

# Rassegne

## I meccanismi cellulari di regolazione ed amplificazione del processo infiammatorio nella placca aterosclerotica: le interazioni cellulari da contatto

Claudia Monaco, Sylvia Young\*, Ewa Paleolog\*, Attilio Maseri, Marc Feldmann\*

Istituto di Cardiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, \*Kennedy Institute of Rheumatology Division, Imperial College School of Medicine, London, UK

**Key words:**  
Atherosclerosis;  
Cytokines;  
Endothelial cells;  
Monocytes/macrophages;  
T lymphocytes.

The regulatory mechanisms of the inflammatory process in the atherosclerotic plaque are still not clearly understood. Stimulated T cells may have a key role in enhancing and perpetuating inflammation at the atherosclerotic site. They activate endothelial cells, macrophages and smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque, not only via the production of soluble mediators, but also through cell-cell contact-mediated interactions (via membrane receptors and their ligands). Cell/cell contact between stimulated T lymphocytes and monocytes/macrophages and endothelial cells induces the production of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6) and chemokines (interleukin-8, monocyte chemoattractant factor-1). Thus, these interactions could play a relevant role in the dysregulation of the inflammatory process in the atherosclerotic plaque, representing a novel mechanism of progression and complication of the atherosclerotic disease. Understanding the key ligands and receptors involved may permit the definition of new therapeutic targets.

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (4): 339-343)

© 2001 CEPI Srl

Premio Giovani Ricercatori, SIC 2000.

Ricevuto il 10 gennaio 2001; accettato il 5 febbraio 2001.

Per la corrispondenza:

Dr.ssa Claudia Monaco

Istituto di Cardiologia  
Università Cattolica  
del Sacro Cuore  
Policlinico A. Gemelli  
Largo A. Gemelli, 8  
00168 Roma  
E-mail:  
c.monaco@eudoramail.com

Numerose sono le evidenze che indicano che la malattia aterosclerotica è una malattia infiammatoria ed ha meccanismi patogenetici (mediatori e tipi cellulari coinvolti) in comune con malattie infiammatorie<sup>1</sup>. I meccanismi di regolazione nell'uomo di questo processo infiammatorio non sono stati ancora completamente chiariti. Le cellule comunicano tra di loro sia attraverso mediatori solubili che direttamente per contatto mediante molecole espresse sulla membrana cellulare. Quest'ultimo meccanismo diretto di interazione cellulare, recentemente descritto e che chiameremo "interazione cellulare da contatto diretto", è un potente mezzo di comunicazione nella malattia aterosclerotica, come in altre malattie infiammatorie.

### Le caratteristiche del processo infiammatorio nella placca aterosclerotica: cellule e mediatori

La placca aterosclerotica è caratterizzata dall'infiltrazione di cellule derivate dal sangue circolante, soprattutto macrofagi e linfociti T, dalla migrazione di cellule mu-

scolari lisce dalla media all'intima e dall'attivazione delle cellule endoteliali<sup>1</sup>. Una considerevole porzione della popolazione cellulare residente nella placca aterosclerotica è attivata ed esprime abbondante HLA di classe II e molecole di adesione<sup>2</sup>. Un vasto range di citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>3</sup>, interleuchina (IL)-1 $\beta$ <sup>4</sup>, IL-6<sup>5</sup>, IL-2<sup>6,7</sup>, interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>8</sup>, macrophage colony stimulating factor<sup>9</sup>, citochine antinfiammatorie come l'IL-10<sup>10</sup> e chemochine [IL-8<sup>5,11</sup>, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)<sup>12</sup>, IP-10, Mig, I-TAC<sup>13</sup>] sono state trovate nella placca aterosclerotica. L'osservazione che elevati livelli di proteina C reattiva<sup>14</sup> e di IL-6<sup>15,16</sup> sono associati ad una prognosi sfavorevole in pazienti con angina instabile supporta l'ipotesi di un ruolo per i meccanismi infiammatori nello sviluppo della placca aterosclerotica e nella precipitazione delle sindromi coronariche acute. I livelli di IL-6<sup>17</sup> e TNF- $\alpha$ <sup>18</sup> sono stati inoltre associati ad una prognosi sfavorevole a lungo termine nel Physicians' Health Study.

I linfociti T potrebbero essere di importanza critica nell'amplificare la risposta infiammatoria nella malattia aterosclerotica e

nelle sue complicazioni. Le cellule T, infatti, sono presenti nelle lesioni aterosclerotiche fin dai loro stadi più precoci<sup>1</sup> e persistono in qualunque stadio della malattia<sup>8</sup>. La maggioranza delle cellule T nella placca aterosclerotica sembra esprimere numerosi marker di attivazione, come HLA-DR, VLA-1, CD40 ligand (CD40L) e CD25<sup>8,19</sup>. Nonostante l'esteso lavoro di fenotipizzazione svolto sui linfociti nelle lesioni aterosclerotiche, il loro ruolo funzionale rimane ancora non del tutto chiarito. Le citochine prodotte dalle cellule T, come IL-4, IL-10 e IL-13, hanno un ruolo prevalentemente antinfiammatorio e IFN- $\gamma$  da solo mostra una scarsa capacità di indurre la produzione di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e fattore tissutale<sup>20-24</sup>. Questo suggerisce che le cellule T possano esercitare un effetto patogenetico mediante contatto cellulare diretto con altri tipi cellulari contenuti nella placca aterosclerotica. Questa rassegna ha lo scopo di descrivere lo stato dell'arte della ricerca sul ruolo delle interazioni cellulari da contatto diretto tra monociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e linfociti T attivati nella progressione e complicazione dell'aterosclerosi.

#### **L'attivazione di monociti e cellule muscolari lisce mediante contatto diretto con linfociti T stimolati: una via maggiore di induzione di citochine, metalloproteinasi e fattore tissutale**

Il contatto con linfociti T attivati è per i monociti e macrofagi un potente stimolo pro-infiammatorio che induce una massiva up-regolazione di citochine pro-infiammatorie, come il TNF- $\alpha$ , di metalloproteinasi e di fattore tissutale.

Il TNF- $\alpha$  è all'apice della cascata delle citochine, ed una volta rilasciato induce a sua volta IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>25</sup>. I segnali che inducono la produzione di TNF- $\alpha$  nell'uomo sono stati solo recentemente chiariti nei monociti-macrofagi, che sono classicamente stimolati da prodotti batterici, come lipopolisaccaridi, o stimoli non specifici come esteri del forbolo o attivati, ma non in misura massimale da citochine endogene come IFN- $\gamma$ <sup>20-23</sup>. Il contatto diretto con linfociti T attivati è, infatti, finora l'unico stimolo endogeno conosciuto in grado di indurre produzione massimale di TNF- $\alpha$  da monociti-macrofagi. Il contatto cellulare diretto con linfociti T induce la produzione di mediatori pro-infiammatori da parte di monociti-macrofagi<sup>26,27</sup> nella stessa misura dell'attivazione da lipopolisaccaridi<sup>20-23</sup>.

Le interazioni cellulari da contatto hanno anche un ruolo nell'induzione di metalloproteinasi, come MMP-1, -3, e fattore tissutale, il principale iniziatore *in vivo* della coagulazione. Le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce ed i macrofagi residenti nella placca aterosclerotica esprimono tutti costitutivamente il CD40<sup>28</sup>, mentre i linfociti T esprimono il CD40L<sup>19</sup>. Il legame tra CD40 e CD40L su monociti e cellule muscolari lisce induce la produzione di MMP-1, MMP-3, TNF- $\alpha$  e fattore tissutale<sup>24,28</sup>. È inoltre stato dimostrato

che l'interferenza con questo meccanismo mediante anticorpo anti-CD40L riduce la comparsa di aterosclerosi in un modello animale<sup>29</sup>. Inoltre questi meccanismi sembrano avere un ruolo anche nelle manifestazioni acute della malattia aterosclerotica coronarica, come l'angina instabile. Ad esempio, i linfociti periferici di pazienti con angina instabile sono in grado di indurre attività procoagulante (espressione dell'attività del fattore tissutale) nei monociti<sup>30</sup>.

Numerose molecole, come il CD40L, membrane-TNF- $\alpha$ <sup>26</sup> e CD69<sup>20</sup> sembrano essere coinvolte nell'attivazione mediata da contatto diretto dei monociti-macrofagi. Oltre a stimoli aspecifici, come la fitoemmaglutina (PHA) ed il forbolo miristato acetato (PMA), numerosi stimoli endogeni inducono le cellule T ad attivare monociti mediante contatto diretto: il cross-linking del CD3 con o senza cross-linking della molecola costimolatoria CD28<sup>26</sup>, riconoscimento antigenico in cloni T specifici<sup>26</sup> e, in maniera antigene-indipendente, citochine<sup>27</sup>.

Infatti, è stato recentemente riportato che un cocktail di citochine, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-2, sono in grado di attivare le cellule T in apparente assenza di stimolazione antigenica a proliferare, attivare le cellule B<sup>31</sup>, ed indurre la secrezione monocitaria di citochine pro-infiammatorie<sup>26,27</sup>. Paragonati a linfociti attivati da citochine i linfociti attivati mediante il complesso TCR-CD3 erano in grado di indurre la produzione della citochina pro-infiammatoria TNF- $\alpha$ , e la citochina antinfiammatoria IL-10. In contrasto, i linfociti attivati da citochine inducono selettivamente la produzione monocitaria di alti livelli di TNF- $\alpha$ , ma non IL-10<sup>26,27</sup>, inducendo quindi nei monociti una risposta citochinica esclusivamente pro-infiammatoria. È stato provato che questo meccanismo è rilevante nella patogenesi di altre malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide, dove i linfociti T isolati dalla membrana sinoviale di pazienti affetti si comportano come linfociti T attivati da citochine inducendo una produzione eccessiva di TNF- $\alpha$  dai monociti<sup>32</sup>. Simili meccanismi potrebbero prendere parte alla patogenesi dell'aterosclerosi, poiché in essa esistono le condizioni per generare linfociti T attivati da citochine (TNF- $\alpha$ <sup>3</sup>, IL-6<sup>5,33</sup>, IL-2<sup>6,7,33</sup>), ed i livelli periferici di TNF- $\alpha$  ed IL-6 hanno un potere predittivo di eventi coronarici acuti in studi di popolazione a lungo termine<sup>17,18</sup>. Le citochine derivate da monociti-macrofagi, come l'IL-6 ed il TNF- $\alpha$  presenti a siti di infiammazione, come la membrana sinoviale reumatoide e le lesioni aterosclerotiche, potrebbero attivare linfociti T "bystander", che a loro volta possono stimolare ulteriormente i monociti-macrofagi a produrre più citochine pro-infiammatorie.

#### **L'attivazione di cellule endoteliali mediante contatto diretto con linfociti T stimolati: una via maggiore di induzione di citochine e chemochine**

Un ruolo potenziale per i linfociti T nell'aterosclerosi riguarda la loro interazione con l'endotelio vascolare.

L'endotelio è il principale cancello di ingresso che regola il reclutamento e l'attivazione di leucociti nella placca aterosclerotica<sup>1</sup>, attraverso l'espressione di molecole di adesione<sup>2</sup>, citochine pro-infiammatorie<sup>3</sup> e chemochine<sup>13</sup>. L'adesione dei linfociti T all'endotelio vascolare è un evento precoce in aterogenesi, che precede la loro migrazione e localizzazione subendoteliale<sup>1</sup>. Durante questo processo, i linfociti T entrano in stretto contatto fisico con le cellule endoteliali. Tale interazione può avvenire anche nei neovasi presenti nelle placche aterosclerotiche avanzate<sup>2</sup>. L'attivazione delle cellule endoteliali mediata dai linfociti T potrebbe giocare un ruolo chiave nella formazione e progressione della placca aterosclerotica, in quanto le cellule T hanno l'abilità di attivare altri tipi cellulari sia mediante mediatori solubili che mediante contatto diretto della membrana cellulare e l'interazione tra recettori di superficie. Quest'ultima possibilità è stata chiarita solo di recente.

Noi abbiamo recentemente descritto l'abilità delle cellule T stimulate di modulare l'attivazione delle cellule endoteliali mediante interazioni cellulari da contatto. Nel nostro studio i linfociti T sono stati coltivati o con anticorpo monoclonale anti-CD3 (linfociti T TCR-attivati), o in presenza di una combinazione di TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 (linfociti T attivati da citochine), o in assenza di stimolo, prima di essere fissati in glutaraldeide. Cellule endoteliali HUV sono state quindi coltivate in presenza di linfociti T fissati ed è stata misurata la loro produzione delle chemochine IL-8 e MCP-1 e della citochina pro-infiammatoria IL-6. Le cellule T attivate e fissate inducono in maniera dose-dipendente un sostanziale rilascio di MCP-1, IL-8 e IL-6 da parte delle cellule endoteliali. Studi precedenti avevano dimostrato che il contatto con linfociti T attivati induce l'espressione di molecole di adesione in cellule endoteliali<sup>23</sup>. Il membrane-TNF- $\alpha$ <sup>23</sup> e/o il CD40-CD40L signaling<sup>28</sup> sembrano essere coinvolti in questa interazione. È da notare che in studi precedenti, i linfociti T sono stati stimolati aspecificamente con PHA o PMA. Invece, nel nostro studio abbiamo voluto mimare l'attivazione fisiologica delle cellule T mediante anticorpo anti-CD3 o citochine. Il contatto cellulare diretto di membrana potrebbe agire in sinergia con fattori solubili, come il TNF- $\alpha$  e l'IFN- $\gamma$ , che sono prodotti da linfociti stimolati<sup>34</sup>.

Il signaling mediante contatto cellulare delle cellule endoteliali da parte di linfociti T stimolati è in grado di indurre chemochine e citochine pro-infiammatorie di rilevante importanza nello sviluppo e progressione della malattia aterosclerotica, come MCP-1, IL-8 e IL-6, tutte presenti in abbondanza nelle lesioni aterosclerotiche<sup>5,35,36</sup>. Questo meccanismo potrebbe inoltre avere un ruolo nell'induzione della risposta infiammatoria sistemica di basso grado, che è una caratteristica della malattia infiammatoria ed in grado di predire eventi cardiovascolari futuri, come infarto miocardico non fatale, ictus e progressione della malattia vascolare periferica<sup>17,18,37,38</sup>. I livelli di IL-6 e proteina C reattiva sono ancora più up-regolati nel sangue periferico dei pazienti con angina instabile<sup>15</sup>.

Un'ulteriore interessante osservazione è che vie differenti di attivazione delle cellule T (antigene-dipendente vs antigene-indipendente) risultano in risposte differenziali nelle cellule endoteliali. Come osservato nel sistema cellule T/monociti, i linfociti T TCR-attivati inducono nelle cellule endoteliali un differente profilo di produzione citochinica rispetto ai linfociti attivati da citochine. I linfociti T TCR-attivati inducono preferenzialmente la produzione di MCP-1, mentre i linfociti attivati da citochine inducono preferenzialmente IL-6. I due set linfocitari potrebbero quindi regolare diversi eventi nella placca aterosclerotica, simultaneamente o in fasi diverse<sup>39</sup>. L'induzione di MCP-1 indotta dall'interazione tra i linfociti T TCR-attivati e le cellule endoteliali potrebbe preferenzialmente regolare l'influsso di monociti nella placca aterosclerotica<sup>35</sup>. Le interazioni tra linfociti T attivati da citochine e cellule endoteliali potrebbero, invece, contribuire all'infiammazione sistemica di basso grado in soggetti con aterosclerosi clinica o subclinica<sup>37,40</sup> e alla up-regolazione di IL-6 nei pazienti con sindromi coronariche acute<sup>15</sup>.

## Conclusioni

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria<sup>1</sup>, caratterizzata da un background cronico e fasi acute di progressione. Ai siti di infiammazione cronica, mediatori pro-infiammatori, la cui produzione in condizioni fisiologiche è strettamente regolata nel tempo e nello spazio portando alla sradicazione degli agenti infettivi e alla riparazione tissutale, sfuggono ai meccanismi regolatori generando, invece, infiammazione e distruzione tissutale.

Nel contesto di una risposta infiammatoria, le interazioni cellulari da contatto possono modulare le funzioni delle cellule bersaglio e perpetuare la risposta infiammatoria. I linfociti T stimolati hanno un ruolo chiave nell'amplificare la risposta infiammatoria al sito della lesione aterosclerotica mediante l'attivazione delle cellule endoteliali, macrofagi e cellule muscolari lisce, o i monociti nella circolazione sistemica. Questo risulta nella produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, metalloproteinasi e fattore tissutale portando alla progressione e complicazione delle lesioni aterosclerotiche.

Le interazioni da contatto cellulare tra linfociti T attivati e cellule circolanti potrebbero essere quindi rilevanti nella disregolazione della risposta infiammatoria nella placca aterosclerotica, rappresentando un nuovo meccanismo della sua progressione. La comprensione dei ligandi e dei recettori coinvolti potrebbe permettere la definizione di nuovi agenti terapeutici.

## Riassunto

I meccanismi di regolazione del processo infiammatorio a livello della placca aterosclerotica non sono stati finora completamente chiariti. I linfociti T po-

trebbero avere un ruolo chiave in quanto in grado di regolare la risposta immunitaria non solo attraverso la produzione di mediatori solubili, ad esempio interferone- $\gamma$ , ma anche attraverso il contatto diretto con altri tipi cellulari, come cellule endoteliali, macrofagi e cellule muscolari lisce. L'importanza di tali interazioni cellulari da contatto, mediate da ligandi e recettori di superficie, nell'amplificazione e disregolazione della risposta infiammatoria nella placca aterosclerotica è stata solo recentemente riconosciuta. I linfociti T stimolati inducono la produzione di citochine proinfiammatorie (fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  e interleuchina-6) e chemochine (interleuchina-8 e monocyte chemoattractant protein-1) da parte di monociti e cellule endoteliali, possibilmente contribuendo alla progressione della lesione aterosclerotica. La comprensione dei ligandi e recettori coinvolti in tali interazioni potrebbe permettere la definizione di nuovi agenti terapeutici.

*Parole chiave:* Aterosclerosi; Cellule endoteliali; Citochine; Linfociti T; Monociti/macrofagi.

## Bibliografia

1. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
2. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992; 141: 1427-33.
3. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 1990; 65: 297-302.
4. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1000-6.
5. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 1996; 127: 263-71.
6. Arbustini E, Grasso M, Diegoli M, et al. Coronary atherosclerotic plaques with and without thrombus in ischemic heart syndromes: a morphologic, immunohistochemical, and biochemical study. *Am J Cardiol* 1991; 68: 36B-50B.
7. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43.
8. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; 135: 169-75.
9. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 301-16.
10. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 611-6.
11. Liu Y, Hulthen LM, Wiklund O. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 317-23.
12. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5252-6.
13. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-5.
14. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-24.
15. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 874-7.
16. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999; 99: 2079-84.
17. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767-72.
18. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-53.
19. Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1998; 137: S89-S95.
20. Isler P, Vey E, Zhang JH, Dayer JM. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 15-23.
21. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994; 269: 22027-33.
22. Li JM, Isler P, Dayer JM, Burger D. Contact-dependent stimulation of monocytic cells and neutrophils by stimulated human T-cell clones. *Immunology* 1995; 84: 571-6.
23. Lou J, Dayer JM, Grau GE, Burger D. Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 3107-13.
24. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997; 96: 396-9.
25. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
26. Parry SL, Sebbag M, Feldmann M, Brennan FM. Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 1997; 158: 3673-81.
27. Sebbag M, Parry SL, Brennan FM, Feldmann M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1997; 27: 624-32.
28. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells,



- smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931-6.
29. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394: 200-3.
  30. Serneri GG, Abbate R, Gori AM, et al. Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 1992; 86: 790-7.
  31. Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med* 1994; 180: 1159-64.
  32. Brennan FM, Hayes AL, Ciesielski CJ, Foxwell BMJ, Feldmann M. Cytokine activated T cells are important in TNF $\alpha$  synthesis in rheumatoid arthritis: PI3 kinase and NF- $\kappa$ B pathways discriminate between cytokine and TCR activated T cells. *Arthritis Rheum* 2001, in press.
  33. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 433-42.
  34. Bevilacqua MP, Gimbrone MA Jr. Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13: 425-33.
  35. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991; 88: 1121-7.
  36. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 353-63.
  37. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-9.
  38. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998; 97: 425-8.
  39. Monaco C, Young S, Paleolog E, Feldmann M. Activated T-cells stimulate endothelial cells to release pro-inflammatory cytokines in a contact-dependent manner: a clue about the pathogenesis of atherosclerosis? (abstr) *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 316A.
  40. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997; 349: 462-6.