



LDL Oksidasyonu ve Atherosklerozla İlişkisi

LDL Oxidation and Atherosclerosis

Melihat DİRİCAN¹

Özet

Plazma düşük dansiteli lipoprotein (LDL)-kolesterol düzeyinin yüksek olması atherosklerotik kalp ve damar hastalıkları riskinde artış ile birlikte. Ancak moleküller düzeyde LDL'nin nasıl atherojen olduğunun cevabı açık değildir. LDL'nin oksidatif modifikasyonunun atheroskleroz gelişiminde önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir. Atherosklerotik lezyonlarda okside LDL'nin varlığı saptanmıştır. Okside LDL sadece köpük hücre oluşumuna yol açmakla kalmayıp, damar duvarında kronik inflamatuvar reaksiyonlara ve hücre hiperplazisine de neden olmaktadır. Bu derlemede LDL oksidasyonunun oluşumu ve atherogenezisdeki rolü incelenmiştir.

Abstract

Elevated concentration of low density lipoprotein (LDL-C) - cholesterol is associated with increased risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The precise mechanism by which LDL causes atherosclerosis has not yet been completely elucidated. Evidence suggests that oxidatively modified LDL contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. Existence of oxidized LDL was shown in atherosclerotic lesions. Oxidized LDL may be atherogenic, not only by its ability to induce foam cell formation, but also by triggering a chronic inflammatory process and cell hyperplasia in the vessel wall. In this article, formation of the oxidized LDL and its role in atherogenesis is reviewed.

İÇİNDEKİLER

- I. GİRİŞ
- II. LDL OKSİDASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER
- III. IN VIVO OKSİDE LDL VARLIĞINI GÖSTEREN BULGULAR
- IV. ATHEROSKLEROZDA OKSİDE LDL'İN OLASI ROLÜ
- V. SONUÇ
- VI. KAYNAKLAR

I. GİRİŞ

Plazma kolesterol ve özellikle düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (LDL-K) düzeyinin yüksek olması atheroskleroz riskini artırmaktadır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular atheroskleroz ile LDL-K konsantrasyonu arasında bağlantı olduğunu göstermekle birlikte hücresel düzeyde LDL'nin nasıl atherojen olduğu açık değildir. Son yıllarda LDL'nin oksidatif modifikasyonunun atheroskleroz gelişiminde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir.

Normal insan arterlerinin apolipoprotein B (apo B) içeriği yaşa bağımlı bir şekilde artar; oysa apo A-I düzeyi hemen hemen sabittir. Çocuklukta intimada bir LDL partikülü başına yaklaşık on yüksek

¹ Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD, Bursa.



dansiteli lipoprotein (HDL) partikülü bulunurken, 20-30 yaşlarında yalnızca üç HDL partikülü bulunur (1). HDL/LDL oranındaki bu azalma yaşamın ikinci dekadında başlar ki bu dekatta koroner arterlerde ilk yağlı çizgiler de görülür (2). Deney hayvanlarında atherosklerotik lezyonların oluşmasından önce arter duvarında LDL birikimi olduğu saptanmıştır. Bundan neyin sorumlu olduğu tam olarak bilinmemektedir ancak proteoglikanların ve glikozaminoglikanların etkisi olduğu sanılmaktadır. İnsan arterlerinde kondroitin sülfat içeriği ile intimadaki LDL ve HDL içeriği arasında anlamlı pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (1).

LDL'nin Yapısı ve Özellikleri

LDL'nin molekül ağırlığı 2.5×10^6 olarak hesaplanmıştır. Bir LDL partikülü lipofilik çekirdek olarak yaklaşık 1600 mol ester kolesterol, 120-170 mol trigliserid içerir. Bu çekirdeği tek tabaka halinde 700 mol fosfolipid ve 600 mol serbest kolesterol çevreler. LDL'nin yüzeyindeki apolipoprotein B ise 4536 amino asitten oluşur ve molekül ağırlığı yaklaşık yarım milyon kadardır (3).

Brown ve Goldstein (4) LDL reseptör yolunu bulmuşlar ve bu yolun makrofajlar tarafından LDL alınmasında sorumlu olduğunu göstermişlerdir (4). Bu reseptörler yoluyla hücre içine alınan kolesterol miktarı sınırlıdır ve makrofaj hücre kültürü ortamına LDL eklendiğinde makrofajların kolesterol esteri birikimi yaratacak kadar çok miktarda LDL'yi almadıkları saptanmıştır. Diğer yandan ailesel homozigot hiperkolesterolemili hastalarda ve Watanabe-türü hiperlipidemik tavşanlarda LDL reseptörü olmadığı halde köpük hücrelerinin oluştuğu bildirilmiştir (5,6). Bu gelişmelerden sonra Goldstein, makrofajların aşırı miktarda LDL alması ve kolesterol birikimi olması için, LDL'nin modifiye olması gerektiğini öne sürmüştür. Daha sonra, LDL'nin kimyasal bir türevi olan asetillenmiş LDL'nin makrofajlar tarafından aşırı şekilde alındığı ve bu olayda "scavenger" çöpçü reseptör olarak adlandırılan başka bir reseptörün rol oynadığı anlaşılmıştır. Diğer bir kimyasal olarak modifiye olmuş form olan malondialdehit ile konjuge LDL'nin de aynı reseptör tarafından tanındığı bulunmuştur (7).

LDL'nin Modifikasyonu

Steinberg ve arkadaşları LDL'nin endotel veya düz kas hücre kültürüyle inkübe edildiğinde modifiye

olduğunu ve bu halde çok daha hızlı şekilde makrofajlar tarafından alındığını gösterdiler (8). Steinbrecher (9) 1984'de buna açıklama getirmiş; bu hücrelerin LDL'de lipid peroksidasyonunu başlatma yetenekleri olduğunu, bunun sonucunda da LDL'nin modifiye olarak makrofajlar tarafından alındığını belirtmiştir. Bu çalışmalara paralel olarak LDL'nin endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine (DKH) karşı sitotoksik etki gösterdiği ve bu sitotoksositeye inkübasyon sırasında LDL'de meydana gelen oksidasyon ürünlerinin yol açtığı bulundu. Çeşitli kültür ortamlarında (endotel, DKH, makrofaj, fibroblast) LDL'nin inkübasyonu sonucu oksidasyon indüklenmektedir. Ayrıca bakır ve demir gibi lipid peroksidasyonunu katalizleyen metallerle birlikte LDL inkübe edildiğinde de oksidasyon indüklenmektedir (9-11). Hücre kültürü ortamında LDL'de lipid peroksidasyonunun nasıl başladığı tam olarak bilinmemekte, ancak bazı mekanizmalar ileri sürülmektedir (12). Bunlar;

- Hücrelerden (örn. DKH) süperoksit anyonunun salınımı,
- Hücre membranında oluşan lipid peroksidlerin LDL'ye transferi,
- Metal iyonların katalizlediği lipid peroksidasyonu,
- Membrana bağlı enzimlerin LDL'ye direkt etkisidir.

Arter duvarı hücrelerinin lipoprotein lipaz, kolesterol esteraz, fosfolipaz A₂, fosfolipaz C, fosfolipaz D ve lipooksijenaz içerdikleri gösterilmiştir. LDL'nin içerdiği kolesterol esterlerinin hidroliziyle serbest kolesterol ve serbest yağ asiti miktarlarında artış olurken, trigliseridlerin hidrolizi digliserid, monogliserid ve gliserolün miktarlarında artışa yol açar. Fosfolipaz A₂ lizolesitin miktarını artırırken, fosfolipaz C inositol fosfat ve diaçilgliserol oluşumuna yol açar. Lipooksijenazların etkisiyle de hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin oksidasyonu gerçekleşir (13).

Lipid peroksidasyonunu herhangi bir serbest radikal (örn; hidroksil, alkoksil, peroksil, alkil radikali gibi) başlatabilir. Serbest radikal doymamış bir yağ asitinin reaktif bir metilen grubundan bir hidrojen atomu çekme yeteneğindedir. Ortamdaki bakır iyonları gibi çift değerlikli metallerin de etkisiyle peroksil radikalleri oluşur ve bu durum zincirleme re-

aksiyonlara neden olarak ortamda çok fazla miktarda lipoperoksidlerin oluşmasına sebep olur. Takiben bağ düzenlenmesi gerçekleşir ve konjuge dien oluşumu gözlenir. Peroksi radikalleri birbirleriyle birleşebilir, proteinlere (örn; apo B) etki edebilir veya başka bir yağ asidinden hidrojen çekerek lipid peroksidasyonunu ilerletebilir. Lipid peroksidasyonunun başlıca ürünleri lipid hidroperoksitleridir. Lipid hidroperoksitleri oldukça stabil moleküllerdir fakat geçiş metalleri veya hem-protein kompleksleri tarafından katalizlenen dekompozisyonları sonucu alkoksil ve peroksil radikalleri oluşur; bunlar olayı yeniden başlatabilirler veya amplifiye edebilirler (3).

Lipid peroksidasyonu reaksiyonları sırasında karbon bağlarının koparılmasıyla aldehit yapıda ürünler olan alkanaller (örn; malondialdehit), alkenaller (örn; 4-hidroksinonenal) ve alkanlar (örn; pentan, etan) oluşur. Bunlara ek olarak oksidatif modifikasyon sırasında LDL'de fosfolipaz A₂ aktivitesiyle lesitinden lizolesitin oluşumu da artar. Lizolesitin okside yağ asitlerinin salınımını artırır (14).

Yağ asiti fragmantasyonu sonucu oluşan ve son derece reaktif ürünler olan aldehitler, ketonlar ve diğer oksitlenmiş ürünler (örn; oksisterol türevleri), daha sonra apo B ile veya fosfolipidlerle kompleks oluşturabilirler. Apo B'nin lizil birimlerinin modifikasyonu LDL'nin reseptörüne bağlanma yeteneğini inhibe eder. Apo B'nin lizin birimlerinin %16'sı reaktif ürünler tarafından bloke edildiğinde LDL partikülü scavenger reseptör tarafından alınmaya başlar.

Okside LDL basit, homojen bir partikül değil, heterojen bir üründür. Okside yağ asitleri ve yıkım ürünleri, okside steroller, okside fosfolipidler ve bunların apo B ve fosfolipidlerle konjuge olmuş hallerini içerir.

LDL oksidasyonunun başlıca arter duvarında olduğu kabul edilmektedir (8). Plazmada LDL oksidasyonunun fazla olmadığı; çünkü plazmada çok miktarda antioksidanın bulunduğu bilinmektedir. Plazmada LDL oksidasyonu oluşsa bile hepatik sinüzoidal hücrelerdeki scavenger reseptörler tarafından ortamdaki uzaklaştırıldığı düşünülmektedir (8,15,16).

LDL oksidasyonu çeşitli yöntemlerle ölçülebilir. Bunlardan en sık kullanılanlar, bakır iyonlarıyla LDL'nin inkübasyonu sırasında oluşan tiyobarbitürik

asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS)'in miktarının ölçümü; diğeri ise bu sırada konjuge dien oluşumunun 234 nm'de izlenmesidir. Bu izlemede 3 fazdan oluşan tipik bir eğri elde edilir (Şekil 1).



Şekil 1. LDL oksidasyonu fazları CD: Konjuge dien, TBARS: Tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddeler.

- 1- Lag faz (Gecikme süresi)
- 2- Propagasyon (ilerleme) fazı
- 3- Dekompozisyon (bozunma) fazı

Lag fazda LDL'de oksidatif reaksiyonlar yavaştır ve bu fazda LDL'deki antioksidanlar tükenir. İlk tükenen antioksidan alfa-tokoferol, en son tükenen ise beta-karotendir. Bu fazın uzunluğu 34-114 (ortalama 68) dakika kadardır. Böylece antioksidanlarını kaybeden LDL'nin çoklu doymamış yağ asitleri hızla lipid hidroperoksidlerine okside olur. Lipid peroksidasyonu başladıktan kısa süre sonra tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren bileşiklerin (TBARS) ve diğer aldehit yapıdaki lipid peroksidasyonu ürünlerinin miktarı artar; 430 nm'de floresans artışı olur, rölatif elektroforetik mobilitede artış görülür; dienler ve lizofosfatidler artar ve apo B fragmantasyonu görülür. Lipid hidroperoksidleri geçici ürünlerdir, bunların oluşum hızı dekompozisyon hızının üzerinde olana kadar artışları sürer. Çoklu doymamış yağ asitlerinin %70-80'i okside olduğunda artık dekompozisyon dominant olur ve lipid hidroperoksit konsantrasyonu azalmaya başlar. Dekompozisyon fazı sırasında oluşan kimyasal reaksiyonlar karışıktır (17).

II. LDL OKSİDASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

1- İntrinsik Faktörler

a- Substratın niteliği : LDL oksidasyonunda substratın niteliği oksidasyona duyarlılığı tayin eden



önemli bir etkidir. Başlıca substratlar çoklu doymamış yağ asitleri ve kolesteroldür. LDL'de başlıca linoleik asit olmak üzere bol miktarda çoklu doymamış yağ asiti bulunur (18). LDL'nin içerdiği yağ asitlerinin bileşimi önemlidir. Tavşan ve insanlarda yapılan çalışmalarda LDL'nin oleik asit içeriğinin artırılmasının oksidasyona duyarlılığı azalttığı saptanmıştır (19-21).

b- LDL'nin antioksidan içeriği : Tokoferolle, β -karoten, ubiquinol-10, lycopene ve probukol gibi antioksidanlar lipid peroksidasyonunun hızlı fazı başlamadan önce tüketilirler. Bu antioksidanların miktarlarının fazla olması oksidasyona direnci artırır, lag fazın uzamasını sağlar (18, 22, 23).

c- LDL partikül büyüklüğü : Küçük, yoğun LDL subfraksiyonları oksidasyona daha duyarlıdır (24-26). Obezite, trigliserid yüksekliği ve HDL-K'ün düşük olması küçük ve yoğun LDL varlığıyla beraberdir (27).

2- Ekstrinsik Faktörler

a- Hücresel prooksidan aktivitedeki potansiyel değişiklikler : Hücrelerin süperoksit anyonu salgılama yetenekleri veya makrofajların 15-lipooksijenaz ekspresyonundaki farklılıklar LDL oksidasyonunu etkiler (28).

b- Plazma ve hücre dışı sıvıdaki bazı metallerin (örn; selenyum, bakır, demir) konsantrasyonu veya bu metalleri bağlayan proteinlerin konsantrasyonu (29).

c- Plazma veya hücre dışı sıvıdaki antioksidanların konsantrasyonu : Özellikle ürik asit ve askorbik asit gibi antioksidanlar büyük öneme sahiptir (30).

d- HDL konsantrasyonu : HDL'nin lipid peroksidasyonu azalttığı belirtilmektedir, ancak mekanizma açık değildir (31).

e- LDL'nin intimada bulunma süresi: Lipoprotein (a) LDL'yi bağlayan glikoproteinler ve matriks proteinlerindeki değişiklikler, LDL veya matriks proteinlerinin non-enzimatik glikozilasyonu LDL'nin intimada bulunma süresini etkiler (1).

III. İN VİVO OKSİDE LDL VARLIĞINI GÖSTEREN BULGULAR

1- Epidemiyolojik kanıtlar : Besinlerle alınan antioksidan miktarı veya plazma antioksidan düzeyleri

ile koroner arter hastalığı gelişim riski arasında ters ilişki vardır. Bundan başka tekli doymamış yağ asiti tüketiminin fazla olduğu yerlerde koroner arter hastalığı daha az görülmektedir. Bu yağ asitleri oksidatif modifikasyona dirençlidirler (32-35).

2- İmmünohistokimyasal kanıtlar: Okside LDL'nin epitoplarına karşı oluşan antikorlarla yapılan çalışmalarda, hayvan ve insanlarda aterosklerotik lezyonlarda daha koyu boyanma olduğu; normal arterlerde bu durumun olmadığı bulunmuştur (36-38).

3- Aterosklerotik lezyonlardan elde edilen LDL'nin bir çok fizikokimyasal, immünojenik ve biyolojik özellikleri, in vitro şartlarda okside edilen LDL'ye benzerlik göstermektedir (39, 40).

4- Okside LDL immünojeniktir, insan ve hayvan serumlarında otoantikolar gösterilmiştir (41-44).

5- Aterosklerotik lezyonlarda okside LDL'nin epitoplarına spesifik immünglobulin G'ler gösterilmiştir (45).

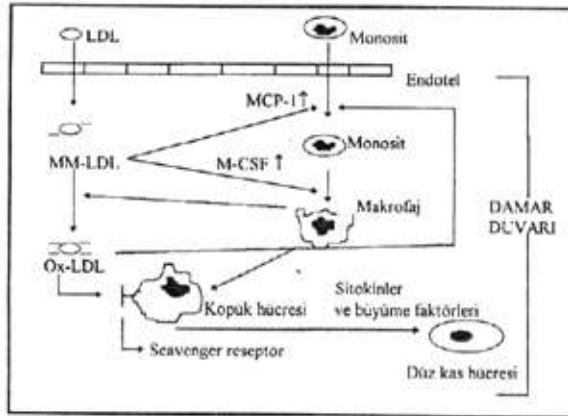
6- Az miktarda olmakla birlikte plazmada okside LDL partikülü saptanmıştır (36).

7- İn vitro deneylerde lipofilik antioksidanların LDL'yi oksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Diğer yandan hiperkolesterolemik tavşanlarla yapılan çalışmalarda antioksidanların verilmesiyle aterosklerotik plaklarda %30-70 oranında gerileme olduğu saptanmıştır (46-49).

IV. ATHEROSKLEROZDA OKSİDE LDL'İN OLASI ROLÜ

Ateroskleroza başlatan mekanizma kesin olarak bilinmemektedir. Zedelenmeye yanıt hipotezi günümüzde yaygın şekilde kabul edilmektedir (50,51). Zedelenmeye yol açan faktörler fiziksel (hipertansiyon), kimyasal (nikotin, LDL-K yüksekliği, okside LDL vs) veya dejeneratif değişiklikler olabilir. Lipid peroksidlerinin endotel hücrelerinde zedelenmeye yol açtığı saptanmıştır (52) (Şekil 2).

İntimaya giren LDL oksidan etkiye maruz kalınca oksidatif modifikasyonunun ilk basamaklarını geçirir ve çeşitli ürünler oluşur. Ancak oluşan bu form tam olarak modifiye olmamıştır; normal reseptörler tarafından alınır, scavenger reseptörlerce henüz tanınmaz. Buna minimal okside veya minimal modifiye LDL (MM-LDL) denir. MM-LDL in vitro olarak plazmanın uzun süre depolanmasıyla veya demirle inkübasyonla da oluşturulabilir (53). MM-



Şekil 2. Okside LDL'nin atherogenezdeki rolü. LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, MM-LDL: Minimal modifiye-LDL, Ox-LDL: Okside-LDL, M-CSF: Makrofaj-koloni uyarıcı faktör, MCP: Monosit kemotaktik protein.

LDL atherosklerozda önemli role sahiptir çünkü arter hücrelerinde gen ekspresyonunu etkileyen ürünlerin (makrofaj koloni uyarıcı faktör = M-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör = GM-CSF, granülosit koloni uyarıcı faktör = G-CSF) salınımına yol açar (54). Farelere in vivo olarak MM-LDL enjekte edildiğinde serum M-CSF düzeyinin 7-26 kat arttığı bulunmuştur (55). Ayrıca MM-LDL'nin aorta, endotel ve düz kas hücre kültürlerinde monosit-kemotaktik protein (MCP-1) sekresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (56,57). Farelere enjekte edilen MM-LDL, JE (MCP-1'in fare homoloğu) mRNA ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (55). MM-LDL, endotel hücrelerinin yüzeyindeki monosit-spesifik adherans moleküllerini de uyarır (58) ve böylece monosit kemoatraksiyonu için ek bir mekanizma daha işe karışır. Bu moleküller vasküler hücre adezyon molekülleri ve endotelial lökosit adezyon molekülleri (VCAMs ve ELAMs) dir.

M-CSF etkisiyle monositlerin makrofajlara dönüşümü indüklenir ve oluşan makrofajlar MM-LDL'nin Ox-LDL'ye dönüşümünü hızlandırır. Ox-LDL scavenger reseptörler aracılığıyla down regülasyona uğramaksızın makrofajlarca alınabilir ve böylece köpük hücreleri oluşur. Ox-LDL, MM-LDL gibi MCP-1 salınımına yol açarak monositler için kemotaktik etki gösterir (59). Yağlı çizgilerde bulunan hücrelerin yaklaşık %20'si T-lenfositlerdir. Ox-LDL T-lenfositler için de kemotaktiktir. Makrofajların migrasyonu okside LDL tarafından inhibe

edilir ve böylece bu hücrelerin arter duvarından çıkışı önlenir (60). Sonuçta arter duvarında patolojik boyutta kolesterol birikimi olur. Bu olay durumu daha da kötüleştirir, çünkü Ox-LDL çeşitli hücelere (örn; endotel hücresi) karşı sitotoksik etkiye sahiptir. Bu hücrelerin kan elemanlarıyla teması büyüme faktörlerinin olaya karışmasına yol açar ve bu da düz kas hücrelerinin migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olur ve böylece yağlı çizgiler daha kompleks lezyonlara döner (61). Ox-LDL makrofajlardan interlökin-1 salınımını uyarır (62). Interlökin-1 DKH proliferasyonuna ve lökositlerin endotele adhezyonuna yol açar (63). Ox-LDL doku faktörü (16) ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 sentezini indükleyerek (7) pıhtılaşma sistemini etkiler. Ayrıca okside LDL ürünleri tümör nekroz faktör ve trombositten türeyen gelişim faktörü gibi indüklenbilir genlerin ekspresyonunu bozabilir. MM-LDL yağlı çizgilerin oluşumuyla ilgili iken okside LDL ise progresyonda etkin gibi görünmektedir (53). LDL'nin oksidatif modifikasyonu sırasında çok sayıda farklı ürünler oluşur ve bunların her biri değişik biyolojik etkiler gösterebilir.

V. SONUÇ

Atherosklerotik kalp damar hastalıkları günümüzde ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Atherosklerozun oluşum mekanizmasının bilinmesi; bu olayın önlenmesi, risk altındakilerin saptanabilmesi, hastaların tanı ve takibinin yapılabilmesi açısından önemlidir. LDL-K düzeyi yüksekliğinin atheroskleroza yol açma mekanizmalarından biri olarak LDL'nin oksidasyona uğraması sorumlu tutulmaktadır. LDL'nin oksidasyona duyarlılığının atheroskleroz gelişim riskinin iyi bir göstergesi olduğu düşünülmektedir ve pek çok araştırmacı bu konuda uygun bir yöntem bulabilme arayışındadır. Antioksidan destek veya diyet yoluyla atherosklerozun önüne geçilebileceği / yavaşlatılabileceği çeşitli araştırmalarda saptanmıştır. Bu konudaki bilgilerin geliştirilmesiyle risk altındakilerin saptanması, dengeli beslenme ve çeşitli antioksidanların alınmasıyla atheroskleroz gelişiminin önlenmesi ve tedaviye katkı sağlanabilmesi mümkün olacaktır.



VI. KAYNAKLAR

1. Yla-Herttuala, S., Solakivi, T., Hirovonen, J., Laksonen, H., Mottonen, M., Pesonen, E., Raekallio, J., Akerblom, H.K., Nikkari, T. (1987) Glycosaminoglycans and apolipoproteins B and A-I in human aortas. Chemical and immunological analysis of lesion-free aortas from children and adults. *Arteriosclerosis* 7(4), 333-340.
2. Yla-Herttuala, S. (1991) Biochemistry of the arterial wall in developing atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 623, 40-59.
3. Esterbauer, H., Wag, G., Puhl, H. (1993) Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.* 49(3), 566-576.
4. Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1986) Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
5. Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 223-261.
6. Buja, L.M., Kita, T., Goldstein, J.L., Watanabe, Y., Brown, M.S. (1983) Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit: an animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 3, 87-101.
7. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., Brown, M.S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 333-337.
8. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.* 320, 915-924.
9. Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3883-3887.
10. Steinbrecher, U.P., Witztum, J.L., Parthasarathy, S., Steinberg, D. (1987) Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 7, 135-143.
11. Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Johl, D., Steinberg, D. (1986) Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 6, 505-510.
12. Yla-Herttuala, S. (1991) Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann. Med.* 23, 561-567.
13. Aviram, M. (1993) Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 98, 1-9.
14. Parthasarathy, S., Steinbrecher, U.P., Barnett, J., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1985) Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3000-3004.
15. Avagaro, P., Bon, G.B., Cazzolato, G. (1988) Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 8, 79-87.
16. Nagelkerke, J.F., Havekes, L., Van Hinsberg, V.W., Van Berkel, T.J. (1984) In vivo catabolism of biologically modified LDL. *Arteriosclerosis* 4, 256-264.
17. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Roheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* 6, 67-75.
18. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13, 341-390.
19. Parthasarathy, S., Khoo, J.C., Miller, E., Barnett, J., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1991) Low density lipoprotein enriched in oleic acid is protected against oxidative modification: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3894-3898.
20. Reaven, P., Parthasarathy, S., Grasse, B.J., Miller, E., Almazan, F., Mattson, F.H., Khoo, J.C., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1991) Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 54 (4), 701-706.
21. Thomas, M.J., Thronburg, T., Manning, J., Hooper, K., Rudel, L.L. (1994) Fatty acid composition of low-density lipoprotein influences its susceptibility to autoxidation. *Biochemistry* 33, 1828-1834.
22. Seccia, M., Albano, E., Bellomo, G. (1997) Suitability of chemical in vitro models to investigate LDL oxidation: study with different initiating conditions in native and α -tocopherol-supplemented LDL. *Clin. Chem.* 43(8), 1436-1441.
23. Princen, H.M.G., van Duyvenvoorde, W., Buytenhek, R., van der Laarse, A., van Poppel, G., Gevers Leuven, J.A., van Hinsbergh, V.W.M. (1995) Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation. *Arterioscler. Thromb.* 15, 325-333.
24. Austin, M.A., Horowitz, H., Wijsman, E., Krauss, R.M., Brunzell, J. (1992) Bimodality of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 92, 67-77.
25. Tribble, D.L., Holl, L.G., Wood, P.D., Krauss, R.M. (1992) Variations in oxidative susceptibility of LDL subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 93, 189-199.
26. Chait, A., Brazg, R.L., Tribble, D.L., Krauss, R.M. (1993) Susceptibility of small, dense low density li-

- poproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype pattern. *B. Am. J. Med.* 94, 350-356.
27. Austin, M.A., Brunzell, J.D., Fitch, W.L., Krauss, R.M. (1990) Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis* 10, 520-530.
 28. Heinecke, J.W., Rosen, H., Suzuki, L.A., Chait, A. (1987) The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262, 10098-10103.
 29. Yoshida, Y., Tsuchiya, J., Niki, E. (1994) Interaction of α -tocopherol with copper and its effect on lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1200, 85-92.
 30. Jialal, I., Vega, G.L., Grundy, S.M. (1991) Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 82, 185-191.
 31. Parthasarathy, S., Barnett, J., Fong, L.G. (1990) High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1044, 275-283.
 32. Gey, K.F., Puska, P. (1989) Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570, 268-282.
 33. Enstrom, J.E., Kanim, L.E., Klein, M.A. (1992) Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 3, 194-202.
 34. Kushi, L.H., Folsom, A.R., Prineas, R.J., Mink, P.J., Wu, Y., Bostick, R.M. (1996) Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N. Eng. J. Med.* 334, 1156-1162.
 35. Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in man. *N. Eng. J. Med.* 328, 1450-1456.
 36. Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., Steinberg, D. (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84, 1086-1095.
 37. Haberland, M.E., Fong, D., Cheng, L. (1988) Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 242, 215-218.
 38. Boyd, H.C., Gown, A.M., Wolfbauer, G., Chait, A. (1989) Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am. J. Pathol.* 135, 815-825.
 39. Jialal, I., Grundy, S.M. (1992) Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 669, 2327-2348.
 40. Hoff, H.F., O'Neil, J. (1991) Lesion-derived low density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein share a lability for aggregation, leading to enhanced macrophage degradation. *Arterioscler. Thromb.* 11, 1209-1222.
 41. Salonen, J.T., Yla-Herttuala, S., Yamamoto, R., Butler, S., Korpela, H., Salonen, R., Nyyssonen, K., Palinski, W., Witztum, J.L. (1992) Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 339, 883-887.
 42. Palinski, W., Yla-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Butler, S.W., Socher, S.A., Parthasarathy, S., Curtiss, L.K., Witztum, J.L. (1990) Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during the oxidative modification of low density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 10 (3), 325-335.
 43. Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (4), 1372-1376.
 44. Seccia, M., Albano, E., Maggi, E., Bellamo, G. (1997) Circulating autoantibodies recognizing peroxidase-oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 134-140.
 45. Yla-Herttuala, S., Butler, S., Picard, S., Palinski, W., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1991) Rabbit and human atherosclerotic lesions contain Ig G that recognizes MDA-LDL and copper-oxidized LDL. *Arteriosclerosis* 11, 1426.
 46. Kita, T., Nagano, Y., Yokode, M., Ishii, K., Kume, N., Ooshima, A., Yoshida, H., Kawai, C. (1987) Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (16), 5928-5931.
 47. Daugherty, A., Zwerfel, B.S., Schonfeld, G. (1989) Probucol attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 98, 612-618.
 48. Bjorkhem, I., Henrikson-Freyschuss, A., Breuer, O., Diczfalusy, U., Berglund, L., Henriksson, P. (1991) The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arterio. Thromb.* 11 (1), 15-22.
 49. Sparrow, C.P., Doebber, T.W., Olszewski, J., Wu, M.S., Ventre, J., Stevens, K.A., Chao, Y.S. (1992) Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-dephenyl - phenylene - diamine. *J. Clin. Invest.* 89 (6), 1885-1891.
 50. Steinberg, D., Witztum, J.L. (1990) Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *J. Am. Med. Assoc.* 264, 3047-3052.
 51. Morin, R.J., Peng, S. (1989) The role of cholesterol oxidation products in the pathogenesis of atherosclerosis. *An. Clin. Lab. Sci.* 19(4), 225-237.

52. Halliwell, B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Path.* 78, 737-757.
53. Berliner, J.A., Territo, M.C., Sevanian, A., Ramin, S., Kim, J.A., Bamshad, B., Esterson, M., Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* 85(4), 1260-1266.
54. Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 344 (6263), 254-257.
55. Liao, F., Berliner, J.A., Mehrabian, M., Navab, M., Demer, L.L., Lusis, A.J., Fogelman, A.M., (1991) Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J. Clin. Invest.* 87(6), 2253-2257.
56. Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 91(9), 2488-2496.
57. Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(13), 5134-5138.
58. Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A. Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251, 788-791.
59. Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D. (1987) Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte / macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2995-2999.
60. Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Steinberg, D. (1985) Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5949-5953.
61. Witztum, J.L. (1993) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart. J.* 69, 12-18.
62. Thomas, C.E., Jackson, R.L., Ohlweiler, D.F., Ku, J. (1994) Multiple lipid oxidation products in LDL induce interleukin-1 β release from human blood mononuclear cells. *J. Lipid Res.* 35, 417-427.
63. Libby, P., Hansson, G.K. (1991) Involvement of the human immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab. Invest.* 64, 5-15.