

Autoanticorpul anti LDL-oxidat, IL-1 α , TNF α – markeri ai riscului cardiac

Anti-oxidized low-density lipoprotein autoantibody, IL-1 α , TNF α - cardiac risk markers

Felicia Sfrijan^{1*}, Mădălina Golieanu², Camelia Gurban¹, Doina Drugărin³

1. Catedra de Biochimie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” Timișoara

2. Cabinet medical individual, Galați

3. Disciplina de Imunologie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” Timișoara

Rezumat

Scop: Acest studiu a avut ca scop analiza corelațiilor între concentrația serică a citokinelor proinflamatorii (IL-1 α , TNF α) și concentrația serică a autoanticorpilor anti LDL-oxidat (oLAB) la bolnavii cu ateroscleroză coronariană și demonstrarea implicării mecanismelor imun-inflamatorii în progresia leziunilor aterosclerotice.

Material și metode: Probele de ser au fost recoltate de la pacienți cu infarct miocardic acut-IMA (70), angină instabilă-AIS (40), angină stabilă-AS (50) și de la martori (40). Pentru determinarea concentrațiilor serice ale IL-1 α , TNF α și oLAB s-a folosit metoda imunoenzimatică (ELISA) directă, tip sandwich cantitativă.

Rezultate: Pacienții cu IMA și AIS prezintă concentrații serice semnificativ crescute ale IL-1 α ($p < 0,05$) și TNF- α ($p < 0,05$) față de lotul martor. Lotul AS se diferențiază de lotul martor numai prin concentrațiile serice crescute ale TNF α ($p < 0,001$). Valori semnificativ crescute ale oLAB apar la loturile IMA și AIS. Există o corelație puternică ($|r| > 0,6$) între citokinele proinflamatorii și oLAB la loturile de pacienți cu IMA și corelații variabile între acești parametri la loturile AIS și AS.

Concluzii: Concentrațiile serice crescute ale citokinelor proinflamatorii la pacienții cu ateroscleroză coronariană confirmă faptul că reacția inflamatorie apare precoce în leziunea aterosclerotică și influențează major progresia și stabilitatea plăcilor de aterom, iar corelația cu markerii circulanți ai oxidării LDL (oLAB) poate fi un indicator pentru predicția riscului cardiac.

Cuvinte cheie: autoanticorpul anti LDL-oxidat, citokine proinflamatorii, ateroscleroza.

*Adresa pentru corespondență: Felicia Sfrijan, Str. Circumvalațiunii Nr. 47, apt.8, RO-300671 Timișoara, Tel.: 0720056353, E-mail: feliciasfrijan@yahoo.co.uk

Adresa instituției: Catedra de biochimie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș”, Piața Eftimie Murgu 2, RO-300041 Timișoara

Abstract

Background: Evidence had been provided that about several interaction between inflammation and oxidized low-density lipoprotein-oxLDL within the artery wall so that the lipid hypothesis and the response to injury hypothesis are considered different aspects of a single pathogenic pathway.

Objective: This study was conducted to analyse the correlation between serum level of proinflammatory cytokines IL-1 α and TNF α and anti-oxidized low-density lipoprotein autoantibody (oLAB) in patients with coronary atherosclerosis and to demonstrate implication of immune-inflammatory mechanisms in progression of atherosclerotic lesion.

Material and methods: Samples were obtained from patients with acute myocardial infarction-AMI (70), unstable angina-UA (40), stable angina-SA (50) and from healthy subjects (40). ELISA assay was used for quantification of serum levels of IL-1 α , TNF α and oLAB.

Results: Patients with AMI and UA had significantly grown serum levels of IL-1 α ($p < 0.05$) and TNF α ($p < 0.05$) compared with the healthy group. The SA group differentiates from the healthy group only through grown serum levels of TNF α ($p < 0.001$). Significantly increased levels of oLAB appear to the AMI and UA group ($p < 0.05$). There is a strong correlation ($r > 0.6$) between serum levels of proinflammatory cytokines and oLAB in the AMI group and a variable correlation of these parameters in UA and SA a groups.

Conclusions: Increased levels of proinflammatory cytokines confirm the fact that the inflammatory reaction appear precocious in atherosclerotic lesion and influence the progress and the stability of plaque, and the correlation with immune markers of oxLDL may be an indicator for the prediction of the cardiac risk.

Key words: proinflammatory cytokines, anti-oxidized low-density lipoprotein autoantibody, atherosclerosis.

Introducere

Boala cardiovasculară de origine aterosclerotică reprezintă principala cauză de mortalitate în societatea modernă. Patogeneza aterosclerozei include interacțiuni complexe între celulele peretelui arterial (celule endoteliale, macrofage, celule musculare netede, fibroblaști), elementele figurate din torentul circulator (monocite, limfocite, trombocite) și lipoproteinele plasmatiche, mai ales creșterea LDL (low density lipoproteins) și scăderea HDL (high density lipoproteins). În evoluția bolii, sistemul imun și reacția inflamatorie cronică participă într-o interacțiune complexă, modulând progresia leziunilor.

LDL-oxidat are un rol esențial în inițierea și progresia leziunilor aterosclerotice, contribuind la disfuncția celulei endoteliale și la destabilizarea plăcii aterosclerotice prin multiple mecanisme.^{16,22} Studii umane confirmă fap-

tul că LDL-oxidat și produșii secundari ai oxidării lipidelor sunt prezenți în plăcile ateromatose.²⁵ LDL-oxidat reprezintă un autoantigen cu imunogenitate ridicată și determină apariția de autoanticorpi la o varietate de epitopi specifici nou formați, din structura sa, generați în cursul oxidării.

Implicarea citokinelor proinflamatorii în patogenia aterosclerozei este controversată. Evoluția inflamației în ateroscleroză este determinată de balanța dintre citokinele proinflamatorii IL-1 α , IL-6, TNF- α și citokinele antiinflamatorii IL-10, TGF- β secretate de macrofagele și limfocitele T activate din placa aterosclerotică.

Numeroase studii clinice, de laborator și epidemiologice urmăresc să identifice cauza (cauzele) esențiale ale inițierii aterosclerozei, concentrându-se pe stadiile preclinice ale acesteia, căutând noi tehnici de diagnostic care să permită o depistare precoce. De asemenea, efor-

turile concertate ale unor mari colective de cercetare sunt orientate către găsirea de noi metode terapeutice și profilactice. Acest studiu a avut ca scop analiza corelațiilor între concentrațiile serice ale citokinelor proinflamatorii (IL-1 α , TNF α) și concentrația serică a autoanticorpilor anti LDL-oxidat (oLAB) la bolnavii cu ateroscleroză coronariană și demonstrarea implicării mecanismelor imun-inflamatorii în progresia leziunilor aterosclerotice.

Material și metode

Probele au fost recoltate de la 200 de subiecți, alcătuind patru loturi: pacienți cu infarct miocardic acut-IMA, în număr de 70, dintre care 63 bărbați și 37 femei, cu vârsta cuprinsă între 61 și 69 de ani, angină instabilă-AIS, în număr de 40, dintre care 28 bărbați și 12 femei, cu vârsta cuprinsă între 60 și 66 de ani, angină stabilă-AS, în număr de 50, dintre care 30 bărbați și 20 femei, cu vârsta cuprinsă între 56 și 70 de ani și martori-M în număr de 40, dintre care 23 bărbați și 17 femei, cu vârsta cuprinsă între 49 și 69 de ani. Pacienții au fost diagnosticați în Secția de Cardiologie și în Unitatea Coronarieni a Spitalului Clinic de Urgență nr.1 din Timișoara.

Lotul martor, dificil de realizat, este format din subiecți care la examenul angiografic coronarian nu prezintă obstrucții coronariene, iar examenul ecografic la nivelul arterelor carotidiene comune nu evidențiază plăci de aterom. Subiecții nu prezintă manifestări clinice de cardiopatie ischemică, insuficiență circulatorie cerebrală, ischemie cronică sau acută periferică sau infarct intestino-mezenteric.

Au fost excluși din studiu subiecții cu coronarografie mai veche de 6 luni, pacienții în stare critică, instabili hemodinamic sau cei care au suferit intervenții chirurgicale în ultimele 3 luni, subiecții cu istoric de boli inflamatorii sau autoimune organice sau sistemice, pacienții cu patologie asociată de tipul boală arterială coronară + boală arterială periferică sau boală arte-

rială coronară + insuficiență circulatorie vertebro-bazilară de cauză aterosclerotică.

Toți pacienții au fost informați de scopul studiului și au acceptat prelevarea probelor de sânge. Probele de sange venos au fost recoltate înaintea administrării medicației. Serurile obținute au fost împărțite în eșantioane și stocate la -20°C, până la prelucrare.

Pentru determinarea profilului lipidic (trigliceride, colesterol total, HDL-colesterol și LDL-colesterol) al subiecților incluși în studiu s-au utilizat teste enzimactice colorimetrice folosind kit-uri BIOCON, Germania. Pentru măsurarea concentrațiilor serice de autoanticorpi umani anti LDL-oxidat a fost utilizată tehnica imunoenzimatică (ELISA) indirectă, necompetitivă, cantitativă, folosindu-se trusa oLAB BIOMEDICA Gesellschaft GmbH., BIOMEDICA GRUPPE, Austria. Tehnica utilizează anticorpi monoclonali murini specifici anti IgG umani anti LDL-oxidat. Coeficientul de variație (precizia) a fost sub 4.3% în cadrul testului și sub 8.2% între teste. Specificitatea testului a fost determinată prin verificarea reactivității încrucișate cu LDL nativ și evaluată de producători <5%. Pentru măsurarea concentrațiilor serice de citokine proinflamatorii a fost utilizată tehnica imunoenzimatică (ELISA) directă, tip sandwich cantitativă. Au fost determinate nivelele serice pentru: IL-1 α (trusa IL-1 Endogen, SUA) și TNF- α (Trusa Quantikine human, R&D Systems, SUA). Pentru IL-1 α , precizia testului (CV) a fost sub 10% atât în cadrul testului cât și între teste. Sensibilitatea testului a fost precizată de producători sub 2pg/ml. Specificitatea testului a fost determinată prin verificarea, de către compania producătoare a reactivității încrucișate cu o serie de 11 citokine umane. Valorile serice normale ale IL-1 α au fost determinate de producător pe un lot de 9 probe și au fost cuprinse între 0 și 5.4 pg/ml. Pentru TNF- α , precizia testului (CV) a fost sub 5.2% în cadrul testului și sub 7.4% între teste. Sensibilitatea testului a fost precizată de producători sub 4.4pg/ml. Specificitatea testului a fost determinată prin

Tabelul 1. Caracteristicile demografice, clinice și profilul lipidic pentru cele 4 loturi

Parametrul	Lotul IMA	Lotul AIS	Lotul AS	Lotul control
Număr	70	40	50	40
Bărbați (%)	89	71	60	56
Vârsta (a)	65±4	63±3	63±7	59±10
Indicele de masă corporală (kg/m ²)	27.1±4.2	26.3±4.3	27.4±2.5	26.8±5.1
Factori de risc coronarian:				
-Antecedente heredo-colaterale de boli cardiovasculare %	39	32	30	20
-Hipertensiune arterială (peste 140/90 mmHg) %	53.4	54.5	35.3	30.0
-fumători(%)	67.3	70.1	63.9	58.8
-diabet zaharat (%)	48	47	40	10
Colesterol total (mg/dl)	247.30±97.17	225.85±85.85	196.19±74.73	177.60±23.32
HDL colesterol (mg/dl)	27.43±14.16*	33.16±13.47*	22.8±9.02*	61.52±18.36
LDL colesterol (mg/dl)	175.40±64.55*	148.97±35.86*	125.61±23.24*	104.41±28.68
Trigliceride (mg/dl)	198.78±61.24*	231.33±149.68*	247.29±126.32*	94,70±34.58
Indice de aterogenitate	9.79±1.51*	6.53±0.07*	8.66±0.15*	3.05±0.51

* $p < 0.05$ versus control

verificarea, de către compania producătoare, a reactivității încrucișate cu o serie de 41 citokine umane. Valorile serice normale ale TNF α au fost determinate de producător pe un lot de 40 probe și au avut valori sub 15.6 pg/ml.

Analiza statistica. Rezultatele au fost exprimate sub forma medie $\pm$ deviație standard. Rezultatele au fost comparate cu ajutorul testului t-Student nepereche, considerându-se pragul minim de semnificație statistică 0.05 ($p < 0.05$). Corelațiile s-au efectuat utilizând testul de corelare Pearson. S-a considerat absența corelației în cazul $|r| < 0.2$, corelație slabă $0.2 < |r| < 0.4$, corelație medie $0.4 < |r| < 0.6$, corelație puternică $0.6 < |r| < 0.8$, corelație foarte puternică $|r| > 0.8$.

Rezultate

În Tabelul 1 sunt redată caracteristicile demografice, clinice și profilul lipidic ale celor patru loturi studiate.

În Tabelul 2 sunt redată nivelele serice ale autoanticorpilor anti LDL-oxidat exprimate în mU/ml la loturile studiate, alături de interpretarea statistică obținută prin compararea loturilor de pacienți cu lotul martor, compararea valorilor lotului infarct miocardic acut cu valorile loturilor angină instabilă și angină stabilă și compararea valorilor loturilor angină instabilă cu angină stabilă.

În Tabelul 3 sunt redată nivelele serice ale IL-1 α exprimate în pg/ml la loturile studiate, alături de interpretarea statistică obținută prin compararea loturilor de pacienți cu lotul martor.

În Tabelul 4 sunt redată concentrațiile serice ale TNF α exprimate în pg/ml, la loturile studiate, alături de interpretarea statistică obținută prin compararea loturilor de pacienți cu lotul martor.

Corelațiile concentrațiilor serice ale citokinelor proinflamatorii IL-1 α , TNF α și ale autoanticorpilor anti LDL-oxidat sunt redată în

Tabelul 2. Nivelul seric al autoanticorpilor anti LDL-oxidat la loturile studiate. Valori medii±DS

	Lotul IMA	Lotul AIS	Lotul AS	Lotul control
Autoanticorpi anti LDL-oxidat (mU/ml)	541.12±154.15	433.87±87.65	209.48±79.16	238.72±60.27
Semnificație statistică	p<0.05	p<0.05	p>0.05	Vs martor
		p>0.05	p<0.05	Vs infarct miocardic acut
			p<0.05	Vs. angină instabilă

Tabelul 3. Nivelul seric al IL-1α la loturile studiate. Valori medii±DS

	Lotul IMA	Lotul AIS	Lotul AS	Lotul control
IL-1 α (pg/ml)	7.7±4.4	5.1±3.1	2.9±1.2	2.6±1.7
Semnificație statistică	p<0.01	p<0.05	p>0.05	

Tabelul 4. Concentrația serică a TNFα la loturile studiate, exprimată în pg/ml. Valori medii±DS

	Lot infarct miocardic acut	Lot angină instabilă	Lot angină stabilă	Lot martor
TNFα (pg/ml)	24.78±5.6	16.7±3.2	16.9±1.6	6.8±2.2
Semnificație statistică	P<0.001	P<0.001	P<0.001	

Tabelul 5. Corelațiile IL-1 α- TNFα- oLAB

	IL-1 α	TNFα
oLAB Lot infarct miocardic acut	r = 0.649 n=70	r = 0.609 n=70
oLAB Lot angină instabilă	r = 0.533 n=40	r = 0.491 n=40
oLAB Lot angină stabilă	r = 0.246 n=50	r = 0.408 n=50

următorul tabel (Tabel 5) sub forma coeficientului de corelație |r|.

Pacienții cu IMA și AIS prezintă concentrații serice semnificativ crescute ale IL-1α (p<0,05) și TNF-α (p<0,05) față de lotul martor. Lotul AS se diferențiază de lotul martor numai prin concentrațiile serice crescute ale TNFα (p<0,001). Valori semnificativ crescute ale oLAB apar la loturile IMA și AIS.

Există o corelație puternică (|r|>0.6) între citokinele proinflamatorii și oLAB la loturile de pacienți cu IMA și corelații variabile între acești parametri la loturile AIS și AS.

Discuții

În cadrul prezentului studiu am constatat că nivelele serice ale IL-1α sunt semnificativ crescute la pacienții cu infarct miocardic acut și angină instabilă. În literatură există date care confirmă aceste rezultate, în plus există unele studii care arată o creștere a nivelelor serice ale IL-1α și la pacienții cu angină stabilă. Aceste rezultate susțin afirmația că IL-1α deține un rol important în progresia leziunilor aterosclerotice. Sursele celulare ale IL-1α sunt aproape toate celulele sistemului mononuclear-fagocitar și limfocitele, în special limfocitul T. Fenomenele

de distrucție celulară miocardică probabil stimulează producția de IL-1 α . IL-1 α stimulează recrutarea leucocitelor la nivelul plăcii aterosclerotice prin creșterea expresiei moleculelor de adeziune la nivelul peretelui vascular și sinteza unor citokine chemoattractante. Efectul inflamator este în parte superpozabil celui IL-6 și TNF α datorită faptului că induce sinteza acestor citokine la nivelul macrofagelor și celulelor T din placă¹⁵, având un rol activ în cascada citokinelor proinflamatorii. IL-1 α poate induce producția locală de factori de creștere incluzând factori de creștere derivați din plachete și factorul de creștere fibroblastic ce pot juca un rol în evoluția și complicarea plăcii.²³ Există studii experimentale care afirmă că IL-1 α poate fi un predictor pentru evenimentele coronariene.¹⁹ IL-1 a fost găsit crescut în primele 2 zile de spitalizare la pacienții cu angină instabilă și asociat cu un risc crescut al evenimentelor coronariene intraspitalicești¹. IL-1 α stimulează transcripția receptorilor specifici pentru LDL-oxidat stimulând astfel captarea acestora de către macrofagele și celulele musculare netede activate din placa de aterom.⁵ IL-1 α prezintă un rol activ în cascada citokinelor proinflamatorii determinând eliberarea de IL-6 la nivelul macrofagelor și celulelor T din placă.¹⁵

Nivele serice ale TNF α au fost crescute la toate loturile de pacienți comparativ cu lotul martor, nivelele cele mai ridicate fiind la pacienții cu infarct miocardic acut. Există studii în literatură care confirmă rezultate noastre^(19,24). Sursa de TNF α o reprezintă limfocitul T activat. TNF α stimulează producția de IL-6, determină creșterea expresiei moleculelor de adeziune (ICAM, VCAM), intervine în favorizarea perpetuării infiltratului inflamator mononuclear, intervine în procesele de fibroză.¹⁴ TNF- α stimulează expresia IL-2R și producția de IL-2 și IFN- γ de către limfocitele T activate.¹¹ TNF- α stimulează producția de IL-1 în celula musculară netedă și producția de IL-6, IL-8, GM-CSF din fibroblaști.³ TNF- α are un rol central în cascada de citokine la nivelul plăcii aterosclerotice,

declanșând eliberarea altor citokine care amplifică efectele biologice ale TNF- α . IL-1 și TNF- γ stimulează efectele TNF- α , iar IL-10 le inhibă. Recent s-a demonstrat că administrarea de inhibitori ai TNF- α inhibă citokina IL-6, receptorii TNF- α și proteinele de fază acută (amiloid A, haptoglobina și fibrinogenul)^{6,12,13}.

În cadrul studiului am constatat că autoanticorpii anti LDL-oxidat sunt prezenți în concentrații detectabile atât la loturile de pacienți cu ateroscleroză coronariană clinic manifestă cât și la lotul martor. Cele mai mari valori ale concentrației serice a autoanticorpilor anti LDL-oxidat aparțin loturilor infarct miocardic acut și angină instabilă, între cele două loturi neexistând diferențe semnificative statistice. Cele mai mici valori ale concentrației serice a autoanticorpilor anti LDL-oxidat aparțin lotului de pacienți cu angină stabilă, existând o diferență semnificativă statistic cu celelalte loturi de pacienți, dar nu și față de lotul martor. Multe studii recente au arătat prezența autoanticorpilor anti LDL-oxidat la pacienții cu boli arteriale coronariene. În aceste studii, pacienții au prezentat concentrații serice crescute ale autoanticorpilor anti LDL-oxidat în comparație cu subiecții normali (confirmând în parte și rezultatele prezentului studiu), ceea ce sugerează că aceste concentrații pot avea o valoare diagnostică și/sau prognostică.^{10,13,21} Există însă studii în care nu au fost observate diferențe ale concentrației serice a autoanticorpilor anti LDL-oxidat între pacienți și martorii sănătoși. Cauzele acestei inconsecvențe între rezultatele diferitelor studii clinice nu sunt cunoscute. Un screening de medicină preventivă efectuat pe un lot de 800 de subiecți sănătoși cu vârste între 20 și 60 ani evidențiază o relație invers proporțională între concentrația serică a autoanticorpilor anti LDL-oxidat și vârstă, valorile autoanticorpilor anti LDL-oxidat scăzând semnificativ în grupul de vârstă 20-40, ceea ce poate indica primul pas în ateroscleroză. Concentrațiile ridicate la populația tânără sunt interpretate de autori ca un mecanism de protecție al organismului față de pro-

cesele oxidative suferite de LDL.^{9,20} Există studii în care măsurarea concentrației serice a autoanticorpilor anti LDL-oxidat arată valorile cele mai mari la pacienții cu infarct miocardic acut^(10,13), în timp ce alte studii evidențiază valori scăzute la pacienții cu sindroame coronariene acute față de subiecții sănătoși, speculându-se faptul că LDL-oxidat poate forma complexe imune cu autoanticorpii preexistenți, care acționează ca un vehicul pentru epurarea antigenului^{6,7,12,17}. Astfel, nivelele scăzute ale autoanticorpilor anti LDL-oxidat în cadrul aterosclerozei coronariene pot reflecta consecința unui efect protector.^{4,8} Studii la care concentrația serică a autoanticorpilor anti LDL-oxidat a fost semnificativ scăzută la loturile de pacienți cu infarct miocardic acut, angină instabilă și angină stabilă, în etapa inițială, după 30 de zile la o nouă evaluare, evidențiază creșteri marcate ale acestui parametru la lotul infarct miocardic acut. Acest răspuns reflectă probabil activarea imună determinată de expunerea la LDL-oxidat și la epitopii specifici oxidați, eliberați atât prin fisura plăcii aterosclerotice cât și, în cazul infarctului miocardic acut, din surse suplimentare (celule musculare netede, celule apoptotice).² În studiul nostru, concentrațiile autoanticorpilor anti LDL-oxidat diferențiază pacienții cu infarct miocardic acut și angină instabilă față de pacienții cu angină stabilă și martori. Există corelații între nivelele plasmatiche ale autoanticorpilor anti LDL-oxidat și citokinele proinflamatorii la toate loturile de pacienți, dar mai ales o corelație puternică la lotul infarct miocardic acut.

Concluzii

Concentrațiile serice crescute ale citokinelor proinflamatorii la pacienții cu ateroscleroză coronariană confirmă faptul că reacția inflamatorie apare precoce în leziunea aterosclerotică și influențează major progresia și stabilitatea plăcilor de aterom, iar corelația cu markerii circulanți ai oxidării LDL (oLAB) poate fi un indicator pentru predicția riscului cardiac.

Bibliografie

1. Biasucci LM, Liuzzo G et al. Increasing level of interleukin 1 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; 99:2079-2084.
2. Chang MK, Bergmark C, Laurila A et al. Monoclonal antibodies against oxidized LDL bind to apoptotic cell and inhibit their phagocytosis elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6353-8.
3. Charles P, Elliott MJ et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 163:1521-1528.
4. Erkkila AT, Narvanen O et al. Autoantibodies against oxidized LDL and cardiolipin in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:204-9.
5. Farzaneh F A, Rudd J, Weissberg P. Inflammatory mechanisms. *British Medical Bulletin* 2001; 59:55-68.
6. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1876-1890.
7. Hökkö S et al. Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28:1771-1779.
8. Hulthe J, Bokemark L, Fagerberg B. 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 Vasc Biol* 2001; 21:101-7.
9. Karabinos I, Koulouris S et al. Increased serum titers of autoantibodies against oxidized LDL cholesterol in young healthy adults: an evidence of a protective effect of these autoantibodies? *Hellenic j Cardiol* 2003; 44:374-384.
10. Lehtimäki T, Lehtinen S et al. Autoantibodies against oxidized LDL in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:23-27.
11. Libby P, Sukhova G et al. Cytokines regulate vascular function related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25:9-12.
12. Libby P. Current concept of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*

2001;104:365-372.

13. Lourida ES, Papathanasiou AI et al. Elevated titer of autoantibodies against oxidized LDL forms in patients with coronary artery disease. *Hellenic J Cardiol* 2002; 43:38-46.

14. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunology today* 1997; 18:231-238.

15. Miyao Y, Ogawa H et al. Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1993; 126:1299-1304.

16. Navab M et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:831-42.

17. Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J. Intern. Med* 2000; 247:371-380.

18. Robbins M, Topol EJ. Inflammation in acute coronary syndromes. *Clin J Med* 2001; 69:130-142.

19. Rus HG, Niculescu F, Vlaicu R. Tumor necrosis factor- α in human arterial wall with atheros-

clerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89:247-254.

20. Tatzber a et al. Antibodies against oxidized LDL (oLAB) in Viennese working people. Poster, Austrian Society for Allergy and Immunology 1995.

21. Tsimikas S, Bergmark C et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized LDL strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *JACC* 2003; 3:360-70.

22. Tsimikas S, Witztum JL. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis. *Kluwer Academic* 2000; 49-74.

23. Warw JA, Heisted DD. Platelet-endothelium interaction. *N Engl J Med* 1993; 328:628-635.

24. Weber C, Draude G et al. Downregulation by tumor necrosis factor- α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by LDL oxidized: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1999; 145:115-123.

25. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11:93-102.