

## Η ενδογενής PAF-ακετυλϋδρολάση επηρεάζει την αντιγονικότητα της οξειδωμένης LDL σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο

**ΣΚΟΠΟΣ** Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL (oxLDL) επάγει τη δημιουργία αντιγονικών επιτόπων, όπως είναι η οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη (oxPC), η λιυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια. Η lyso-PC παράγεται ενζυμικά από την υδρόλυση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων με τη δράση της PAF-ακετυλϋδρολάσης (PAF-AH). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL σε σχέση με το βαθμό οξειδωσής της σε ασθενείς με νόσο των στεφανιαίων αγγείων και ο πιθανός ρόλος της PAF-AH στην αντιγονικότητα της oxLDL. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 65 ασθενείς με γνωστή στεφανιαία νόσο και συμπτωματολογία σταθερής στηθάγχης και 47 υγιείς εθελοντές (ομάδα ελέγχου). LDL, η οποία απομονώθηκε από πρόσφατο πλάσμα, οξειδώθηκε παρουσία 5 μM CuSO<sub>4</sub>. Παρασκευάστηκαν 3 μορφές oxLDL, η oxLDL<sub>L</sub>, η oxLDL<sub>p</sub> και η oxLDL<sub>D</sub> (στο τέλος της λανθάνουσας, της εκθετικής φάσης και της φάσης αποικοδόμησης, αντίστοιχα). Αντίστοιχες μορφές οξειδωμένης LDL παρασκευάστηκαν μετά από προηγούμενη απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH, [oxLDL(-)]. Τέλος, παρασκευάστηκε LDL τροποποιημένη με μηλονική διαδεϋδη (MDA-LDL). Σε όλους τους συμμετέχοντες προσδιορίστηκαν τίτλοι αυτοαντισωμάτων κατά των διαφόρων μορφών οξειδωμένης LDL με μέθοδο ELISA. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Οι στεφανιαίοι ασθενείς εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>L</sub> (1,102±0,391 έναντι 0,873±0,254, αντίστοιχα, P<0,001), oxLDL<sub>p</sub> (1,223±0,340 έναντι 0,915±0,243, αντίστοιχα, P<0,0001), oxLDL<sub>D</sub> (1,199±0,397 έναντι 0,969±0,280, αντίστοιχα, P=0,002) oxLDL(-)<sub>L</sub> (1,368±0,392 έναντι 1,043±0,226, αντίστοιχα, P<0,0001), oxLDL(-)<sub>p</sub> (1,567±0,332 έναντι 1,154±0,269, αντίστοιχα, P<0,0001) και oxLDL(-)<sub>D</sub> (1,563±0,320 έναντι 1,270±0,269, αντίστοιχα, P<0,0001) σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στους τίτλους αυτοαντισωμάτων κατά MDA-LDL, στις δύο ομάδες της μελέτης. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, αυξημένα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>p</sub> και oxLDL(-)<sub>p</sub> σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου (RR=0,076, 0,012-0,478 95%CI, P=0,006 και RR=0,150, 0,035-0,641 95%CI, P=0,010, αντίστοιχα). **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και lyso-PC στον ορό τόσο ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα όσο και υγιών εθελοντών. Η lyso-PC φαίνεται να είναι ο επίτοπος, ο οποίος διακρίνει τους ασθενείς από τα φυσιολογικά άτομα. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο της PAF-AH όσον αφορά στον τύπο των επιτόπων που σχηματίζονται στην oxLDL και, κατά συνέπεια, τον τύπο των αυτοαντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι αυτής της αθηρογόνου λιποπρωτεΐνης. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι τα αυτοαντισώματα έναντι oxLDL<sub>p</sub> αποτελούν έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο.

Ε. Λουρίδα,<sup>1</sup>  
Α. Παπαθανασίου,<sup>2</sup>  
Ι. Γουδέβενος,<sup>2</sup>  
Α.Δ. Τσελέπης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,  
<sup>2</sup>Καρδιολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Endogenous PAF-acetylhydrolase affects the antigenicity of oxidized LDL in patients with coronary artery disease

*Abstract at the end of the article*

### Λέξεις ευρετηρίου

Αντισώματα  
Λιποπρωτεΐνες  
Στεφανιαία νόσος

Η αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αγγείων και η καρδιαγγειακή νόσος αποτελούν έναν από τους κύριους λόγους θνητότητας στο δυτικό κόσμο. Η παθογένεια της αθηρωμάτωσης περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος (ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα) και των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, κυρίως των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) και των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL).<sup>1</sup> Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) επάγει τη συσσώρευση της χοληστερόλης στα μακροφάγα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηρωματικής νόσου.<sup>2,3</sup>

Η οξείδωση της LDL είναι μια πολύπλοκη διεργασία. Διάφοροι μηχανισμοί, παρόντες σε αθηρωματικές βλάβες, μπορούν να οδηγήσουν στην οξείδωσή της *in vivo*. Η oxLDL δεν είναι ένα ομογενές σωματίδιο αλλά έχει πολύπλοκη δομή. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, τόσο το λιπιδιακό περιεχόμενο όσο και η απολιποπρωτεΐνη B-100, η οποία αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της LDL, υπόκεινται σε μια σειρά από χημικές τροποποιήσεις διαμέσου αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Μια από τις πιο σημαντικές μεταβολές που παρατηρούνται κατά την οξείδωση της LDL είναι η υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα στην sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων. Τα λιπούπεροξειδία παρουσία μεταλλικών ιόντων διασπώνται προς δραστικά φωσφολιπίδια, όπως είναι η οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη (oxPC), η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), ο lyso-PAF, και αλδεΐδες, όπως η μηλονική διαλδεΐδη (MDA) και η 4-υδροξυνονεάλη (4-HNE), οι οποίες αντιδρούν με την apo B-100. Τα προϊόντα αυτά είναι υπεύθυνα για πολλές από τις βιολογικές δράσεις της oxLDL, συμπεριλαμβανομένης και της αντιγονικότητας.<sup>4</sup>

Μια από τις σημαντικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της LDL είναι η υδρόλυση της oxPC και η παραγωγή της lyso-PC. Η lyso-PC φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο-κλειδί σε πολλές από τις βιολογικές δράσεις της oxLDL.<sup>5</sup> Η υδρόλυση της oxPC καταλύεται από την ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF-ακετυλοϋδρολάση, PAF-AH), η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο πλάσμα με τις λιποπρωτεΐνες και κυρίως με την LDL. Το ένζυμο αυτό υδρολύει φωσφολιπίδια, τα οποία περιέχουν μικρού μεγέθους ακυλο-ομάδα στην sn-2 θέση.<sup>6,7</sup>

Αποτέλεσμα της οξείδωσης της LDL είναι ο σχηματισμός διαφόρων νέων επιτόπων στο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο, οι οποίοι μπορεί να εμφανίζουν αντιγονικότη-

τα.<sup>5,8,9</sup> Αντισώματα έναντι oxLDL τύπου IgG και IgM είναι παρόντα σε υγιή άτομα.<sup>10</sup> Πολλές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL καθώς και έναντι LDL τροποποιημένης με MDA (MDA-LDL) σε ασθενείς με νόσο των στεφανιαίων αγγείων.<sup>11-18</sup> Σε όλες αυτές τις μελέτες οι ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα, ένα εύρημα το οποίο υποδεικνύει ότι η ύπαρξη αυτών των αντισωμάτων μπορεί να έχει διαγνωστική ή και προγνωστική αξία.<sup>19-30</sup> Βέβαια, υπάρχουν και μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων μεταξύ των ασθενών και των υγιών εθελοντών. Οι αιτίες αυτής της ασυμφωνίας δεν είναι γνωστές. Μπορεί να υποτεθεί ότι η φυσιολογική λειτουργία των αντισωμάτων έναντι oxLDL είναι η συμμετοχή τους στην απομάκρυνση αυτών των προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων σωματιδίων από την κυκλοφορία και το αρτηριακό τοίχωμα. Από την άλλη πλευρά, πολλές μελέτες έδειξαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της αθηρωμάτωσης και των επιπέδων των αντισωμάτων έναντι oxLDL.<sup>31,32</sup> Ένας πιθανός παθογόνος/αθηρογόνος ρόλος αυτών των αντισωμάτων μπορεί να είναι η αυξημένη φλεγμονή που αναπτύσσεται λόγω σχηματισμού ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ oxLDL και αντισωμάτων, η οποία οδηγεί σε επιτάχυνση του ρυθμού σχηματισμού αφρωδών κυττάρων.<sup>21</sup>

Επιπρόσθετα, έχει προταθεί από διάφορους ερευνητές ότι αυτοαντισώματα έναντι καρδιολιπίνης<sup>33-35</sup> και oxLDL<sup>29,30</sup> καθώς επίσης και έναντι MDA-LDL<sup>36</sup> έχουν προγνωστική αξία για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL σε σχέση με το βαθμό οξείδωσης της LDL και της ενεργότητας της PAF-AH σε ασθενείς με νόσο των στεφανιαίων αγγείων (CAD), σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος που διαδραματίζει αυτό το ένζυμο στην αντιγονικότητα της oxLDL.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Πληθυσμός της μελέτης

Εξήντα πέντε ασθενείς (58 άνδρες, 89,2% και 7 γυναίκες, 10,8%, μέσος όρος ηλικίας 62,5±9,5 έτη) με ιστορικό σταθερής σπασμικής (έναρξη συμπτωματολογίας τουλάχιστον 1 έτος πριν και η οποία παρέμεινε σταθερή για το τελευταίο εξάμηνο) συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Όλοι οι ασθενείς είχαν δοκιμασία κόπωσης θετική για μυοκαρδιακή ισχαιμία και υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία από τον Ιανουάριο έως και τον Ιούλιο του 2002. Ως σημαντική αγγειογραφικά στεφανιαία νόσος

θεωρήθηκε οποιαδήποτε στένωση >50% σε 1 ή περισσότερες επικάρδιες στεφανιαίες αρτηρίες. Από τους στεφανιαίους ασθενείς, οι 29 είχαν στεφανιαία νόσο ενός αγγείου, 13 είχαν νόσο 2 αγγείων και 23 είχαν νόσο 3 αγγείων. Ασθενείς με ιστορικό ηπατικής, νεφρικής ή ρευματικής νόσου, καθώς και ασθενείς με ιστορικό κακοήθειας και ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφικό έλεγχο στα πλαίσια αντιμετώπισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ή διερεύνησης μυοκαρδιοπάθειας ή βαλβιδοπάθειας, αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 47 υγιείς εθελοντές (άτομα με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό και χωρίς συμπτωματολογία συμβατή με καρδιαγγειακή νόσο). Η συμμετοχή στη μελέτη, τόσο των ασθενών όσο και των υγιών εθελοντών, έγινε ύστερα από ενημέρωσή τους για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης και την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

Στους στεφανιαίους ασθενείς, η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε πριν από την έναρξη της αντισπασμωδικής και της υπολιπιδαιμικής αγωγής. Σε όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη έγινε καταγραφή των κλασικών παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριακή υπέρταση και οικογενειακό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου, υπολογισμός δείκτη μάζας σώματος), ενώ προσδιορίστηκαν τα επίπεδα στον ορό της ολικής, της LDL-, της HDL-χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.

#### Απομόνωση της LDL

Η συλλογή του φλεβικού αίματος έγινε σε σωληνάρια που περιείχαν αντιπηκτικό EDTA. Το πλάσμα υποβλήθηκε σε τρεις διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις διάρκειας 10 ωρών η καθεμιά στις 40.000 στροφές στους 14 °C. Μετά από το τέλος της τρίτης υπερφυγοκεντρήσης συλλέχθηκε η LDL και υποβλήθηκε σε 24ωρη διαπίδυση. Η ποσοτικοποίησή της έγινε με τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο BCA.<sup>37</sup>

#### Παρασκευή διαφόρων μορφών oxLDL

*Απενεργοποίηση της ενδογενούς PAF-AH.* Η μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση της PAF-AH της LDL πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη διαλύματος 100 mM Pefabloc, 5 μL/mL LDL (τελική συγκέντρωση 0,5 mM Pefabloc). Μετά από το τέλος της επώασης, η LDL με απενεργοποιημένη την ενδογενή PAF-AH υπέστη εκτενή διαπίδυση. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η πρωτεΐνη σύμφωνα με τη μέθοδο BCA.

*Οξειδωση της LDL.* Η LDL με ή χωρίς απενεργοποιημένη την ενδογενή PAF-AH (τελική συγκέντρωση 100 μg πρωτεΐνης/mL) οξειδώθηκε με την προσθήκη διαλύματος 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 μL/mL LDL (τελική συγκέντρωση 5 μM Cu<sup>2+</sup>).<sup>38</sup> Η οξειδωση παρακολούθηθηκε στα 234 nm με καταγραφή της σιγμοειδούς καμπύλης παραγωγής των συζυγών διενίων. Παρασκευάστηκαν τρεις μορφές oxLDL με ενεργό την ενδογενή PAF-AH, η oxLDL<sub>L</sub> (στο τέλος της λανθάνουσας φάσης), η oxLDL<sub>P</sub> (στο τέλος της εκθετικής φάσης) και η oxLDL<sub>D</sub> (στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης). Οι ίδιες μορφές παρασκευά-

στηκαν μετά από προηγούμενη απενεργοποίηση της PAF-AH [oxLDL(-)], η oxLDL(-)<sub>L</sub> (στο τέλος της λανθάνουσας φάσης), η oxLDL(-)<sub>P</sub> (στο τέλος της εκθετικής φάσης) και η oxLDL(-)<sub>D</sub> (στο τέλος της φάσης αποικοδόμησης). Ο τερματισμός της οξειδωσης έγινε με την προσθήκη 0,01% EDTA.

*Παρασκευή της MDA-LDL.* Η LDL επώαστηκε για 3 ώρες στους 37 °C με 0,5 M MDA (100 μL MDA/mg πρωτεΐνης LDL). Η τροποποιημένη LDL (MDA-LDL) υποβλήθηκε σε εκτενή διαπίδυση και ακολούθησε μέτρηση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο BCA.

#### Προσδιορισμός αυτοαντισωμάτων

Τα αυτοαντισώματα έναντι φυσικής LDL (natLDL), όλων των μορφών oxLDL και MDA-LDL, προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ELISA. Συνοπτικά, το πλακίδιο ELISA καλύφθηκε με το αντιγόνο σε συγκέντρωση 10 μg/mL PBS/BHT/EDTA/well και φυλάχθηκε στους 4 °C για 24 ώρες. Ακολούθησε έκπλυση δύο φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου με τέτοιο τρόπο, ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντιγόνου που δεν είχε δεσμευτεί και να εξασφαλιστεί με τον τρόπο αυτόν η μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου. Προστέθηκαν 100 μL διαλύματος ζελατίνης 1% για τη δέσμευση των κενών θέσεων. Έγινε επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση δύο φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου με τέτοιο τρόπο, ώστε να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υγρού. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μL ορού σε αραιώση 1/50 στο διάλυμα 1% ζελατίνης. Έγινε επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση πέντε φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μL του δευτερογενούς αντισώματος που ήταν συζευγμένο με υπερξειδάση αγριοραπινίου αραιωμένου σε όγκο 1/1000 σε διάλυμα 1% ζελατίνης. Η επώαση έγινε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση πέντε φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Σε κάθε well προστέθηκαν 50 μL από το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος. Ακολούθησε επώαση για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε well προστέθηκαν 50 μL από το αντιδραστήριο τερματισμού της αντίδρασης (2N HCl). Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 492 nm σε φωτόμετρο microELISA. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο λόγος των αντισωμάτων που προσδέθηκαν στην oxLDL/natLDL.<sup>39-43</sup> Στα πειράματα αναστολής, οι οροί προεπώαστηκαν επί μία ώρα με 10 μg/mL lyso-PC ή διάφορες μορφές oxLDL πριν από την προσθήκη τους στο πλακίδιο ELISA.

#### Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές σε κάθε ομάδα (συμπεριλαμβανομένων και των τίτλων των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL) εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± σταθερή απόκλιση, ενώ οι διακριτές μεταβλητές ως απόλυτοι αριθμοί. Οι δύο ομάδες της μελέτης

συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη βοήθεια του Student's t-test (συνεχείς μεταβλητές) και  $\chi^2$ -test (διακριτές μεταβλητές). Για τον υπολογισμό των σχετικών κινδύνων (RR) και των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95%CI) μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση, λαμβάνοντας υπόψη τις στατιστικά σημαντικές παραμέτρους, όπως προέκυψαν από τη μονοπαραγοντική ανάλυση. Η διερεύνηση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο backward stepwise (likelihood ratios) και παράμετροι με  $P < 0,05$  θεωρήθηκαν ως ανεξάρτητοι παράγοντες. Σε κάθε περίπτωση,  $P < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το <sup>®</sup>SPSS 11.0 Software (SPSS, Inc, Chicago, Ill).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Συνολικά, μελετήθηκαν 112 άτομα. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 1. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης. Αντίθετα, οι στεφανιαίοι ασθενείς, συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου, είχαν μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης ορού ( $38,20 \pm 11,43$  έναντι  $44,08 \pm 9,43$ ,  $P=0,016$ ), ήταν πιο ηλικιωμένοι και εμφάνισαν μεγαλύτερη επίπτωση αρτηριακής υπέρτασης. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές

**Πίνακας 1.** Κλινικά χαρακτηριστικά και λιπιδαιμικό προφίλ του πληθυσμού της μελέτης.

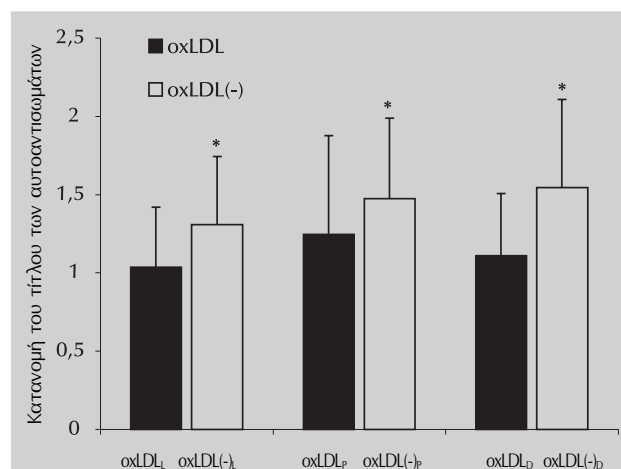
	Ομάδα ελέγχου (n=47)	Στεφανιαίοι ασθενείς (n=65)
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	24/23	58/7*
Ηλικία (έτη)	52,4±17,7	62,5±9,5*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,8±3,8	25,5±3,3
Υπέρταση (n)	7	21*
Σακχαρώδης διαβήτης (n)	1	12
Κάπνισμα (ενεργοί/ πρώην καπνιστές)	8/7	28/18
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	226,08±43,91	238,88±60,14
LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	154,57±41,30	172,97±61,22
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	44,08±9,43	38,20±11,43**
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	137,11±58,36	175,45±58,36

\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,02$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης, όσον αφορά στην επίπτωση του σακχαρώδους διαβήτη, του οικογενειακού ιστορικού πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου και της παχυσαρκίας.

### Τίτλοι αυτοαντισωμάτων έναντι όλων των μορφών οξειδωμένης LDL

Αυτοαντισώματα τύπου IgG έναντι όλων των μορφών οξειδωμένης LDL είναι παρόντα τόσο σε υγιείς εθελοντές όσο και σε στεφανιαίους ασθενείς. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι και στις δύο ομάδες της μελέτης οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων ήταν υψηλότεροι όταν ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι μορφές oxLDL<sub>P</sub> και oxLDL<sub>D</sub> σε σύγκριση με την oxLDL<sub>L</sub>. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται όταν οι μορφές oxLDL(-) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα (εικ. 1). Επιπλέον, και στις δύο ομάδες μελέτης οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων έναντι κάθε μορφής oxLDL(-) ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με τις αντίστοιχες oxLDL μορφές (εικ. 1). Οι στεφανιαίοι ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερους τίτλους IgG αντισωμάτων έναντι όλων των μορφών oxLDL και oxLDL(-) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα (πίν. 2). Τα διαγράμματα διασποράς, που δείχνουν την κατανομή των αντισωμάτων του πληθυσμού της μελέτης, φαίνονται στην εικόνα 2. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων έναντι MDA-LDL μεταξύ στεφανιαίων ασθενών και υγιών εθελοντών (πίν. 2). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων όταν οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τη νόσο των αγγείων (1, 2 ή 3 αγγεία).

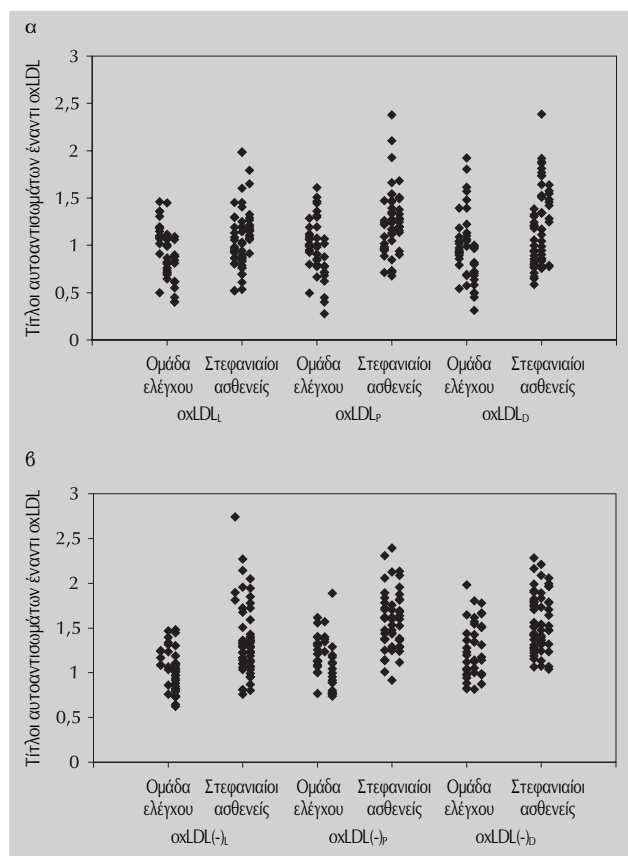


**Εικόνα 1.** Κατανομή του τίτλου των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL στον πληθυσμό της μελέτης, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους έναντι oxLDL(-) στην ίδια φάση οξείδωσης (\* $P < 0,000$ ).

**Πίνακας 2.** Τίτλοι αυτοαντισωμάτων του πληθυσμού της μελέτης.

	Ομάδα ελέγχου (n=47)	Στεφανιαίοι ασθενείς (n=65)	Τιμή P
OxLDL <sub>L</sub>	0,873±0,254	1,102±0,391	0,0007
OxLDL <sub>P</sub>	0,915±0,243	1,223±0,340	0,000001
OxLDL <sub>D</sub>	0,969±0,280	1,199±0,397	0,002
OxLDL(-) <sub>L</sub>	1,043±0,226	1,368±0,392	0,000008
OxLDL(-) <sub>P</sub>	1,154±0,269	1,567±0,332	0,000000
OxLDL(-) <sub>D</sub>	1,270±0,269	1,563±0,320	0,00002
MDA-LDL	1,182±0,205	1,298±0,529	NS

NS: Στατιστικά μη σημαντικό



**Εικόνα 2.** (α) Διάγραμμα διασποράς των τίτλων των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>P</sub> και oxLDL<sub>D</sub> σε υγιείς εθελοντές και στεφανιαίους ασθενείς. (β) Διάγραμμα διασποράς των τίτλων των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL(-)<sub>L</sub>, oxLDL(-)<sub>P</sub> και oxLDL(-)<sub>D</sub> σε υγιείς εθελοντές και στεφανιαίους ασθενείς.

Για τον προσδιορισμό των επιτόπων της oxLDL ή oxLDL(-), οι οποίοι διαφοροποιούν τους στεφανιαίους ασθενείς από τους υγιείς εθελοντές, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής με τη χρησιμοποίηση ως ανα-

στολέων διαφόρων μορφών oxLDL και oxLDL(-), καθώς και lyso-PC. Όταν οι οροί προεπωάστηκαν με 10 μg/mL lyso-PC πριν από τον προσδιορισμό, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL σε σύγκριση με τους αντίστοιχους έναντι oxLDL(-) (83±6,5% έναντι 35,3 ±21,5%, P<0,02).

Για την πιθανή συμμετοχή των τίτλων αυτοαντισωμάτων κατά οξειδωμένων μορφών LDL-χοληστερόλης ως ανεξάρτητων παραγόντων κινδύνου για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου, χρησιμοποιήθηκε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του μοντέλου και τη μονοπαραγοντική ανάλυση (πίν. 3) ήταν τα επίπεδα ορού ολικής, LDL- και HDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, καθώς και τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>P</sub>, oxLDL<sub>D</sub>, oxLDL(-)<sub>L</sub>, oxLDL(-)<sub>P</sub> και oxLDL(-)<sub>D</sub>. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση (μοντέλο 1, πίν. 4) χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>P</sub>, oxLDL<sub>D</sub>, oxLDL(-)<sub>L</sub>, oxLDL(-)<sub>P</sub>, oxLDL(-)<sub>D</sub> και HDL-χοληστερόλη, όπως προέκυψαν από τη μονοπαραγοντική ανάλυση. Ύστερα από προσαρμογή για την ηλικία και τους άλλους παράγοντες κινδύνου, μόνο τα αυξημένα επίπεδα αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>P</sub> και τα χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης ορού σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (RR=0,043, 0,004–0,461 95%CI, P=0,009, και RR=1,136, 1,039–1,242 95%CI, P=0,005, αντίστοιχα). Σε ένα δεύτερο μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης (μοντέλο 2, πίν. 4) συμπεριελήφθησαν τα επίπεδα αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>P</sub>, oxLDL<sub>D</sub>, oxLDL(-)<sub>L</sub>, oxLDL(-)<sub>P</sub> και oxLDL(-)<sub>D</sub>. Σε αυτό το μοντέλο, μόνο τα αυξημένα επίπεδα των

**Πίνακας 3.** Μονοπαραγοντική ανάλυση για την ύπαρξη της στεφανιαίας νόσου.

	β	95%CI (β)	Τιμή P
TCHOL	0,995	0,987–1,004	0,275
HDL-C	-0,056	-0,106–0,008	0,021
LDL-C	0,993	0,983–1,002	0,140
TG	0,995	0,989–1,001	0,078
oxLDL <sub>L</sub>	0,085	0,019–0,385	0,01
oxLDL <sub>P</sub>	0,028	0,005–0,146	0,000
oxLDL <sub>D</sub>	0,165	0,052–0,524	0,002
oxLDL(-) <sub>L</sub>	0,147	0,042–0,517	0,003
oxLDL(-) <sub>P</sub>	0,096	0,027–0,342	0,000
oxLDL(-) <sub>D</sub>	0,270	0,090–0,808	0,019

95%CI: 95% διάστημα αξιοπιστίας, TCHOL: Ολική χοληστερόλη, HDL-C: HDL-χοληστερόλη, LDL-C: LDL-χοληστερόλη, TG: Τριγλυκερίδια

**Πίνακας 4.** Πολυπαραγοντική ανάλυση για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου.

	$\beta$	95%CI ( $\beta$ )	Τιμή P
<b>Μοντέλο 1*</b>			
HDL-χοληστερόλη	1,136	1,039-1,242	0,005
oxLDL <sub>p</sub>	0,043	0,004-0,461	0,009
<b>Μοντέλο 2**</b>			
oxLDL <sub>p</sub>	0,076	0,012-0,478	0,006
oxLDL(-) <sub>p</sub>	0,150	0,035-0,641	0,010

\*: Συμπεριλαμβάνονται: oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>p</sub>, oxLDL<sub>D</sub>, oxLDL(-)<sub>L</sub>, oxLDL(-)<sub>p</sub>, oxLDL(-)<sub>D</sub> και HDL-χοληστερόλη, όπως προκύπτουν από τη μονοπαραγοντική ανάλυση.

\*\* : Όπως το προηγούμενο μοντέλο, αλλά χωρίς τη HDL-χοληστερόλη

95%CI: 95% διάστημα αξιοπιστίας

αυτοαντισωμάτων κατά oxLDL<sub>p</sub> και oxLDL(-)<sub>p</sub> σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου (RR=0,076, 0,012-0,478 95%CI, P=0,006, και RR=0,150, 0,035-0,641 95%CI, P=0,010, αντίστοιχα).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η oxLDL φαίνεται ότι αποτελεί ένα ανοσογόνο σωματίδιο, το οποίο διεγείρει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα Β-κύτταρα. Αντι-oxLDL αντισώματα είναι παρόντα τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε στεφανιαίους ασθενείς.<sup>10</sup> Πολλές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL καθώς και έναντι LDL τροποποιημένης με MDA (MDA-LDL) σε ασθενείς με νόσο των στεφανιαίων αγγείων.<sup>11-18</sup> Σε όλες αυτές τις μελέτες, οι ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα.<sup>19-30</sup>

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε για πρώτη φορά η συσχέτιση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων στον ορό στεφανιαίων ασθενών με το βαθμό της οξειδωσης (φάση οξειδωσης) της LDL, καθώς επίσης και με την ενεργότητα της PAF-AH που είναι συνδεδεμένη με την LDL. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και lyso-PC στον ορό τόσο ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα όσο και υγιών εθελοντών, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο της ενδογενούς PAF-AH στα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων στον ορό καθώς επίσης και στην αντιγονική τους εξειδίκευση. Πράγματι, όταν οι μορφές oxLDL(-), δηλαδή μορφές oxLDL όπου έχει απενεργοποιηθεί η ενδογενής PAF-AH (εμπλουτισμένες σε οξειδωμένα φωσφολιπιδία και πτωχές σε lyso-PC), χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα, οι τίτλοι των αυτοαντισωμάτων τόσο στους ασθενείς όσο και στους υγιείς εθελοντές

ήταν υψηλότεροι συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους που παρατηρήθηκαν όταν οι μορφές oxLDL (εμπλουτισμένες σε lyso-PC) χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι τα αντισώματα αυτά κατευθύνονται έναντι των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης της LDL. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα οξειδωμένα φωσφολιπιδία υδρολύονται με τη δράση της ενδογενούς PAF-AH. Κατά συνέπεια, όταν η ενδογενής PAF-AH είναι απενεργοποιημένη, η ποσότητα των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων συνεχώς αυξάνεται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης,<sup>38</sup> οδηγώντας σε υψηλότερο τίτλο αυτοαντισωμάτων όταν οι μορφές oxLDL(-) χρησιμοποιούνται ως αντιγόνα, σε σύγκριση με αυτούς που παρατηρούνται όταν χρησιμοποιούνται οι μορφές oxLDL. Οι στεφανιαίοι ασθενείς εμφάνισαν υψηλότερους τίτλους αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές όταν οι μορφές oxLDL χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στους τίτλους των αυτοαντισωμάτων έναντι MDA-LDL μεταξύ των στεφανιαίων ασθενών και των υγιών εθελοντών, υποδηλώνοντας ότι τα αντισώματα αυτά δεν κατευθύνονται έναντι της τροποποιημένης apoB-100.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και από άλλους ερευνητές,<sup>44</sup> πολλές από τις προφλεγμονώδεις δράσεις της oxLDL αποδίδονται στη lyso-PC. Η lyso-PC ενισχύει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων διαμέσου της πρωτεϊνοκινάσης C, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και προκαλεί το χημειοτακτισμό των T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Επιπρόσθετα, lyso-PC που είναι παρούσα σε αθηρωματικές πλάκες εμφανίζει ισχυρή αντιγονικότητα.

Κατά συνέπεια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι δυνατή η διατύπωση της υπόθεσης ότι οι αυξημένοι τίτλοι αυτοαντισωμάτων έναντι oxLDL, που παρατηρούνται στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, οφείλονται κυρίως στη lyso-PC. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναστολής, σύμφωνα με τα οποία η προσθήκη της lyso-PC στο ορό, πριν από τον προσδιορισμό, ανέστειλε σημαντικά την πρόσδεση των αυτοαντισωμάτων στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Τα αντισώματα που κατευθύνονται έναντι lyso-PC μπορούν να σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα στο αρτηριακό τοίχωμα, τα οποία απομακρύνονται ταχύτατα οδηγώντας στο σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, είναι πιθανόν η lyso-PC, που παράγεται ενζυμικά με τη δράση της PAF-AH κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, να ενεργοποιεί τα Β-κύτταρα ώστε να εκκρίνουν αντισώματα και με αυτόν τον τρόπο να συμμετέ-

χουν και να προάγουν χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις, οι οποίες παρατηρούνται στην αθηρωμάτωση και σε πλήθος ανοσολογικών δυσλειτουργιών.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά την παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι οξειδωμένων φωσφολιπιδίων και lyso-PC στον ορό τόσο ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα όσο και σε υγιών εθελοντών. Παρόλα αυτά, η lyso-PC φαίνεται να είναι ο επίτοπος που διακρίνει τους ασθενείς από τα φυσιολο-

γικά άτομα. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο της PAF-AH όσον αφορά στον τύπο των επιτόπων που σχηματίζονται στην oxLDL και, κατά συνέπεια, τον τύπο των αυτοαντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι αυτής της αθηρογόνου λιποπρωτεΐνης. Επιπλέον, αυτή η μελέτη δείχνει ότι τα αυτοαντισώματα έναντι oxLDL<sub>p</sub> αποτελούν έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο.

## ABSTRACT

### Endogenous PAF-acetylhydrolase affects the antigenicity of oxidized LDL in patients with coronary artery disease

E. LOURIDA,<sup>1</sup> A. PAPATHANASIOU,<sup>2</sup> J. GOUDEVENOS,<sup>2</sup> A.D. TSELEPIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, <sup>2</sup>Department of Cardiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(1):63-71*

**OBJECTIVE** The oxidative modification of LDL induces immunogenic epitopes, many of which are due to phospholipids formed during oxidation, such as oxidized phosphatidylcholine (oxPC), lysophosphatidylcholine (lyso-PC), platelet activating factor (PAF) and oxidized phospholipids. Lyso-PC is enzymatically generated during LDL oxidation through the hydrolysis of oxidized phospholipids by the LDL-associated PAF-acetylhydrolase (PAF-AH). The aim of this study was to evaluate the autoantibody titers against oxLDL in relation to the phase of LDL oxidation and to the activity of the LDL-associated PAF-AH in patients with coronary artery disease, in order to investigate a possible role of this enzyme in the immunogenicity of oxLDL. **METHOD** The autoantibody titers against various forms of oxLDL were estimated in 65 patients with stable angina pectoris and angiographically verified coronary artery disease (CAD) (7 women, 58 men, mean age 62.5±9.5 years) and in 47 healthy volunteers (control group). LDL isolated from fresh plasma was oxidized in the presence of 5 μM CuSO<sub>4</sub>. Three different forms of oxLDL were prepared, oxLDL<sub>L</sub>, oxLDL<sub>p</sub> and oxLDL<sub>D</sub>, i.e. at the end of the lag, propagation and decomposition phases, respectively. The same forms were also prepared after inactivation of endogenous PAF-AH [oxLDL(-)]. Malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) was prepared and used as antigen. Autoantibody titers were measured by ELISA. **RESULTS** CAD patients had significantly higher titers than controls against oxLDL<sub>L</sub> (1.102±0.391 vs 0.873±0.254, P<0.001), oxLDL<sub>p</sub> (1.223±0.340 vs 0.915±0.24, P<0.0001), oxLDL<sub>D</sub> (1.199±0.397 vs 0.969±0.280, P=0.002), oxLDL(-)<sub>L</sub> (1.368±0.392 vs 1.043±0.226, P<0.0001), oxLDL(-)<sub>p</sub> (1.567±0.332 vs 1.154±0.269, P<0.0001), and oxLDL(-)<sub>D</sub> (1.563±0.320 vs 1.270±0.269, P<0.0001). By contrast, the autoantibody titers against MDA-LDL did not differ between CAD patients and controls. On multivariate logistic regression analysis after adjustment for other risk factors only elevated levels of oxLDL<sub>p</sub> and oxLDL(-)<sub>p</sub> were associated with a significantly higher risk for CAD (RR=0.076, 0.012-0.478 95%CI, P=0.006, and RR=0.150, 0.035-0.641 95%CI, P=0.010, respectively). **CONCLUSIONS** This study shows for the first time that autoantibodies against oxidized phospholipids and lyso-PC are observed in the serum of both patients with CAD and healthy subjects. Lyso-PC is probably the epitope that discriminates patients from healthy subjects. These findings indicate the significant role of PAF-AH as regards the type of epitopes formed in oxLDL, and consequently the type of autoantibodies formed against this atherogenic lipoprotein. Moreover, this study shows that autoantibodies to oxLDL<sub>p</sub> constitute an independent risk factor for cardiovascular disease.

**Key words:** Antibodies, Coronary disease, Lipoproteins

## Βιβλιογραφία

- KAPLAN MAM. Oxidized low density lipoprotein: Atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med* 1999, 37:777–787
- BHAKDI SLK, HAN SR, TORZEWSKI M, HUSMANN M. Beyond cholesterol: The enigma of atherosclerosis revisited. *Thromb Haemost* 2004, 91:639–645
- SCOTT J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev* 2004, 14:271–279
- STEINBERG DSP, CAREW TE, KHOO JC, WITZTUM JL. Beyond cholesterol: Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320:915–924
- ITABE H, TAKANO T. Oxidized low-density lipoprotein: The occurrence and metabolism in circulation and in foam cells. *J Atheroscler Thromb* 2000, 7:123–131
- TSELEPIS ADCM. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* 2002, 3:57–68
- KARASAWA KHA, SATOH N, INOUE K, SETAKA M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res* 2003, 42:93–114
- ITABE H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998, 37:181–207
- ITABE H. Oxidized low-density lipoproteins: What is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 2003, 26:1–9
- FUKUMOTO M, SHOJI T, EMOTO M, KAWAGISHI T, OKUNO Y, NISHIZAWA Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:703–707
- HOLVOET PCD. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994, 8:1279–1284
- HOLVOET PSJM, VAN LEEMPUT J, COLLEN D, VAN-HAECKE J. Oxidized low-density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18:100–107
- VAARALA O. Antibodies to oxidized LDL. *Lupus* 2000, 9:202–205
- HORKKO S, BINDER CJ, SHAW PX, CHANG MK, SILVERMAN G, PALINSKI W ET AL. Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:1771–1779
- HOLVOET PCD, VAN DE WER F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. *JAMA* 1999, 281:1718–1721
- KWON KMKH, HONG BK, KIM D, YONG LEE J, KEE RYU S, EUN PARK B ET AL. Autoantibody against malondialdehyde-modified low density lipoprotein in patients with non-diabetic unstable angina: A potential role in immunologic reaction of plaque instability. *Yonsei Med J* 2002, 43:203–210
- SHERER Y, TENENBAUM A, BLANK M, SHEMESH J, HARATS D, FISMAN EZ ET AL. Autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein in coronary artery disease. *Am J Hypertens* 2001, 14:149–154
- MONACO C, CREA F, NICCOLI G, SUMMARIA F, CIANFLONE D, BORDONE R ET AL. Autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease; pathophysiological implications. *Eur Heart J* 2001, 22:1572–1577
- SALONEN JTYHS, YAMAMOTO R, BUTLER S, KORPELA H, SALONEN R, NYSSONEN K ET AL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992, 339:883–887
- PUURUNEN MMM, MANNINEN V, TENKANEN L, ALFTHAN G, EHNHOLM C. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994, 154:2605–2609
- BERGMARK CWR, DE FAIRE U, LEFVERT AK, SWEDENBORG J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15:441–445
- BUI MNSM, MOUTSATSOS G, LU DY, KATZ P, McCOWN R. Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1996, 131:663–667
- BOULLIER A, HAMON M, WALTERS-LAPORTE E, MARTIN-NIZART F, MACKEREEL R, FRUCHART JC ET AL. Detection of autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and of IgG-bound low density lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 1995, 238:1–10
- VAN DE VIJVER LP, STEYGER R, VAN POPPEL G, BOER JM, KRUIJSSEN DA, SEIDELL JC ET AL. Autoantibodies against MDA-LDL in subjects with severe and minor atherosclerosis and healthy population controls. *Atherosclerosis* 1996, 122:245–253
- CRAIG WY, RAWSTRON MW, RUNDELL CA, ROBINSON E, POULIN SE, NEVEUX LM ET AL. Relationship between lipoprotein- and oxidation-related variables and atheroma lipid composition in subjects undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:1512–1517
- LEHTIMAKI T, LEHTINEN S, SOLAKIVI T, NIKKILA M, JAAKKOLA O, JOKELA H ET AL. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:23–27
- GEORGE J, HARATS D, BAKSHI E, ADLER Y, LEVY Y, GILBURD B ET AL. Anti-oxidized low-density lipoprotein antibody determination as a predictor of re-stenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Immunol Lett* 1999, 68:263–266
- ERKKILA AT, NARVANEN O, LEHTO S, UUSITUPA MI, YLA-HERTTUALA S. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and cardiolipin in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:204–209
- LIANG KW, HUANG JL, KAO CH, HSUEH CW, HO HY, LEE WL ET AL. Significantly higher levels of oxidized LDL autoantibody in coronary artery disease patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2000, 63:101–106



30. TSIMIKAS S, BERGMARK C, BEYER RW, PATEL R, PATTISON J, MILLER E ET AL. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41:360–370
31. SALONEN JT, YLA-HERTTUALA S, YAMAMOTO R, BUTLER S, KORPELA H, SALONEN R ET AL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992, 339:883–887
32. MAGGI E, CHIESA R, MELISSANO G, CASTELLANO R, ASTORE D, GROSSI A ET AL. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of *in vitro* and *in vivo* oxidation markers. *Arterioscler Thromb* 1994, 14:1892–1899
33. NITYANAND SBC, DE FAIRE U, SWEDENBORG J, HOLM G, LEFVERT AK. Antibodies against endothelial cells and cardioplipin in young patients with peripheral atherosclerotic disease. *J Intern Med* 1995, 238:437–439
34. VAARALA OMM, MANTTARI M, MANNINEN V, TENKANEN L, PUURUNEN M, AHO K ET AL. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995, 91:23–27
35. WU JT, WU LL. Autoantibodies against oxidized LDL. A potential marker for atherosclerosis. *Clin Lab Med* 1997, 17:595–604
36. IRIBARREN C, FOLSOM AR, JACOBS DR Jr, GROSS MD, BELCHER JD, ECKFELDT JH. Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. A case-control study. The ARIC study investigators. Atherosclerosis risk in communities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17:1171–1177
37. LIAPIKOS TAAS, KARABINA SAP, TSOUKATOS DC, DEMOPOULOS CA, TSELEPIS AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1212:353–360
38. KARABINA SAPLT, GREKAS G, GOUDEVENOS J, TSELEPIS AD. Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1213:34–38
39. CRAIG WY, RAYTCHEVA SE, POULIN SE, RITCHIE RF. Effect of low-density lipoprotein (LDL) antigen source on an enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies against oxidized LDL. *Ann Clin Biochem* 1999, 36:333–339
40. CRAIG WY, POULIN SE, NEVEUX LM, PALOMAKI GE, DOSTAL-JOHNSON DA, LEDUE TB ET AL. Anti-oxidized LDL antibodies and antiphospholipid antibodies in healthy subjects: Relationship with lipoprotein- and oxidation-related analytes. *J Autoimmun* 1995, 8:713–726
41. CRAIG WY, DAVIS AE, POULIN SE. Effects of incubation conditions on ELISA for autoantibodies against oxidised low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1996, 42:1709–1711
42. CRAIG WY, POULIN SE, NELSON CP, RITCHIE RE. ELISA of IgG antibody to oxidized low-density lipoprotein: Effects of blocking buffer and method of data expression. *Clin Chem* 1994, 40:882–888
43. CRAIG WY, RAWSTRON MW, RUNDELL CA, ROBINSON E, POULIN SE, NEVEUX LM ET AL. Relationship between lipoprotein- and oxidation-related variables and atheroma lipid composition in subjects undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:1512–1517
44. WU R, HUANG YH, ELINDER LS, FROSTEGARD J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18:626–630

*Corresponding author:*

E. Lourida, Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, GR-451 10 Ioannina, Greece  
e-mail: me00933@cc.uoi.gr

