

**FISIOPATOLOGIA**

# RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE NELL'ATEROSCLEROSI

**GIUSEPPE DANILÒ NORATA, ALBERICO LUIGI CATAPANO****Introduzione**

L'aterosclerosi è una condizione patologica caratterizzata da infiammazione cronica e non risolutiva nell'intima della parete arteriosa, innescata da elevati livelli di colesterolo trasportato dalle lipoproteine a bassa densità (LDL). Molte sono le evidenze che hanno confermato la natura infiammatoria dell'aterosclerosi:

- 1) presenza nelle placche aterosclerotiche di cellule infiammatorie, il cui numero correla con la severità della malattia;
- 2) aumento dei livelli circolanti di citochine infiammatorie e chemochine con la progressione dell'aterosclerosi;
- 3) associazione tra eventi cardiovascolari e livelli plasmatici di marker infiammatori, come la proteina C-reattiva e l'interleuchina 6 (IL-6).

Queste osservazioni indicano come l'infiammazione caratterizzi tutti gli stadi del processo aterosclerotico, dalla formazione delle strie lipidiche fino alla rottura della placca.

In seguito all'accumulo di LDL nella parete arteriosa, si assiste a un cambiamento della funzionalità dell'endotelio, che perde la sua attività di barriera impermeabile e assume una condizione "attivata", che favorisce un considerevole richiamo dal circolo di monociti (cellule dell'immunità in-

nata) e linfociti T (cellule dell'immunità adattativa) (1). I monociti infiltrati differenziano in macrofagi (che rappresentano le cellule immunitarie più abbondanti presenti nella placca aterosclerotica), con conseguente aumento dell'espressione di recettori *scavenger* sulla loro superficie, accumulo di LDL modificate e formazione di *foam cells* cariche di lipidi; l'aumento dello stress ossidativo induce la produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Oltre ai monociti-macrofagi, le cellule dell'immunità adattativa giocano un ruolo fondamentale nell'aterosclerosi (*Figura 1*), in cui svolgono sia attività pro-infiammatoria (linfociti T-helper-1 e linfociti B2) che anti-infiammatoria (linfociti T-regolatori e linfociti B1) (2). I linfociti Th1 sono presenti in elevato numero nella placca aterosclerotica e, grazie alla secrezione di citochine pro-infiammatorie, possono attivare macrofagi, linfociti T e altre cellule presenti nella placca, accentuando la risposta infiammatoria. Inoltre, IL-17 secreto dai linfociti Th17 promuove la secrezione di citochine infiammatorie, chemochine e fattori di crescita da diversi tipi cellulari (3). All'interno delle popolazioni di linfociti attivati, è possibile identificare cellule memoria ad attività effettrice (T *effector memory*) associate con il peggioramento del quadro infiammatorio e

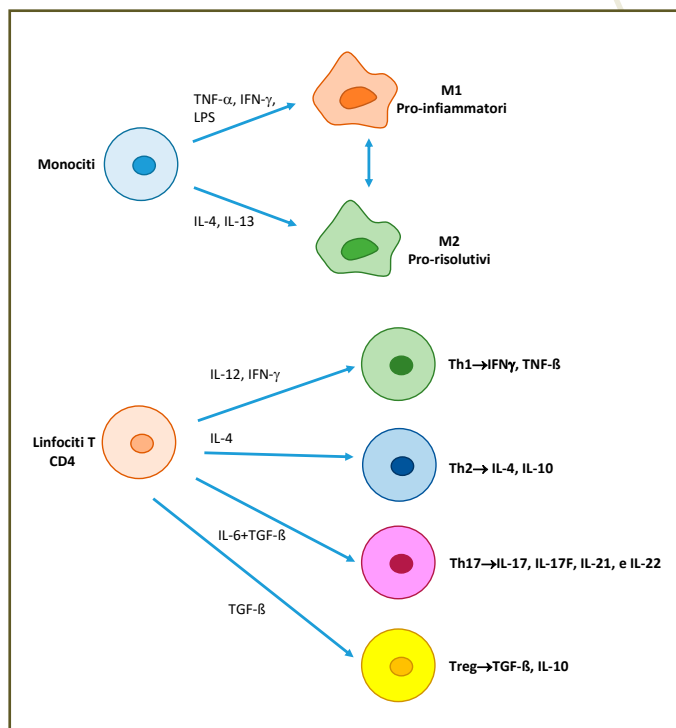
popolazioni T regolatorie (Treg) che invece controllano l'eccessiva attivazione delle popolazioni linfocitarie (4-7). È importante ricordare come l'attività delle cellule T regolatorie risulti diminuita nei pazienti con ipercolesterolemia familiare. Infine, le cellule muscolari lisce presenti nella media del vaso arterioso migrano nell'intima in risposta a uno stimolo pro-infiammatorio; qui proliferano, acquisiscono un fenotipo sintetico e contribuiscono alla produzione di matrice extra-cellulare e alla cronicizzazione della risposta infiammatoria nella placca aterosclerotica.

### Monociti/macrofagi e infiammazione vascolare

Le cellule immunitarie innate, tra cui i monociti, i macrofagi ed i neutrofili, rappresentano la prima linea di difesa immunitaria.

In condizioni di ipercolesterolemia, i monociti circolanti vanno incontro ad un *priming* del metabolismo cellulare che ne influenza la funzionalità, e agisce come segnale di polarizzazione verso un fenotipo infiammatorio ben prima che avvenga il processo di differenziamento a macrofagi nella parete arteriosa. Monociti isolati da pazienti con aterosclerosi, quando trattati in vitro con un secondo stimolo producono livelli più elevati di IL-6 e IL-1 $\beta$  rispetto a monociti isolati da individui controllo, suggerendo la presenza di un'attivazione in senso pro-infiammatorio già prima di raggiungere la placca aterosclerotica.

In presenza di un elevato contenuto di colesterolo intracellulare si formano cristalli di colesterolo in grado di attivare l'infiammasoma NLRP3 con conseguente produzione di IL-1 $\beta$ . Inoltre, un elevato contenuto di colesterolo nelle membrane cellulari nei *lipid rafts* dei macrofagi della placca può amplificare le vie di trasduzione del



**Figura 1** - Differenziamento delle cellule immunitarie. In seguito a differenziamento, i monociti danno origine ai macrofagi, che sono classicamente suddivisi in due sottotipi: M1, con attività pro-infiammatoria, e M2, con attività anti-infiammatoria. Dai linfociti T CD4 originano diversi sottotipi di linfociti T: Th1 (pro-infiammatori), caratterizzati dalla produzione di interferone- $\gamma$  e TNF- $\beta$ ; Th17, che producono IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22; Th2 (anti-infiammatori), che producono IL-4 e IL-10; Treg, coinvolte nella regolazione dell'attività delle popolazioni linfocitarie.

segnale coinvolte nell'infiammazione, in particolare tramite l'attivazione di TLR4 e del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- $\kappa$ B.

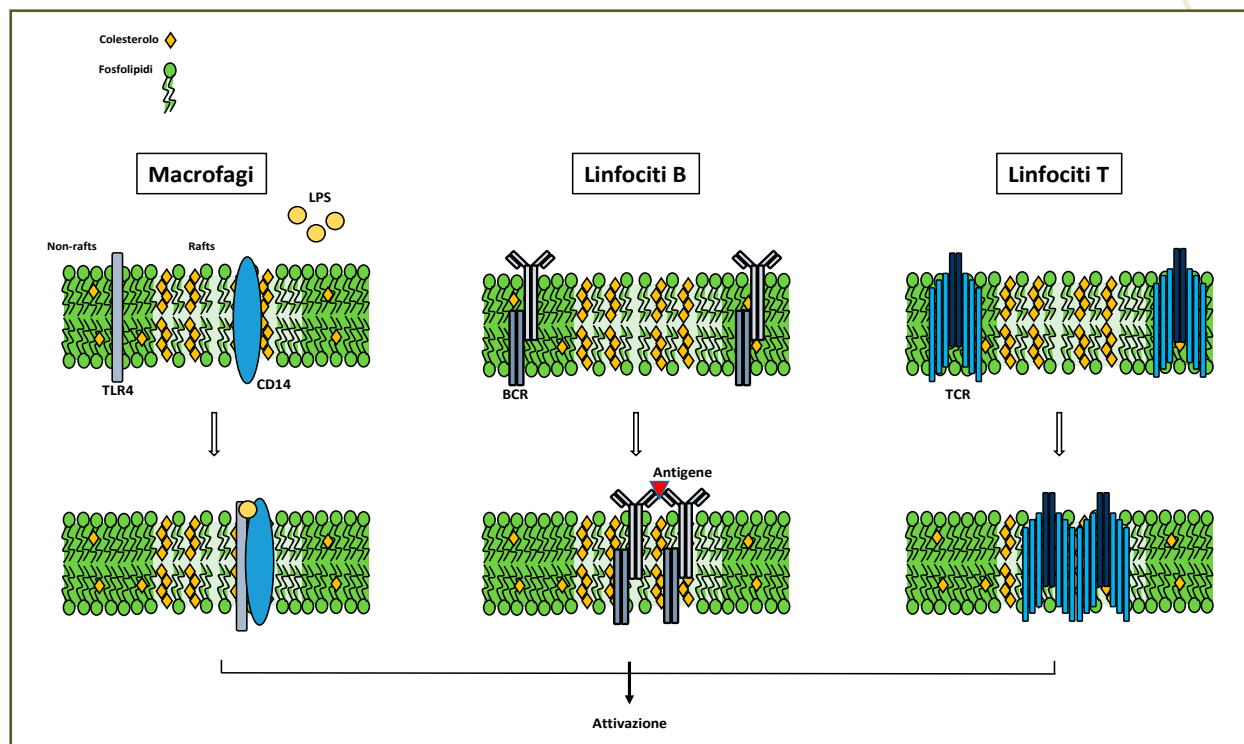
I macrofagi derivano dai monociti e svolgono un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria associata all'aterosclerosi. Una volta differenziati, i macrofagi esprimono sulla loro superficie numerosi recettori *scavenger* (SR) e *toll like receptors* (TLR) che sono fondamentali per la loro attività. Nella lesione aterosclerotica, i macrofagi riconoscono ed internalizzano LDL modificate (LDL ossidate o OxLDL);

quando la loro capacità di degradare è inferiore all'abilità nel fagocitarle, si trasformano in *foam cells*, un evento che contribuisce all'instaurazione di una risposta infiammatoria cronica. I macrofagi, inoltre, secernono citochine pro-infiammatorie e contribuiscono al rimodellamento vascolare.<sup>8</sup> Lo stato fenotipico dei macrofagi è altamente dinamico e può variare in risposta all'ambiente tissutale in cui si trovano e ai segnali esterni. Nella lesione aterosclerotica si possono identificare due sottogruppi principali di macrofagi che hanno caratteristiche funzionali distinte in base al profilo di citochine prodotte (*Figura 1*): i macrofagi M1 (pro-infiammatori) e quelli M2 (anti-infiammatori). La formazione dei macrofagi M1 è indotta da citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e da patogeni; dopo differenziamento, producono a loro volta citochine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ ), chemochine ed elevati livelli di ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno. I macrofagi M1 rappresentano il fenotipo dominante durante la progressione della placca e sono generati per combattere gli agenti patogeni ed eliminare sostanze "not self". I macrofagi M2 si formano principalmente in risposta alle citochine IL-4 e IL-13 e producono IL-10 con attività anti-infiammatoria e sono principalmente coinvolti nella risposta pro-risolutiva che è chiave nel ripristinare l'omeostasi tissutale dopo che la risposta infiammatoria ha svolto il suo ruolo. Questi due sottogruppi di macrofagi hanno anche un diverso metabolismo cellulare; una volta attivati, i macrofagi M1 producono ATP principalmente attraverso glicolisi anaerobica, mentre i macrofagi M2 prediligono la fosforilazione ossidativa. Comprendere meglio il metabolismo cellulare durante i diversi stati di attivazione potrebbe portare ad identificare nuovi target in ambito di terapia dell'aterosclerosi.

### **Lipid rafts e infiammazione**

Il colesterolo è un componente essenziale delle membrane cellulari; i *lipid rafts* sono microdomini della membrana plasmatica arricchiti in colesterolo e sfingolipidi, altamente dinamici, finemente regolati, essenziali per la funzionalità cellulare; costituiscono il 30-40% della membrana cellulare dei mammiferi e servono come piattaforma in cui proteine coinvolte nella trasduzione del segnale vengono transitoriamente assemblate o organizzate spazialmente per promuovere interazioni cineticamente favorevoli e innescare una adeguata risposta a uno stimolo. Infatti, molti enzimi e proteine coinvolti nel sistema di trasduzione del segnale sono attivi quando sono concentrati in questi microdomini di membrana. L'abbondanza e le proprietà funzionali dei *lipid rafts* si modificano molto rapidamente in risposta a uno stimolo, e per preservare la normale funzionalità cellulare, l'omeostasi del colesterolo è fondamentale per assicurare un'ottimale composizione dei *lipid rafts*.

Alterazioni della composizione e dell'abbondanza dei *lipid rafts* sono associate a condizioni patologiche, inclusa l'attivazione della risposta immunitaria e l'infiammazione. I *lipid rafts* infatti svolgono un ruolo fondamentale nel modulare la risposta immunitaria, sia innata che acquisita. Non solo i *toll like receptors* (TLRs), che fanno parte del sistema dell'immunità innata e agiscono come sensori di patogeni, richiedono l'integrità strutturale dei *lipid rafts* per la loro attività, ma anche i recettori fondamentali per l'attività dei linfociti T e B si associano ai *lipid rafts* e iniziano il processo di trasduzione del segnale che porta alla loro attivazione se opportunamente localizzati in queste zone di membrana arricchite in colesterolo (*Figura 2*). L'alterazione dell'integrità dei *lipid*



**Figura 2** - Lipid rafts e recettori coinvolti nell'attivazione delle cellule immunitarie. I lipid rafts sono microdomini di membrana arricchiti in colesterolo e fondamentali nella risposta infiammatoria. Nei macrofagi, i toll like receptors (TLR), e in particolare TLR4, in assenza di stimolo risiedono in porzioni della membrana non-raft; in seguito a stimolazione (ad esempio con LPS) migrano nei lipid rafts dove vengono attivati e innescano un processo di trasduzione del segnale che determina produzione di citochine pro-infiammatorie e attivazione della cellula. Nei linfociti non attivati, i recettori BCR e TCR sono localizzati in domini non raft della membrana plasmatica in forma monomeric. In seguito a stimolazione, i recettori migrano nei lipid rafts e innescano l'attivazione delle vie di segnalazione a valle e la conseguente attivazione e proliferazione delle cellule.

rafts modifica la risposta di diverse cellule immunitarie (9).-

Variazioni dei livelli di colesterolo libero modulano il contenuto di *lipid rafts* in membrana ed il clustering dei recettori in queste regioni; questo si traduce in una differente risposta di *rolling* e adesione dei leucociti all'endotelio vasale: un elevato contenuto di colesterolo aumenta l'interazione monociti-endotelio e la tras migrazione dei monociti attraverso l'endotelio in risposta a uno stimolo chemotattico, aumentando così la risposta infiammatoria (10). Inoltre, i *lipid rafts* regolano la funzionalità dei linfociti T. Nel processo infiammatorio

sono coinvolti diversi tipi di linfociti T helper: i linfociti pro-infiammatori Th1, caratterizzati dalla produzione di interferone- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , e Th17, che producono IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22, e i linfociti Th2 anti-infiammatori che producono IL-4 e IL-10 (*Figura 1*) (11). Un maggiore contenuto di colesterolo nella membrana cellulare dirige l'attivazione dei linfociti verso un fenotipo infiammatorio.

### Inflammasoma e aterosclerosi

L'inflammasoma è un complesso multiproteico citoplasmatico che rappresenta

una componente fondamentale dell'immunità innata; nello specifico, l'inflammasoma NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) è quello meglio caratterizzato e ha un ruolo fondamentale nell'infiammazione vascolare causata dai lipidi e, come conseguenza, nell'iniziazione e progressione dell'aterosclerosi (12). I componenti dell'inflammasoma NLRP3 sono espressi prevalentemente in macrofagi e nelle *foam cells* presenti nella placca aterosclerotica.

L'inflammasoma NLRP3 consiste di un sensore (NLRP3), un adattatore (ASC o PYCARD) e un effettore (caspasi-1). In presenza di un segnale di attivazione, NLRP3 oligomerizza e recluta ASC e caspasi-1; in seguito a questa associazione, la caspasi-1 si attiva e promuove la generazione di IL-1 $\beta$  e IL-18 dai loro precursori, che promuovono la risposta infiammatoria sistemica (*Figura 3*) (13). Inoltre, l'attivazione di caspasi-1 è in grado di indurre una forma di morte cellulare infiammatoria denominata piroptosi. L'attivazione dell'inflammasoma è un processo che avviene in due fasi. La prima fase, detta *priming*, ha lo scopo di aumentare l'espressione dei vari componenti dell'inflammasoma (NLRP3, caspasi-1, pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18) a livello trascrizionale e viene indotta dall'interazione tra strutture altamente conservate espresse dai patogeni, i PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), o da cellule danneggiate, i DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*), e recettori specifici espressi dal sistema immunitario innato come i PRRs (*Pathogen recognition receptors*), tra cui i TLRs. Un successivo stimolo inizia la fase di attivazione vera e propria, con l'assemblaggio dell'inflammasoma e produzione delle citochine pro-infiammatorie (*Figura 3*) (13).

Gli attivatori dell'inflammasoma NLRP3 sono numerosi (13); nel contesto dell'atero-

sclerosi un fattore chiave sono i cristalli di colesterolo (12).

Una perturbazione dell'omeostasi del colesterolo (ad esempio durante la fase di progressione dell'aterosclerosi) determina un accumulo di colesterolo libero nei macrofagi che, se non esterificato a sufficienza, si deposita in forma di cristalli nel citoplasma delle cellule. L'accumulo citoplasmatico di cristalli di colesterolo attiva il complesso NLRP3 e promuove la risposta infiammatoria. Questa attivazione avviene attraverso diversi meccanismi, che comprendono danno lisosomiale, efflusso di potassio, attivazione di Nrf2 (un fattore di trascrizione coinvolto nella risposta allo stress ossidativo), aumento dell'espressione del recettore CD36, attivazione del complemento (12).

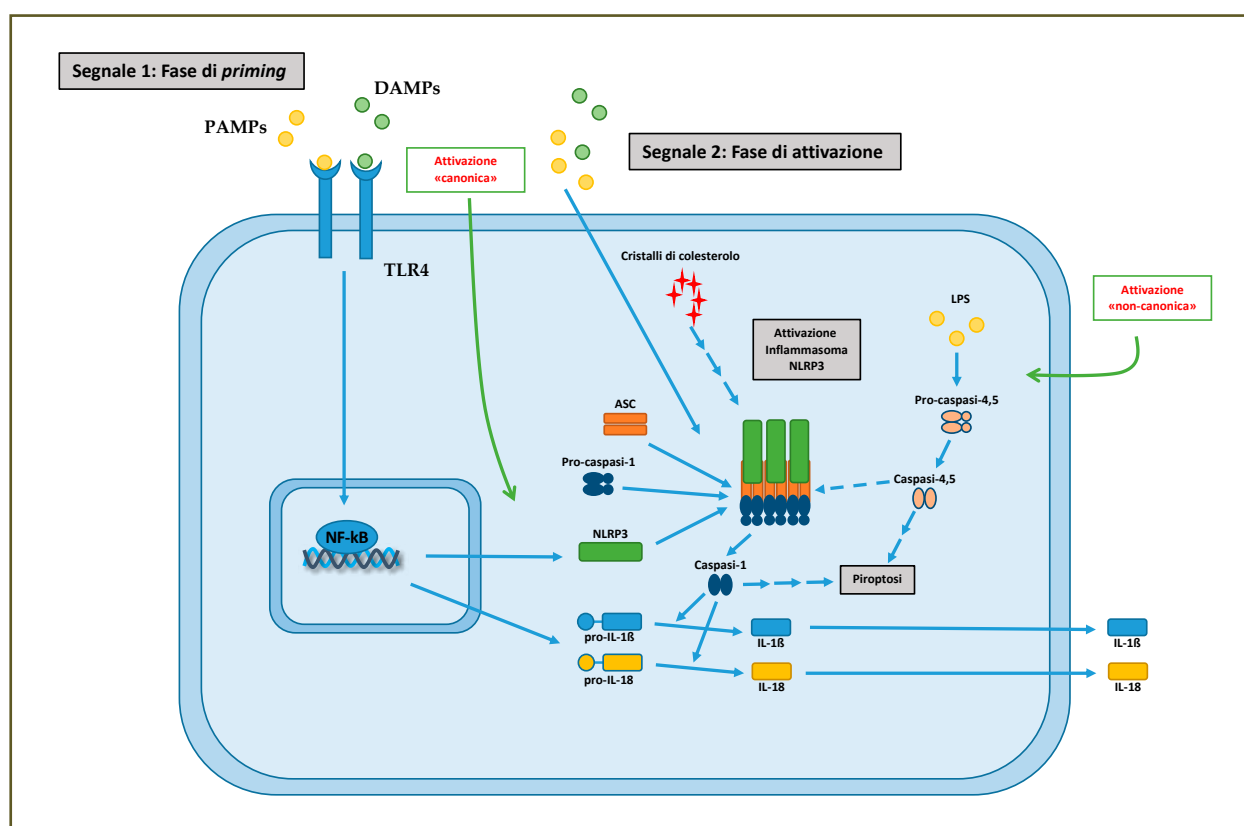
IL-1 $\beta$  e IL-18, generate via NLRP3, sono altamente espresse nella placca aterosclerotica, con livelli che correlano positivamente con la gravità della condizione. Il ruolo di queste citochine nel processo aterosclerotico è stato verificato in modelli animali di aterosclerosi, in cui la mancanza del gene che codifica per IL-1 $\beta$  o IL-18 riduce lo sviluppo della patologia (12). Oltre a indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie, l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 aumenta la capacità migratoria dei macrofagi e aumenta la deposizione intracellulare di lipidi, facilitando l'ingresso o la ritenzione di macrofagi nella parete arteriosa (14).

IL-1 $\beta$  è una citochina primordiale che sta a monte della cascata infiammatoria; è in grado di aumentare la sua stessa espressione in molti tipi cellulari coinvolti nel processo aterosclerotico, un fenomeno noto come autoinduzione. IL-1 $\beta$  agisce su molti tipi di cellule: infatti, stimola l'espressione di molecole di adesione e di chemochine coinvolte nel reclutamento di cellule infiammatorie dal circolo sanguigno, aumen-

ta il richiamo di neutrofilii, coinvolti sia nel processo di formazione che di rottura della placca (12), ma favorisce anche l'attivazione delle cellule endoteliali. IL-1 $\beta$  aumenta la proliferazione delle cellule muscolari lisce e la produzione di metalloproteasi coinvolte sia nella migrazione cellulare che nel rimodellamento della placca. La produzione di IL-1 $\beta$  induce la generazione di mediatori secondari dell'infiammazione tramite IL-6: quest'ultima agisce come citochina

primaria e induce una risposta di fase acuta mediante produzione epatica di proteina C reattiva (CRP), che rappresenta un marker di infiammazione.

È importante ricordare che l'accumulo di cristalli di colesterolo nei macrofagi può portare anche a morte cellulare e, di conseguenza, il colesterolo che precipita nel core necrotico contribuisce alla perforazione del cappuccio fibroso che avvolge la placca stessa (12).



**Figura 3** - Attivazione dell'inflammasoma NLRP3. L'inflammasoma NLRP3 è costituito da un sensore (NLRP3), un adattatore (ASC o PYCARD) e un effetore (caspasi-1). In presenza di uno stimolo, NLRP3 oligomerizza e recluta ASC e caspasi-1, con conseguente attivazione di quest'ultima e generazione di IL-1 $\beta$  e IL-18 dai loro precursori, che promuovono la risposta infiammatoria sistemica. L'attivazione di caspasi-1 induce una forma di morte cellulare infiammatoria (piroptosi). L'attivazione dell'inflammasoma avviene in due fasi. Durante la prima fase di priming, innescata dall'interazione tra PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) o DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) e recettori specifici espressi dal sistema immunitario innato, tra cui i toll like receptors (TLRs). Un secondo stimolo inizia la fase di attivazione vera e propria, con l'assemblaggio dell'inflammasoma e produzione delle citochine pro-infiammatorie. Questa via di attivazione è definita "canonica", in contrapposizione a quella "non-canonica" innescata sempre da LPS ma indipendentemente da TLR4: LPS intracellulare lega e attiva pro-caspasi 4 e 5 determinando sia un processo di piroptosi sia una attivazione indiretta dell'inflammasoma.



### Microbiota intestinale, infiammazione e aterosclerosi

Negli ultimi anni, molto interesse ha suscitato l'analisi della connessione tra microbiota intestinale, cioè l'insieme di microorganismi che colonizzano il tratto gastrointestinale e in grado di produrre diversi metaboliti, e malattia aterosclerotica. Il profilo del microbiota e dei metaboliti da esso prodotti sembrano infatti avere un ruolo chiave sia in stati fisiologici che in stati patologici. L'omeostasi del microbiota intestinale è fondamentale per la salute, mentre perturbazioni del microbiota (disbiosi), dovute a stress ambientale o alimentare, possono indurre uno stato infiammatorio e alterare il metabolismo dell'organismo ospite. È sempre più evidente il ruolo del microbiota intestinale in diverse patologie, incluse le malattie cardiovascolari, anche se molti dei meccanismi rimangono ancora sconosciuti (15). Appare tuttavia evidente che composti derivanti dal microbiota possono indurre effetti anche in organi diversi dall'intestino.

L'alterazione del microbiota intestinale può indurre uno stato infiammatorio pro-aterogeno, che può essere ulteriormente sostenuto dalla successiva alterazione della risposta immunitaria locale e sistemica. I macrofagi, sia che risiedano nella lamina propria intestinale o nell'intima dell'arteria possono essere attivati da diverse componenti presenti o generate dal microbiota intestinale (traslocazione di batteri vivi, componenti strutturali di batteri morti, come ad esempio il lipopolisaccaride o LPS, o metaboliti funzionali di derivazione batterica, quali trimetilammina N-ossido o TMAO). Le cellule immunitarie reagiscono a questi segnali batterici sia a livello locale sia a livello sistemico producendo diverse citochine (IL-1, IL-17, IL-18, IL-22) e

proteine (peptidi antimicrobici e immunoglobuline A) allo scopo di generare una risposta di difesa o di immunotolleranza verso il microbiota intestinale.

In condizioni normali, la barriera intestinale previene il passaggio di LPS (uno tra i PAMPs più importanti) nella circolazione sistemica; LPS può però raggiungere il circolo in presenza di una barriera intestinale con permeabilità alterata causata da disbiosi (16). LPS è riconosciuto principalmente da un recettore appartenente alla classe dei PRR, CD14, che a sua volta facilita l'attivazione di TLR4 (anch'esso appartenente ai PRR, ed espresso in monociti, macrofagi, cellule dendritiche, ma anche cellule endoteliali); questa interazione induce l'internalizzazione di TLR4 e la generazione di un segnale intracellulare con conseguente risposta infiammatoria mediata da citochine quali IL-6, IL-1, IL-27 e TNF- $\alpha$  sia a livello locale che a livello sistemico (17).

Da un lato, l'attivazione di TLR4 funziona come segnale di *priming* per NLRP3 che può venire attivato da LPS presente nel citoplasma (indipendentemente da TLR4) (*Figura 3*): LPS lega e attiva caspasi-4 e caspasi-5, che a loro volta attivano l'infiammasoma NLRP3 (*non-canonical inflammasome*), inducendo direttamente piroptosi e un'attivazione secondaria di NLRP3 (*canonical inflammasome*) con conseguente rilascio di IL-1 $\beta$  e IL-18.

La disbiosi intestinale induce la formazione, a partire da carnitina, di elevati livelli di TMAO, un composto con attività pro-infiammatoria e causalmente associato all'aterosclerosi. Infatti, è stato dimostrato che elevati livelli di TMAO inducono l'attivazione di NLRP3, l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e riducono l'espressione di citochine anti-infiammatorie (quali IL-10) (18). Inoltre TMAO, mediante l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, aumenta l'e-

spressione di proteine infiammatorie con attività pro-aterogena, incluse la ciclossigenasi-2, IL-6, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, determinando attivazione dell'endotelio e aumento dell'adesione dei leucociti (18, 19). La disfunzione endoteliale e infiammazione vascolare sono anche associati allo stress ossidativo indotto da elevati livelli di TMAO (19). Numerosi studi in modelli sperimentali hanno dimostrato una correlazione tra elevati livelli di TMAO e aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie; questa associazione positiva è stata dimostrata anche nell'uomo (18). In pazienti con ictus ischemico, i livelli di TMAO sono risultati significativamente correlati con la percentuale di monociti pro-infiammatori, e positivamente correlati con marcatori di attivazione monocitaria in pazienti con HIV e aterosclerosi carotidea (18).

## Conclusioni

Tutte le osservazioni accumulate in numerosi decenni di ricerca hanno posto l'attenzione sul processo immuno-infiammatorio come uno dei *driver* della progressione della malattia aterosclerotica. Tuttavia, i diversi tentativi di modulare la risposta infiammatoria in ambito di patologia aterosclerotica sono risultati molto promettenti negli studi pre-clinici ma poi non hanno mantenuto questa efficacia a livello clinico. Ad oggi, solo metrotrexato, colchicina e canakinumab (anti-IL-1 $\beta$ ) sono stati valutati in ampi studi di fase III in pazienti con malattia aterosclerotica. Colchicina e canakinumab hanno mostrato un'importante efficacia nel ridurre gli eventi cardiovascolari a discapito però di una riduzione dell'efficacia della risposta immunitaria in corso di infezioni. Oggi è ancora aperta la ricerca per identificare il modo migliore di controllare la risposta

infiammatoria nella placca aterosclerotica senza compromettere l'efficienza della risposta immunitaria.

## Bibliografia

1. Bonacina F, Da Dalt L, Catapano AL, Norata GD. Metabolic adaptations of cells at the vascular-immune interface during atherosclerosis. *Molecular aspects of medicine*. 2020; 100918.
2. Montarello NJ, Nguyen MT, Wong DTL, et al. Inflammation in Coronary Atherosclerosis and Its Therapeutic Implications. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020.
3. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nature reviews Cardiology*. 2020; 17: 387-401.
4. Ammirati E, Cianflone D, Vecchio V, et al. Effector memory T cells are associated with atherosclerosis in humans and animal models. *J Am Heart Assoc*. 2012; 1: 27-41.
5. Bonacina F, Martini E, Svecla M, et al. Adoptive transfer of CX3CR1 transduced-T regulatory cells improves homing to the atherosclerotic plaques and dampens atherosclerosis progression. *Cardiovasc Res*. 2020. doi: 10.1093/cvr/cvaa264
6. Ammirati E, Cianflone D, Banfi M, et al. Circulating CD4+CD25hiCD127lo regulatory T-Cell levels do not reflect the extent or severity of carotid and coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 1832-41.
7. Garetto S, Trovato AE, Lleo A, et al. Peak inflammation in atherosclerosis, primary biliary cirrhosis and autoimmune arthritis is counter-intuitively associated with regulatory T cell enrichment. *Immunobiology*. 2015; 220: 1025-9.
8. Chistiakov DA, Kashirskikh DA, Khotina VA, et al. Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis: The Role of Myeloid Cells. *J Clin Med*. 2019; 8.
9. Varshney P, Yadav V, Saini N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology*. 2016; 149: 13-24.
10. Ouweneel AB, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. The ins and outs of lipid rafts: functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes. *J Lipid Res*. 2020; 61: 676-86.
11. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Microdomains, Inflammation, and Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118: 679-91.
12. Jin Y, Fu J. Novel Insights Into the NLRP 3 In-



- flammasome in Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8: e012219.
13. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature reviews Immunology.* 2019; 19: 477-89.
  14. Li X, Zhang Y, Xia M, et al. Activation of Nlrp3 inflammasomes enhances macrophage lipid-deposition and migration: implication of a novel role of inflammasome in atherogenesis. *PLoS One.* 2014; 9: e87552.
  15. Eshghjoo S, Jayaraman A, Sun Y, Alaniz RC. Microbiota-mediated immune regulation in atherosclerosis. *Molecules.* 2021; 26.
  16. Yeh CF, Chen YH, Liu SF, et al. Mutual interplay of host immune system and gut microbiota in the immunopathology of atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21.
  17. Duttaroy AK. Role of Gut Microbiota and Their Metabolites on Atherosclerosis, Hypertension and Human Blood Platelet Function: A Review. *Nutrients.* 2021; 13.
  18. Yang S, Li X, Yang F, et al. Gut Microbiota-Dependent Marker TMAO in Promoting Cardiovascular Disease: Inflammation Mechanism, Clinical Prognostic, and Potential as a Therapeutic Target. *Front Pharmacol.* 2019;10: 1360.
  19. Liu Y, Dai M. Trimethylamine N-Oxide Generated by the Gut Microbiota Is Associated with Vascular Inflammation: New Insights into Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2020; 2020: 4634172.