

Received: 2005.03.14
Accepted: 2005.06.09
Published: 2005.07.12

Rola lipidów w powstawaniu miażdżycy

The role of lipids in atherogenesis

Anna Skoczyńska

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Cholesterol pochodzący z lipoprotein jest kluczem do zrozumienia patogenezy miażdżycy. Głównym źródłem estrów cholesterolu dla makrofagów obecnych w przestrzeni pod śródbłonkiem są lipoproteiny zmodyfikowane tlenowo lub zagregowane. Dostają się one do makrofagów za pośrednictwem endocytozy lub fagocytozy i są dostarczane do obwodowych endosomów i lizosomów, gdzie podlegają hydrolizie. Estry związane z błonami cytoplazmatycznymi stale podlegają działaniu obojętnej hydrolazy i ponownej reestryfikacji pod wpływem ACAT. Uwolniony wolny cholesterol jest dostarczany do błon plazmatycznych i innych struktur komórkowych w postaci pęcherzyków. W transporcie tym prawdopodobnie uczestniczą białka npc1 i npc2 (HE1) oraz kwas lizobifosfatydowy. Jeśli w pobliżu pojawią się akceptory cholesterolu, np. cząsteczki HDL, pewna część cholesterolu może opuścić komórki, przejść do krążenia i być transportowana do wątroby w procesie zwrotnego transportu cholesterolu. Skład kropli lipidów oddziałuje na ten proces przez wpływ na płynność kropli. Wolny cholesterol, w części występujący w postaci krystalicznej, indukuje apoptozę. Ostatecznie komórki piankowe w obrębie uszkodzenia obumierają, a komórkowe zasoby estrów cholesterolu i wolnego cholesterolu, w tym krystalicznego, są uwalniane do środowiska. Proces ten uczestniczy w powstawaniu lipidowego lub martwiczego rdzenia w zaawansowanej blaszce miażdżycowej. W pracy przedstawiono także rolę oksysteroli, trójglicerydów, kwasów tłuszczowych i fosfolipidów w powstawaniu i progresji uszkodzenia miażdżycowego.

Słowa kluczowe: cholesterol • oksysterole • ceramidy • uszkodzenie miażdżycowe

Summary

The lipoproteins derived from cholesterol are the key to understanding atherogenesis. The main source of lipids for macrophages presented in the subendothelial space are lipoproteins undergoing oxidative modification or aggregation. Lipoproteins internalized in macrophages via endocytosis or phagocytosis are delivered to peripheral endosomes or lysosomes, where they are hydrolyzed. Large amounts of cholesteryl esters bound to cytoplasmic membranes are permanently affected by neutral hydrolase and repeated re-esterification by ACAT. Liberated free cholesterol is provided to the plasma membrane and other intracellular structures, probably by vesicular transport. This transport is probably partially mediated by npc1 and npc2 (HE1) proteins, as well as lysobiphosphatidic acid. If some cholesterol acceptors, for example HDL particles, are available, some of the cholesterol can leave the cell, enter the circulation, and be transported to the liver in a process of reverse cholesterol transport. Modification of the lipid droplets fluidity by lipid composition is an important factor in susceptibility to this cholesterol efflux. The free cholesterol, especially crystalline, induces apoptosis. Finally, foam cells die and cellular cholesterol esters and free cholesterol are released into the lesion. This represents lipid or necrotic core formation in advanced atheromata. In this paper the role of oxysterols, triglycerides, fatty acids, and phospholipids in atherogenesis are also described.

Key words: lipids • oxysterols • ceramides • atherosclerotic lesion

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7720.pdf**Word count:** 5955**Tables:** 2**Figures:** 2**References:** 75**Adres autorki:** dr hab. Anna Skoczyńska Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego AM, ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław; e-mail: annaskoc@ak.am.wroc.pl

Podwyższone stężenie lipidów we krwi jest związane ze zwiększonym ryzykiem powstania miażdżycy. Dowody potwierdzają tezę, że cholesterol frakcji LDL w osoczu w stężeniu przekraczającym 100 mg/dl, czyli wyższym od poziomu optymalnego, w odpowiednich warunkach powoduje miażdżycę. Miażdżycą jest wynikiem wielu procesów i to czy rozwinie się czy też nie, zależy jednak od różnych czynników, włączając w to choćby zaburzenia krzepnięcia. Zaburzenia metabolizmu pozostałych lipidów odgrywają także istotną rolę w patogenezie miażdżycy. Nie przeczy temu fakt, że występują one w uszkodzeniach miażdżycowych w ilościach znacznie mniejszych niż cholesterol, obecny tu głównie w postaci estrów, tabela 1. Istotna rola biologiczna lipidów, coraz bardziej poznawana, rzuca nowe światło na mechanizmy powstawania miażdżycy.

1. CHOLESTEROL I MIAŻDŻYCA

W warunkach fizjologicznych zawartość cholesterolu w komórkach ssaków jest utrzymywana na względnie stałym poziomie. Jest to możliwe dzięki licznym mechanizmom regulacji opartych na zasadzie sprzężeń zwrotnych ujemnych. Można wyróżnić dwa podstawowe źródła cholesterolu komórkowego. Jest to cholesterol pochodzący z lipoprotein, który dostaje się do komórki drogą receptorową oraz cholesterol syntetyzowany w komórce w sytuacji, gdy pula lipoprotein dostępnych komórce jest ograniczona. Schemat toru metabolicznego cholesterolu w komórce przedstawia rycina 1.

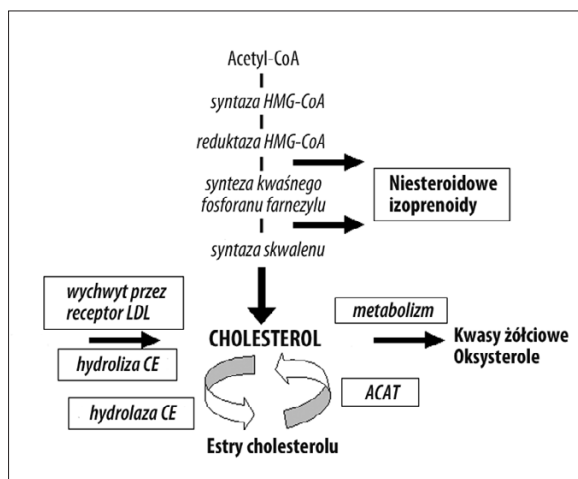
Najważniejszym procesem w powstawaniu uszkodzenia miażdżycowego jest gromadzenie cholesterolu w ścianie naczyń. Cholesterol ten pochodzi z lipoprotein krążących w osoczu, które zawierają zarówno cholesterol niezestryfikowany, tzw. wolny (free cholesterol – FC), jak i estry

cholesterolu (cholesteryl ester – CE). Do głównych źródeł cholesterolu należą dwie klasy lipoprotein: są to LDL oraz lipoproteiny resztkowe, tzw. remnanty, powstałe w wyniku lipolizy chylomikronów oraz VLDL. Lipoproteiny osoczowe stale wnikają do przestrzeni podśródbłonkowej naczyń „przeciekając” przez pojawiające się połączenia między komórkami śródbłonka oraz prawdopodobnie drogą śródbłonkowej transcytozy. W prawidłowych warunkach lipoproteiny nie są zatrzymywane pod śródbłonkiem i swobodnie powracają do krążenia. W pewnych obszarach drzewa naczyniowego występuje jednak zwiększona retencja lipoprotein, a to prowadzi do ich gromadzenia w macierzy zewnątrzkomórkowej pod śródbłonkiem. Zgromadzone lipoproteiny indukują wiele odpowiedzi komórkowych oraz pozakomórkowych, powodując uszkodzenia miażdżycowe. Ponieważ wysokie stężenie aterogennych lipoprotein w osoczu promuje gromadzenie się tych cząsteczek w ścianie naczyń, model ten dobrze tłumaczy udokumentowany związek między stężeniem cholesterolu w osoczu i miażdżycą, występujący zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u ludzi [24,65].

Dalsze losy FC i CE zatrzymanych pod śródbłonkiem lipoprotein są związane z procesami zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowymi. Lipoproteiny te są modyfikowane przez lipazy, proteazy i utlenianie. W wyniku tych reakcji powstają pęcherzyki lipidowe bogate w FC i ubogie w proteiny i CE. Biologiczne znaczenie tych pęcherzyków pozostaje nieznane. Inne reakcje prowadzą do powstawania zmodyfikowanych lipoprotein, które działają jak zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne w uszkodzonych komórkach lub są wychwytywane przez makrofagi i komórki mięśni gładkich. Zmodyfikowane lipoproteiny są więc odpowiedzialne nie tylko za powstawanie komórek piankowatych, ale także za przekazywanie sygnałów komórkowych [65].

Tabela 1. Procentowy udział poszczególnych lipidów w uszkodzeniu miażdżycowym (jego masie) z uwzględnieniem stadiów rozwoju miażdżycy [65]

Lipid	Nacieczenie tłuszczowe	Uszkodzenie pośrednie	Uszkodzenie włókniste	Uszkodzenie zaawansowane
Cholesterol	9,6	21,1	22,5	31,5
Trójglicerydy	2,8	4,4	5,2	6,0
Estry cholesterolu	77,0	55,0	55,5	47,2
Fosfolipidy	10,1	19,6	16,8	15,3
Fosfatydylocholina	4,8	7,6	4,5	4,3
Sfingomielina	5,6	11,0	11,7	10,1
Lizofosfatydylocholina	0,3	1,0	0,6	0,9



Ryc. 1. Zarys toru metabolicznego w komórkach ssaków. Cholesterol jest syntetyzowany z acetyl-CoA z udziałem czterech enzymów regulujących. Komórki otrzymują cholesterol także w wyniku wychwyty i hydrolizy estrów cholesterolu (CE) zawartych w lipoproteinach o małej gęstości (LDL). Produktami końcowymi lub pośrednimi są: kwasy żółciowe, oksysterole, estrы cholesterolu i niesteroidowe izoprenoidy. ACAT – acylotransferaza acylo-CoA: cholesterol [34]

Głównym typem komórek wychwytyjących umiejscowione pod śródbłonkiem lipoproteiny są makrofagi. Pochodzą one z tych krążących monocytów, które wniknęły do ściany naczyń w odpowiedzi na chemokiny. Chemokiny są uwalniane przez komórki śródbłonka w odpowiedzi zarówno na gromadzące się pod powierzchnią lipoproteiny, jak i pod wpływem cytokin pochodzących z komórek T. Pod wpływem innych cząstek uwalnianych przez komórki śródbłonka, przede wszystkim czynnika stymulującego monocytę (macrophage colony stimulating factor – MCSF), monocytę różnicują się w makrofagi. Te z kolei kontaktują się z podśródbłonkowymi lipoproteinami i wychwytyują je, gromadząc w ten sposób pochodzący z nich cholesterol. Gromadząc go wewnątrzkomórkowo w postaci kropli zawierających estrы cholesterolu, zamieniają się w komórki piankowe (foam cells). Są one oznaką rozwoju wczesnej miażdżycy, ale występują także w zmianach zaawansowanych.

O cholesterolu lipoprotein podległych internalizacji przez makrofagi decydują procesy zachodzące na powierzchni komórek i receptory. W badaniach *in vitro* hodowli komórkowych wykazano, że natywne LDL podlegają internalizacji przez makrofagi znacznie słabiej niż w ścianie naczyń. Stąd wzięła się koncepcja o modyfikacji LDL ułatwiającej wychwyt LDL przez te komórki. Spośród różnych propozycji dwa sposoby modyfikacji LDL wydają się najbardziej istotne: utlenianie i agregacja.

W uszkodzeniach miażdżycowych stwierdza się obecność utlenionych cząstek LDL (oxy-LDL). Wiadomo też, że makrofagi wychwytyują utlenione LDL znacznie szybciej i łatwiej niż inne postaci LDL. W wychwycie tym uczestniczą receptory zmiatające klasy A, B (np. CD 36) oraz podobny do lektyny receptor utlenionych LDL typu 1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1 – LOX-1). Jest jednak mało prawdopodobne, aby ten tor metabolizmu LDL, jak-

kolwiek bardzo istotny w powstawaniu uszkodzenia miażdżycowego, był jedynym.

Innym torem modyfikacji LDL jest agregacja cząstek tych lipoprotein. Czynnikiem stymulującym agregację może być zarówno utlenianie, jak i lipoliza oraz hydroliza LDL. Jednym ze sposobów agregacji LDL jest np. hydroliza LDL przez sfingomielinazę, wydzielaną przez komórki ściany naczyń. Wykazano, że makrofagi wychwytyują zagregowane LDL znacznie łatwiej niż postaci natywne. Wychwyt ten następuje w sposób podobny do fagocytozy. Nie udało się jednak stworzyć takiego modelu doświadczalnego, w którym wykazano by występowanie receptorów na powierzchni makrofagów innych niż receptory LDL [65]. Istotne jest, że w wyniku internalizacji zagregowanych LDL przez makrofagi, w komórkach tych gromadzą się głównie estrы cholesterolu, które są podstawą powstania nacieczenia tłuszczowego w ścianie naczyń.

Źródłem cholesterolu w makrofagach, i to głównie zestryfikowanego, są także lipoproteiny resztkowe (tzw. remnanty). Pochodzą one z chylomikronów oraz VLDL. Podobnie jak cząsteczki LDL, mogą podlegać utlenianiu lub agregacji i tak zmodyfikowane są internalizowane przez makrofagi. Nie wiadomo dokładnie, jaki jest mechanizm receptorowy przedostawania się remnantów do wnętrza makrofagów – prawdopodobnie uczestniczą w nim receptory LDL oraz receptory do nich podobne, tzw. białka odpowiadające receptorom LDL (LDL receptor related protein – LRP). Źródłem cholesterolu w makrofagach może być także lipoproteina (a), której część białkowa (glikoproteina a) kowalentnie wiąże się z apolipoproteiną B100 cząsteczki LDL.

Losy cholesterolu pochodzącego z lipoprotein są kluczem do zrozumienia biologii i patologii uszkodzonych makrofagów. Lipoproteiny, które dostały się do tych komórek przez endocytozę lub fagocytozę, są dostarczane do obwodowych endosomów lub lizosomów, gdzie podlegają hydrolizie (hydrolizowane są fragmenty białkowe i lipidowe). Lipoproteiny będące źródłem estrów cholesterolu są hydrolizowane w lizosomach przez kwaśną lipazę lizosomalną. Uwolniony wolny cholesterol jest dostarczany do błon plazmatycznych i innych struktur komórkowych. W jaki sposób następuje transport cholesterolu z lizosomów i endosomów, dokładnie nie wiadomo. Na podstawie badań komórek z mutacjami w transporcie cholesterolu, zakłada się udział w tym transporcie białek nazwanych npc1 i npc2 (HE1) [8, 45, 48] oraz lipidu, kwasu lizobifosfatydowego [23]. Czynniki te mają warunkować transport cholesterolu w postaci pęcherzyków do bliżej nieokreślonych struktur „sortujących”, a następnie, także w postaci pęcherzyków, do struktur docelowych. Jest prawdopodobne, że zależnie od typu komórek, a nawet od warunków w obrębie tych samych komórek, rozkład cholesterolu w strukturach wewnątrzkomórkowych może się zmieniać.

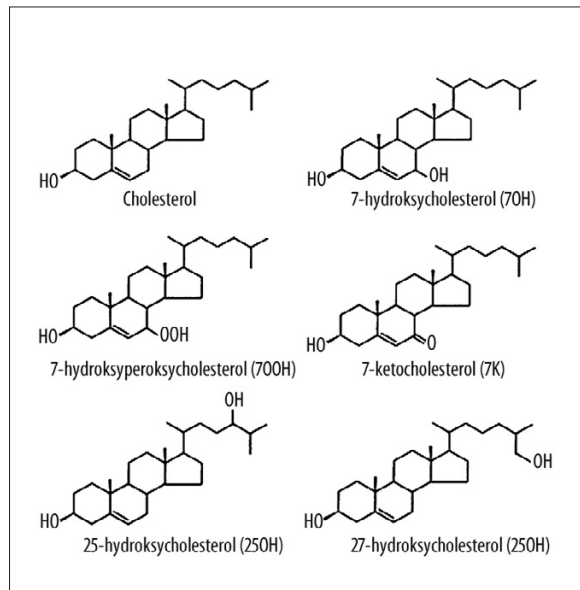
W powstawaniu miażdżycy najważniejsze są dwie ścieżki transportowe cholesterolu: do reticulum endoplazmatycznego, w którym cholesterol jest estryfikowany pod wpływem acylotransferazy acylo-CoA: cholesterol (ACAT) oraz do błon plazmatycznych, skąd cholesterol może być dostarczany do akceptorów pozakomórkowych w procesie „wypływu cholesterolu” z komórki.

Pierwszy z tych procesów, tj. estryfikacja, jest źródłem masowego gromadzenia cholesterolu w komórkach piankowatych. Estry cholesterolu obecne we wczesnych uszkodzeniach miażdżycowych zawierają dużo oleinianów, ponieważ pierwotnym substratem dla ACAT jest oleilo: CoA. Z kolei estry cholesterolu obecne w osoczu zawierają więcej linoleinianów, stąd stosunek oleiniany/linoleiniany w estrach cholesterolu zawartych w komórkach piankowatych nacieżeń lipidowych wynosi prawie 2. W zaawansowanych uszkodzeniach stosunek ten maleje do około 1. Można wnioskować, że w miarę progresji miażdżycy wzrasta ilość lipoprotein bogatych w estry cholesterolu w przestrzeni pod śródbłonkiem, ponieważ ich wychwyt przez makrofagi maleje lub też dochodzi do upośledzenia hydrolizy lipoprotein w lizosomach w uszkodzonych makrofagach [65].

Jest interesujące, że w komórkach piankowatych zaawansowanych uszkodzeń miażdżycowych obecna jest duża ilość nie tylko estrów, ale także wolnego cholesterolu, który w części występuje w postaci krystalicznej. Nie wiadomo, co sprzyja gromadzeniu FC. Być może są to zaburzenia transportu wewnątrzkomórkowego, w wyniku czego cholesterol nie jest poddawany działaniu ACAT. Być może dochodzi do zmniejszenia aktywności ACAT w makrofagach. Gromadzący się cholesterol, szczególnie w postaci kryształów, sprzyja nekrozie komórek i apoptozie [21]. Zmiany nekrotyczne są wynikiem zaburzeń funkcji białek błon plazmatycznych, narażonych na działanie mikrośrodowiska o wysokim współczynniku cholesterol/fosfolipidy. Zgromadzone wewnątrzkomórkowo kryształy cholesterolu także prowadzą do martwicy. Indukowana przez wolny cholesterol apoptoza w hodowli makrofagów obejmuje aktywację ligandu Fas oraz uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, co jest skojarzone ze wzrostem poziomu Bax w tych komórkach [64]. Jednak hamowanie aktywności ACAT z zastosowaniem syntetycznego inhibitora tego enzymu (avasimibe) może ograniczać rozwój miażdżycy, nie przez działanie na stężenie lipidów, ale przeciwnie – poprawiające funkcjonowanie naczyń krwionośnych [30,67].

Komórki mięśni gładkich (smooth muscle cells – SMCs) obecne w uszkodzeniach miażdżycowych, także zawierają duże ilości estrów cholesterolu, chociaż mechanizm tego zjawiska nie jest znany. W badaniach *in vitro* SMC wychwytyują słabo natywne LDL i znacznie skuteczniej zagregowane LDL [36]. Lipoproteiny resztkowe, szczególnie β -VLDL i emulsje estrów cholesterolu mogą indukować gromadzenie cholesterolu w SMC w hodowli, ale nie wiadomo, czy odgrywa to rolę w żywych organizmach. Prawdopodobnie w wychwytywaniu cholesterolu przez różne komórki obecne w uszkodzeniu miażdżycowym największą rolę odgrywają białka odpowiadające receptorowi LDL [35].

Jakie są losy komórek piankowatych w uszkodzeniu miażdżycowym? Prawdopodobnie krople estrów cholesterolu, związane z błonami w cytoplazmie, stale podlegają działaniu obojętnej hydrolazy estrów cholesterolu i ponownej estryfikacji pod wpływem ACAT [25]. Jeśli w pobliżu pojawiają się akceptory cholesterolu, np. cząsteczki HDL lub apolipoproteina A-I, pewna część cholesterolu może opuścić komórki, wejść do krążenia i być transportowana do wątroby w procesie zwrotnego transportu cholesterolu



Ryc. 2. Struktura niektórych oksysteroli biorących udział w powstawaniu zmian miażdżycowych [65]

lu. Skład kropli lipidów może wpływać na ten proces poprzez oddziaływanie na płynność kropli. Jest możliwe, że komórki piankowate mogą w całości opuszczać uszkodzenie miażdżycowe, jakkolwiek jest to trudne do wykazania. Ostatecznie komórki piankowate w obrębie uszkodzenia obumierają, a komórkowe zasoby estrów cholesterolu i wolnego cholesterolu, w tym także krystalicznego, są uwalniane do środowiska. Proces ten uczestniczy w powstawaniu lipidowego lub martwiczego rdzenia zaawansowanej blaszki miażdżycowej.

2. OKSYSTEROLE I MIAŻDŻYCA

Oksysterole pochodzą ze źródeł dietetycznych oraz powstają w wyniku reakcji nie enzymatycznego i enzymatycznego utleniania steroli. Strukturę oksysteroli wciągniętych w aterogenezę przedstawia rycina 2. Wśród oksysteroli zawartych w diecie i wbudowywanych w chylomikrony znajdują się: 7-ketocholesterol (7K), 7α - i 7β -hydroksycholesterol (7OH) oraz α - i β -5,6-epoksycholesterol (EPOX). Utlenione sterole: 7OH, 7K, 24-hydroksycholesterol (24OH), 25 hydroksycholesterol (25OH) i 27 hydroksycholesterol (27OH) mogą być wytwarzane *in vivo*, jakkolwiek nie wiadomo, czy powstają w wyniku enzymatycznego, czy też nieenzymatycznego utleniania. Wiadomo natomiast, że pewne oksysterole mogą powstawać w wyniku specyficznych reakcji enzymatycznych, np. 7α OH powstaje w wątrobie pod wpływem 7α -hydroksylazy, a 27OH i kwas 3β -hydroksy-5-cholestenowy pod wpływem 27-hydroksylazy w wątrobie i makrofagach.

W osoczu ludzkim w największej ilości występują 27OH, 24OH oraz 7α OH. Większość z nich jest estryfikowana w pozycji 3β przez acylotransferazę lecytyna: cholesterol (LCAT). Rozkład oksysteroli wolnych i zestryfikowanych w lipoproteinach jest podobny do rozkładu wolnego i zestryfikowanego cholesterolu, jakkolwiek 27OH nie są znajdowane w VLDL, a niezestryfikowane 25OH mogą być związane z albuminą. Z możliwym wyjątkiem doty-

czącym $7\beta\text{OH}$, nie obserwowano wyraźnej zależności między oksysterolami w osoczu i miażdżycą [65].

W uszkodzeniach miażdżycowych stwierdza się obecność głównie 27OH i 7K (ich zawartość stanowi około 1% zawartości cholesterolu) oraz znacznie mniejsze niż w osoczu, ilości 7OH . Są one przeważnie zestryfikowane, umiejscowione w komórkach piankowatych.

Wpływ oksysteroli na powstawanie i rozwój miażdżycy pozostaje niewyjaśniony. Wyniki badań doświadczalnych, w których zwierzętom podawano oksysterole w diecie lub w iniekcjach, nie przyniosły jednoznacznych wyników: u części zwierząt obserwowano rozwój miażdżycy, u innych regresję uszkodzeń miażdżycowych, a jeszcze inne nie wykazywały żadnych zmian. Różnice dotyczące zastosowanego modelu doświadczalnego tylko w części tłumaczą odmienne wyniki obserwacji [65].

Liczne badania *in vitro* nad wpływem oksysteroli na mechanizmy powstawania miażdżycy skupiły się wokół następujących problemów:

- wpływu na wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu,
- wpływu na wypływ cholesterolu z makrofagów,
- działania cytotoksycznego,
- aktywacji jądrowych czynników transkrypcji.

Wpływ oksysteroli na wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu badano *in vitro* i wykazano, że zarówno sam cholesterol jak i pewne oksysterole (25OH i 7K) zmniejszają proteolityczną aktywność białka wiążącego sterole. To z kolei, w mechanizmie down-regulation, zmniejsza transkrypcję receptora LDL i pewnych enzymów toru syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych. 25OH i 7K , a także cholesterol, mogą również promować degradację 3-hydroksyglutaryl-3-metylglutaryl CoA, uczestniczącego w biosyntezie izoprenoidów i cholesterolu. 25OH może aktywować ACAT i hamować aktywność obojętnej hydrolazy estrów cholesterolu. Wykazano, że komórki zawierają białko wiążące oksysterole, ale rola tego białka w odpowiedzi komórkowej na sterole nie jest znana. W odniesieniu do miażdżycy wyniki badań *in vitro* nie są jednak wiążące, choćby z tego powodu, że stężenia oksysteroli w makrofagach w hodowli znacznie przekraczają stężenia oksysteroli obecnych w komórkach piankowatych *in vivo*.

Działanie oksysteroli na wypływ cholesterolu z komórki może być różny; obserwowano zarówno hamowanie, jak i nasilenie wypływu cholesterolu z komórek piankowatych. Zmniejszenie wypływu może być następstwem hamowania desorpcji błonowej cholesterolu i fosfolipidów lub hamowania lizosomalnej sfingomielinazy, co prowadzi do sekwestracji cholesterolu w lizosomach [39]. Jednak cholesterol pod wpływem 27-hydroksylazy makrofagów podlega konwersji do 27OH i kwasu 3β -hydroksy-5-cholestenowego, które łatwo opuszczają komórki piankowate [7]. 27OH są głównymi oksysterolami znajdowanymi w uszkodzeniach miażdżycowych, opisano także zależność występowania zmian miażdżycowych od poziomu 27-hydroksylazy [56]. Kolejne badania z użyciem myszy genetycznie pozbawionych 27-hydroksylazy (enzymu w całości lub tylko frakcji syntetyzowanej w makrofagach), powinny bliżej wyjaśnić udział oksysteroli w patogenezie miażdżycy.

Działanie cytotoksyczne oksysteroli obserwowano *in vitro* w komórkach śródbłonna, mięśni gładkich i makrofagach. Najsilniej działały 27OH , $7\beta\text{OOH}$, $7\alpha\text{OH}$ i 7K [14]. Mechanizmem cytotoksyczności było zubożenie komórek w cholesterol, peroksydacja lipidów komórkowych, zaburzenia na poziomie błon i aktywacja toru apoptozy. Jakkolwiek progresja uszkodzenia miażdżycowego jest związana z obumieraniem komórek śródbłonna, makrofagów i SMCs, nie wiadomo, czy można je łączyć z działaniem oksysteroli. Nie można bowiem porównywać warunków występujących w hodowli komórek ze środowiskiem uszkodzenia miażdżycowego.

W ostatnich latach wykazano, że niektóre oksysterole aktywują jądrowe czynniki transkrypcji. Działanie to jest o tyle istotne, że dotyczy nawet małych stężeń oksysteroli, a więc prawdopodobnie jest istotne w żywych organizmach. Wykazano, że cztery oksysterole, występujące fizjologicznie, mogą aktywować czynniki transkrypcji dla grupy genów kodujących białka istotne w zapobieganiu miażdżycy, albo jej regresji. Te oksysterole to: $24,25\text{EPOX}$, 24OH , 22OH i 27OH . Pobudzają one wątrobowe receptory typu X, należące do nadrodziny receptorów jądrowych [29]. Są to wątrobowy α receptor ($\text{LXR}\alpha$), wątrobowy β receptor ($\text{LXR}\beta$) oraz farnazyloowy receptor x (FXR). Receptory te są uznawane za krytyczne dla metabolizmu lipidów u kręgowców [68]. Aktywowane przez oksysterole, tworzą heterodimery z receptorem retinowym X (retinoid X receptor – RXR), tworząc aktywne czynniki transkrypcji, które indukują różne geny ważne w miażdżycy. Aktywują przede wszystkim grupę genów istotnych w transporcie zwrotnym cholesterolu. Białka kodowane przez te geny to:

- ABCA1 makrofagów i apolipoproteina E, które promują wypływ cholesterolu z komórek piankowatych [52],
- osoczowe białko transportujące estry cholesterolu (CETP), które przekazuje cholesterol zawarty w HDL do lipoprotein podlegających internalizacji w hepatocytach,
- wątrobowa 7α -hydroksylaza cholesterolu, podstawowy enzym konwertujący cholesterol do kwasów żółciowych w hepatocytach [52,65].

Badania z użyciem transgenicznych myszy pozbawionych apolipoproteiny E wykazały, że aktywacja RXR redukuje miażdżycę, natomiast u myszy pozbawionych $\text{LXR}\alpha$, dieta cholesterolowa powoduje gromadzenie bardzo dużych ilości cholesterolu w wątrobie [16]. Jednak w komórkach mięśni gładkich aorty szczura ligandy oksysterolowe (np. 25OH) wiążące wątrobowy receptor X powodują gromadzenie mRNA wydzielniczej fosfolipazy A2 i wzrost aktywności enzymu [1]. Enzym ten jest wydzielany w długotrwałych procesach zapalnych. Z kolei w komórkach śródbłonna 7-oksycholesterol hamuje aktywację cytosolowej fosfolipazy A2, ale także hamuje syntazę tlenu azotu [42]. Wiadomo też, że 7-ketocholesterol stymuluje apoptozę, prawdopodobnie przez zwiększanie wytwarzania wolnych rodników tlenowych. W makrofagach aktywuje on mitochondrialny tor apoptozy z uwalaniem cytochromu c i aktywacją kaspaz [6]. W komórkach mięśni gładkich aktywuje układ proteaz i wytwarzanie białek sprzężonych z mikrotubulami [40,47]. Istotny wpływ na metabolizm lipidów, reakcję zapalną i apoptozę wskazuje na ważną rolę oksysteroli w patogenezie miażdżycy. Czy

wyniki tych badań, a przede wszystkim fascynujące wyniki badań dotyczących wpływu oksysteroli na czynniki genetyczne warunkujące miażdżycę, znajdują przełożenie na strategię profilaktyczne i terapeutyczne? Zsyntetyzowanie ostatnio oksysterolowego ligandu LXR [49] stwarza takie nadzieje.

3. TRÓJGLICERYDY I MIAŻDŻYCA

Badania kliniczne i epidemiologiczne już w latach 80. ub.w. wykazywały związek między podwyższonym stężeniem trójglicerydów (TG) w osoczu i zwiększoną częstością zachorowań na chorobę niedokrwienną serca [4,9,73]. Niektórzy autorzy sugerowali, że hipertrójglicerydemia może być czynnikiem ryzyka o znaczeniu większym niż podwyższone stężenie cholesterolu [9], szczególnie gdy towarzyszy obniżonemu stężeniu cholesterolu we frakcji HDL [62]. Od lat 90. ub.w. podwyższone stężenie trójglicerydów w surowicy jest uważane za niezależny czynnik ryzyka chorób układu krążenia [71]. Wyniki badań prospektywnych potwierdziły związek między stężeniem małych cząsteczek VLDL i IDL a progresją łagodnych i umiarkowanych zmian miażdżycowych [38]. Także upośledzony katabolizm chylomikronów w naczyniach krwionośnych jest uznawany za niezależny wskaźnik prognostyczny miażdżycy naczyń wieńcowych serca oraz marker ciężkości choroby [60].

Stężenie trójglicerydów w osoczu podlega regulacji przez lipazę lipoproteinową i wątrobową, które odpowiadają za hydrolizę trójglicerydów w chylomikronach i lipoproteinach o bardzo małej gęstości. Oba enzymy odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy, chociaż nie ustalono jednoznacznie, czy działają one pro- czy przeciwmiażdżycowo. Wydaje się, że w małych stężeniach przyspieszają, natomiast w dużych chronią przed rozwojem zmian w naczyniach [55,69].

Miażdżycorodne działanie TG sugeruje cytotoksyczne działanie lipoprotein resztkowych powstałych pod wpływem lipazy lipoproteinowej z chylomikronów i VLDL. W wyniku tego działania z makrofagów powstają komórki zbliżone do piankowatych, czyli patognomonicznych dla miażdżycy [15]. Mechanizm tego działania nie jest znany. Prawdopodobnie lipoproteiny resztkowe są wbudowywane przez makrofagi inaczej niż LDL i mają odmienny wpływ na metabolizm cholesterolu [63]. Ponieważ cząsteczki resztkowe zawierają duże ilości TG rdzeniowych, jedna z hipotez zakłada lipolizę remnantów na powierzchni makrofagów pod wpływem LPL. Makrofagi inkubowane z beta VLDL są eksponowane zarówno na lipidy rdzenia jak i zdysocjowany w nadmiarze materiał powierzchniowy, zawierający wolny cholesterol, fosfolipidy i kwasy tłuszczowe. W dużych stężeniach produkty lipolizy są toksyczne dla komórek [22], ale w małych stężeniach, kwasy tłuszczowe, podobnie jak cholesterol, stymulują wewnątrzkomórkową acylotransferazę acyl-CoA: cholesterol, powodując wzrost wytwarzania estrów cholesterolu. W ten sposób lipoliza może stymulować tworzenie komórek piankowatych, a także wiązanie lipoprotein z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej w ścianie naczyń krwionośnych [55].

Kolejny mechanizm miażdżycorodnego działania lipoprotein resztkowych jest związany z ich oddziaływaniem

na procesy krzepnięcia, fibrylizacji i indukowaniem stanu prokoagulacyjnego [57]. Czynnikiem sprzyjającym ateroonemu działaniu hipertrójglicerydemii jest obecność małych, tzw. gęstych LDL (LDL typu B). Występowanie tej podfrakcji LDL jest skojarzone z częstym występowaniem bezobjawowej miażdżycy tętnic szyjnych [24]. Kolejnym mechanizmem działania hipertrójglicerydemii jest dysfunkcja śródbłonna. Jedną z ostatnich hipotez zakłada, że trójglicerydy, razem z turbulentnym przepływem krwi, sprzyjając aktywacji śródbłonna, zwiększają adhezję monocytów [72].

Potwierdzeniem związku między trójglicerydami i powstawaniem zmian miażdżycowych są wyniki badań histochemicznych naczyń. Stwierdzono, że lipidy obecne w blaszkach miażdżycowych są lipidami podobnymi do mielin lub są wielkością zbliżone do VLDL i zawierają trójglicerydy [50] oraz że produkty lipolizy lipoprotein bogatych w trójglicerydy, pod względem struktury i składu biochemicznego, są zbliżone do materiału obecnego w obrębie blaszek [15]. Jednym z tych produktów jest lizolecytyna, wytwarzana z udziałem zewnątrzkomórkowej fosfolipazy z substratu lipidowego powstałego w wyniku lipolizy na powierzchni naczyń lub w wyniku działania enzymów lizosomalnych wytwarzanych przez komórki nekrotyczne obecne w zmianach miażdżycowych. W mikrośrodoisku w albuminy, lizolecytyna i wolne kwasy tłuszczowe mogą stymulować chemotaksję makrofagów, promować ekspresję czynników wzrostu i adhezję cząsteczek oraz powodować zmiany w wazodylatacyjnym działaniu tlenu azotu [22]. Komórki uszkodzenia miażdżycowego, szczególnie makrofagi, zawierają trójglicerydy dostające się do komórek w wyniku wychwytu lipoprotein bogatych w te lipidy oraz syntetyzowane wewnątrzkomórkowo. W komórkach piankowatych trójglicerydy stanowią stosunkowo niewielki procent lipidów tworzących płynne kropelki. Mogą one jednak obniżyć temperaturę topnienia tych kropelek, co powoduje szybszą hydrolizę i szybszy wpływ cholesterolu niż w przypadku kropelek krystalicznych [65].

4. KWASY TŁUSZCZOWE I MIAŻDŻYCA

W uszkodzeniu miażdżycowym wolne kwasy tłuszczowe stanowią do 0,4 mg/g mokrej tkanki. W tej ilości mogą wpływać zarówno bezpośrednio na rozwój uszkodzenia, jak i pośrednio, jako prekursorzy lipidów o swoistym działaniu biologicznym. Działaniem bezpośrednim może być np. obniżanie pH w środowisku zewnątrzkomórkowym, co aktywuje enzymy, takie jak lizosomalna hydroksylaza, wydzielana lub uwalniana z komórek. Po wejściu do komórek, kwasy tłuszczowe stymulują syntezę estrów cholesterolu, fosfolipidów i trójglicerydów. Poszczególne typy kwasów wykazują działanie swoiste, np. oleiniany są stymulatorem reakcji z udziałem ACAT. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe, charakteryzując się niższą temperaturą topnienia, łatwiej podlegają hydrolizie i wypływowi z komórki [65]. Utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach oraz metabolitów kwasu arachidonowego stanowi jeden z najważniejszych mechanizmów w patogenezie miażdżycy [53,54,74].

W cząsteczkach LDL peroksydacji ulegają wolne i zestyfikowane wielonienasycone kwasy tłuszczowe, głów-

nie w pozycji *sn*-2 fosfolipidów: kwas oleinowy, linolowy i arachidonowy [19,58]. Powstają one, podobnie jak kwasy pochodzące z błon komórkowych, w wyniku hydrolizy fosfolipidów przez fosfolipazę A_2 lub w wyniku lizosomalnej hydrolizy lipoprotein, które podległy internalizacji. Jednym ze sposobów miażdżycorodnego działania LDL może być dostarczanie do miejsc miażdżycowego uszkodzenia substratu do utleniania, to jest nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawartych w fosfolipidach lub estrach cholesterolu. LDL ulegają modyfikacji tlenowej *in vivo* pod wpływem kontaktu z komórkami śródbłonna, mięśni gładkich i makrofagów w błonie wewnętrznej naczyń [5]. Proces ten jest związany z aktywacją komórkowych oksygenaz i zależy od utrzymania równowagi między tymi oksygenazami (głównie oksydazą NADPH, syntazą tlenku azotu i lipooksygenazami) oraz komórkowymi antyoksydantami. W ognisku miażdżycowym modyfikacja tlenowa LDL jest wyzwalana przez enzymy oksydacyjne wydzielane przez uszkodzone komórki, w tym mieloperoksydazę, indukowaną syntazę tlenku azotu i 15-lipooksygenazę. Powstają pochodne mono- i hydroperoksy- wymienionych kwasów, a następnie aldehydy oraz izoprostany. Jednocześnie z cholesterolu tworzą się cytotoksyczne oksysterole [11]. Niektóre z powstałych fragmentów tworzą kowalენტne wiązania z apolipoproteina B, co prowadzi do modyfikacji apolipoproteiny B, zmian właściwości funkcjonalnych LDL i zwiększonego wychwytu LDL przez receptory zmiatające. Powstające komórki piankowe stanowią podstawowy składnik nacieczn tłuszczowych. Aterogenne działanie utlenionych LDL jest związane także z ich działaniem chemotaktycznym, cytotoksycznym w stosunku do komórek ściany naczyniowej, wpływem na ekspresję genów kodujących białka, działaniem immunizującym, hamowaniem wazodylatacji stymulowanej przez tlenek azotu, nasilaniem procesu krzepnięcia, w tym zwiększaniem aktywacji płytek oraz oddziaływaniem na proteoglikany i glikozoaminoglikany ściany naczyniowej.

Utlenione metabolity kwasu arachidonowego

Powstawanie eikozanoidów z kwasu arachidonowego w torze działania cyklooksygenazy, lipooksygenazy i cytochromu P-450 oraz epoksygenaz jest coraz lepiej poznawane [59]. W aspekcie patogenezy miażdżycy warto zwrócić uwagę na powstawanie utlenionych metabolitów kwasu arachidonowego (arachidonic acid – AA): tromboksanu A_2 i F_2 izoprostanom. Kwas arachidonowy w dużej mierze podlega konwersji do prostaglandyn pod wpływem syntaz prostaglandyny G lub H. Enzymy te mają aktywność zarówno cyklooksygenazy, jak i hydroperoksydazy i nazywane są COX-1 i COX-2. Jakkolwiek w uszkodzeniach miażdżycowych wykazano ekspresję obu izoform, dojrzałe płytki krwi zawierają tylko COX-1. W wyniku działania COX-1 w płytkach krwi powstaje tromboksan A_2 . Promiażdżycowa rola tromboksanu A_2 , jako czynnika aktywującego agregację płytek i skurcz naczyń, jest dobrze znana. Wiadomo też, że ochronne działanie aspiryny w prewencji wtórnej chorób układu krążenia wiąże się z hamowaniem COX-1 i blokowaniem syntezy tromboksanu A_2 . Rola innych prostaglandyn znajdujących w miejscu uszkodzenia miażdżycowego pozostaje niepewna. Powszechnie znane jest korzystne działanie prostacykliny wytwarzanej przez komórki śródbłonna, jako hamowanie agregacji płytek, interakcji komórkowych, proliferacji mięśni gładkich i skur-

czu naczyń w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Stosowanie inhibitorów syntezy prostacykliny lub wykorzystanie myszy z brakiem receptora prostacykliny nie dostarczyło jednak dowodów na korzystne, przeciwmiażdżycowe działanie prostacykliny *in vivo*.

Ostatnio dużą uwagę poświęcono kolejnej prostaglandynie powstałej pod wpływem działania COX, 15-deoksy-D12,14-prostaglandynie J_2 . Prostaglandyna ta jest agonistą receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksyso-mów typu γ . Receptory te są obecne w uszkodzeniach miażdżycowych, a także hodowli komórek śródbłonna, mięśni gładkich naczyń, monocytów i makrofagów [41].

Stosunkowo niedawno zidentyfikowano nową klasę utlenionych pochodnych kwasu arachidonowego. Są to izoprostany F_2 . Powstają one w wyniku nieenzymatycznego ataku wolnych rodników na kwasy tłuszczowe fosfolipidów komórkowych lub należących do lipoprotein. Uwalnianie kwasów tłuszczowych następuje pod wpływem działania fosfolipaz. W warunkach *in vitro* 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ może powstawać także w wyniku działania COX-1 (w płytkach) oraz COX-2 (w monocytach). F_2 izoprostany krążą w osoczu i pojawiają się w moczu jako wolne związki lub zestryfikowane do fosfolipidów. Znalezione je w uszkodzeniach miażdżycowych w powiązaniu z monocytami i komórkami mięśni gładkich. Potencjalne znaczenie izoprostanów w powstawaniu miażdżycy wynika z badań w hodowlach komórkowych. Jest ono na tyle istotne, że izoprostany są uznane za przydatne w nieinwazyjnym monitorowaniu stresu oksydacyjnego. 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ indukuje agregację płytek, syntezę DNA w komórkach mięśni gładkich i skurcz naczyń. Podwyższone stężenie 8-izo-PGF $_{2\alpha}$ stwierdzono u osób palących papierosy, chorych na cukrzycę i u pacjentów z hipercholesterolemią, u których może służyć jako marker zwiększonej peroksydacji lipidów.

Kwas arachidonowy może być także utleniany przez 5-, 12- i/lub 15-lipooksygenazę do różnych jedno-, dwu- i trzy-hydroksypochodnych, nazywanych leukotrienami. Niektóre z nich są obecne w uszkodzeniach miażdżycowych. Leukotrieny mono-hydroksypochodne 12(S)- i 15(S)-HETE mogą być wytwarzane przez komórki śródbłonna. Pełnią one ważną rolę w początkowym stadium powstawania uszkodzenia miażdżycowego, indukując adhezję monocytów do powierzchni śródbłonna. W samym uszkodzeniu miażdżycowym powstają dwu-hydroksypochodne AA, czyli LTC4 i LTB4 [65]. LTC4 może powstawać w monocytach, makrofagach i komórkach śródbłonna, natomiast LTB4 powstaje w aktywowanych monocytach. Teoretycznie, LTC4 mogą promować skurcz naczyń, natomiast LTB4 może zwiększać przepuszczalność śródbłonna. LTB4 ma być także aktywatorem receptorów PPAR α , ale ta rola w powstawaniu miażdżycy jest raczej ochronna. Trzy-hydroksypochodne AA, tzw. lipoksyny, wykazują właściwości przeciwzapalne, chociaż prawdopodobnie mogą indukować chemotaksję monocytów.

Kolejnym losem AA istotnym w patogenezie miażdżycy jest konwersja do kwasów epoksy-eikozatrienowych (EETs). Kwasy te powstają albo w wyniku interakcji AA z wolnymi rodnikami, albo w wyniku reakcji enzymatycznej, w której pośredniczą monoooksygenazy cytochromu P 450. W hodowli komórek śródbłonna syntezę EETs indu-

kują LDL, a same EETs można znaleźć zarówno w LDL, jak i w uszkodzeniach miażdżycowych. Biologiczne działanie EETs to zarówno promowanie miażdżycy (zwiększanie adhezji monocytów), jak i działanie przeciwmiażdżycowe (rozszerzanie naczyń, zapobieganie agregacji płytek).

Przyjmowanie w diecie kwasów n-6, takich jak kwas linolenowy i kwasów n-3, np. olejów rybnych (kwasu eikozapentanowego) obniża stężenie cholesterolu w osoczu i zapobiega aktywacji płytek. Oleje rybne działają silniej w tym zakresie, a ponadto konkurencyjnie hamują syntezę trombosanu w płytkach, nie hamując syntezy prostacykliny w komórkach śródbłonna. Oleje te hamują także syntezę cytokin w monocytach, proliferację SMCs i adhezję monocytów. Ostatnio opublikowane wyniki badań wskazują na silne przeciwzapalne działanie tych kwasów [43]. Tak więc działanie oleju rybnego bogatego w kwasy n-3 wydaje się zdecydowanie chronić przed miażdżycą. Działanie kwasów n-6 nie jest jednoznaczne w odniesieniu do miażdżycy, a wyniki badań przeprowadzanych z udziałem pacjentów i zwierząt doświadczalnych są kontrowersyjne. Należy też pamiętać, że nadmiar kwasów zarówno n-3 jak i n-6 sprzyja peroksydacji lipidów. Enzymatyczne i nieenzymatyczne utlenianie kwasu linolenowego w pozycji *sn*-2 fosfolipidów LDL do 9- i 13- hydroksypochodnych jest głównym czynnikiem w utlenianiu tych lipoprotein.

5. FOSFOLIPIDY I MIAŻDŻYCA

Badania ostatnich lat wykazały ważną rolę fosfolipidów w biologii ściany naczyniowej i dostarczyły fascynujących przesłanek do dalszych badań nad patogenezą, monitorowaniem i prognozowaniem miażdżycy i jej powikłań. Niektóre z tych badań wskazują na nowe możliwości terapeutyczne. Fosfolipidy tworzą zewnętrzną, pojedynczą warstwę lipoprotein i komórek. W lipoproteinach warstwa ta stanowi amfipatyczne łącznie między lipidowym, obojętnym rdzeniem lipoprotein i zewnętrznym środowiskiem wodnym. Stanowi także strukturalny fundament dla różnych apolipoprotein [70]. Fosfolipidy lipoprotein ulegając peroksydacji czynią te lipoproteiny podatnymi na wychwyty przez receptory zmiatające makrofagów.

Fosfolipidy wchodzące w skład błon komórkowych (jest to głównie fosfatydylocholina), stanowią nie tylko mechanizm konstrukcyjny błon, ale także są prekursorami cząsteczek sygnalizacyjnych powstających pod wpływem fosfolipazy i uczestniczą w torach sygnalizacyjnych istotnych w aterogenezie. Dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania białek błonowych konieczne jest utrzymanie odpowiedniego stosunku zawartości cholesterolu do zawartości fosfolipidów w uszkodzonych komórkach. Komórki piankowe bogate w cholesterol, izolowane z uszkodzenia miażdżycowego, zawierają wewnątrzkomórkowe fosfolipidy o strukturze spiralnej. Synteza komórkowych fosfolipidów jest w tych regionach ściany naczyń zwiększona. W badaniach *in vitro* wykazano, że wolny cholesterol, obecny w nadmiarze w makrofagach, aktywując cytydyltransferazę CTP: fosfocholinową, zwiększa biosyntezę fosfatydylocholino oraz jej masę. Jest to reakcja adaptacyjna w odpowiedzi na nadmiar cholesterolu w komórce, co potwierdzono w komórkach z genetycznie indukowanym defektem cytydyltransferazy α w makrofagach [65]. Aktywacja biosyntezy fosfatylocholino w uszkodzonych

makrofagach pomaga chronić te komórki przed toksycznym działaniem nadmiaru cholesterolu.

Komórkowe fosfolipidy, szczególnie fosfatydyloinozytol i fosfolipidy zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji *sn*-2, są prekursorami cząsteczek sygnalizacyjnych. Należą do nich diacylglicerol i trójfosforan inozytolu powstałe pod wpływem hydrolizy fosfatydyloinozytolu przez swoistą dla fosfatydyloinozytolu fosfolipazę C, kwas fosfatydowy powstały w wyniku hydrolizy przez fosfolipazę D oraz kwasy tłuszczowe i lizofosfatydylocholina powstałe pod wpływem działania fosfolipazy A₂.

Diacylglicerol aktywuje kinazę proteinową C, a trójfosforan inozytolu powoduje uwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia. Obie te reakcje biorą udział w różnych torach procesów sygnalizacyjnych (np. odpowiedzi na cytokiny i czynniki wzrostu), prowadzących do uszkodzenia komórek mięśni gładkich, makrofagów i komórek śródbłonna. W hodowli SMC utlenione LDL aktywują fosfolipazę D w mechanizmie, w którym pośredniczy kinaza tyrozyny, a kwas fosfatydowy może naśladować proliferacyjne działanie utlenionych LDL w tych komórkach [46].

Uwzględniając znaczenie apoptozy w miażdżycy, najważniejszym fosfolipidem może się okazać fosfatydyloseryna. Jest ona składnikiem wewnętrznej warstwy błon plazmatycznych, ale podczas apoptozy wydostaje się na zewnątrz komórki i działa jako sygnalizator rozpoznający ligand fagocytów. Wykazano, że receptory (CD36 i receptor B-1) makrofagów podlegających apoptozie są receptorami zarówno oxy-LDL, jak i fosfatydyloseryny. Oxy-LDL mogą więc hamować fagocytozę i oczyszczanie z komórek apoptotycznych w uszkodzeniach miażdżycowych.

Sfingomielina jest ważnym składnikiem pojedynczych warstw fosfolipidowych zarówno uszkodzonych lipoprotein jak i uszkodzonych komórek obecnych w zmianach miażdżycowych. Hydroliza sfingomieliny LDL do ceramidów w środowisku pozakomórkowym *in vitro* prowadzi do agregacji i fuzji LDL, które tworzą konglomeraty bardzo podobne do znajdujących w przestrzeni podśródkowej uszkodzenia miażdżycowego. Enzymem odpowiedzialnym za to zjawisko *in vivo* jest S-sfingomielinaza [66], uwalniana przez komórki śródbłonna i makrofagi. Enzym ten działa tym skuteczniej, im większy jest stosunek zawartości sfingomieliny do fosfolipidów. Agregacja i fuzja LDL jest następstwem wytwarzania wodnych połączeń między sąsiadującymi cząsteczkami LDL. Tworzenie agregatów sprzyja retencji LDL w środowisku pozakomórkowym, ale przede wszystkim ułatwia wychwytywanie LDL przez makrofagi i SMC. Zawartość sfingomieliny w cząsteczkach LDL może więc determinować tempo powstawania komórek piankowatych. Rzeczywiście, wykazano zaskakująco dużą zawartość sfingomieliny i ceramidów w uszkodzeniach miażdżycowych. Wykazano także wysoki stosunek zawartości sfingomieliny do fosfolipidów w LDL krążących w osoczu u osób z miażdżycą. Stosunek ten jest obecnie uważany za niezależny czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca [26].

Sfingomielina jest składnikiem budującym zewnętrzną warstwę cząsteczek także innych lipoprotein, w tym bogatych w trójglicerydy oraz HDL. Ponieważ wiąże cholesterol,

może zwiększać zdolność HDL do działania jako zewnątrzkomórkowy akceptor cholesterolu wypływającego z komórki. Może również hamować wiązanie acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej z cząsteczkami lipoprotein, a to działanie może osłabiać korzystny wpływ sfingomieliny HDL na wypływ cholesterolu z komórki w procesie transportu zwrotnego [28].

Sfingomielina wchodząca w skład błon komórkowych może także odgrywać istotną rolę w patogenezie miażdżycy. Ponieważ ma dużą zdolność do wiązania cholesterolu, od miejsc wewnątrzkomórkowych bogatych w sfingomielinę zależą kierunki wewnątrzkomórkowego transportu cholesterolu pochodzącego z internalizowanych oksy-LDL i dostępność tego cholesterolu dla ACAT, czyli skuteczność jego estryfikacji. Synteza sfingomieliny w makrofagach obciążonych wolnym cholesterolem wzrasta, co może być wynikiem adaptacji komórki do nadmiaru wolnego cholesterolu.

Inna rola sfingomieliny komórkowej w powstawaniu miażdżycy jest związana z jej udziałem w przekazywaniu sygnałów w komórce [31]. Powstające ze sfingomieliny ceramidy (w wyniku hydrolizy przez obojętną lub kwaśną sfingomielinazę) są cząsteczkami toru sygnalizacyjnego proliferacji komórek mięśni gładkich, a także apoptozy SMCs i apoptozy makrofagów. W tym kontekście, istotną rolę odgrywa nie tylko synteza ceramidów, ale także ich hydroliza przez komórkowe ceramidazy. Powstała pod wpływem ceramidazy sfingozyna może być fosforylowana do sfingozyno-1-fosforanu, który jest kolejną cząsteczką sygnalizacyjną, blokującą np. migrację naczyń SMC, indukowaną przez płytkowopochodny czynnik wzrostu [31,51].

Ceramidy mogą podlegać także konwersji przez transferazy cukrowe, tworząc glikosfingolipidy. Należą do nich glikosfingolipidy obojętne, takie jak glikozyloceramid i laktozyloceramid (LacCer) oraz glikosfingolipidy polarne, takie jak gangliozydy, zawierające ceramid, cukier i kwas sialowy i/lub kwas N-glikoneuraminowy. Glikosfingolipidy są znajdowane zarówno w lipoproteinach krążących w osoczu, jak i w komórkach oraz w uszkodzeniach miażdżycowych. Prawdopodobnie odgrywają one ważną rolę w powstawaniu miażdżycy. LacCer jest obecny w komórkach ściany naczyń: komórkach śródbłonna, mięśni gładkich, makrofagach, neutrofilach, płytkach i monocytach. W dużych ilościach zgromadzony jest w nacieczeniach tłuszczowych oraz blaszkach miażdżycowych, zarówno w stadium początkowym, jak i w zaawansowanych zmianach przesyconych związkami wapnia [12,27]. W badaniach *in vitro* wykazano udział laktozyloceramidu w proliferacji SMC indukowanej przez oksy-LDL, ale także stymulujący wpływ laktozyloceramidu na proliferację SMC bez obecności oksy-LDL. Utlenione LDL stymulują syntezę endogennego LacCer aktywując swoistą β 1-4gal transferazę (GalT-2). Na tej podstawie założono, że laktozyloceramid działa jako drugi czynnik sygnalizacyjny w komórce. Kolejne badania wykazały, że LacCer działa przez aktywację oksydazy NADPH zapoczątkowując kaskadę sygnalizacyjną wyzwalaną przez rodniki nadtlenkowe i wciągając aktywację Ras i kinazy proteinowej aktywowanej przez mitogen p44 (p44MAPK; p44 mitogen-activated protein kinase). Fosforylowana postać tej ostatniej przenosi się z cytoplazmy do jądra i włącza się w ekspresję c-fos, namnażanie antygenów jądra komórkowego (np.

aktywację cykliny) i proliferację komórek. Z kolei N-heksanol-D-erytro-sfingozyna, należąca do grupy C-6 ceramidów, aktywując NADPH w komórkach śródbłonna żyły pępowinowej człowieka, jednocześnie w mechanizmie upregulation stymuluje syntezę mRNA dla śródbłonkowej syntazy tlenu azotu i ekspresję tego enzymu. Wydaje się jednak, że wzrost aktywności NOS w tym mechanizmie jest niewystarczający, by zapobiegać promiażdżycowemu działaniu ceramidów [33]. Istotne znaczenie w aktywacji toru sfingomielina/ceramidy i proliferacji komórek mięśni gładkich w ścianie naczyń mają odgrywać metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano to w odniesieniu do proliferacji SMC indukowanej przez utlenione LDL [2].

W innych badaniach wykazano, że w komórkach śródbłonna LacCer pośredniczy w indukowanej przez TNF alfa ekspresji czynnika jądrowego kappa B i ekspresji międzykomórkowej cząstki adhezyjnej (intercellular adhesion molecule ICAM-1). Odbywa się to drogą transkrypcyjną zależną od aktywności red-ox. LacCer pośredniczy także w wytwarzaniu wolnych rodników tlenowych przez siły mechaniczne działające na ścianę naczyń w związku z przepływem krwi [75]. Laktozyloceramid stymuluje także ekspresję CD11/CD8 lub Mac-1 na powierzchni ludzkich neutrofilów. Zjawisko to może uczestniczyć w adhezji neutrofilów lub monocytów do powierzchni śródbłonna i inicjować w ten sposób proces miażdżycowy. Z kolei przebiegająca z udziałem LacCer proliferacja komórek mięśni gładkich ściany naczyń może uczestniczyć w progresji miażdżycy. Jednak programowana śmierć komórki, stymulowana przez prozapalne cytokiny (TNF alfa, interleukina 1), duże stężenia oksy-LDL czy tzw. minimalnie zmodyfikowane LDL (mmLDL), według niektórych autorów następuje przez aktywację obojętnej sfingomielinazy związanej z błonami komórkowymi i hydrolizę sfingomieliny do ceramidów i fosfocholiny [13,37]. Według innych, apoptoza indukowana przez oksy-LDL zachodzi poza szlakiem sfingomielina-ceramidy i różni się od niej zależnością od jonów wapnia [20]. Prawdopodobnie różnice te wynikają z typu komórek i rodzaju bodźca [17]. I tak w komórkach mięśni gładkich aorty ludzkiej obojętna sfingomielinaza stymuluje apoptozę zachodzącą za pośrednictwem TNF alfa, natomiast nie stymuluje jej w ludzkich hepatocytach. Działanie w aorcie polega na „multioligomeryzacji” tzw. domen śmierci. W odniesieniu do blaszki miażdżycowej, aktywacja obojętnej sfingomielinazy i w następstwie apoptozy, może być decydującym czynnikiem w zapoczątkowaniu pęknięcia blaszki i w konsekwencji zawału serca lub udaru mózgu. Z kolei w wątrobie, aktywowana za pośrednictwem TNF alfa sfingomielinaza, stymuluje dojrzewanie białka wiążącego element regulujący sterole (sterol regulatory element binding protein; SREBP-1).

Postępy w zrozumieniu metabolicznych i czynnościowych zależności między biologicznie aktywnymi fosfolipidami i sfingomielinowym torem przekazywania sygnałów w komórce opierają się na coraz lepszym poznaniu mechanizmów apoptozy w makrofagach. Wytwarzanie ceramidów zostało uznane za niezbędny i wczesny etap programowanej śmierci komórki. Obecnie wiadomo, że ceramidy są wytwarzane w różnych układach i w wyniku różnych mechanizmów. Powstają w następstwie aktywacji sfingomielinaz w błonach komórkowych, lizosomalnych, jądrowych i mi-

tochondrialnych, a także wytwarzane są *de novo*. Działanie ceramidów w apoptozie polega na stymulacji gromadzenia się tzw. receptorów śmierci w błonach komórkowych, zapobieganiu aktywacji kinazy proteinowej B/Akt i promowaniu aktywacji kaspazy 3 [61].

Poza udziałem ceramidów w proliferacji, adhezji i apoptozie, wielu autorów zakłada udział metabolitów sfingomieliny także w różnicowaniu komórek, ich wzroście, skurczu, migracji i retrakcji [3,32]. Ale nawet niezależnie od udziału ceramidów w procesach związanych z miażdżycą, modyfikowanie przez ceramidy procesów, takich jak proliferacja komórek i apoptoza, nie może pozostać obojętne dla funkcji i reaktywności ściany naczyń na różnorodne bodźce wewnątrzprochodne. Tak więc powstająca obecnie wiedza o znaczeniu ceramidów w przekazywaniu sygnałów może dostarczyć punktów docelowych dla zapobie-

gania i terapii nie tylko miażdżycy, ale też nadciśnienia tętniczego, procesu tworzenia naczyń czy uszkodzenia niedokrwiennego i reperfuzyjnego.

Uważa się, że zwiększanie zawartości komórkowych ceramidów służy hamowaniu wzrostu komórek i promowaniu apoptozy. Przeciwnie, redukcja ceramidów osłabia apoptozę i sprzyja proliferacji komórek. Korzystne dla układu krążenia przeciwutleniające działanie polifenoli, może być związane z ich oddziaływaniem na ceramidowe tory sygnalizacyjne w komórce [44]. Niedawno wykazano, że powleczenie ceramidami cewnika balonowego stosowanego w przezskórnej angioplastyce naczyń wieńcowych serca, ogranicza wzrost komórek mięśni gładkich po zabiegu [10].

Podsumowanie roli poszczególnych lipidów w patogenezie miażdżycy przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Rola lipidów w powstawaniu miażdżycy [65]

Lipidy	Działanie w miażdżycy	Przykłady
Wolny cholesterol (FC)	gromadzenie w makrofagach różnicowanie makrofagów i SMCs, włączając regulację genów i śmierć komórek	stymulacja ACAT tłumienie transkrypcji genu receptora LDL śmierć makrofagów indukowana przez FC
Estry cholesterolu (CE)	gromadzenie w makrofagach i SMCs substraty do utleniania	tworzenie komórek piankowych wodorotlenek linoleinianu cholesterolu jako prooksydant
Oksysterole	regulacja metabolizmu cholesterolu w komórce działanie cytotoksyczne drogi wypływu steroli aktywacja jądrowych czynników transkrypcji	stymulacja ACAT śmierć makrofagów indukowana przez 7K wypływ 270H aktywacja LXR przez 220H
Trójglicerydy	źródło kwasów tłuszczowych oddziaływanie na płynność kropelek lipidów w komórkach piankowych	transformacja kropelek lipidowych w komórkach piankowych z krystalicznych w płynne
Kwasy tłuszczowe	stymulacja syntezy CE, trójglicerydów i fosfolipidów, źródło ROS wielonienasycone kwasy tłuszczowe są źródłem bioaktywnych eikozanoidów	tromboksan A ₂ → agregacja płytek izoprostany → proliferacja SMCs
Fosfolipidy (poza sfingolipidami)	rola strukturalna w lipoproteinach i komórkach uszkodzenia miażdżycowego źródło cząsteczek sygnalizacyjnych substrat do oksydacyjnej modyfikacji do cząstek bioaktywnych	częściowo odpowiedź adaptacyjna wobec cytotoksycznego działania FC lizofosfatydylocholina → chemotaksja monocytów utlenione fosfolipidy → indukcja cząstek adhezyjnych w śródbłonku
Sfingolipidy	źródło cząsteczek sygnalizacyjnych udział w agregacji lipoprotein wpływ na wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu	ceramidy → proliferacja i śmierć komórek w uszkodzeniu miażdżycowym agregacja LDL indukowana przez sfingomielinazę laktozyloceramidy → proliferacja SMCs

FC – wolny cholesterol; SMCs – komórki mięśni gładkich; CE – estry cholesterolu; ACAT – acylotransferaza acylo-CoA: cholesterol; LXR – wątrobowy receptor X; ROS – reaktywne formy tlenu; 7K, 270H, 220H – oksysterole

PIŚMIENNICTWO

- [1] Antonio V., Janvier B., Brouillet A., Andreani M., Raymondjean M.: Oxysterol and 9-cis-retinoic acid stimulate the group IIA secretory phospholipase A2 gene in rat smooth-muscle cells. *Biochem. J.*, 2003; 376: 351–360
- [2] Auge N., Maupas-Schwalm F., Elbaz M., Thiers J.C., Waysort A., Itohara S., Krell H.W., Salvayre R., Negre-Salvayre A.: Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 2004; 110: 571–578
- [3] Auge N., Negre-Salvayre A., Salvayre R., Levade T.: Sphingomyelin metabolites in vascular cell signaling and atherogenesis. *Prog. Lipid Res.*, 2000; 39: 207–229
- [4] Austin M.A.: Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb.*, 1991; 11: 2–14
- [5] Aviram M., Rosenblat M.: Phospholipase A2 and phospholipase D are involved in macrophage NADPH oxidase-mediated oxidation of low density lipoprotein. *Isr. J. Med. Sci.*, 1996; 32: 749–756

- [6] Biasi F, Leonarduzzi G., Vizio B., Zanetti D., Sevanian A., Sottero B., Verde V., Zingaro B., Chiarotto E., Poli G.: Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *FASEB J.*, 2004; 18: 693–695
- [7] Bjorkhem I., Andersson O., Diczfalusy U., Sevastik B., Xiu R.J., Duan C., Lund E.: Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994; 91: 8592–8596
- [8] Blanchette-Mackie E.J.: Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1486: 171–183
- [9] Bottiger L.E., Carlson L.A. 1980: Risk factors for ischaemic vascular death for men in the Stockholm prospective study. *Atherosclerosis*, 1980; 36: 389–408
- [10] Bourbon N.A., Sandirasegarane L., Kester M.: Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implications for growth arrest. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 3286–3292
- [11] Carpenter K.L., Wilkins G.M., Fussell B., Ballantine J.A., Taylor S.E., Mitchinson M.J., Leake D.S.: Production of oxidized lipids during modification of low density lipoprotein by macrophages or copper. *Biochem. J.*, 1994; 304: 625–633
- [12] Chatterjee S.: Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 1523–1533
- [13] Chatterjee S.: Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem. Phys. Lipids*, 1999; 102: 79–96
- [14] Chisolm G.M., Steinberg D.: The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 1815–1826
- [15] Chung B.H., Tallis G., Yalamoori V., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P.: Liposome-like particles isolated from human atherosclerotic plaques structurally and compositionally similar to surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler. Thromb.*, 1994; 14: 622–635
- [16] Claudel T., Leibowitz M.D., Fievet C., Tailleux A., Wagner B., Repa J.J., Torpier G., Lobaccaro J.M., Paterniti J.R., Mangelsdorf D.J., Heyman R.A., Auwerx J.: Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 2610–2615
- [17] Claus R., Russwurm S., Meisner M., Kinscherf R., Deigner H.P.: Modulation of the ceramide level, a novel therapeutic concept? *Curr. Drug Targets*, 2000; 1: 185–205
- [18] Connelly P.W., Maguire G.F., Vezina C., Hegele R.A., Kuksis A.: Kinetics of lipolysis of very low density lipoproteins by lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 20554–20560
- [19] Craig W.Y., Poulin S.E., Palomaki G.E., Neveux L.M., Ritchie R.F., Ledue T.B.: Oxidation-related analytes and lipid and lipoprotein concentrations in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995; 15: 733–739
- [20] Escargueil-Blanc I., Andrieu-Abadie N., Caspar-Bauguil S., Brossmer R., Levade T., Negre-Salvayre R.: Apoptosis and activation of the sphingomyelin-ceramide pathway induced by oxidized low density lipoproteins are not causally related in ECV-304 endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 27389–27395
- [21] Geng Y.J., Phillips J.E., Mason R.P., Casscells S.W.: Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis: implication for atherosclerotic plaque instability and rupture. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 1485–1492
- [22] Goldberg I.J.: Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid. Res.*, 1996; 37: 693–707
- [23] Gu F., Gruenberg J.: Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett.*, 1999; 452: 61–66
- [24] Hallman D.M., Brown S.A., Ballantyne C.M., Sharrett A.R., Boerwinkle E.: Relationship between low-density lipoprotein subclasses and asymptomatic atherosclerosis in subjects from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Biomarkers*, 2004; 9: 190–202
- [25] Ho Y.K., Brown M.S., Goldstein J.L.: Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J. Lipid Res.*, 1980; 21: 391–398
- [26] Jiang X.C., Paultre F., Pearson T.A., Reed R.G., Francis C.K., Lin M., Berglund L., Tall A.R.: Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20: 2614–2618
- [27] Johns D.G., Charpie J.R., Webb R.C.: Is ceramide signaling a target for vascular therapeutic intervention? *Curr. Pharm. Des.*, 1998; 4: 481–488
- [28] Jonas A.: Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog. Lipid Res.*, 1998; 37: 209–234
- [29] Joseph S.B., Tontonoz P.: LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2003; 3: 192–197
- [30] Kharbanda R.K., Wallace S., Walton B., Donald A., Cross J.M., Deanfield J.: Systemic Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces inflammation and improves vascular function in hypercholesterolaemia. *Circulation*, 2005; 111: 804–807
- [31] Kolesnick R.: The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J. Clin. Invest.*, 2002; 110: 3–8
- [32] Levade T., Auge N., Veldman R.J., Cuvillier O., Negre-Salvayre A., Salvayre R.: Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ. Res.*, 2001; 89: 957–968
- [33] Li H., Junk P., Huwiler A., Burkhardt C., Wallerath T., Pfeilschifter J., Forstermann U.: Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2002; 106: 2250–2256
- [34] Liscum L.: Cholesterol biosynthesis. W: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition, red.: D.E. Vance, J.E. Vance. Elsevier, Amsterdam, 2002; 409–431
- [35] Llorente-Cortes V., Badimon L.: LDL receptor-related protein and the vascular wall: implication for atherothrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25: 497–504
- [36] Llorente-Cortes V., Martinez-Gonzalez J., Badimon L.: Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 738–746
- [37] Loidl A., Claus R., Ingolic E., Deigner H.P., Hermetter A.: Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1690: 150–158
- [38] Mack W.J., Krauss R.M., Hodis H.N.: Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). Treatment effects and relation to coronary angiographic progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996; 16: 697–704
- [39] Maor I., Mandel H., Aviram M.: Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-ketocholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995; 15: 1378–1387
- [40] Martinet W., De Bie M., Schrijvers D.M., De Meyer G.R., Herman A.G., Kockx M.M.: 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 2296–2301
- [41] Marx N., Duez H., Fruchart J.C., Staels B.: Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ. Res.*, 2004; 94: 1168–1178
- [42] Millanvoye-Van Brussel E., Topal G., Brunet A., Do Pham T., Deckert V., Rendu F., David-Duflho M.: Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca²⁺ signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase A₂. *Biochem. J.*, 2004; 380: 533–539
- [43] Mori T.A., Beilin L.J.: Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2004; 6: 461–467
- [44] Nardini M., Leonardi F., Scaccini C., Virgili F.: Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 722–733
- [45] Naureckiene S., Sleat D.E., Lackland H., Fenson A., Vanier M.T., Wattiaux R., Jadot M., Lobel P.: Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*, 2000; 290: 2298–2301
- [46] Parthasarathy S., Santanam N.: Mechanism of oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1994; 5: 371–375
- [47] Pedruzzi E., Guichard C., Ollivier V., Driss F., Fay M., Prunet C., Marie J.C., Pouzet C., Samadi M., Elbim C., O'dowd Y., Bens M., Vandewalle A., Gougerot-Pocidallo M.A., Lizard G., Ogier-Denis E.: NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 10703–10717
- [48] Pentchev P.G., Blanchette-Mackie E.J., Dawidowicz E.A.: The NP-C gene: a key to pathways of intracellular cholesterol transport. *Trends Cell Biol.*, 1994; 4: 365–369
- [49] Quinet E.M., Savio D.A., Halpern A.R., Chen L., Miller C.P., Nambi P.: Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J. Lipid Res.*, 2004; 45: 1929–1942
- [50] Rapp J.H., Lespine A., Hamilton R.L., Colyvas N., Chaumeton A.H., Tweedie-Hardman J., Kotite L., Kunitake S.T., Havel R.J., Kane J.P.: Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler. Thromb.*, 1994; 14: 1767–1774

- [51] Ross R.: Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1995; 57: 791–804
- [52] Rowe A.H., Argmann C.A., Edwards J.Y., Sawyez C.G., Morand O.H., Hegele R.A., Huff M.W.: Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene: lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation. *Circ. Res.*, 2003; 93: 717–725
- [53] Salonen J.T., Salonen R., Seppanen K., Kantola M., Suntioinen S., Korpela H.: Interaction of serum copper, selenium and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *Brit. Med. J.*, 1991; 302: 756–760
- [54] Salonen J.T., Ylä-Herttuala S., Yamamoto R., Butler S., Korpela H., Salonen R., Nyyssonen K., Palinski W., Witztum J.L.: Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992; 339: 883–887
- [55] Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H., Freeman L, Wagner E, Nong Z. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1750–1754
- [56] Shanahan C.M., Carpenter K.L., Cary N.R.: A potential role for sterol 27-hydroxylase in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2001; 154: 269–276
- [57] Simpson H.C., Mann J.I., Meade T.W., Chakrabarti R., Stirling Y., Woolf L.: Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. *Lancet*, 1983; 1: 786–790
- [58] Skoczyńska A., Andrzejak R.: Peroksydacja lipidów w patogenezie miażdżycy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1997; 5: 515–529
- [59] Smith W.L., Murphy R.C.: The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. W: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition, red.: D.E. Vance, J.E. Vance. Elsevier, Amsterdam, 2002; 341–371
- [60] Sposito A.C., Ventura L.I., Vinagre C.G., Lemos P.A., Quintella E., Santos R.D., Carneiro O., Ramires J.A., Maranhao R.C.: Delayed intravascular catabolism of chylomicron-like emulsion is an independent predictor of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2004; 176: 397–403
- [61] Steinbrecher U.P., Gomez-Munoz A., Duronio V.: Acid sphingomyelinase in macrophage apoptosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2004; 15: 531–537
- [62] Szapary P.O., Rader D.J.: The triglyceride-high-density lipoprotein axis: an important target of therapy? *Am. Heart J.*, 2004; 148: 211–221
- [63] Tabas I.: The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1995; 6: 260–268
- [64] Tabas I.: Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1529: 164–174
- [65] Tabas I.: Lipids and atherosclerosis. W: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition, red.: D.E. Vance, J.E. Vance. Elsevier, Amsterdam, 2002; 573–597
- [66] Tabas I., Li Y., Brocia R.W., Xu S.W., Swenson T.L., Williams K.J.: Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 20419–20432
- [67] Tardif J.C., Gregoire J., L'Allier P.L., Anderson T.J., Bertrand O., Reeves F., Title L.M., Alfonso F., Shampaert E., Hassan A., McLain R., Pressler M.L., Ibrahim R., Lesperance J., Blue J., Heinson T., Rodes-Cabau J., for the Avasimibe and Progression of Lesions on UltraSound (A-PLUS) Investigators: Effects of the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2004; 110: 3372–3377
- [68] Tontonoz P., Mangelsdorf D.J.: Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.*, 2003; 17: 985–993
- [69] Tsutsumi K.: Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2003; 1: 11–17
- [70] Vance D.E.: Phospholipid biosynthesis in eucariotes. W: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition, red.: D.E. Vance, J.E. Vance. Elsevier, Amsterdam, 2002; 205–232
- [71] Welin L., Eriksson H., Larsson B., Ohlson L.O., Svardsudd K., Tibblin G., Wilhelmsen L.: Triglycerides, a major coronary risk factor in elderly men. A study of men born in 1913. *Eur. Heart J.*, 1991; 12: 700–704
- [72] Wilhelm M.G., Cooper A.D.: Induction of atherosclerosis by human chylomicron remnants: a hypothesis. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2003; 10: 132–139
- [73] Wilson P.W.F., Anderson K.M., Castelli W.P.: The impact of triglycerides on coronary heart disease. *Atherosclerosis Rev.*, 1991; 22: 59–63
- [74] Witztum J.L., Hökkö S.: The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological response and anti-phospholipid antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1997; 811: 88–96
- [75] Yeh L.H., Kinsey A.M., Chatterjee S., Alevriadou B.R.: Lactosylceramide mediates shear-induced endothelial superoxide production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Vasc. Res.*, 2001; 38: 551–559