



Perkembangan Kandidat Antigen untuk Vaksinasi Aterosklerosis

Makhyan Jibril Al-Farabi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Indonesia

ABSTRAK

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit kardiovaskular yang menjadi masalah besar di dunia. Aterosklerosis terjadi akibat penumpukan sel *foam* akibat proses inflamasi kronis dan *uptake* dari OxLDL dan PC. Hingga saat ini, terapi untuk aterosklerosis kebanyakan berupa obat-obat yang bekerja menghambat progresivitas plak aterosklerosis. Penemuan terkini menunjukkan bahwa regulasi sel imun baik adaptif maupun *innate* yang tepat terbukti memiliki hubungan dengan pencegahan lesi aterosklerosis. Di masa depan, terdapat peluang besar untuk dikembangkannya vaksinasi sebagai salah satu pencegahan aterosklerosis mengingat sudah cukup banyak penelitian yang telah membuktikan efek ateroprotektif vaksinasi dengan beberapa jenis antigen. Pada tinjauan pustaka ini akan dibahas jenis antigen yang dapat berperan untuk vaksinasi aterosklerosis dan tantangan pengembangannya di masa yang akan datang.

Kata kunci: Antigen, aterosklerosis, OxLDL, pencegahan, vaksinasi.

ABSTRACT

Atherosclerosis is one of major cardiovascular problem in the world. Atherosclerosis occurs due to accumulation of foam cells due to a chronic inflammatory process and uptake of OxLDL and PC. Up until now, the only treatment for atherosclerosis was drugs to inhibit the progression of atherosclerotic plaque. Recent discoveries show that regulation of both adaptive and innate immune cells can prevent atherosclerosis progression. In the future, atherosclerosis vaccine held great opportunity as many researches show ateroprotective effect of vaccination using several types of antigen. This literature review will discuss types of antigens that can be used for atherosclerosis vaccination and future challenges. **Makhyan Jibril Al-Farabi. The Development of Candidate Antigens for Vaccination Atherosclerosis.**

Keywords: Antigen, atherosclerosis, OxLDL, prevention, vaccination.

LATAR BELAKANG

Aterosklerosis merupakan salah satu penyakit kardiovaskular yang menjadi masalah terbesar bagi negara maju dan negara berkembang. Menurut WHO, tahun 2005 penyakit kardiovaskular merupakan penyebab kematian terbesar di dunia. Hasil Survei Kesehatan Nasional tahun 2007 (Riskesdas) menunjukkan penyakit kardiovaskular menempati peringkat pertama penyakit tidak menular di Indonesia.¹

Aterosklerosis merupakan inflamasi kronik terhadap deposisi kolesterol pada dinding pembuluh darah. Oksidasi kolesterol jenis *low density lipoprotein* (LDL) memegang peranan penting dalam proses pembentukan plak aterosklerosis. LDL yang telah teroksidasi (OxLDL) akan mengekspresikan *phosphorylcholine* (PC) yang akan di-*uptake* oleh makrofag di dalam subendotel dan menjadi sel *foam*. Sel *foam* dapat

mensekresikan sitokin proinflamasi, faktor pertumbuhan, dan menginduksi kematian sel. Selanjutnya plak aterosklerosis akan terus berkembang menjadi lesi yang progresif karena proses inflamasi.²

Hingga saat ini, terapi untuk aterosklerosis meliputi obat-obat yang bekerja menghambat progresivitas plak aterosklerosis yang telah ada, bukan mencegah pembentukannya.³ Aterosklerosis merupakan "*silent killer*" dan manifestasinya baru muncul ketika telah terjadi komplikasi. Oleh karena itu, tindakan preventif seperti pola hidup sehat, antioksidan, dan vitamin, penting dalam pencegahan aterosklerosis.⁴ Namun, tindakan preventif sering terlambat dan sulit dipatuhi masyarakat.

Sistem kekebalan tubuh yakni kekebalan *innate* dan kekebalan adaptif, keduanya berperan dalam proses aterosklerosis. Kekebalan

innate bereaksi cepat untuk mengetahui PAMP (*pathogen associated microbial pattern*) seperti lipopolisakarida bakteri gram negatif.⁵ Kekebalan *innate* meliputi makrofag, sel NK, sel *mast*, komplemen, berbagai macam sitokin dan kemokin. Kekebalan adaptif bereaksi lebih lambat dengan mengenali *epitope* spesifik dari antigen. Komponen selulernya meliputi sel B dan sel T, sel T sitotoksik, dan kemokin sebagai efekturnya. Regulasi sel imun baik adaptif maupun *innate* yang tepat terbukti memiliki hubungan dengan pencegahan lesi aterosklerosis. Beberapa penelitian telah membuktikan potensi vaksin untuk aterosklerosis menggunakan beberapa jenis antigen tertentu. Pada tinjauan ini akan dibahas potensi masing-masing antigen kandidat vaksin aterosklerosis dan tantangan di masa depan.

ATEROSKLEROSIS

Patogenesis aterosklerosis diawali oleh



Tabel 1. Ringkasan penelitian vaksinasi aktif dengan LDL untuk pencegahan aterosklerosis (dimodifikasi dari Shah, *et al.*³³)

Hewan Coba	Antigen	Proses Vaksinasi	Efek pada Aterosklerosis	
Kelinci LDLR ^{-/-}	MDA-LDL	Subkutan	Menurun (Aorta)	24
Kelinci NZW dengan diet kolesterol tinggi	LDL <i>native</i> / MDA-LDL	Subkutan	Menurun (Aorta)	25
Mencit LDLR ^{-/-}	LDL <i>native</i> / MDA-LDL	Subkutan	Menurun (Sinus Aorta)	26
Mencit ApoE ^{-/-}	MDA-LDL	Subkutan	Menurun (Sinus Aorta)	27
Mencit ApoE ^{-/-}	MDA-LDL/Plak	Injeksi Kaki	Menurun (Sinus Aorta)	28
Mencit ApoE ^{-/-}	LDL <i>native</i>	Subkutan	Menurun (Sinus Aorta)	29
Mencit ApoE ^{-/-} atau apoE/CD4 <i>double knockout</i>	MDA-LDL	Subkutan	Menurun (Sinus Aorta)	30
Mencit LDLR ^{-/-}	Cuox-LDL	Intravena	Menurun (Sinus Karotis)	31
Mencit ApoE ^{-/-}	Cuox-LDL	Nasal	Menurun (Sinus Aorta & Aorta)	32

Keterangan: Apo (apolipoprotein); Cuox (*copper-oxidized*); LDL (*low-density lipoprotein*); LDLR (*low-density lipoprotein receptor*); MDA (*malondialdehyde*); NZW (*New Zealand white*); OxLDL (*oxidatively-modified low-density lipoprotein*).

disfungsi endotel dan oksidasi lipoprotein jenis LDL (*low density lipoprotein*). Oksidasi LDL akan menyebabkan LDL mengalami proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid ini berawal dari modifikasi *polyunsaturated fatty acids* (PUFA), bagian dari fosfolipid LDL, menjadi *lipid hydroperoxide*. *Lipid hydroperoxide* ini mengalami degradasi menjadi *malondialdehyde* (MDA) dan *1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-3-phosphorylcholine* (POVPC), lebih dikenal sebagai PC (*phosphorylcholine*). PC dapat membentuk *epitope* pada OxLDL yang dapat dikenali oleh *scavenger receptors* (SR) makrofag dan sel-sel imun lainnya.⁶

Disfungsi endotel akan meningkatkan ekspresi kemokin yang dapat menstimulasi migrasi sel-sel monosit dan leukosit ke intima. Selanjutnya, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag.⁷ OxLDL akan mengalami *uptake* oleh makrofag dan dimetabolisme hingga terbentuk sel *foam*. Selain itu, sel juga akan mensekresikan *growth factor* yang akan memicu migrasi dan proliferasi *fibroblast* dan sel otot polos di dalam tunika media pembuluh darah. Keseluruhan proses tersebut dapat menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah aterosklerosis.^{8,9}

Telah diketahui sebelumnya bahwa pada patofisiologi aterosklerosis terjadi inflamasi akibat antigen dan sel imun. Oleh karena itu, pendekatan terapi untuk meregulasi sel imun dan antigen memiliki potensi besar, antara lain melalui modulasi respons imun pro-inflamatorik dengan vaksinasi sebelum memperberat plak. Salah satu tantangan dalam pengembangan vaksin ini adalah identifikasi antigen spesifik yang tepat dan relevan pada proses pembentukan plak aterosklerosis.

PROSES IMUN PADA ATEROSKLEROSIS Kekebalan *Innate*

Kekebalan *innate* mencerminkan respons langsung nonspesifik pada patogen dan sinyal bahaya lainnya. Sel dendritik dan makrofag akan berperan sebagai penjaga dan responden pertama terhadap molekul yang berbahaya, seperti *Oxidatively modified low-density lipoprotein* (OxLDL). OxLDL mampu mempengaruhi dinding pembuluh darah melalui interaksinya dengan *Toll-like receptor* yang menyebabkan aktivasi gen pemicu inflamasi akut yang pada akhirnya memicu terlepasnya sitokin pro-inflamasi yang memperberat aterosklerosis.¹⁰

Makrofag sebagai sel imun *innate* telah dibuktikan berperan proaterogenik, Rajavashisth, *et al.*¹¹ telah membuktikan bahwa delesi gen M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*-berfungsi untuk maturasi dan proliferasi makrofag) pada mencit dapat mengurangi terjadinya aterosklerosis secara bermakna meskipun mencit telah dipapar hiperkolesterolemia berat.

Sel *natural killer* (NK) merupakan sel imun yang juga berkontribusi dalam pembentukan lesi aterosklerosis. Penelitian membuktikan bahwa penurunan sel NK pada tikus apoE^{-/-} dengan menggunakan antibodi anti-asialo-GM1 mampu menurunkan terjadinya aterosklerosis. Proses pro-aterosklerosis yang disebabkan sel NK diduga akibat mediator seperti perforin dan granzim B.¹² Sel *mast* juga berperan dalam proses lesi aterosklerotik, mencit dalam kondisi hiperkolesterolemia dengan penurunan sel *mast* mengalami penurunan pembentukan lesi aterosklerosis.¹³

Kekebalan *Adaptif*

Kekebalan adaptif juga berperan dalam

proses aterosklerosis. Sel B memiliki peran protektif melawan aterosklerosis pada tikus hiperkolesterolemia.¹⁴ Penelitian Shaw, *et al.*¹⁵ menunjukkan bahwa antibodi alami imunoglobulin (Ig) M reaktif terhadap *phosphorylcholine* dari OxLDL dan sel yang apoptosis; *natural antibody* mampu menurunkan progresivitas aterosklerosis. Schenkein, *et al.*¹⁷ juga menunjukkan bahwa antibodi *natural* yang dihasilkan oleh sel B merupakan *inhibitor* yang efektif dalam proses pembentukan plak aterosklerosis. Peran antibodi *natural* antara lain: pertama, dapat mengikat fosfolipid yang teroksidasi pada OxLDL dengan mengenali *epitope*-nya (PC) dan menetralkan sitokin pro-inflamasi. Kedua, menghambat *uptake* OxLDL oleh makrofag sehingga menghambat pembentukan sel *foam*.

Antibodi IgM diproduksi oleh sel B1, hal ini juga menjelaskan peran sel B dalam menghambat atherogenesis.¹⁷ Namun, penelitian lain menunjukkan hal berbeda, depleksi sel B menggunakan antibodi anti-CD20 justru mengurangi aterosklerosis.¹⁸ Dengan demikian, sel B diduga memiliki berbagai peran, sel B1 bersifat ateroprotektif, sedangkan sel B2 memiliki efek pro-aterogenik.

Pemberian beberapa dosis infus antibodi monoklonal anti-OxLDL (MLDL1278A, alias BI-204) pada 2 penelitian multisenter, acak, buta-ganda, dengan kontrol plasebo, pada pasien dengan lesi aterosklerotik stabil menunjukkan kegagalan dalam proses penurunan inflamasi yang ditunjukkan dengan kadar 18F *2-deoxyglucose* tomografi PET.¹⁹ Plak aterosklerosis manusia mengandung makrofag dan DC, keduanya dapat berfungsi sebagai sel antigen (APC), serta sel-sel T yang menunjukkan aktivasi APC.²⁰ Peran pro-aterogenik sel CD4⁺ diduga karena efek pro-inflamasi berlebihan dari respons sitokin Th1, terutama sekresi interferon- γ .²¹ Sebaliknya, penelitian lain justru menunjukkan adanya sitokin yang diekspresikan oleh Th2, yakni IL-10, yang bersifat protektif terhadap aterosklerosis.²²

PERKEMBANGAN KANDIDAT ANTIGEN UNTUK VAKSINASI ATEROSKLEROSIS

Vaksinasi Berbasis Antigen Endogen Vaksinasi Berbasis LDL dan apoB-100

LDL dan lipoprotein lain yang mengandung apoB-100 merupakan faktor yang paling



berperan dalam proses pembentukan plak aterosklerosis. LDL dan lipoprotein lain yang mengandung apoB-100 juga terbukti mampu menjadi antigen.²³ Oleh karena itu, antigen yang diturunkan dari mereka menjadi kandidat utama dalam pengembangan vaksinasi aterosklerosis.

Selama ini, vaksinasi hewan coba dengan antigen MDA-LDL, LDL baik *native* maupun OxLDL yang diformulasikan sebagai vaksin secara konsisten menunjukkan efek ateroprotektif (Tabel 1).

LDL merupakan molekul heterogen besar yang mengandung muatan beragam apolipoprotein, kolesterol ester, trigliserida, dan fosfolipid. Banyaknya kandungan dalam LDL mengakibatkan penggunaan seluruh LDL homolog sebagai antigen dalam formulasi vaksin kurang efektif. Kompleksitas LDL menyulitkan penentuan epitop imunogenik yang tepat dalam LDL. Oleh karena itu, penelitian difokuskan untuk menemukan epitop paling antigenik di dalam apoB-100 sebagai komponen protein terbesar LDL. Setelah skrining pada 4536- asam amino pada protein apoB-100 dengan 302 peptida ditemukan adanya 102 peptida yang memicu respons imun.²³ Penelitian lain menunjukkan bahwa terdapat peptida p2, p143, dan P210 yang mampu mengakibatkan penurunan 40% sampai 70% progresivitas aterosklerosis saat digunakan sebagai formulasi vaksin pada tikus hiperkolesterolemia.³⁴

Penelitian di Amerika Serikat dan Swedia telah menggunakan P210 sebagai antigen dalam formulasi vaksin prototipe aterosklerosis dan berhasil memiliki efek ateroprotektif yang konsisten.³⁵ Mekanisme P210 dalam menghambat progresivitas aterosklerosis diduga akibat adanya aktivasi sel CD8⁺ yang diikuti dengan penurunan sel dendritik pada lokasi vaksinasi dan plak aterosklerosis. Modulasi sel dendritik oleh vaksin p210 diduga spesifik pada antigen tertentu karena sel efektor CD8⁺ memiliki efek sitotoksik yang tinggi terhadap sel dendritik dengan p210 secara *in vitro*. Modulasi sel dendritik dan respons imun seluler tersebut tidak mengganggu fungsi sel T terhadap antigen lain yang irelevan.³⁶

Vaksinasi dengan P210 berkorelasi dengan respons sel CD4⁺CD25⁺; vaksinasi akan

meningkatkan respons sel CD4⁺CD25⁺ dan menurunkan progresivitas aterosklerosis. Pemberian antibodi terhadap CD25 menurunkan sel CD4⁺CD25⁺ sehingga efek ateroprotektif vaksinasi P210 berkurang.³⁷

Penelitian Klingenberg³⁵ menunjukkan bahwa mencit betina apoE^{-/-} yang divaksinasi protein rekombinan p210 yang difusi dengan CTB (*Cholera Toxin B Subunit*) secara intramukosa mampu menurunkan aterosklerosis sinus aorta. Selain itu, ditemukan bahwa sel CD4⁺ di limpa mencit yang divaksinasi dengan P210-CTB memiliki kadar IL10⁺ lebih tinggi. Herbin, *et al*,³⁸ membuktikan bahwa pemberian pompa miniosmotik yang mampu secara subkutan menginjeksikan peptida campuran dari apoB-100 (p210, MDA-P210, dan P240) dan P210 saja selama dua minggu mampu menurunkan besar lesi aterosklerotik setelah 10 minggu pasca-terapi dibandingkan kontrol. Injeksi subkutan diduga berkorelasi dengan penurunan aktivasi sel T CD4⁺ dan peningkatan sel CD⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada limfonodi.

Vaksinasi menggunakan MDA-LDL juga mampu bersifat ateroprotektif; hal tersebut karena *uptake* MDA-LDL oleh makrofag akan mengakibatkan terbentuknya sel *foam*, sehingga antibodi terhadap MDA-LDL akan menghambat *uptake* MDA-LDL dan mencegah terbentuknya sel *foam* dan penebalan dinding pembuluh darah.³⁹ Salah satu penelitian menunjukkan bahwa peptida apoB-100 dengan asam amino residu 688-707 yang dimasukkan ke dalam sebuah konstruksi multiantigenik dengan epitop peptida *Chlamydomydia pneumonia* dan protein *heat shock* (HSP)60 terbukti mampu mengurangi aterosklerosis disertai penurunan infiltrasi makrofag dan peningkatan sel T di CD4⁺FoxP3 pada plak aterosklerosis.⁴⁰ Penelitian lain⁴¹ menemukan bahwa fragmen peptida dari apoB-100 yang diprediksi dengan algoritma mampu berikatan dengan molekul MHC-II mencit adalah ApoB₃₅₀₁₋₃₅₁₆ dan ApoB₉₇₈₋₉₉₃ yang juga dibuktikan mampu menurunkan progresivitas aterosklerosis saat digunakan untuk vaksinasi mencit ApoE^{-/-}; mekanismenya diduga *dependent* terhadap IL-10.

Vaksinasi Berbasis *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP)

Pada kelinci, vaksinasi menggunakan *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), salah

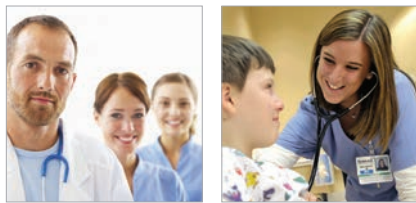
satu enzim yang berperan dalam metabolisme HDL terbukti mampu meningkatkan produksi HDL-C dengan penurunan aterosklerosis.⁴² Meskipun demikian, penelitian fase 1 pada manusia tidak menunjukkan adanya perubahan CETP ataupun HDL pasca-vaksinasi CETP.⁴³

Vaksinasi Berbasis *Heat Shock Protein*

Heat shock protein merupakan stres protein yang dimiliki oleh sebagian besar organisme dan mengalami peningkatan ekspresi saat sel terpapar kondisi stres seperti perubahan pH dan penurunan oksigen. HSP juga dibuktikan berperan dalam patofisiologi aterosklerosis.⁴⁴ Meskipun demikian, efek vaksinasi menggunakan HSP masih inkonsisten. Beberapa penelitian melaporkan adanya peningkatan lesi aterosklerosis pasca-vaksinasi HSP65,⁴⁵ sedangkan penelitian lain menunjukkan vaksinasi HSP 65 menurunkan lesi aterosklerosis.⁴⁶ Perbedaan tersebut diduga karena perbedaan jenis adjuvan dan metode pemberian vaksin. Diduga apabila HSP digabungkan dengan *Freund's adjuvant* justru akan meningkatkan lesi aterosklerosis akibat inflamasi berlebihan. Sedangkan kombinasi HSP dengan alum justru menurunkan aktivitas sel B yakni penurunan IgG1 untuk HSP65, IgG untuk OxLDL, dan penurunan lesi aterosklerosis.⁴⁷ Penelitian lain menggunakan DNA ataupun protein HSP65 intranasal mampu menurunkan respons IgG dari HSP65, meningkatkan IL-10, menurunkan IFN γ , menurunkan kolesterol dan progresivitas aterosklerosis.⁴⁶

Vaksin terhadap Matriks Ekstraseluler (ECM)

Keterlibatan sel-sel inflamasi tertentu dalam pembentukan plak aterosklerosis menunjukkan bahwa *marker* seluler dari permukaan sel juga berpotensi untuk dikembangkan dalam vaksinasi aterosklerosis. Vaksinasi ECM yang dibuktikan berhasil pada hewan coba yakni vaksin dengan antigen VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2*)⁴⁸ dan C99⁴⁹ yang dibawa oleh *live attenuated Salmonella typhimurium*. Vaksin tersebut mampu meningkatkan respons sel CD8⁺ sitolitik yang mentarget VEGFR2 dan CD99, sehingga mampu menurunkan aterosklerosis. Vaksinasi tersebut diberikan secara oral dan dibuktikan mampu mentransfer materi genetik dari karier kepada *host* melalui saluran cerna. Materi genetik akan ditangkap



oleh fagosit dan diekspresikan secara *de novo* pada sitosol dan dipresentasikan pada MHC.

LDL mengalami retensi berkepanjangan pada dinding sel arteri melalui ECM sebagai lesi awal aterosklerosis. Salah satu ECM yang sering ditemukan adalah fibronektin. Vaksinasi menggunakan fibronektin yang diformulasikan dengan alum terbukti mampu menurunkan progresivitas aterosklerosis pada mencit ApoE^{-/-}, peningkatan sel Trg dan antibodi Th2-type dengan diikuti penurunan kolesterol total pada mencit.³¹

Vaksin Sel Dendritik

Sel dendritik merupakan salah satu sel APC yang paling efektif, *antigen delivery* menggunakan sel DC akan menghasilkan respons imun yang efisien. Habets, *et al*,⁵⁰ menunjukkan bahwa penggunaan OxLDL dengan LPS untuk faktor maturasi secara intravena terbukti mampu meningkatkan titer IgG OxLDL dan menurunkan aterosklerosis. Hermantsson, *et al*,⁵¹ menggunakan apoB-100 sebagai antigen pada DC, DC juga diberi LPS dan ditambah dengan IL10 untuk fenotip tolerogenik dan diinjeksikan intravena. Vaksin tersebut terbukti menurunkan proses aterosklerosis diikuti dengan peningkatan sel CD4⁺IL-10⁺, peningkatan RNA FOxP pada limpa, dan penurunan proliferasi limfosit. Hal ini menunjukkan adanya respons imunoregulasi terhadap vaksinasi.

Meskipun demikian, terdapat variasi efektivitas vaksinasi dengan stimulasi DC. Vaksinasi MDA-LDL yang diemulsifikasi dengan CFA mampu menurunkan aterosklerosis dan menginduksi CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells.⁵¹ Sedangkan sel DC yang diberi MDA-LDL tanpa CFA tidak mengalami penurunan aterosklerosis.⁵¹ Hal ini menunjukkan bahwa formulasi vaksin terhadap DC sangat mempengaruhi hasil.⁵¹

Vaksinasi Berbasis Antigen Eksogen

Vaksinasi Berbasis Antigen Phosphorylcholine

Salah satu yang berkembang adalah penggunaan PC (*Phosphorylcholine*). Vaksinasi dengan PC terbukti mampu menghambat *uptake* OxLDL dan apoptosis sel oleh makrofag.⁵² Penelitian lain⁵³ menunjukkan bahwa vaksinasi PC-keyhole limpet hemocyanin yang dicoupling dengan CpG pada mencit apoE^{-/-} secara intraperitoneal mampu

meningkatkan IgG dan IgM terhadap PC dan OxLDL diikuti dengan penurunan *uptake* OxLDL dari makrofag dan penurunan progresivitas aterosklerosis.⁵⁴

Selain penggunaan PC secara langsung, penggunaan antigen yang memiliki *molecular mimicry* dengan PC juga cukup sering dikembangkan. Hal ini didasari karena selama ini banyak antigen asing, termasuk bakteri seperti *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, dan virus seperti virus hepatitis C, enterovirus, HIV, dan *cytomegalovirus*, dan telah diidentifikasi di plak aterosklerotik.⁵⁵ Sampai sejauh ini, masih belum jelas apakah patogen tersebut berperan dalam proses patogenesis aterosklerosis, atau mengakibatkan kondisi inflamasi melalui *molecular mimicry*, sehingga mengakibatkan dinding arteri lebih rentan terhadap pembentukan plak aterosklerosis.

Salah satu antigen yang diduga memiliki *molecular mimicry* dengan PC dan berperan dalam proses aterosklerosis, yakni *Pseudomonas gingivalis*. Paparan *P. gingivalis* pada hewan coba terbukti mempercepat terjadinya aterosklerosis.⁵⁶ Vaksinasi terhadap *P. gingivalis* terbukti menghambat proses aterosklerosis yang diinduksi *P. gingivalis*.⁵⁸ Meskipun demikian, manfaat vaksin tersebut pada manusia masih dalam perdebatan.

Vaksinasi lain menggunakan antigen yang memiliki *molecular mimicry* dengan PC adalah vaksinasi menggunakan *heat-killed Salmonella typhimurium*. *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri batang gram negatif yang cukup pendek dengan panjang 1 – 1,5 mikrometer. Bakteri ini menyebabkan gastroenteritis dan demam tifoid melalui penularan makanan atau per oral.⁵⁸ Bakteri tersebut mengekspresikan *phosphorylcholine* (PC) pada dinding selnya yang terbukti dapat meningkatkan respons imun humoral. *S. typhimurium* mampu menginduksi sel B-1 yang banyak diekspresikan pada rongga peritoneal untuk memproduksi antibodi IgM-anti-PC, IgG, IgA-anti-PC.⁵⁹ Diduga terdapat *molecular mimicry* antara PC dinding sel *Salmonella typhimurium* dan PC yang diekspresikan OxLDL yang dapat dikenali oleh SR pada makrofag dan sel-sel imun lainnya.⁶⁰

Vaksinasi menggunakan *Streptococcus pneumoniae* pada mencit LDLR^{-/-} juga terbukti

mampu meningkatkan kadar anti-PC yang juga meningkatkan IgM anti-OxLDL diikuti dengan penurunan progresivitas aterosklerosis.⁶¹ Peningkatan IgM anti-OxLDL diduga akibat adanya *molecular mimicry* dari OxLDL dengan *S. Pneumonia*, sehingga terjadi krosreaktivitas dari antibodi anti-PC *S. pneumoniae* dengan PC pada OxLDL. Meskipun demikian, penelitian kohort pada manusia belum menunjukkan adanya efek protektif yang konsisten dari vaksinasi *pneumococcus* dengan kejadian infark miokard.⁶¹

Pada dasarnya, mekanisme vaksinasi berbasis *molecular mimicry* dengan PC dimulai dari kemampuan vaksin yang memicu terbentuknya antibodi anti-PC. Antibodi anti-PC tersebut mampu mengalami kros reaksi dengan PC lain, yakni PC yang diekspresikan pada OxLDL. Hal ini mengakibatkan antibodi anti-PC mengikat OxLDL sehingga *uptake* OxLDL oleh makrofag dapat dicegah. Kompleks imun antara anti-PC dan PC di OxLDL juga akan menghambat adhesi OxLDL pada endotel pembuluh darah, sehingga mengurangi jumlah OxLDL yang berada di dalam intima.⁶²

TANTANGAN DALAM PERKEMBANGAN VAKSINASI ATEROSKLEROSIS

Metode Vaksinasi dan Adjuvan yang Digunakan

Respons imun terhadap antigen ditentukan tidak hanya oleh jenis antigen (protein, lipid, atau karbohidrat antigen), tetapi juga oleh teknik administrasinya (subkutan vs intramuskuler vs mukosa) dan pilihan adjuvan. Faktor tersebut dapat mempengaruhi proses presentasi antigen, dan induksi sitokin imunomodulator. Adjuvan yang sering dipakai, yakni Alum *salt* garam dan CFA. Gel g mengandung garam aluminium sebagai adjuvan telah disetujui untuk digunakan dalam vaksin di Amerika Serikat. Beberapa jenis adjuvan baru sedang dalam uji pra-klinis dan klinis, termasuk liposom, kompleks imunostimulan, sekuen DNA yang mengandung *unmethylated* motif CpG, dan mikrosfer polimer *biodegradable*.⁶³ Masih perlu diteliti mekanisme dari setiap kandidat antigen vaksin aterosklerosis dengan kombinasinya dengan berbagai adjuvan dan teknik administrasi.

Saat Vaksinasi

Saat yang tepat untuk vaksinasi merupakan



masalah penting untuk dipertimbangkan jika vaksin sudah dipakai. Sebagian besar penelitian eksperimental vaksinasi dengan antigen LDL atau OxLDL teroksidasi telah menunjukkan pencegahan lesi aterosklerotik awal yang signifikan jika digunakan sebelum lesi aterosklerosis berkembang. Hal ini menunjukkan akan lebih baik diberikan sebelum terjadi aterosklerosis. Meskipun demikian, masih belum jelas apakah vaksinasi masih efektif dan perlu dilakukan di usia dewasa atau bahkan ketika plak sudah terlanjur terbentuk, sebagai prevensi sekunder. Secara teori, target ideal pemberian vaksin aterosklerosis ini adalah anak usia 5-15 tahun berdasarkan mulai terbentuknya akumulasi lemak yang disebut *fatty streak* pada pembuluh darah pada rentang usia tersebut.⁶⁴ Selain itu, pada anak usia 5-15 tahun, respons imun tubuh baik respons imun seluler maupun humoral sedang berkembang. Pemberian vaksin aterosklerosis diharapkan dapat menginduksi respons imun yang memiliki efek atero-protektif.⁶⁵

Efektivitas

Evaluasi aktivitas atero-protektif vaksinasi secara klinis pada manusia juga sulit. Aterosklerosis merupakan penyakit kronis, sehingga untuk evaluasinya perlu durasi waktu sangat panjang. Tahapan uji klinis

pertama efikasi vaksinasi akan bergantung pada penilaian ketebalan plak aterosklerosis atau komposisinya menggunakan modalitas pencitraan baik non-invasif maupun invasif. Apabila telah terbukti berhasil selanjutnya dilakukan evaluasi efektivitas vaksinasi dalam mengurangi kejadian infark miokard.⁶³

Efek Samping Vaksinasi

Vaksin memiliki dampak sangat besar dalam pemberantasan berbagai penyakit menular. Oleh karena itu, pengembangan vaksinasi untuk penyakit kronis dan prevalensi tinggi seperti aterosklerosis memiliki potensi yang sangat besar.

Meskipun demikian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai berbagai hal, salah satunya adalah keamanan vaksin. Efek samping yang mungkin terjadi karena pemberian vaksinasi aterosklerosis antara lain adalah demam setelah pemberian vaksin. Selain itu, sering terjadi pembengkakan di tempat injeksi. Berdasarkan studi epidemiologi terdapat hubungan antara pemberian vaksin secara umum dan penyakit-penyakit kronis pada anak, seperti asma, *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), diabetes, gangguan perkembangan otak, dan perilaku termasuk autisme.⁶⁶ Berdasarkan data NHANES *cohort of children* tahun 2006,

penyakit-penyakit tersebut terjadi pada satu dari empat anak di Amerika. Meskipun demikian, masih dibutuhkan penelitian untuk membuktikan bahwa penyakit-penyakit tersebut benar-benar merupakan efek samping vaksin tanpa terpengaruh faktor lain seperti lingkungan dan genetik.²⁸ Salah satu model vaksinasi non-penyakit infeksi, yakni vaksinasi β -amiloid peptida, meskipun terbukti mengurangi neurotoksisitas yang dipicu β -amiloid peptida pada mencit model Alzheimer, saat uji klinis terbukti justru mengakibatkan meningoensefalitis.⁶⁷

SIMPULAN

Vaksinasi aterosklerosis memiliki banyak potensi dan memiliki banyak kandidat antigen, meliputi antigen endogen (LDL, MDA-LDL, ApoE100, OxLDL, CETP, HSP, ECM) ataupun antigen eksogen (PC dan molekul mimikri dengan PC dari *Pseudomonas gingivalis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*) dengan efektivitas bervariasi. Meskipun demikian, masih banyak tantangan, meliputi: 1. saat vaksinasi, apakah saat kecil atau dewasa, atau keduanya; 2. Antigen, adjuvan yang paling cocok dan rute administrasi yang paling tepat; 3. Evaluasi manfaat atero-protektif jangka pendek dan panjang menggunakan teknik yang tepat; 4. Keamanan dan efek samping jangka panjang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Boudi FB. Atherosclerosis. Medscape [Internet]. 2010 [cited 2015 Aug 18]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/cardiology#atherosclerosis>.
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *NEJM*. 2005; 352:1685-95
3. Curtiss LK. Reversing atherosclerosis. *NEJM*. 2009;360:11.
4. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med*. 2001;345(22):1583-92.
5. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders; 2003.
6. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, et al. Oxidized phospholipid, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *NEJM* 2005; 353(1):46-57
7. Ludewig B, Krebs P, Scandella E. Immunopathogenesis of atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2004;76(2):300-6.
8. Su J. Natural antibodies against phosphorylcholine as potential protective factors in atherosclerosis, cardiovascular disease and systemic lupus erythematosus [Thesis]. Sweden: Stockholm; 2009.
9. Kearney JF. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2000; 105(12): 1683-5. doi: 10.1172/JCI10426
10. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10679-84.
11. Rajavashisth T, Qiao JH, Tripathi S, Tripathi J, Mishra N, Hua M, et al. Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;101:2702-10.
12. Selathurai A, Deswaerte V, Kanellakis P, Tipping P, Toh BH, Bobik A, et al. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res* 2014;102:128-37. doi: 10.1093/cvr/cvu016.
13. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* 2007;13:719-24.
14. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 2002;109:745-53. doi: 10.1172/JCI07272
15. Shaw PX, Hörkkö S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest*. 2000;105:1731-40.
16. Schenkein HA, Berry CR, Purkall D, Burmeister JA, Brooks CN, Tew JG. Phosphorylcholine dependent cross-reactivity between dental plaque bacteria and OxLDL.



- Infect Immun. 2001;69(11):6612-7.
17. Kyaw T, Tay C, Krishnamurthi S, Kanellakis P, Agrotis A, Tipping P, et al. B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2011;109(8):830-40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.248542.
 18. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med*. 2010;207(8):1579-87. doi: 10.1084/jem.20100155.
 19. Drug Discovery and Development. BI-204 fails to meet study goals [Internet]. 2012 July 17 [cited 2014 Oct 11]. Available from: <http://www.dddmag.com/news/2012/07/bi-204-fails-meet-study-goals>.
 20. Hermansson A, Johansson DK, Ketelhuth DF, Andersson J, Zhou X, Hansson GK. Immunotherapy with tolerogenic apolipoprotein B-100-loaded dendritic cells attenuates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2011;123(10):1083-91. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.973222.
 21. Gupta S, Pablo AM, Jiang Xc, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997;99:2752-61.
 22. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:17-24.
 23. Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G, Alm R, Ares M, Cercek B, et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):872-8.
 24. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:821-5.
 25. Ameli S, Hultgårdh-Nilsson A, Regnström J, Calara F, Yano J, Cercek B, et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1074-9.
 26. Freigang S, Hörmkö S, Miller E, Witztum JL, Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(12):1972-82.
 27. George J, Afek A, Gilburd B, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, et al. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998;138:147-52.
 28. Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert AK, Hansson GK. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:108-14.
 29. Chyu KY, Reyes OS, Zhao X, Yano J, Dimayuga P, Nilsson J, et al. Timing affects the efficacy of LDL immunization on atherosclerotic lesions in apo E (-/-) mice. *Atherosclerosis* 2004;176:27-35.
 30. Zhou X, Robertson AK, Rudling M, Parini P, Hansson GK. Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis. *Circ Res*. 2005;96:427-34.
 31. Dunér P, To F, Beckmann K, Björkbacka H, Fredrikson GN, Nilsson J, et al. Immunization of apoE^{-/-} mice with aldehyde-modified fibronectin inhibits the development of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2011;91(3):528-36. doi: 10.1093/cvr/cvr101.
 32. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010;11:155-61.
 33. Shah PK, Chyu KY, Dimayuga PC, Nilsson J. Vaccine for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(25):2779-91.
 34. Fredrikson GN, Söderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:879-84.
 35. Klingenberg R, Ketelhuth DF, Strothoff D, Gregori S, Hansson GK. Subcutaneous immunization with heat shock protein-65 reduces atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Immunobiology*. 2012;217(5):540-7. doi: 10.1016/j.imbio.2011.06.006.
 36. Chyu KY, Zhao X, Dimayuga PC, Zhou J, Li X, Yano J, et al. CD8⁺ T cells mediate the athero-protective effect of immunization with an ApoB-100 peptide. *PLoS One*. 2012;7(2):30780. doi: 10.1371/journal.pone.0030780.
 37. Wigren M, Kolbus D, Dunér P, Ljungcrantz I, Söderberg I, Björkbacka H, et al. Evidence for a role of regulatory T cells in mediating the atheroprotective effect of apolipoprotein B peptide vaccine. *J Intern Med*. 2011;269(5):546-56. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02311.x.
 38. Herbin O, Ait-Oufella H, Yu W, Fredrikson GN, Aubier B, Perez N, et al. Regulatory T-cell response to apolipoprotein B100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):605-12. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242800.
 39. Kametsu Y, Kitagawa Y, Sekiyama S, Takagi S. Increase in plasma malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in patients with atherothrombotic cerebral infarction. *Tokai J Exp Clin Med*. 2005;30(3): 171-6.
 40. Lu X, Xia M, Endresz V, Faludi I, Szabo A, Gonczol E, et al. Impact of multiple antigenic epitopes from ApoB100, hHSP60 and Chlamydia pneumoniae on atherosclerotic lesion development in Apob(tm2Sgy)Ldlr(tm1Her) J mice. *Atherosclerosis*. 2012;225(1):56-68. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.021.
 41. Tse K, Gonen A, Sidney J, Ouyang H, Witztum JL, Sette A, et al. Atheroprotective vaccination with MHC-II Restricted Peptides from ApoB-100. *Front Immunol*. 2013;4:493. doi: 10.3389/fimmu.2013.00493
 42. Gaofu Q, Jun L, Xin Y, Wentao L, Jie W, Xiuyun Z, et al. Vaccinating rabbits with a cholesteryl ester transfer protein (CETP) B-Cell epitope carried by heat shock protein-65 (HSP65) for inducing anti-CETP antibodies and reducing aortic lesions in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:591-8.
 43. Davidson MH, Maki K, Umporowicz D, Wheeler A, Rittershaus C, Ryan U. The safety and immunogenicity of a CETP vaccine in healthy adults. *Atherosclerosis* 2003;169: 113-20.
 44. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, Wick MC, Wick G. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):960-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.217877.
 45. George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shaish A, et al. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:505-10.
 46. Long J, Lin J, Yang X, Yuan D, Wu J, Li T, et al. Nasal immunization with different forms of heat shock protein-65 reduced high-cholesterol-diet-driven rabbit atherosclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(1):82-7. doi: 10.1016/j.intimp.2012.03.008.
 47. Klingenberg R, Lebens M, Hermansson A, Fredrikson GN, Strothoff D, Rudling M, et al. Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(5):946-52. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.202671.



48. Hauer AD, van Puijvelde GH, Peterse N, de Vos P, van Weel V, van Wanrooij EJ, et al. Vaccination against VEGFR2 attenuates initiation and progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2050–7.
49. van Wanrooij EJ, de Vos P, Bixel MG, Vestweber D, van Berkel TJ, Kuiper J. Vaccination against CD99 inhibits atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2008;78(3):590-6. doi: 10.1093/cvr/cvn025.
50. Habets KL, van Puijvelde GH, van Duivenvoorde LM, van Wanrooij EJ, de Vos P, Tervaert JW, et al. Vaccination using oxidized low-density lipoprotein-pulsed dendritic cells reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):622-30. doi: 10.1093/cvr/cvp338.
51. Hermansson A, Johansson DK, Ketelhuth DF, et al. Immunotherapy with tolerogenic apolipoprotein B-100-loaded dendritic cells attenuates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2011;123:1083–91.
52. Hörkkö S, Bird DA, Miller E, Itabe H, Leitinger N, Subbanagounder G, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin Invest.* 1999;103:117–28.
53. Caligiuri G, Khallou-Laschet J, Vandaele M, Gaston AT, Delignat S, Mandet C, et al. Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(6):540-6.
54. Hung IF, Leung AY, Chu DW, Leung D, Cheung T, Chan CK, et al. Prevention of acute myocardial infarction and stroke among elderly persons by dual pneumococcal and influenza vaccination: A prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2010;51:1007–16. doi: 10.1086/656587.
55. Rosenfeld ME, Campbell LA. Pathogens and atherosclerosis: Update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106:858–67.
56. Hayashi C, Viereck J, Hua N, Phinikaridou A, Madrigal AG, Gibson FC 3rd, et al. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 2011;215(1):52-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.009.
57. Koizumi Y, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, Yamamoto M. Nasal immunization with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein decreases *P. gingivalis*-induced atherosclerosis and inflammation in spontaneously hyperlipidemic mice. *Infect Immun.* 2008;76(7):2958-65. doi: 10.1128/IAI.01572-07.
58. Damianus LE. *Salmonella typhimurium*, sang jawara penginfeksi dari genus *Salmonella*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma; 2000.
59. Pecquet SS, Ehrat C, Ernst PB. Enhancement of mucosal antibody response to *Salmonella typhimurium* and the microbial hapten phosphorylcholine in mice with X-linked immunodeficiency by B-cell precursors from peritoneal cavity. *Infection and Immunity* 1992;60(2): 503-9
60. Tsimikas S et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 353: 46-57
61. Binder CJ, Hörkkö S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: Molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med.* 2003;9:736–43.
62. Kearney JF. Immune recognition of OxLDL in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2000;105:1683-5.
63. Chyu KY, Zhao X, Reyes OS, Babbidge SM, Dimayuga PC, Yano J, et al. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:1982–9.
64. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(5 Suppl):1307-15.
65. Delves PJ, Roitt IM. Advances immunology: The immune system. *N Engl J Med.* 2000; 343:37-49. DOI: 10.1056/NEJM200007063430107
66. King PG. Vaccines and autism – the wrong argument [Internet]. 2008 [cited 2015 Dec 29]. Available from: <http://www.whale.to/v/king12.pdf>
67. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Aβ42 immunization. *Neurology* 2003;61:46–54