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implication for plaque rupture and thrombosis. Lancet 1996; 347: 1447-51.
56. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, et al. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: a new method of detection by application of a special thermography catheter. Circulation 1999; 99: 1965-71.
57. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: from laboratory evidence to clinical application. Ital Heart J 2001; 2: 796-800.
58. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis. A review of atherosclerosis and restenosis. Circ Res 2000; 86: 125-30.
59. Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Kristensen L, Sottrup-Jensen L. Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. Biochim Biophys Acta 1994; 1201: 415-23.
60. Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. FEBS Lett 2001; 504: 36-40.
61. O'Brien KD, McDonald TO, Chait AA, Allen MD, Alpers CE. Neovasculature expression of E-selectin, intracellular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. Circulation 1996; 93: 672-82.
62. Ranier G, Clement I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte

- Copyright - Il Pensiero Scientifico Editore downloaded by IP 18.218.38.125 Mon, 29 Apr 2024, 00:40:04

and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. Endocrinology 1996; 137: 4611-8.
63. Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. Am J Cardiol 2003; 91 (Suppl): 4B-8B.
64. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. N Engl J Med 2001; 345: 1022-9.
65. Sangiorgi G, Mauriello A, Christiansen M, et al. Pregnancy-associated plasma protein A: a new marker of unstable carotid plaques? (abstr) Eur Heart J 2002; 4 (Suppl): 498.
66. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. J Pathol 1993; 171: 223-9.
67. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction in apparently healthy men. Circulation 2000; 101: 1767-72.
68. Peter K, Nawroth P, Conradt C, et al. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin and thrombomodulin. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 505-12.
69. Libby P, Aikawa M. New insights into plaque stabilisation by lipid lowering. Drugs 1998; 56 (Suppl 1): 9-13.
70. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. Circulation 2001; 104: 1598-603.
71. Rhoads GG, Dahlen G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. JAMA 1986; 256: 2540-4.
72. Edelstein C, Italia JA, Scanu AM. Polymorphonuclear cells isolated from human peripheral blood cleave lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) at multiple interkringle sites via the enzyme elastase. Generation of mini-Lp(a) particles and apo(a) fragments. J Biol Chem 1997; 272: 11079-87.
73. Fortunato JE, Bassiouny HS, Song RH, et al. Apolipoprotein(a) fragments in relation to human carotid plaque instability. J Vasc Surg 2000; 32: 555-63.
74. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, et al. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. J Clin Invest 1999; 103: 421-7.
75. Liuzzo G, Vallejo AN, Kiopecky SL, et al. Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. Circulation 2001; 103: 1509-14.
76. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, et al. Perturbation of T-cell repertoire in patients with unstable angina. Circulation 1999; 100: 2135-9.
77. Ciulla MM, Paliotti R, Ferrero S, Vandone P, Magrini F, Zanchetti A. Assessment of carotid plaque composition in hypertensive patients by ultrasonic tissue characterization: a validation study. J Hypertens 2002; 20: 1589-96.
78. Takiuchi S, Rakugi H, Honda K, et al. Quantitative ultrasonic tissue characterization can identify high-risk atherosclerotic alteration in human carotid arteries. Circulation 2000; 102: 766-70.