

بررسی اثر ایمونیزاسیون با دو آنتی‌ژن مختلف بر علیه LDL اکسید بر ایجاد و توسعه آترواسکلروز در خرگوش

صدیقه عسگری^۱، زهرا فتاحی^۱، غلامعلی نادری^۱، شیرین اعظم پناه^۱

چکیده

مقدمه: مطالعات گوناگون از LDL اکسید شده (OX-LDL) به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌هایی که دارای نقش اساسی در ایجاد آسیب‌های اولیه آترواسکلروز می‌باشد، نام می‌برند. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر ایمونیزاسیون با دو آنتی‌ژن متفاوت تهیه شده از OX-LDL در خرگوش، سعی در شناخت بیشتر ارتباط سیستم ایمنی و آترواسکلروز دارد.

روش‌ها: ابتدا LDL از پلاسماي انسانی استخراج و خالص شده سپس با دو روش مالون دی آلدئید (MDA) و یا مس (CU⁺⁺) اکسید شد. خرگوش‌ها به سه گروه ۶ تایی تقسیم شده و پس از دو هفته که همگی تحت رژیم غذایی پایه بودند، اقدام به ایمونیزاسیون توسط MDA-LDL یا CU-LDL در آنها شد. در گروه کنترل نیز از بافر فسفات نمکی (PBS) استفاده گردید. ایمونیزاسیون در هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ نیز مجدداً با همین مواد تکرار شد و در هر مرحله میزان آنتی بادی OX-LDL اندازه‌گیری شد. در پایان هفته هشتم، هر گروه به مدت دو ماه تحت رژیم غذایی پرکلسترول قرار گرفت. در ابتدا و انتهای مطالعه، فاکتورهای بیوشیمیایی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت و در انتهای مطالعه نیز میزان رگه چربی (Fatty Streak) در عروق کرونر (راست و چپ) و آئورت آنها مورد ارزیابی پاتولوژیک قرار گرفت.

یافته‌ها: ایمونیزاسیون با MDA-LDL در رژیم پرکلسترول موجب کاهش معنی‌دار میانگین کلسترول و LDL-C و قندخون ناشتا (FBS) در انتهای مطالعه شد و به طور معنی‌داری از میزان رگه چربی در آئورت و کرونر راست این گروه نسبت به گروه پر کلسترول (کنترل) کاسته شد. ایمونیزاسیون با CU-LDL در رژیم پرکلسترول موجب کاهش معنی‌دار میانگین FBS، تری‌گلیسرید و کلسترول در انتهای مطالعه شد ولی تاثیر معنی‌داری بر کاهش رگه چربی در این گروه نسبت به گروه پرکلسترول (کنترل) مشاهده نشد. در گروه تحت رژیم پرکلسترول ایمونیزه شده با CU-LDL تغییرات میانگین CRP هم نسبت به گروه پرکلسترول (کنترل) و هم نسبت به گروه پرکلسترول ایمونیزه شده با MDA-LDL به طور معنی‌داری کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که فرضیه اثرات حفاظتی پاسخ‌های ایمنی بر آترواسکلروز بستگی به نوع اتوانتی‌بادی همراه دارد، به طوری‌که ایمونیزاسیون با MDA-LDL نسبت به CU-LDL با سازوکاری متفاوت در پیشگیری از آترواسکلروز موثر بوده است.

واژگان کلیدی: آترواسکلروز، سیستم ایمنی، MDA-LDL، CU-LDL، اتوانتی‌بادی OX-LDL، رگه چربی

۱- مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

* **نشانی:** اصفهان، میدان جمهوری اسلامی، خیابان خرم، مجتمع مراکز درمانی تحقیقاتی حضرت صدیقه طاهره (س)؛ صندوق پستی: ۸۱۴۶۵-۱۱۴۸؛ تلفن: ۳۳۵۹۶۹۶ و ۳۳۵۹۷۹۷-۳۳۱۱؛ شماره: ۳۳۷۳۴۳۵-۳۳۱۱؛ پست الکترونیک: s_asgari@crc.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۸۶/۴/۱۶

مقدمه

در مطالعات اخیر به ارتباط سیستم ایمنی و آترواسکلروز اشارات فراوانی شده [۶-۱] و نشان داده شده است که این سیستم با ایمونوژن‌های متفاوت و با سازوکارهای متفاوت می‌تواند در ایجاد و توسعه آترواسکلروز موثر باشد [۹-۷]. مطالعات مختلف، LDL اکسید شده (OX-LDL) را یکی از ایمونوژن‌های اصلی که نقش مهمی در آسیب‌های اولیه آترواسکلروز ایفا می‌کند، معرفی می‌کنند [۸، ۹]. حتی تغییرات بسیار جزئی در LDL موجب می‌گردد که این ذره به شدت ایمونوژن گردد. OX-LDL یک ذره توکسیک است که پاسخ‌های سلولی و هومورال زیادی را بر علیه خود باعث می‌شود [۱۰]. وجود ماکروفاژهای فعال شده بر علیه OX-LDL در آسیب‌های آترواسکلروز در انسان بیانگر پاسخ‌های اولیه سلولی است [۱۱]. اشکال متفاوتی از آنتی‌بادی‌های علیه OX-LDL نیز در جریان خون شناسایی گردیده‌اند که این اتوآنتی‌بادی‌ها با اپی‌توپ‌های OX-LDL باند شده و موجب بروز آترواسکلروز می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها هم در مدل‌های حیوانی (موش و خرگوش) و هم در مدل انسانی به خوبی اندازه‌گیری شده‌اند [۱۵-۱۲]. مطالعات زیادی به نقش محافظتی اتوآنتی‌بادی OX-LDL در آترواسکلروز اشاره دارند [۱۹-۱۶] و گروه‌هایی نیز ارتباط منفی بین این اتوآنتی‌بادی و آترواسکلروز را نشان داده‌اند [۱۰]. برخی نیز معتقدند هیچ ارتباطی بین آن و آترواسکلروز وجود ندارد [۲۰، ۲۱]. از آنجا که نقش آتروژن بودن یا آتروپروتکتیو بودن سیستم ایمنی در آترواسکلروز به درستی مشخص نشده است، در این مطالعه با انجام ایمونیزاسیون بر علیه OX-LDL با دو آنتی‌ژن متفاوت در یک مدل حیوانی (خرگوش) سعی در شناخت بیشتر ارتباط سیستم ایمنی و آترواسکلروز شده است.

روش‌ها

خالص کردن و اکسیداسیون LDL: از پلاسمای افراد سالم توسط اولتراسانتریفوژ و با کمک شیب غلظتی KBr (پتاسیم بروماید)، LDL با دانسیته $< 1.063 \text{ g/ml}$ < d جدا شده [۲۲] و به منظور اکسیداسیون LDL

خالص شده توسط مس، از روش Steinbrecher استفاده گردید [۲۳]. جهت اکسیداسیون LDL توسط MDA، از روش Fogleman استفاده شد [۲۴].

ایمونیزاسیون خرگوش‌ها: ۱۸ خرگوش نر بالغ در محدوده وزنی $200 \pm 2000 \text{ g}$ از انستیتو پاستور ایران خریداری و همگی به مدت ۲ هفته تحت رژیم غذایی پایه قرار داده شدند. شرایط نگهداری از نظر نور، دما و دسترسی به آب برای همه یکسان در نظر گرفته شد. سپس به ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شده و به ازای هر کیلوگرم از وزن خرگوش، $160 \mu\text{g}$ از آنتی‌ژن MDA-LDL یا CU-LDL را به همراه همین مقدار از آجودانت فروند در بافر فسفات نمکی حل نموده به صورت زیر صفاقی به خرگوش‌ها تزریق شد. در گروه سوم یعنی گروه کنترل تنها بافر فسفات نمکی تزریق شد [۲۵]. در هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ایمونیزاسیون با همین مواد در هر گروه تکرار شد و نیز اتوآنتی‌بادی بر علیه OX-LDL در این هفته‌ها با استفاده از کیت IMTEC ساخت کشور آلمان از شرکت Immunodiagnostica و با روش الیزا اندازه‌گیری شد.

رژیم غذایی: در پایان ایمونیزاسیون، هر گروه به مدت ۲ ماه تحت رژیم غذایی پرکلسترول قرار گرفت. قبل و بعد از شروع مطالعه در حالت ناشتا از خرگوش‌ها خونگیری و فاکتورهای بیوشیمیایی تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول (Chol)، LDL کلسترول (LDL-C)، HDL کلسترول (HDL-C)، قندخون ناشتا (FBS) و CRP با استفاده از اتوآنالایزر مدل هیتاچی ۹۰۲ به روش آنزیمی اندازه‌گیری شده و در انتهای مطالعه با بیهوش کردن خرگوش‌ها توسط پنتو باربیتال ۵٪ و شکافتن قفسه سینه، قلب به همراه آنورت خارج گردید و از هر یک از عروق کرونر راست، چپ و آنورت هر خرگوش ۳ لام پاتولوژیک تهیه و پس از رنگ‌آمیزی، طبق روش زیر میزان رگه چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. سطوح عاری از ضایعه درجه صفر، وجود رگه‌های رگه چربی و نقطه‌های چربی^۱ به میزان کم درجه یک، به میزان متوسط درجه دو، به میزان زیاد درجه سه و میزان رگه‌ها و نقاط چربی در اکثر قسمت‌های عروق درجه ۴ در نظر گرفته شد [۲۶].

^۱ Fatty dots

یافته‌ها

در گروه تحت رژیم پرکلسترول ایمونیزه شده با MDA-LDL؛ تغییرات میانگین کلسترول، LDL-C و قند خون، همچنین میزان رگه چربی در آئورت و کرونر راست نسبت به گروه پرکلسترول (کنترل) کاهش معنی داری نشان داد (جدول ۱ و ۲). همچنین ایمونیزاسیون با MDA-LDL در رژیم پرکلسترول موجب کاهش معنی دار میانگین-LDL، C، Chol، FBS در انتهای مطالعه شد (جدول ۱).

آنالیز آماری: مقایسه میانگین تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی و میزان رگه چربی بین گروه‌ها با استفاده از تست N Par-Mann-Whitney به دلیل کم بودن حجم نمونه و عدم توزیع نرمال انجام شد و با استفاده از تست Wilcoxon نیز مقایسه میانگین تغییرات بیوشیمیایی در هر گروه در ابتدا و انتهای مطالعه انجام شد. مقادیر به صورت (Mean ± SD) بیان شده و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی قبل و بعد از مطالعه در گروه‌های خرگوش‌های ایمونیزه شده تحت رژیم پرکلسترول

	ایمونیزه شده با CU- LDL		ایمونیزه شده با MDA-LDL		کنترل		
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	
	۱۸/۷±۱۱	۵۰۳±۱۳۶/۸ ^{††}	۴۰۳/۶±۲۱۸*	۶/۸±۵/۳	۱۳/۸±۸/۷	۵۵۸/۷±۴۲/۲	LDL-C (mg/dl)
	۳۹/۶±۱۴	۱۲۸±۱۹/۳	۱۱۴±۵۶/۵	۳۵/۴±۴/۹	۳۳/۶±۱/۵	۱۰۳±۶۲/۲	HDL-C (mg/dl)
	۰/۸±۰/۲	۱/۲±۰/۶۹ [†]	۲/۴±۰/۳	۰/۸±۰/۲۳	۰/۹±۰/۴۴	۳/۸±۲/۴	CRP (mg/l)
	۱۱۶±۲۰/۸	۱۹۸/۸±۴۹/۲ ^{**}	۱۳۶±۴۱	۱۰۵±۳۹/۸	۱۱۶±۳۱/۴	۲۵۴/۸±۱۳۹/۴	تری گلیسرید (mg/dl)
	۶۱/۶±۹/۶	۱۳۵±۳۷ ^{**}	۱۳۰/۶±۵۰/۳ [*]	۵۰/۴±۸/۳	۸۰/۲±۳۹/۸	۱۲۲/۶±۴۵/۷	FBS (mg/dl)
	۵۳/۷±۳۵/۲	۶۷۱±۱۴۴/۶ ^{**}	۵۴۵/۸±۲۷۶/۷ [*]	۵۸/۸±۷/۴	۶۸/۲±۱۵/۳	۷۱۱/۲±۶۳/۴	کلسترول (mg/dl)

* اختلاف میانگین LDL-C و FBS و Chol در ابتدا و انتهای مطالعه در گروه ایمونیزه شده با MDL-LDL معنی دار بوده است. (P=۰/۰۴) روش آماری استفاده شده N par-Man Whitney می‌باشد.

** اختلاف میانگین FBS, TG, Chol در ابتدا و انتهای مطالعه در گروه ایمونیزه شده با CU-LDL معنادار بوده است. (P=۰/۰۴) روش آماری استفاده شده N par-Man Whitney می‌باشد.

† اختلاف میانگین CRP در گروه ایمونیزه شده با CU-LDL نسبت به گروه کنترل (پرکلسترول) و نسبت به گروه ایمونیزه شده با MDA-LDL همراه رژیم پرکلسترول معنا دار بوده است. (P=۰/۰۳) روش آماری استفاده شده Willcoxon می‌باشد.

†† اختلاف LDL در گروه ایمونیزه شده با MDA-LDL نسبت به گروه کنترل (پرکلسترول) و نسبت به گروه ایمونیزه شده با CU-LDL همراه رژیم پرکلسترول معنا دار بوده است. (P=۰/۰۲) روش آماری استفاده شده Willcoxon می‌باشد.

n = ۶ سرخرگوش مقادیر نشانگر Mean±SD است.

(جدول ۱). ایمونیزاسیون با CU-LDL در رژیم پرکلسترول همچنین موجب کاهش معنی دار میانگین Chol، FBS و TG در انتهای مطالعه شد (جدول ۱).

در گروه تحت رژیم پرکلسترول ایمونیزه شده با CU-LDL، تغییرات میانگین CRP هم نسبت به گروه پرکلسترول و هم نسبت به گروه پرکلسترول ایمونیزه شده با MDA-LDL به طور معنی داری کاهش نشان داد

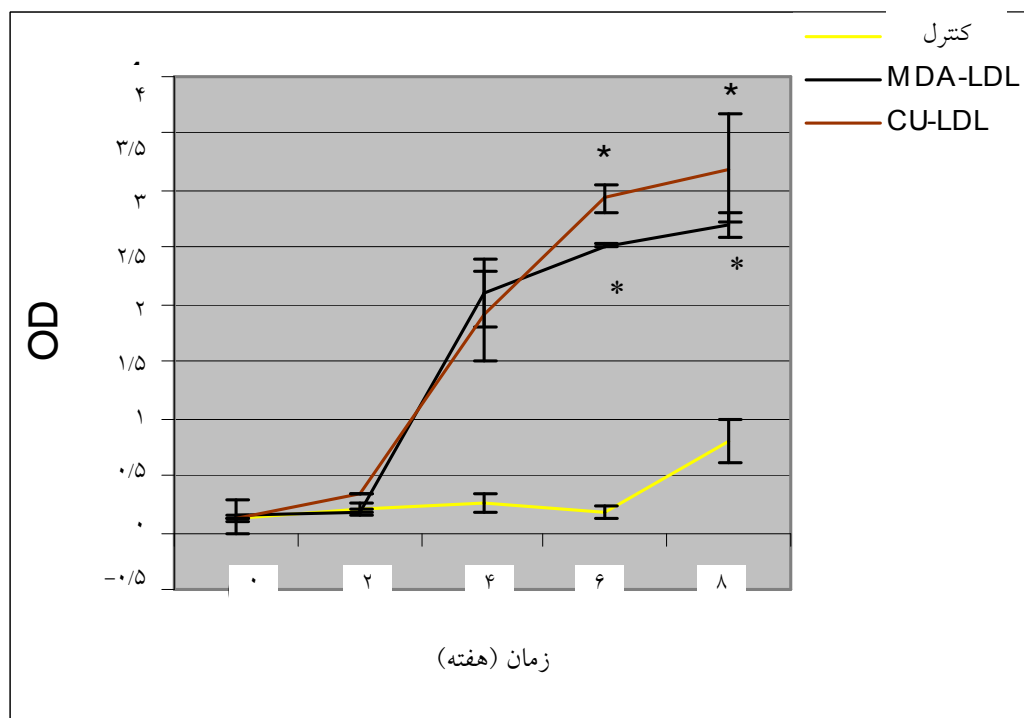
جدول ۲- مقایسه میانگین درجه پلاک آترواسکلروزی در گروه خرگوش‌های ایمونیزه شده با MDA-LDL یا CU-LDL

ایمونیزه شده با	ایمونیزه شده با	کنترل	
CU- LDL	MDA-LDL		
۳/۴±۱/۶۷	۱/۷±۲/۴*	۳/۲±۱/۴۸	کروتر راست
۲/۸±۱/۵	۲/۱±۰/۵	۲/۵±۱/۸	کروتر چپ
۳/۵±۰/۰۵	۲/۷±۰/۵۲*	۳/۴±۰/۱۵	آنورت

* میانگین قطر پلاک در گروه ایمونیزه شده با MDA-LDL نسبت به گروه کنترل (پرکلسترول) در کروتر راست و آنورت به طور معنی‌دار کاهش داشته است (P=۰/۰۴)، روش آماری استفاده شده Man Whitney می‌باشد.

** مقادیر ± نشانگر Mean±SD است

† n=۶ سر خرگوش



نمودار ۱- میانگین آنتی بادی تولیدشده علیه LDL اکسید در خرگوش‌های ایمونیزه شده توسط MDA-LDL, Cu-LDL و یا PBS در زمان‌های مختلف

مقادیر Mean±SD در هر گروه نشان داده شده است.

P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شده است.

n=۶ سر خرگوش

* میانگین آنتی بادی تولید شده نسبت به گروه پرکلسترول به طور معنی‌دار افزایش داشته است.

(قبل از ایمونیزاسیون) و نیز در هفته دوم و چهارم در بین گروه‌ها تفاوت آماری معنی‌داری نداشته است ولی در هفته‌های ششم و هشتم این مقادیر به طور معنی‌دار در گروه‌های ایمونیزه شده با MDA و یا CU نسبت به گروه

مقادیر آنتی بادی علیه OX-LDL در بین خرگوش‌های ایمونیزه شده توسط MDA-LD, CU-LD و یا بافر فسفات نمکی در زمان‌های مختلف در نمودار ۱ آمده است. همانطور که نشان داده شده، این مقادیر در ابتدای مطالعه

همسو با نتایج ما Palinski با ایمونیزاسیون خرگوش‌های هیپرکلسترولمیک توسط MDA-LDL و در مطالعه دیگر توسط Amile با ایمونیزاسیون خرگوش‌های هیپرکلسترولمیک توسط CU-LDL، شاهد کاهش آترواسکلروز در آنها بوده‌اند [۲۵ و ۲۷].

آنچه مهم است اینکه در دو مطالعه ذکر شده قبلی که به طور جداگانه انجام شده، شرایط مطالعه از جمله نوع حیوان، نوع آنتی‌ژن، تکنیک ایمونیزاسیون و ... متفاوت بوده است در حالی که در مطالعه انجام شده فعلی، سعی شده است با انجام تحقیق در شرایط یکسان و با دو آنتی‌ژن (MDA-LDL و CU-LDL) بتوان به تفاوت‌ها و شباهت‌های اثرات ایمونیزاسیون بر عوامل بیوشیمیایی و نیز ایجاد و توسعه آترواسکلروز پی برد.

همچنین در این مطالعه نشان داده شد که ایمونیزاسیون با MDA-LDL در رژیم پرکلسترول نسبت به گروه کنترل موجب کاهش معنی دار LDL-C، Chol، FBS و TG و ایمونیزاسیون با CU-LDL در رژیم پرکلسترول هم نسبت به گروه کنترل و هم نسبت به گروه ایمونیزه شده با MDA-LDL موجب کاهش معنی دار CRP شده است، بنابراین شاید بتوان احتمال تفاوت سازوکار اثر این دو آنتی‌ژن بر آترواسکلروز را بیان کرد.

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که CRP یک نشانگر غیر اختصاصی در بیماری‌های قلبی عروقی است که بطور غیر مستقیم بر آترواسکلروز تاثیر می‌گذارد [۳۴]، بنابراین احتمالاً انتخاب یک آنتی‌ژن مناسب در افزایش تاثیر ایمونیزاسیون بر علیه آترواسکلروز بسیار حائز اهمیت است.

ضمناً در این مطالعه در ایمونیزاسیون خرگوشها به همراه استفاده از آنتی‌ژنهای اصلی آجودانت کامل فروند نیز استفاده شد. نشان داده شده است که آجودانت فروند به‌ویژه آجودانت کامل فروند نسبت به دیگر آجودانت‌ها علاوه بر اینکه پاسخ‌های ایمونولوژیک قوی‌تر و ماندگارتری را ایجاد می‌کند، خود خاصیت ضد آترواسکلروزی دارد [۳۵] و قادر است اولین آسیب‌های به وجود آمده در آترواسکلروز را کاهش دهد [۳۶]. بنابراین

کنترل ایمونیزه شده با بافر فسفات نمکی افزایش داشته است.

بحث

ذرات LDL پلاسمایی به فضای زیر رگ‌ها نفوذ می‌کنند و در آنجا اکسید می‌شوند. OX-LDL از جمله آنتی‌ژن‌های اصلی است که نقش مهمی در شکل‌گیری آسیب‌های اولیه آترواسکلروز ایفا می‌کند [۲۵]. اگر اکسیداسیون به ملایمت صورت گرفته باشد، فسفولیپیدهای LDL به لیزوفسفاتی‌دیل کولین و فسفاتیدیل کولین اکسید شده، تبدیل می‌شوند [۲۵ و ۲۷] و اگر اکسیداسیون به شدت صورت گرفته باشد، قسمت apoB (آپولیپوپروتئین اصلی در ذره LDL) دچار تغییر و دگرگونی شده و در نتیجه تمایل آن به گیرنده‌های LDL کاهش پیدا می‌کند.

ماکروفاژهای پاک‌کننده خون با شناسایی این ذره تغییر ماهیت یافته اقدام به پاکسازی آن می‌کنند و سبب تولید سلول‌های کف‌آلود می‌شوند [۲۸-۳۰]، بنابراین اقدام به پاکسازی OX-LDL از جانب سلول‌های ایمنی ممکن است شروع آترواسکلروز را باعث شود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سیستم ایمنی با سازوکارهای متفاوتی بر آترواسکلروز تاثیر می‌گذارد [۳۱، ۳۲]. در مطالعات اخیر روی افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، با اندازه‌گیری میزان آنتی بادی ضد OX-LDL به ارتباط معنی‌دار [۳۸، ۳۷، ۱۹، ۱۶] و یا غیر معنی‌دار [۲۱، ۱۰] در آترواسکلروز رسیده‌اند و یا حتی گروه‌هایی به عدم ارتباط بین این دو رسیده‌اند [۲۰، ۲۱، ۳۹، ۴۰]. می‌توان گفت که هنوز نقش آتروژن بودن یا آتروپروتکتیو بودن این آنتی بادی مبهم است.

در مطالعه حاضر با انجام ایمونیزاسیون توسط MDA-LDL و یا CU-LDL در یک مدل حیوانی (خرگوش) همراه با رژیم غذایی پرکلسترول، کاهش معنی‌دار میزان رگه چربی در آئورت و کرونر راست خرگوش‌های ایمونیزه شده با MDA-LDL به همراه رژیم پرکلسترول مشاهده شده ضمن این‌که در خرگوش‌های ایمونیزه شده با CU-LDL به همراه رژیم پرکلسترول تاثیر معنی‌داری بر کاهش رگه چربی مشاهده نشده است.

چربی را در کرونر راست و آئورت کاهش داد در صورتیکه Cu-LDL هر چند موجب کاهش معنی‌دار CRP گردید، ولی تأثیر معنی‌داری در نتیجه نهایی که ایجاد رگه چربی است، نداشت. به هر حال شاید با افزایش دوره مطالعه و یا اندازه‌گیری سایر عوامل خطر قلبی-عروقی بتوان نتایج مطلوبتری به دست آورد و بنابراین احتمالاً فرضیه مبارزه با آترواسکلروز توسط نقش محافظتی سیستم ایمنی آینده‌ای روشن را در این زمینه نوید می‌بخشد.

شاید بتوان بخشی از نتایج حاصل در این مطالعه را به این آجودانت نسبت داد. در مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط سیستم ایمنی و آترواسکلروز، از مهمترین نتایجی که بدست آمد چنین نتیجه‌گیری شد که پاسخ سیستم ایمنی به OX-LDL آنتی‌آتروژنیک است ضمن این‌که تأثیر اتوآنتی‌بادی به وجود آمده از روش‌های مختلف متفاوت بود. به طوری‌که MDA-LDL علاوه بر کاهش عوامل خطر معمولی بیماری‌های قلبی-عروقی، به طور معنی‌دار ایجاد رگه‌های

مآخذ

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- G.K Hansson, P. Libby, U. Schonbeck and Z.Q Yan, innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis *Circ Res* 2002; 91:281-291.
- Wick G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995;16:27-33.
- Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991;64:5-15.
- George J, Harats D, Gilburd B, Shoenfeld Y. Emerging cross-regulatory roles of immunity and autoimmunity in atherosclerosis. *Immunol Res* 1996;15:315-22.
- Ross, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- Johannes H. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development-clinical and animal studies. *Clinica chimica Acta* 2004;348:1-8.
- Yaniv Sherer, Yehuda shoenfeld . Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Auto immunity Reviews* 2002;1:21-27.
- Arnon Afek, Jacob George, Boris Gilburd, Lubica Rauova, Iris Goldberg, Juri Kopolovic. Immunization of low density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heart shock protein 65 (HSP-65) promotes Early atherosclerosis. *J autoimmunity* 2000;14:115-127.
- Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, et al. Cloning o~JnOncloclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteitis from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density k lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest* 1996;98:800-14.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuaia S, Gurtner OC' Isocher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein under- goes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:1372-6.
- Yla-Herttuaia S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, IWitztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain . IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14:32-40.
- M.E Rosen feld, W. Palinski, S. Yla Herttuaia, S.Bulter and JI. Witztum Distribution of oxidation specific lipid protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerosis lesion of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:336-349.
- J.T. Salonen, S. Yla-Herttuaia, R. Yamamoto, S. Butler, H. Korpela, R. Salonen, K. Nyssonen, W. Palinski and J.L. Witztum, Autoantibody against oxidised LDL and , progression of carotid atherosclerosis, *Lancet* 1992;339:883-887.
- C.Bergmark, R. Wu, U. de faire. A.K. Lefuert and J. SW edenborg. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of auto antibodies against oxidized LDL. *Arteriovas thromb Vasc Biol* 1995;15: 441-445.
- J. Hulthe, L. Bokemark and B. Fagerberg. Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58 year old subjectively clinically healthy men. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2001;21: 101-107.
- M.N. Bui, M.N. Sack, G. Moutsatsos, D.Y.Lu P. Autoantibody titers to oxidized LDL in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1996;131: 663-667.
- J. Halthe, J. Wikstrand, H. Emanuelsson, O. Wiklund, P.J.de Fegter and I. Wendelbag Atherosclerotic change in the carotid artery bulb as measured by B-made ultrasound are

- associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Stroke* 1997;28: 1189-1194.
19. J Hulthe, Owikluad E. Hurt-camejo and G. Bondjers, Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules and phospholipase A(2). *Artheroscler Thromb Vas Biol* 2001;21: 262-274.
 20. Tetso shoji, Yoshiki Nishizawa, Mariko Fukumoto, Kyoko Shimamura. Inverse relationship between circulation oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) and anti-OX-LDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000;148: 171-177.
 21. Stemme S, Faber B, Holm J, Wlklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:3893-7.
 22. Lopes Virella M, Koshinen S, Mironova M, Horne D, Klein R, Chasserean C, Enockson C, Vivella G. The preparation of copper-oxidized LDL for measurement of oxidized LDL antibodies by EIA. *Atherosclerosis* 2000;152: 07-115.
 23. Steinbrech UP, Oxidation of human low density lipoprotein result in derivatization of lysine residues of (APoB) by lipid prooxide decomposition products. *J Biol Chem* 1987;262: 36.3-8.
 24. Harberland ME, Fogelman A.M, Edwards S.P. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde modified low density lipoproteins. *Proos Natl Acade Sci* 1981;79: 1712-1716.
 25. W. Palinski, E. Miller, J.L. Witztum, Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient habbits with homologous malondialdehyde modified LDL atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92: 821-825.
 26. Fischer Hansen BA, Mortensen JF, Hansen P, Ibsen H, Frandsen. 1994. Atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Evaluation by microscopic and biochemical methods and comparison of atherosclerosis variables. *APMIS* 102: 177-190.
 27. S. Ameli, A Hultgardh-Nilsson, J. Regnstrom, F. Calara, J. Yano, B. Cercek, P.K. Shah, J. Nilsson, Effect of immunization with homologous LDL, and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasco Bioi* 1996;16: 1074-1079.
 28. S. Freigang, S. Horkko, E. Miller, J.L. Witztum, W. Palinski, Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehydOomodilied and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasco Bioi* 1998;18: 1972-1982.
 29. J. George, A. Mek, B. Gilburd, H. Levkovitz, A. Shaish, I. Goldberg, -Y. Kopolovic, G. Wick, Y. Shoenfeld, D. Harats, Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologoUl malondialdehyde low- density lipoprotein suppress:s early atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 147-152.
 30. G. Virella, I. Virella, R.B. Leman, M.B. Pryor and M.F. Lopes-Virella, Anti-oxidized low- density lipoprotein antibodies in patients wi~th coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int. J: Clin Lab Res* 1993;23: 95-101.
 31. Emeson EE, Shen ML. Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57 BL/6 mice treated with cyclosporine A. *Am J Pathol* 1993;142:1906-15.
 32. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson GK. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med* 2000;247:397-405.
 33. Usitupa MI, Niskanen L, Luoma J, Vilja P, Mercuri M, uramaa R, et al. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-ile- pendent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Bioi* 1996; 16: 1236-42.
 34. P.M.Riker, N. Rifai, L. Ross, JE. Buring and N.R. Cook. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Eng J Med* 2002; 347: 1557-1565.
 35. J. Khallou-Laschet. Et al. Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mic. *Atherosclerosis* 2000;184: 330-341.
 36. Peter Riis Hansen, et al. Freunds adjuvant alon is antiatherogenic in apo-E-deficient mice and specific immunization against TNF-X coners no additional benefit. *Atherosclerosis* 2001;158: 87-94.
 37. S. Freigang, S. Horkko, E. Miller, J.L. Witztum, W. Palinski, Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasco Bioi* 1998;18: 1972-1982.
 38. J. George, A. Mek, B. Gilburd, H. Levkovitz, A. Shaish, I. Goldberg, -Y. Kopolovic, G. Wick, Y. Shoenfeld, D. Harats, Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low- density lipoprotein suppress early atherogenesis, *Atherosclerosis* 1998; 138: 147-152.
 39. G. Virella, I. Virella, R.B. Leman, M.B. Pryor and M.F. Lopes-Virella, Anti-oxidized low- density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res* 1993; 23: 95-101.

40. M.I.-J.Uusitupa, L.Niskanen, J.Luoma, P. Vilja, M.Mercuri, R. Rauramaa et al, Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non- insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasco Biol* 1996; 16: 1236-1242.