

A role for phospholipid oxidation products as modulators of inflammatory reactions in atherogenesis

Rola produktów oksydacji fosfolipidów w modulowaniu reakcji zapalnej w powstawaniu miażdżycy

Norbert Leitinger

Department of Vascular Biology and Thrombosis Research, University of Vienna, Austria (Zakład Biologii Naczyń i Badań nad Zakrzepicą, Uniwersytet w Wiedniu)

Abstract

In 1990 Berliner et al. demonstrated that LDL that had been mildly oxidized by prolonged storage or using iron had unique properties different from those of native and oxidized LDL (oxLDL). This LDL was called minimally oxidized or minimally modified LDL (MM-LDL) and shown to have unique bioactivity such as: induction of monocyte-endothelial interactions, expression of MCP-1, monocyte transmigration. 1-palmitoyl-2-archidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC) is an arachidonic acid-containing phospholipid especially prone to oxidation. Biologically active oxidized derivatives of PAPC were identified as 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) and 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) and epoxyisoprostan PC. Upon stimulation with various agonists or lipid oxidation, eukaryotic cells release membrane vesicles (MV) into the extracellular space due to increase in intracellular calcium and loss of membrane asymmetry. Membrane vesicles are also carriers of the bioactive lipids. Oxidized lipids may inhibit acute, but promote chronic inflammation. There is evidence that LPS-induced NF κ B-mediated inflammation is down regulated by OxPAPC. Oxidized phospholipids increase synthesis of EGR-1. EGR-1 is known to be up regulated by growth factors, cytokines, hypoxia, physical forces and injurious stimuli, and high levels of EGR-1 were found in atherosclerotic lesions. EGR-1 up-regulates expression of TF. In contrast to the up-regulation of proinflammatory genes, oxidized phospholipids were also shown to induce the expression of protective enzymes such as HO-1, which is the rate-limiting enzyme in heme-catabolism and has antioxidative capacity. Thus, identification of mechanisms and signaling pathways induced by oxidized lipids that modulate inflammatory response in the vascular wall will lead to novel strategies of therapeutic intervention in chronic inflammatory diseases.

Streszczenie

Berliner i wsp. wykazali w 1990 r., że LDL umiarkowanie oksydowane przez wydłużone przechowywanie lub reakcją z jonami żelaza charakteryzują się specyficznymi właściwościami, odmiennymi od natywnych i oksydowanych LDL. Lipidy te zostały nazwane minimalnie zmodyfikowanymi lub minimalnie oksydowanymi (MM-LDL). Mają one specyficzną aktywność biologiczną wyrażoną przez: indukcję oddziaływań monocytów i śródbłonna, zwiększenie ekspresji MCP-1, transmigracji monocytów oraz wzmagania ekspresji genów wczesnej odpowiedzi (JE, KC, c-myc) w komórkach fibroblastów mysich. Związek 1-palmitoil-2-archidonoil-sn-glicero-3-fosfocholina (PAPC) to fosfolipid zawierający resztę arachidonową, szczególnie podatny na oksydację. Zidentyfikowane pochodne PAPC o aktywności biologicznej to: 1-palmitoil-2-(5-oksowaleryl)-sn-glicero-3-fosfocholina (POVPC) i 1-palmitoil-2-glutaryl-sn-glicero-3-fosfocholina (PGPC) oraz epoksyizoprostan-PC.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

PhD, Norbert Leitinger, Department of Vascular Biology and Thrombosis Research, University of Vienna, Schwarzschanerstrasse 17, A-1090 Vienna, Austria

tel: +43 1 4277 62507, fax: +43 1 4277 9625, e-mail: norbert.leitinger@univie.ac.at

Komórki eukariotyczne pod wpływem stymulacji różnymi czynnikami lub oksydacji lipidów, w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i utraty asymetrii błony, uwalniają do przestrzeni pozakomórkowej pęcherzyki błonowe (MV). Pęcherzyki te są przenośnikami lipidów aktywnych biologicznie. Wydaje się, że oksydowane lipidy mogą hamować ostry stan zapalny, a nasilać przewlekły. Istnieją dowody, że stan zapalny indukowany przez LPS, zależny od NFκB, jest hamowany przez OxPAPC. Oksydowane fosfolipidy zwiększają syntezę EGR-1. Nasilona ekspresja EGR-1 jest obecna w blaszkach miażdżycowych, a indukują ją czynniki wzrostu, cytokiny, hipoksja, siły mechaniczne i czynniki uszkodzające. EGR-1 zwiększa natomiast ekspresję TF. Wykazano również, że oksydowane fosfolipidy poza zwiększaniem stężenia czynników prozapalnych nasilają ekspresję enzymów protekcyjnych, takich jak HO-1. Enzym ten jest kluczowym, regulacyjnym enzymem katabolizmu hemu, wykazujący działanie antyoksydacyjne. Podsumowując, wyjaśnienie mechanizmów i szlaków przekazywania sygnału indukowanych przez oksydowane lipidy, regulujących odpowiedź zapalną w ścianie naczynia, będzie prowadzić do nowych sposobów interwencji leczniczej w chorobach związanych z przewlekłym odczynem zapalnym.

Introduction

Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) is thought to play a major role in atherogenesis [1, 2]. While unoxidised (native) LDL plays a physiologic role in lipid metabolism, oxidised LDL (oxLDL) is thought to cause pathologic changes in the vessel wall and oxidised lipids are likely to be involved in settings of general inflammation [3]. Moreover, oxLDL has been isolated from atherosclerotic aorta and lipid oxidation products have been detected immunohistochemically in atherosclerotic lesions. In the development of chronic inflammatory diseases a role for oxidised lipids has been implicated and autoantibodies against lipid oxidation products have been detected in patients with atherosclerosis, diabetes, hypertension, rheumatoid arthritis and preeclampsia [4].

In 1990 Berliner et al. demonstrated that LDL that had been mildly oxidised by prolonged storage or using iron had unique properties different from those of native and oxLDL. This LDL was called minimally oxidised or minimally modified LDL (MM-LDL) and shown to induce monocyte-endothelial interactions, a key event in the formation of the atherosclerotic lesion [5].

MM-LDL and monocyte transmigration and differentiation

MM-LDL stimulates production of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in endothelial cells and smooth muscle cells [5] leading to monocyte transmigration into the subendothelial space, as determined by a transmigration assay using cocultures of vascular endothelial cells and smooth muscle cells. In addition, it was shown that MM-LDL had the potential to stimulate the maturation of monocytes into macrophages by inducing the synthesis of macrophage colony stimulating factor (MCSF) [6]. MCSF and MCP-1

Wstęp

Modyfikacja oksydacyjna lipoprotein o małej gęstości (LDL, *low-density lipoprotein*) pełni istotną rolę w powstawaniu miażdżycy [1, 2]. Podczas gdy natywne (nieoksydowane) LDL spełniają istotną funkcję w metabolizmie lipidów, oksydowane LDL (oxLDL, *oxidised LDL*) najprawdopodobniej wiążą się z uogólnionymi stanami zapalnymi i powodują patologiczne zmiany w ścianie naczynia [3]. Ponadto, oksydowane LDL izolowane z aorty objętej miażdżycą, a produkty oksydacji lipidów wykrywano immunohistochemicznie w blaszkach miażdżycowych. Uważa się, że oksydowane lipidy pełnią ważną rolę w chorobach z przewlekłym procesem zapalnym. Autoprzeciwiactwa skierowane przeciw oxLDL wykrywano u chorych z miażdżycą, cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, reumatoidalnym zapaleniem stawów i stanem przedrzucawkowym [4].

W 1990 r. Berliner i wsp. wykazali, że LDL podlegające umiarkowanej oksydacji w czasie dłuższego przechowywania lub pod wpływem żelaza charakteryzują się wyjątkowymi cechami odróżniającymi je zarówno od natiwnych, jak i oxLDL. Takie właśnie LDL nazwano minimalnie oksydowanymi lub minimalnie modyfikowanymi LDL (MM-LDL, *minimally modified LDL*). Wykazano, że wywołują one interakcję monocytów z komórkami śródbłonna, co wydaje się kluczowym czynnikiem powstawania blaszki miażdżycowej [5].

MM-LDL a transmigracja i różnicowanie monocytów

W testach transmigracji przy użyciu wspólnej hodowli śródbłonna i mięśni gładkich naczyń wykazano, że MM-LDL zwiększa produkcję białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*) przez komórki śródbłonna i mięśni gładkich [5], a przez to — migrację monocytów do przestrzeni podśródbłonkowej.

were found to be expressed in atherosclerotic lesions. In addition, it was shown that MM-LDL increased mRNA levels of the early response genes JE, KC and c-myc in murine fibroblasts [7]. By expression screening of a cDNA library from rabbit aortic endothelial cells (RAEC) for molecules mediating monocyte adhesion, a cDNA homologous to growth-regulated oncogene (*gro*) was isolated. It was found that transcription of *gro* was induced by MM-LDL [8]. CXCR-2, the *gro* chemokine receptor, was shown to be important for macrophage accumulation in atherosclerotic lesions.

Consequently, it was tested whether MM-LDL was biologically active *in vivo*. Microgram quantities of MM-LDL were injected into mice and levels of colony stimulating factors (CSF), as well as JE, the mouse homologue of MCP-1, were determined. Both CSF in serum and JE in various tissues were markedly increased after 4–5 hours of injection with MM-LDL, but were not induced after injection of native LDL [9]. These results indicated that MM-LDL indeed exerts biological activity *in vivo*.

Bioactive oxidised phospholipids in MM-LDL

Separation and individual testing of the components in MM-LDL for bioactivity showed that only the lipid soluble fraction of MM-LDL induced monocyte-endothelial interactions while the water soluble fraction (containing apoB) was inactive. Further separation of the lipid fraction demonstrated that almost 100% of the bioactivity was associated with the polar lipid fraction, containing the phospholipids, whereas the neutral lipid fraction and fatty acids did not increase monocyte binding to endothelial cells. Since arachidonic acid-containing phospholipids in MM-LDL were especially prone to oxidation, 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAPC) was oxidised *in vitro* and tested for its ability to stimulate monocyte-endothelial interactions. It turned out that oxidised PAPC (OxPAPC) could be used as a surrogate for MM-LDL in leukocyte adhesion experiments since it mimicked the effects of MM-LDL. OxPAPC stimulated endothelial cells to bind monocytes, but not neutrophils, in a concentration-dependent manner. However, the oxidation of PAPC results in the formation of numerous new phospholipids, due to either fragmentation or the addition of oxygen to the arachidonate moiety at the *sn*-2 position. The molecular structures of biologically active oxidation products of PAPC were determined using liquid chromatography and electrospray ionisation mass spectrometry in conjunction with chemical derivatisation techniques. Two of three biologically active oxidised derivatives of PAPC were

Ponadto, pokazano, że MM-LDL przyspiesza różnicowanie monocytów w makrofagi, indukując produkcję czynnika stymulującego powstawanie kolonii makrofagów (MCSF, *macrophage colony stimulating factor*) [6]. Ekspresja MCSF i MCP-1 jest obecna w blaszkach miażdżycowych. Wykazano również, że MM-LDL zwiększa ekspresję mRNA genów wczesnej odpowiedzi JE, KC i c-myc w fibroblastach mysich [7]. W trakcie poszukiwania cząsteczek biorących udział w adhezji monocytów w komórkach śródbłonna aorty królika metodą przeszukiwania bibliotek cDNA wyizolowano onkogen regulowany wzrostem — *gro*. Okazało się, że transkrypcja *gro* następuje pod wpływem MM-LDL [8]. Natomiast receptor chemokiny *gro* — CXCR-2 — jest istotny dla akumulacji makrofagów w zmianach miażdżycowych.

Następnie sprawdzano czy MM-LDL są aktywne biologicznie *in vivo*. Oznaczano stężenia czynników stymulujących powstawanie kolonii (CSF, *colony stimulating factors*) oraz JE (mysiego odpowiednika MCP-1) po podaniu myszy mikrogramowych ilości MM-LDL. Zarówno stężenia CSF w surowicy, jak i JE w różnych tkankach były istotnie wyższe po 4–5 h od podania MM-LDL. Takiego efektu nie obserwowano po podaniu natywnych LDL [9]. Eksperymenty te wykazały, że MM-LDL istotnie wykazują aktywność biologiczną *in vivo*.

Aktywne biologicznie oksydowane fosfolipidy w MM-LDL

Izolacja i wybiórcze eksperymenty z poszczególnymi składnikami MM-LDL w celu wykazania ich aktywności biologicznej wykazały, że jest ona obecna wyłącznie we frakcji lipidowej MM-LDL, natomiast frakcja rozpuszczalna w wodzie (zawierająca apoB) jest nieaktywna. W dalszych badaniach stwierdzono, że prawie 100% aktywności biologicznej wiąże się z frakcją lipidową polarną (zawierającą fosfolipidy), natomiast frakcja obojętna i kwasy tłuszczowe nie zwiększają wiązania monocytów do komórek śródbłonna. Ponieważ fosfolipidy MM-LDL zawierające kwas arachidonowy są szczególnie podatne na oksydację, poddano jej *in vitro* 1-palmitoil-2-arachidonoyl-*sn*-glicero-3-fosfocholinę (PAPC) i sprawdzono jej zdolność do wywoływania oddziaływań monocytów ze śródbłonkiem. Ponieważ efekty obserwowane zarówno w eksperymentach, jak i związanych z obecnością MM-LDL są identyczne, uznano, że oksydowaną PAPC (oxPAPC) można użyć jako substytut MM-LDL w badaniach nad adhezją leukocytów. Oksydowana PAPC stymulowała wiązanie monocytów (ale nie neutrofilów) do komórek śródbłonna proporcjonalnie do stężenia. Oksydacja PAPC prowadzi jednak do powstawania licznych nowych fosfolipidów, w związku z fragmentacją lub addycją tlenu do reszty

identified as 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleryl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) and 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) [10], whereas the third molecule contained three oxygens added to the arachidonate moiety and had a mass of 828 Da and was identified as epoxyisoprostane PC [11]. We found that oxidation of 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SAPC) followed exactly the same pattern as seen for PAPC, producing analogous molecules with comparable bioactivity. These results indicated that the biological activity of oxidation products derived from arachidonoyl-containing phospholipids was not dependent on the lipid moiety at the sn-1 position [12]. The two oxidised phospholipids present in MM-LDL and OxPAPC, POVPC and PGPC, were found to mediate monocyte-endothelial interactions. The effect of POVPC could be inhibited by a platelet activating factor (PAF) receptor antagonist, WEB 2086 [13]. The action of PGPC, on the other hand, differed from that of POVPC and was not affected by WEB 2086, indicating different binding sites for POVPC and PGPC [14].

Other sources for lipid oxidation products

LDL is not the only source of biologically active oxidised phospholipids. Upon stimulation with various agonists, eukaryotic cells release membrane vesicles (MV) into the extracellular space due to an increase in intracellular calcium and loss of membrane asymmetry [15]. Lipid peroxidation also leads to loss of phospholipid asymmetry in plasma membranes, causing membrane vesiculation [16]. Studies by Patel et al. have shown that MV released from endothelial cells (EC) treated with tert-butyl-hydroperoxide (t-BuOOH) contained PAF-like oxidised phospholipids that were able to stimulate neutrophils through their receptor for PAF [16]. We found that MV released from t-BuOOH-treated EC stimulated EC to bind monocyte-like U-937 cells. However, neutrophil adhesion was not induced by these MV, showing striking similarities to MM-LDL- and OxPAPC-induced endothelial activation. MV released from EC treated with calcium ionophore (A23187) were not active, however, when these MV were oxidised *in vitro* using t-BuOOH and iron, they induced monocyte-endothelial interactions [17]. These results indicated that oxidation products present in MV were responsible for biological activity. We were able to show that the biological activity of oxidised MV resided in the polar lipid fraction. The presence of the biologically active oxidised phospholipids POVPC and PGPC in oxidised MV was demonstrated using electrospray-ionisation mass spectrometry (ESI-MS). Furthermore, quantitation of

arachidonoylowej w pozycji sn-2. Budowę cząsteczkową biologicznie aktywnych produktów oksydacji PAPC oznaczono za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej z jonizacją typu *electrospray* w połączeniu z technikami derywatywacji chemicznej. Dwie z trzech biologicznie aktywnych oksydowanych pochodnych PAPC zidentyfikowano jako: 1-palmitoil-2 (5-oksowaleeryl)-sn-glicero-3-fosfocholina (POVPC) oraz 1-palmitoil-2-glutaryl-sn-glicero-3-fosfocholina (PGPC) [10]. Trzecia cząsteczka zawierała 3 atomy tlenu włączone do reszty arachidonoylowej, posiadała masę cząsteczkową 828 Da i została zidentyfikowana jako epoksyizoprostano-fosfocholina [11]. Autor wykazał, że oksydacja 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glicero-3-fosfocholiny (SAPC) przebiega według takiego samego schematu, jak oksydacja PAPC, z wytworzeniem analogicznych cząsteczek o porównywalnej aktywności biologicznej. Wyniki te dowodzą, że aktywność biologiczna produktów oksydacji fosfolipidów zawierających resztę arachidonową nie zależy od reszty lipidowej zlokalizowanej w pozycji sn-1 [12]. Okazało się, że 2 oksydowane fosfolipidy zawarte w MM-LDL i oxPAPC, tzn. POVPC i PGPC, regulują oddziaływania monocytów ze śródbłonkiem. Działanie POVPC hamuje antagonista receptora czynnika aktywującego płytki (PAF, *platelet activating factor*) — WEB-2086 [13]. Natomiast działanie PGPC różniło się od POVPC i nie podlegało wpływowi WEB-2086, co sugerowało odmienne miejsca wiązania dla POVPC i PGPC [14].

Inne źródła produktów oksydacji lipidów

Lipoproteiny o małej gęstości nie są jedynym źródłem aktywnych biologicznie oksydowanych fosfolipidów. Pod wpływem stymulacji różnymi agonistami, w wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i utraty asymetrii błonowej [15], komórki eukariotyczne uwalniają do przestrzeni pozakomórkowej pęcherzyki błonowe (MV, *membrane vesicles*). Peroksydacja lipidów również prowadzi do utraty asymetrii fosfolipidów w błonach, powodując wytwarzanie pęcherzyków [16]. Badania Patel i wsp. wykazały, że MV uwalniane z komórek śródbłonka poddane działaniu hydroksynadtlenku tert-butyłu (t-BuOOH) zawierały oksydowane lipidy podobne do PAF zdolne do pobudzania neutrofilów przez ich receptor dla PAF [16]. W badaniach przeprowadzonych przez autora niniejszego artykułu wykazano, że MV uwalniane z komórek śródbłonka (EC, *endothelial cells*) poddanych działaniu hydroksynadtlenku tert-butyłu zwiększyło wiązanie komórek monocytopodobnych (U-937) do EC. Te same MV nie zwiększały adhezji neutrofilów, co bardzo przypominało aktywację śródbłonka wywołaną MM-LDL i oxPAPC. Pęche-

POVPC and PGPC by ESI-MS showed that the biological activity of MV correlated with the amounts of these oxidised phospholipids [17]. In our studies we could also demonstrate that stimulation of EC with oxidised MV could be partly inhibited by structurally unrelated PAF receptor antagonists.

Membrane vesiculation are also carriers of other bioactive lipids. In a series of papers Barry et al. have investigated the mechanisms of cellular activation by platelet-derived MV. These MV contained free arachidonic acid (AA) due to the action of sPLA₂, and induced platelet aggregation [18], activation of EC and monocytes, leading to monocyte-endothelial interactions [19], and cyclooxygenase-2 upregulation [20], free AA being the active principle. sPLA₂ was also shown to be important in producing lysophosphatidic acid (LPA) in MV derived from platelets and erythrocytes [21]. We have shown that LPA stimulates EC to express inflammatory adhesion molecules [22] and LPA-containing MV were isolated from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients, indicating a possible role of MV in chronic inflammation.

Membrane vesiculation originating from different cell types were demonstrated in various pathological settings [15], coagulation abnormality [23], chronic inflammation [21], in atherosclerotic lesions [24], and a role for MV in atherogenesis has been suggested [25]. Since at sites of inflammation increased oxidant stress is known to cause modifications of lipids and proteins, oxidative modification of MV *in vivo* seems likely. We hypothesise that at sites of inflammation MV are released and further oxidised in the surrounding tissue (Fig. 1). Investigation

rzyki błonowe uwalniane ze śródbłonka pod wpływem jonoforu wapniowego (A23187) nie były aktywne, natomiast gdy następnie oksydowano je *in vitro* przy użyciu t-BuOOH i żelaza, powodowały interakcje monocytów ze śródbłonkiem [17]. Wyniki te dowodzą, że za aktywność biologiczną MV odpowiadają zawarte w nich oksydowane fosfolipidy. Wykazano, że aktywność biologiczna oksydowanych MV była zlokalizowana w polarnej frakcji lipidowej. Metodą spektrometrii masowej z jonizacją typu *electrospray* (ESI-MS, *electrospray-ionisation mass spectrometry*) stwierdzono, że aktywne biologicznie oksydowane fosfolipidy POVPC i PGPC są obecne w oksydowanych MV. Badając za pomocą ESI-MS ilość POVPC i PGPC w MV, stwierdzono, że aktywność biologiczna MV korelowała z liczbą zawartych w nich oksydowanych fosfolipidów [17]. W badaniach wykazano również, że stymulacja EC przez oksydowane MV może być częściowo zahamowana przez antagonistów receptora PAF, które mają odmienną strukturę cząsteczki.

Pęcherzyki błonowe są również nośnikami innych biologicznie aktywnych lipidów. Barry i wsp. w kilku doniesieniach przedstawiali wyniki prac nad mechanizmami aktywacji komórek przez MV pochodzące z płytek. Pęcherzyki te zawierały wolny kwas arachidonowy (AA, *arachidonic acid*) wytwarzany w związku z aktywnością sPLA₂, indukowały agregację płytek [18], aktywację EC i monocytów, powodując oddziaływanie monocytarno-śródbłonkowe [19], oraz wzmożoną aktywność cyklooksigenazy 2 [20]. Aktywnym składnikiem był wolny AA. Wykazano, że sPLA₂ jest również istotna dla produkcji kwasu lizofosfatydowego (LPA, *lysophospho-*

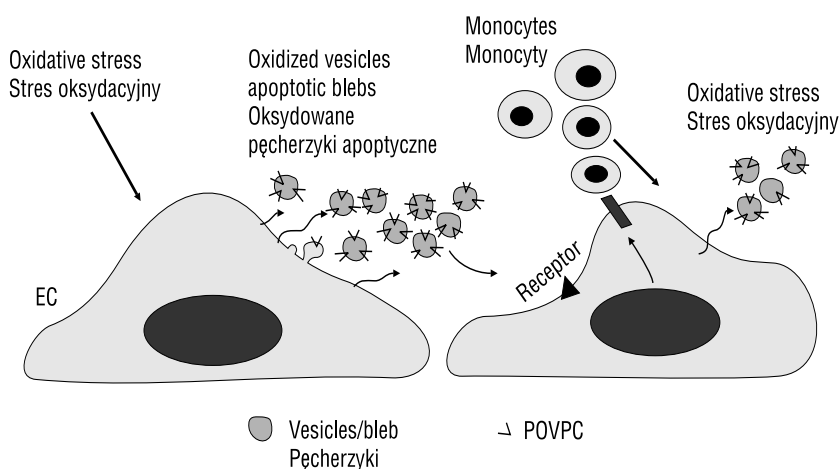


Figure 1. Microvesicles are released from activated and apoptotic cells and biologically active oxidised lipids contained in these vesicles act on surrounding tissue and neighbouring cells, attracting monocytes and thus propagating chronic inflammation

Rycina 1. Uwalnianie mikropecherzyków z komórek aktywowanych i apoptotycznych oraz wpływ biologicznie aktywnych oksydowanych lipidów zawartych w tych pęcherzykach na otaczające tkanki i sąsiadujące komórki, które ściągają monocyty i podtrzymują przewlekły proces zapalny

EC (*endothelial cells*) — komórki śródbłonka

of biologically active lipids in both native and oxidised MV will help to elucidate the role of such MV in the initiation and amplification of chronic inflammatory processes.

Oxidised lipids inhibit acute but promote chronic inflammation

There is increasing evidence that lipid oxidation products may play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis as well as other chronic inflammatory diseases [3]. Oxidised lipids were shown to activate cells of the vascular wall as well as blood cells to induce expression of inflammatory genes. However, there are striking differences from cell activation by other proinflammatory mediators such as IL-1, TNF α or LPS. These mediators activate the classical NF κ B pathway leading to an acute inflammatory response by elevating the expression of adhesion molecules like E-selectin, VCAM-1, or ICAM-1, resulting in adhesion of monocytes as well as neutrophils to the site of inflammation. Oxidised lipids, however, stimulate endothelial cells to specifically bind monocytes, but not neutrophils, a hallmark of atherosclerosis and other chronic inflammatory diseases.

We were interested in the mechanisms of endothelial activation leading to specific monocyte adhesion after stimulation with various oxidised lipids. We were able to show that different lipid oxidation products, such as oxidised phospholipids [5, 26], oxidised cholesterol esters [27] and isoprostanes [28], all were capable of inducing specific monocyte adhesion to endothelial cells. Activation of the MAP-kinase signalling cascade, rather than the classical NF κ B pathway, was shown to be important for this effect. Furthermore, tissue factor (TF) expression induced by OxPAPC was mediated by the PKC/MEK/ERK/EGR-1 and Ca⁺⁺/calcineurin/NFAT pathways, not involving the NF κ B pathway [29]. In addition, OxPAPC-induced expression of IL-8 was mediated by a pathway independent of NF κ B, C/EBP β and AP-1 [30].

Moreover, there is evidence that LPS-induced NF κ B-mediated inflammation is down-regulated by OxPAPC [31] (Bochkov et al., *Nature*, in press). An important mechanism of antibacterial defence in higher organisms is the generation of reactive oxygen species (ROS) capable of killing bacteria [32]. Activated neutrophils release ROS into phagolysosomes or the extracellular space where they kill bacteria and also modify host molecules. Lipid peroxidation occurs in inflammation by non-enzymatic as well as enzymatic reactions, such as through myeloperoxidase. Upon oxidation some lipids acquire novel activities, which can modulate the inflammatory reactions influencing inflammatory signalling

(*tidic acid*) w MV pochodzących z płytek i erytrocytów [21]. Wykazano, że LPA powoduje zwiększoną ekspresję molekuł adhezyjnych związanych ze stanem zapalnym na powierzchni EC [22], a MV zawierające LPA można wyizolować z płynu stawowego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, co sugeruje możliwe zaangażowanie MV w przewlekły proces zapalny.

W wielu stanach patologicznych obserwuje się uwalnianie MV z różnych typów komórek [15]. Sugerowano udział MV w zaburzeniach krzepnięcia [23], przewlekłych procesach zapalnych [21], zapoczątkowaniu miażdżycy [25] i rozwoju blaszek miażdżycowych [24]. Ponieważ w miejscach toczącego się procesu zapalnego stres oksydacyjny jest zwiększony i powoduje modyfikację lipidów i białek, oksydacja MV *in vivo* wydaje się prawdopodobna. Autor przypuszcza, że MV uwalniają się w miejscach, w których przebiega proces zapalny i następnie w okolicznych tkankach ulegają oksydacji (ryc. 1). Badanie aktywnych biologicznie lipidów obecnych zarówno w natywnych, jak i oksydowanych MV pomoże w zrozumieniu ich roli w zapoczątkowaniu i przebiegu przewlekłego procesu zapalnego.

Oksydowane lipidy hamują ostry proces zapalny i nasilają przewlekły

Wzrasta liczba dowodów badawczych, że produkty oksydacji lipidów mogą pełnić istotną rolę w patogenezie miażdżycy i w przewlekłych procesach zapalnych [3]. Wykazano, że oksydowane lipidy aktywują komórki krwi i ściany naczyń, wzmagając ekspresję genów odczynu zapalnego. Obserwuje się jednak duże różnice w stosunku do aktywacji komórki wywołanej innymi mediatorami zapalenia, takimi jak IL-1, TNF- α czy liposacharydem bakterii (LPS, *bacterial lipopolysaccharide*). Mediatorzy te aktywują klasyczną drogę ostrej odpowiedzi zapalnej zależnej od NF κ B, która prowadzi do wzmożonej ekspresji molekuł adhezyjnych, takich jak selektyna E, VCAM-1 czy ICAM-1, oraz do adhezji monocytów i neutrofilów w miejscu zapalenia. Natomiast oksydowane lipidy powodują, że komórki śródbłonna wybiórczo wiążą się z monocytami, a nie z neutrofilami, co stanowi cechę charakterystyczną miażdżycy i innych przewlekłych procesów zapalnych.

Autor interesował się mechanizmami aktywacji komórek śródbłonna wiodących do specyficznej adhezji monocytów po stymulacji różnymi oksydowanymi lipidami. Pokazano, że różne produkty oksydacji lipidów, takie jak oksydowane fosfolipidy [5, 26], oksydowane estry cholesterolu [27] oraz izoprostany [28] mogły wywoływać specyficzną adhezję monocytów do komórek śródbłonna. W badaniach wykazano, że w zjawiska te były zaangażowane szlaki aktywacji kaskady sygnał-

ing events. Oxidised phospholipids are increasingly recognised as pro-inflammatory agonists inducing chronic inflammation in atherosclerosis; however, recent data suggest that they can inhibit up-regulation of E-selectin, which is characteristic of acute inflammation. We were able to show that oxidised, but not native, phospholipids completely block NF κ B-mediated signalling and up-regulation of inflammatory genes in endothelial cells treated with bacterial lipopolysaccharide (LPS) [14] (Bochkov et al. *Nature*, in press).

Taken together, these results lead to the hypothesis that lipid oxidation products may promote the shift from an acute inflammatory response to a chronic state (Fig. 2).

Recently, we were able to show that oxidised phospholipids increase synthesis of EGR-1 *in vitro* [29] and *in vivo* (Kadl et al., *Cardiovasc Pharm*, in press). EGR-1 is known to be up-regulated by growth factors, cytokines, hypoxia, physical forces and injurious stimuli, and high levels of EGR-1 were found in atherosclerotic lesions. Oxidised lipids thus may contribute to increased levels of EGR-1 in atherosclerotic lesions. One of the genes

wej MAP-kinaz, a nie klasyczna droga NF κ B. Ponadto ekspresja czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*) indukowana przez oxPAPC zależała od szlaków PKC/MEK/ERK/EGR-1 oraz Ca⁺⁺/kalcineuryna/NFAT, bez zaangażowania NF κ B [29]. Wykazano także zależność indukcji IL-8 od oxPAPC i brak zależności od NF κ B, C/EBP β i AP-1 [30].

Udowodniono, że odczyn zapalny wywołany przez LPS, a zależny od NF κ B jest hamowany przez oxPAPC [31] (Bochkov i wsp., *Nature*, w druku). Ważnym mechanizmem obrony antybakteryjnej organizmów wyższych jest wytwarzanie reaktywnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) zdolnych do unicestwienia bakterii [32]. Aktywowane neutrofile uwalniają ROS do fagolizosomów lub do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie zabijają bakterie, ale również modyfikują białka gospodarza. Peroksydacja lipidów zachodzi w toku odczynu zapalnego w reakcjach nieenzymatycznych oraz enzymatycznych (np. przez mieloperoksydazę). Po oksydacji niektóre lipidy uzyskują nowe aktywności, które modulują reakcje zapalne, wpływa-

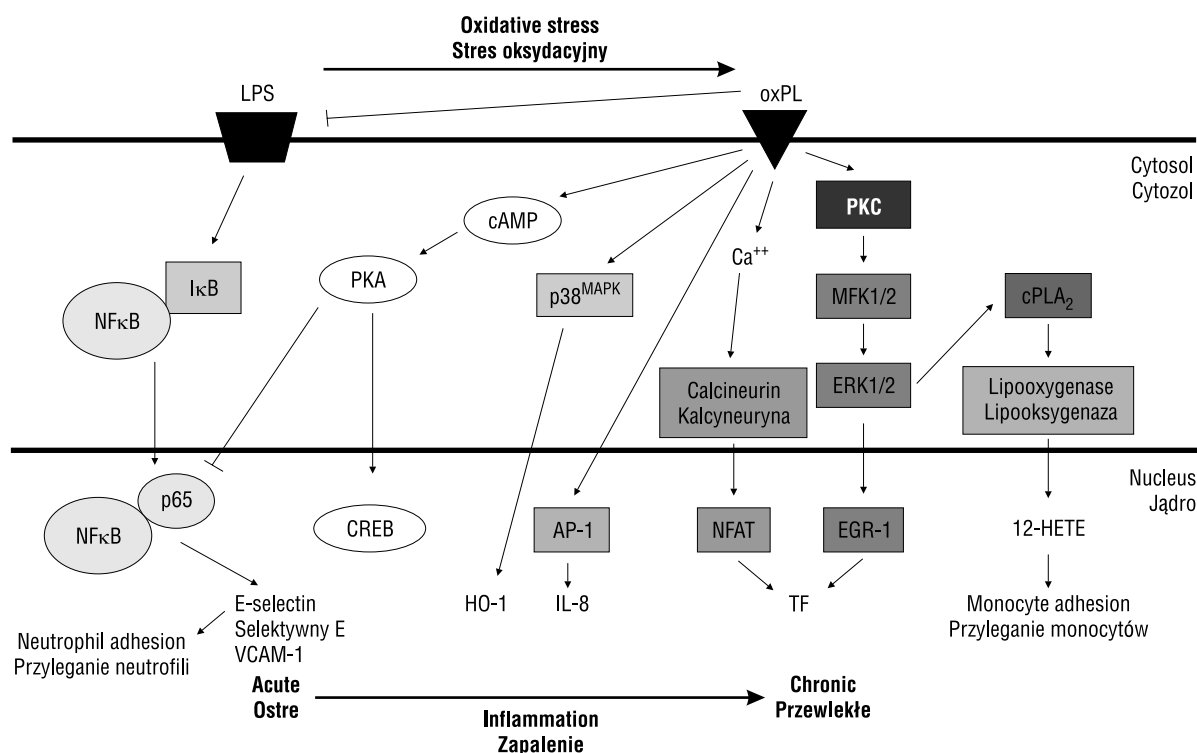


Figure 2. Oxidised phospholipids may promote the shift from acute to chronic inflammation by down-regulating acute inflammatory NF κ B-mediated transcription and promoting induction of inflammatory gene transcription by activating alternative signaling pathways and specific monocyte adhesion

Rycina 2. Oksydowane fosfolipidy mogą wpływać na przekształcenie się ostrej reakcji zapalnej w stan przewlekły, zmniejszając transkrypcję mediatorów ostrego zapalenia zależną od NF κ B i zwiększając transkrypcję genów przewlekłego zapalenia, aktywując alternatywne drogi przekazywania i specyficzną adhezję monocytów

LPS (*bacterial lipopolysaccharide*) — lipopolisacharyd bakterii; TF (*tissue factor*) — czynnik tkankowy; cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) — adenylozomonofosforan cykliczny; PKA (*protein kinase A*) — białko kinazy białkowej A; PKC (*protein kinase C*) — białko kinazy białkowej C; CREB (*cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding [protein]*) — białko wiążące aktywny element cAMP

that are regulated by EGR-1 is TF. Moreover, TF was also shown to be up-regulated by oxidised lipids. In contrast to the up-regulation of proinflammatory genes, oxidised phospholipids were also shown to induce the expression of protective enzymes such as HO-1 [33], which is the rate-limiting enzyme in heme-catabolism and has antioxidative capacity.

Thus, identification of mechanisms and signalling pathways induced by oxidised lipids that modulate inflammatory response in the vascular wall will lead to novel strategies of therapeutic intervention in chronic inflammatory diseases.

References

- Berliner JA, Heinecke JW (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 20: 707–727.
- Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785–1792.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature*, 407: 233–241.
- Palinski W, Horkko S, Miller E, et al. (1996) Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest*, 98: 800–814.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 5134–5138.
- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, 344: 254–257.
- Navab M, Imes SS, Hama SY, et al. (1991) Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*, 88: 2039–2046.
- Schwartz D, Andalibi A, Chaverri AL, et al. (1994) Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium. *J Clin Invest*, 94: 1968–1973.
- Liao F, Berliner JA, Mehrabian M, et al. (1991) Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest*, 87: 2253–2257.
- Watson AD, Leitinger N, Navab M, et al. (1997) Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem*, 272: 13597–13607.
- Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, et al. (1999) Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 274: 24787–24798.
- Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, et al. (2000) Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2248–2254.
- Leitinger N, Watson AD, Faull KF, Fogelman AM, Berliner JA (1997) Monocyte binding to endothelial cells induced by oxidized phospholipids present in minimally oxidized low density lipoprotein is inhibited by a platelet activating factor receptor antagonist. *Adv Exp Med Biol*, 433: 379–382.
- Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, et al. (1999) Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 12010–12015.
- Zwaal RF, Schroit AJ (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89: 1121–1132.

jąc na ich drogi przekazywania. Oksydowane fosfolipidy uważa się głównie za czynniki prozapalne wywołujące przewlekły stan zapalny w miażdżycy, jednak wg najnowszych badań mogą one hamować wzrost ekspresji selektyny E — cecha charakterystyczna ostrej reakcji zapalnej. Autor wykazał, że oksydowane, ale nie natywne fosfolipidy całkowicie blokują przekazywanie zależne od NFκB i następujący wzrost ekspresji genów reakcji zapalnej w komórkach śródbłonna zadawanych LPS [14] (Bochkov i wsp., *Nature*, w druku).

Podsumowując, wyniki te mogą sugerować, że produkty oksydacji lipidów sprzyjają przekształceniu się ostrej odpowiedzi zapalnej w stan przewlekły (ryc. 2).

Ostatnio wykazano, że oksydowane fosfolipidy zwiększają syntezę EGR-1 *in vitro* [29] oraz *in vivo* (Kadl i wsp., *Cardiovasc Pharm*, w druku). Wiadomo, że do czynników zwiększających ekspresję EGR-1 należą czynniki wzrostu, cytokiny, hipoksja, siły mechaniczne oraz czynniki uszkodzające, natomiast wysokie poziomy ekspresji EGR-1 stwierdzono w zmianach miażdżycowych. Wydaje się więc, że oksydowane lipidy mogą mieć znaczenie dla zwiększonej ekspresji EGR-1 w blaszce miażdżycowej. Jednym z genów regulowanych przez EGR-1 jest czynnik tkankowy TF (*tissue factor*). Dodatkowo pokazano, że ekspresja TF wzrasta pod wpływem oksydowanych fosfolipidów. Wykazano również, że oksydowane fosfolipidy, kontrastowo do wzmożonej ekspresji genów prozapalnych, zwiększają także ekspresję enzymów ochronnych, takich jak OH-1 [33], który decyduje o tempie katabolizmu hemu i ma własności antyoksydacyjne.

Identyfikacja mechanizmów i szlaków przekazywania indukowanych przez oksydowane lipidy, modulujące odpowiedź zapalną ściany naczynia, będzie prowadzić do powstania nowych strategii terapeutycznych w przewlekłych stanach zapalnych.

16. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992). Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem*, 267: 15168–15175.
17. Huber J, Vales A, Mitulovic G, et al. (2002) Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 101–107.
18. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA (1997) Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*, 99: 2118–2127.
19. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*, 102: 136–144.
20. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA (1999) Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274: 7545–7556.
21. Fourcade O, Simon MF, Viode C, et al. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80: 919–927.
22. Rizza C, Leitinger N, Yue J, et al. (1999) Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest*, 79: 1227–1235.
23. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 104: 93–102.
24. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 99: 348–353.
25. Nomura S, Suzuki M, Katsura K, et al. (1995) Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 116: 235–240.
26. Watson AD, Navab M, Hama SY, et al. (1995) Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 95: 774–782.
27. Huber J, Boechzelt H, Karten B, et al. (2002) Oxidized cholesteryl linoleates stimulate endothelial cells to bind monocytes via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 581–586.
28. Leitinger N, Huber J, Rizza C, et al. (2001) The isoprostane 8-iso-PGF (2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *FASEB J*, 15: 1254–1256.
29. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, et al. (2002) Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca⁽⁺⁺⁾/NFAT. *Blood*, 99: 199–206.
30. Yeh M, Leitinger N, de Martin R, et al. (2001) Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1585–1591.
31. Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, et al. (1999) Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 12010–12015.
32. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92: 3007–3017.
33. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ (1997) Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest*, 100: 1209–1216.